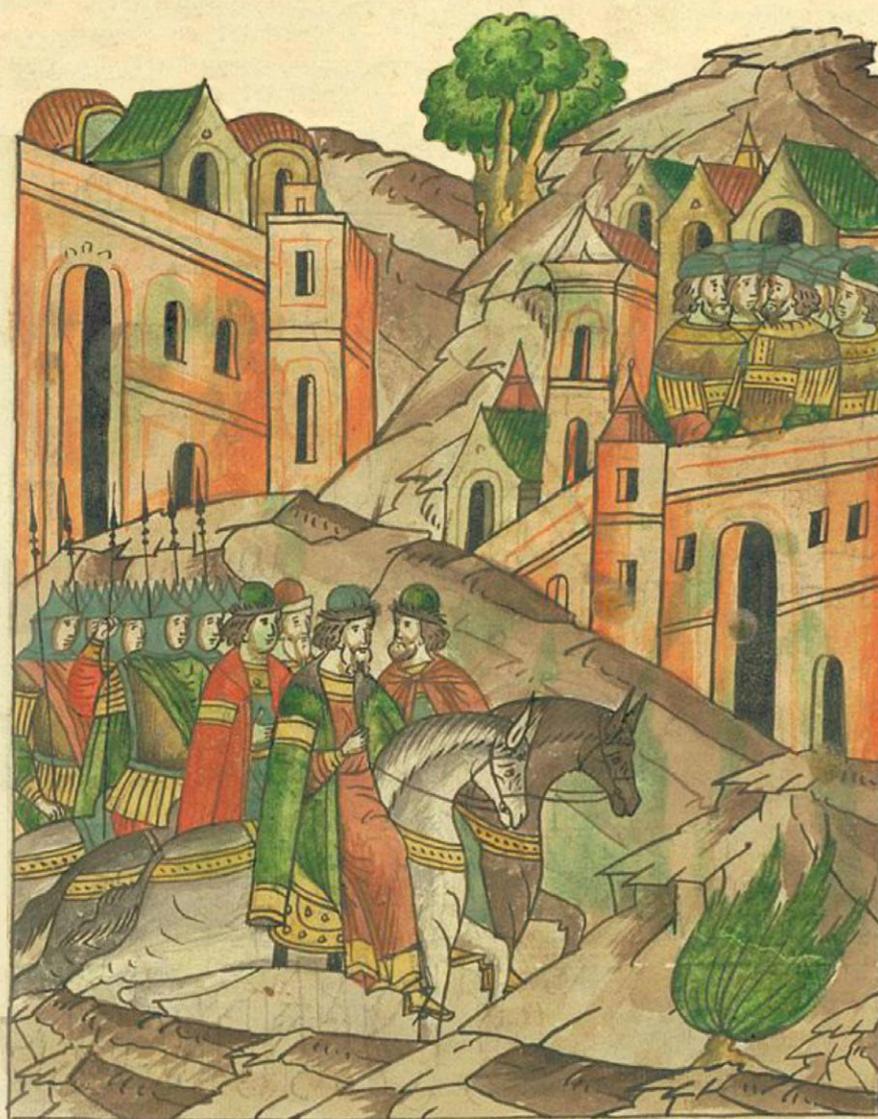


Acta Naturae

Рюриковичи: первый опыт реконструкции генетического облика правящего рода средневековой Руси по данным палеогеномики



**РОЛЬ АУТОФАГИИ В РАЗВИТИИ
ПАТОЛОГИЧЕСКИХ СОСТОЯНИЙ
ОРГАНИЗМА**
СТР. 37

**ВЛИЯНИЕ ДЕЛЕЦИИ ГЕНА *ati*
НА ПАТОГЕННЫЕ И ИММУНОГЕННЫЕ
СВОЙСТВА ВИРУСА ОСПОВАКЦИНЫ**
СТР. 82

Останки князя Дмитрия Александровича из разрушенного саркофага
Спасо-Преображенского собора Переславля



Первый шейный позвонок, вид сзади



Третий шейный позвонок



Фрагмент тела грудного позвонка

Современные подходы к геномному редактированию биосинтетических кластеров антибиотиков в актиномицетах

Ю. А. Буюклян, Ю. В. Закалюкина, И. А. Остерман, М. В. Бирюков
 Глобальный рост антибиотикорезистентности среди патогенов приводит к необходимости искать новые пути поиска антибиотиков, в частности через активацию «молчащих биосинтетических кластеров» представителей филума Actinomycetota. Традиционными методами удается получить лишь небольшую долю вторичных метаболитов, из огромного множества предсказываемых при помощи биоинформационных методов. В работе рассмотрены перспективные методы и подходы к геномному редактированию биосинтетических кластеров антибиотиков и изменения экспрессии соответствующих генов, приводящих к синтезу потенциально новых молекул с антибактериальной активностью.

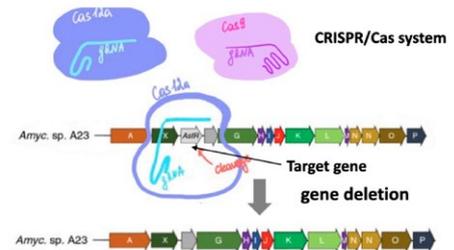
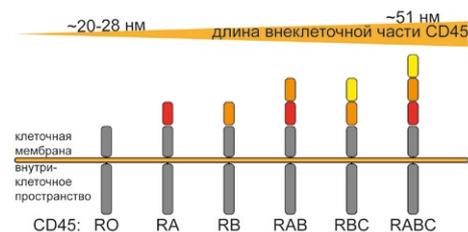


Схема внесения мутаций в геном актиномицетов CRISPR-Cas-опосредованным методом геномного редактирования

Тирозинфосфатаза CD45 – регулятор иммунитета и потенциальный эффектор CAR T-терапии

Д. В. Волков, В. М. Степанова, Ю. П. Рубцов, А. В. Степанов, А. Г. Габибов



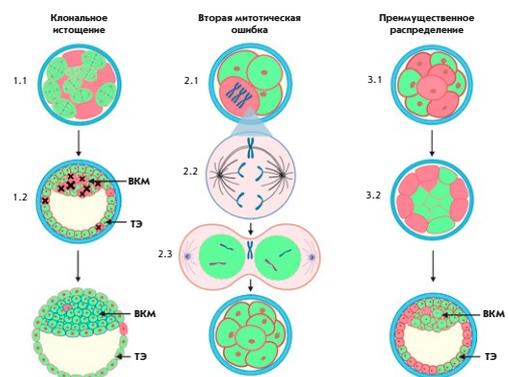
Структура и распространенность изоформ CD45 в клетках крови человека

Общий лейкоцитарный антиген CD45 – рецепторная тирозинфосфатаза и один из самых представленных антигенов на поверхности клеток крови – ключевой участник ранних этапов передачи сигналов от рецепторов большинства типов иммунных клеток. Нарушения экспрессии гена и дисбаланс изоформ CD45 часто являются причиной иммунодефицитных, аутоиммунных и онкологических заболеваний. Понимание структурных особенностей CD45, а также роли фосфатазы в регуляции активации клеток иммунной системы крайне важно для изучения молекулярного патогенеза онкологических заболеваний и вклада CD45 в функционирование лимфоцитов и T-клеток, модифицированных химерными антигенными рецепторами.

Хромосомные aberrации в эмбриональном развитии человека как биологическое явление

А. Д. Иванова, М. Л. Семёнова

Отличительной чертой раннего эмбрионального развития млекопитающих, особенно человека, являются частые хромосомные аномалии. Анеуплоидии считаются фактором, способствующим неудачной имплантации эмбриона и спонтанным абортam. В данном обзоре внимание акцентируется на биологических механизмах возникновения хромосомных дефектов. В частности, рассмотрены главные события ооцитарного мейоза, процесса, влияющего не только на генетический статус неоплодотворенного ооцита, но и на дальнейшую жизнеспособность эмбриона; также проанализированы особенности первых делений дробления и причины частых хромосомных ошибок в раннем эмбриональном развитии. Кроме того, обсуждаются данные о самокоррекции хромосомного статуса ранних эмбрионов.



Модели самокоррекции хромосомного статуса мозаичных эмбрионов

Acta Naturae

ТОМ 15, № 3 (58), ИЮЛЬ—СЕНТЯБРЬ 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 сентября 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

- Ю. А. Буюклян, Ю. В. Закалюкина,
И. А. Остерман, М. В. Бирюков
Современные подходы к геномному
редактированию биосинтетических
кластеров антибиотиков в актиномицетах 4
- Д. В. Волков, В. М. Степанова, Ю. П. Рубцов,
А. В. Степанов, А. Г. Габибов
Тирозинфосфатаза CD45 — регулятор
иммунитета и потенциальный эффектор
CAR T-терапии..... 17
- А. Д. Иванова, М. Л. Семёнова
Хромосомные aberrации
в эмбриональном развитии человека
как биологическое явление..... 27

У. С. Кенч, С. С. Сологова, В. С. Прасолов,
П. В. Спирин
Роль аутофагии в развитии
патологических состояний организма 37

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ СТАТЬИ

К. В. Жур, Ф. С. Шарко, Вл. В. Седов,
М. В. Добровольская, В. Г. Волков,
Н. Г. Максимов, А. Н. Сеславин, Н. А. Макаров,
Е. Б. Прохорчук
Рюриковичи: первый опыт реконструкции
генетического облика правящего
рода средневековой Руси по данным
палеогеномики 50

М. К. Ибрагимова, Е. А. Кравцова,
М. М. Цыганов, Н. В. Литвяков
СНА-ландшафт HER2-негативного
рака молочной железы при использовании
антрациклинсодержащих схем
неoadьювантной химиотерапии 66

Р. М. Курабекова, О. Е. Гичкун,
О. М. Цирульников, И. Е. Пашкова,
В. А. Фомина, О. П. Шевченко, С. В. Готье
Анализ ассоциаций гаплотипов гена
Tgfb1 с болезнями печени у детей. 75

С. Н. Якубицкий, А. А. Сергеев, К. А. Титова,
И. С. Шульгина, Е. В. Старостина,
М. Б. Боргоякова, Л. И. Карпенко,
С. Н. Щелкунов
Влияние делеции гена *ati*
на патогенные и иммуногенные
свойства вируса осповакцины. 82

Z. W. Huang, Y. Y. Liu, X. M. Chen, C. L. Yu,
H. Y. He, Y. H. Deng
Attenuating Neuronal Autophagy Alleviates
Inflammatory Injury in OGD-Deprived
Co-culture of HT22 with BV2 91

S. Shi, G. Wen, C. Lei, J. Chang, X. Yin, X. Liu,
S. Huang
A DNA Replication Stress-Based Prognostic
Model for Lung Adenocarcinoma 100

Правила для авторов 111

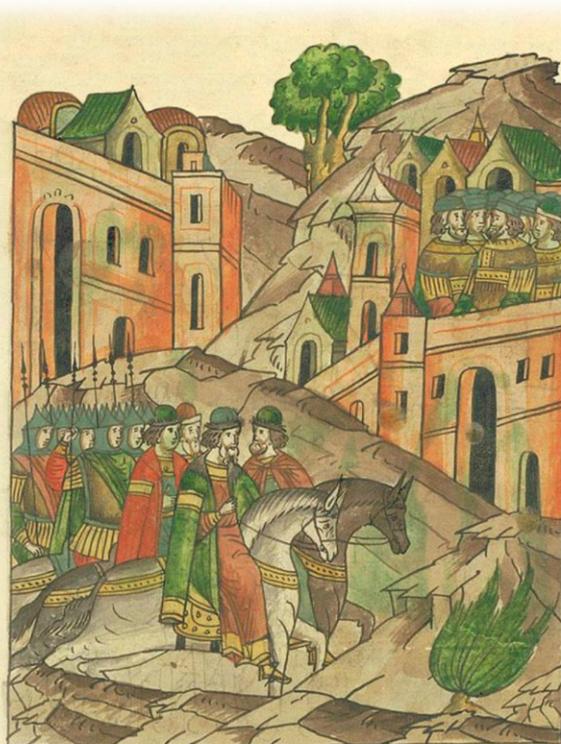


РИСУНОК НА ОБЛОЖКЕ

Великий князь Ярослав Ярославич с князем Дмитрием Александровичем, Товтивилом Полоцким и новгородцами идут под немецкий город Юрьев. АНО «Руниверс» выражает благодарность «Обществу любителей древней письменности» и лично Герману Львовичу Стерлигову за предоставленные исходные иллюстрации Лицевого летописного свода Ивана Грозного. (см. статью Жур и др.)

УДК 577.21

Современные подходы к геномному редактированию биосинтетических кластеров антибиотиков в актиномицетах

Ю. А. Буюклян¹, Ю. В. Закалюкина^{1,2}, И. А. Остерман^{1,3}, М. В. Бирюков^{1,2*}¹Научно-технологический университет «Сириус», Научный центр трансляционной медицины, Сочи, 354340 Россия²Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, Москва, 119234 Россия³Сколковский институт науки и технологий, Москва, 121205 Россия

*E-mail: metrim@gmail.com

Поступила в редакцию 13.07.2023

Принята к печати 19.08.2023

DOI: 10.32607/actanaturae.23426

РЕФЕРАТ Рост числа случаев инфицирования людей и животных патогенами, устойчивыми к наиболее распространенным в терапевтической практике антибиотикам, бросает вызов современным технологиям поиска новых лекарственных средств. Представители филума Actinomycetota являются одним из основных источников вторичных метаболитов, в том числе антибиотиков различных классов, однако, несмотря на весь богатый биосинтетический потенциал штаммов актиномицетов, удается получить лишь небольшую долю вторичных метаболитов. Оставшееся разнообразие молекул с антибактериальной активностью, закодированных в геноме, находится в «молчащем», репрессированном состоянии. В связи с этим возникает необходимость применения методов геномного редактирования и метагеномного анализа для идентификации новых биосинтетических кластеров антибиотиков и изменения экспрессии соответствующих генов, приводящих к синтезу потенциально новых молекул с антибактериальной активностью.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА биосинтетические кластеры антибиотиков, редактирование генома, сайт-направленный мутагенез, актиномицеты, антибиотики.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ BGC – biosynthetic gene clusters (биосинтетические кластеры генов); PCR – polymerase chain reaction (полимеразная цепная реакция); NRPS – nonribosomal peptide (нерибосомные пептиды); PKS – polyketide synthase (поликетидсинтаза); UDG – Uracil-DNA glycosylase (урацил-ДНК-гликозилаза); DSB – double-strand DNA break (двухцепочечные разрывы ДНК).

ВВЕДЕНИЕ

Одним из основных источников биологически активных веществ выступают представители филума Actinomycetota – грамположительные микроорганизмы с высоким содержанием GC-пар в геноме [1, 2]. Современные исследования с применением методов высокопроизводительного секвенирования позволяют обнаружить в геномах многих актиномицетов десятки биосинтетических кластеров потенциальных антибиотиков [3], однако, используя в лабораторных условиях традиционные методы скрининга [4, 5], заложенные еще в 40-х годах XX века Waksman, удается получить не более 5% вторичных метаболитов от всего кодирующего потенциала штаммов-продуцентов [6, 7]. При этом антибиотики, входящие в эту долю, зачастую оказыва-

ются ранее описанными соединениями. Происходит непрерывное «переоткрытие» известных антибиотиков, а новые молекулы на общем фоне практически незаметны. Сложившимися подходами, направленными на повышение продукции новых антибиотиков, являются: подбор оптимальных условий культивирования посредством модификации состава питательных сред [8], методы совместного культивирования [9], микрофлюидики [10], а также использование различных транскрипционных факторов для активации молчащих генов [11, 12]. К сожалению, такие инструменты не являются универсальными для различных штаммов актиномицетов, носят стохастический характер и потому не всегда приводят к успешным результатам. Гораздо более эффективно использование генно-инженерных тех-

нологий, поскольку они позволяют осуществлять направленное и контролируемое изменение продукции целевых метаболитов [13]. Одним из примеров таких технологий является геномное редактирование биосинтетических кластеров антибиотиков посредством мутагенеза [14–16]. Этот целенаправленный подход позволяет изменять экспрессию генов [17], подавлять продукцию ранее охарактеризованных молекул и тем самым способствовать синтезу других неизвестных вариантов антибиотиков. Кроме того, методы мутагенеза могут быть с успехом применены как на новых штаммах-продуцентах, так и на генах ранее известных изолятов с целью обнаружения новых компаундов.

ГЕНОМ АКТИНОМИЦЕТОВ

Геном актиномицетов представлен кольцевой или линейной молекулой ДНК (*Streptomyces* spp.) длиной 5–10 млн п.н., имеющей GC-богатый контент, достигающий у некоторых родов более 70% [18–20]. У актиномицетов – представителей прокариот – процесс реализации генетической информации, а именно транскрипции и трансляции, сопряжен во времени и пространстве, ввиду отсутствия внутренней компарментализации клетки [21]. С мРНК, еще синтезируемой РНК-полимеразой, может связываться рибосома и начинать синтез белка.

Как правило, в геномах актиномицетов гены, кодирующие биоактивные соединения, организованы в биосинтетические кластеры (BGC) [22, 23]. BGC представляют собой группу из двух или более генов, имеющих общий старт транскрипции, которые вместе кодируют конкретный биосинтетический путь, обеспечивающий синтез специализированного метаболита. Данные гены содержат информацию о регуляторных белках, контролирующих время и уровень экспрессии и секрецию конкретного метаболита.

Существуют различные структурные классы BGC, включая нерибосомные пептидные синтетазы (NRPS), поликетидные синтетазы (PKS), терпены и бактериоцины [24]. NRPS и PKS являются часто используемыми маркерами для обнаружения вторичных метаболитов, поскольку они синтезируют разнообразные по структуре молекулы, проявляющие антибиотические и иммуносупрессорные свойства с огромным фармацевтическим потенциалом [25, 26]. Эти регионы могут использоваться для выявления новых путей биосинтеза антибиотиков [27] (рис. 1).

Согласно биоинформатическим данным, собранным DOE Joint Genome Institute, все продуценты антибиотиков содержат десятки потенциальных биосинтетических кластеров, то есть имеют много

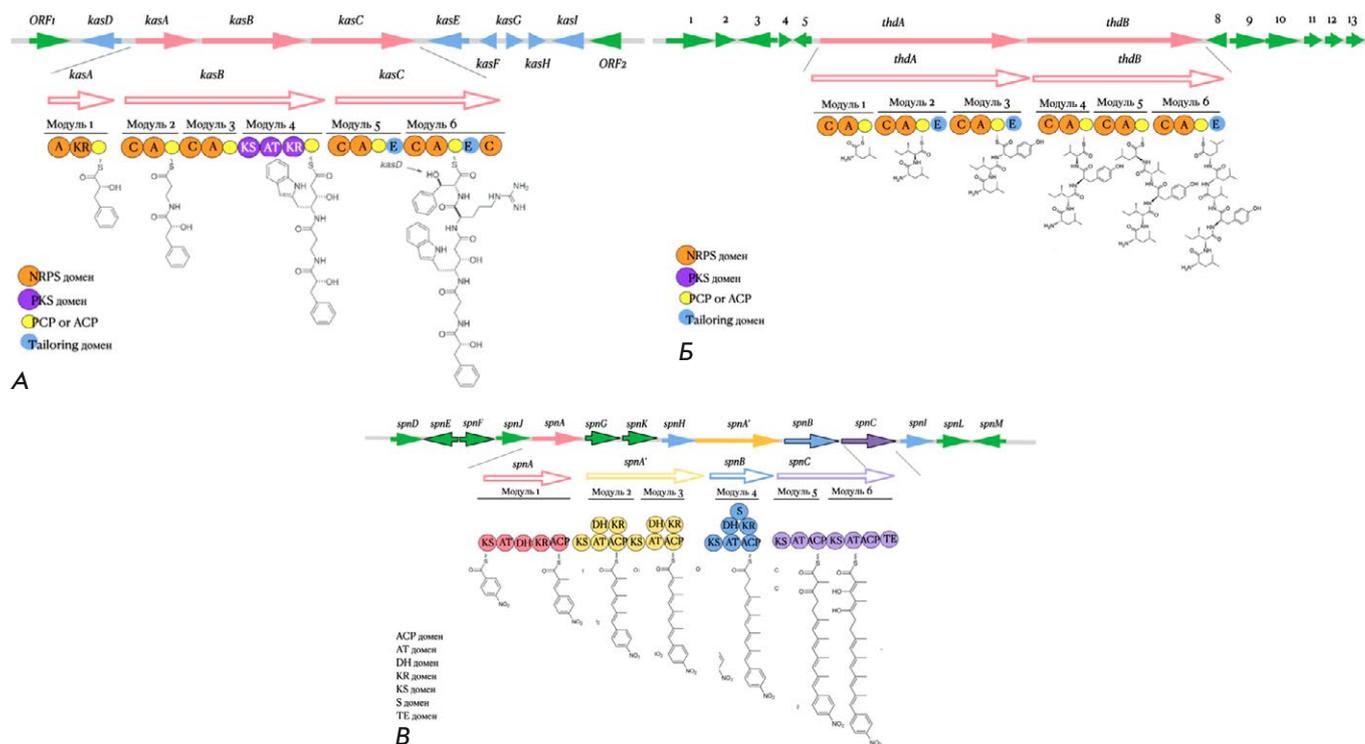


Рис. 1. Схема кластеров биосинтеза антибиотиков: А – термоактиноамид А из *Thermoactinomyces* sp. [28]; Б – касугамицин из *St. kasugaensis* [29]; В – спинозин из *St. albus* J1074 [30]

большой биосинтетический потенциал, чем можно выявить при рутинном культивировании [27].

На сегодняшний день существуют различные подходы к активации молчащих кластеров [31], которые можно разделить на две группы: в основе первой лежит гетерологическая экспрессия кластеров в штаммах модельных организмов *Escherichia coli* или *Saccharomyces cerevisiae* [32, 33], а вторая опирается на редактирование геномов непосредственно в штаммах-продуцентах [34, 35]. Каждый из этих подходов имеет свои достоинства и недостатки. Говоря о гетерологической экспрессии кластеров в штаммах *E. coli* или *S. cerevisiae* [36], можно выделить следующие преимущества: простота, связанная с трансформацией и экспрессией генов в хорошо изученных модельных микроорганизмах, позволяющая регулировать уровень экспрессии генов синтеза антибиотиков. Такой контроль регуляции экспрессии генов может быть реализован на основе использования индуцибельных или конститутивных промоторов. Соответственно, синтез конкретных метаболитов будет происходить или в присутствии молекул-индукторов, или на постоянной основе в гетерологичном штамме. Кроме того, модельные организмы, особенно кишечная палочка, не содержат эндогенных вторичных метаболических путей, что не будет влиять на синтез целевого кластера. Несмотря на положительные стороны подхода, существует ряд ограничивающих факторов: во-первых, основной процесс, лежащий в основе переноса кластера, – гомологичная рекомбинация [37], точность которой снижается при увеличении количества происходящих актов. Во-вторых, существуют отличия в нуклеотидной последовательности триплетов, кодирующих аминокислоты в разных организмах. Поэтому возникает дополнительный этап, связанный с созданием кодон-оптимизированной последовательности для синтеза целевой молекулы антибиотика. Такие манипуляции необходимы, чтобы устранить смещение рамки считывания между родными штаммами и хозяевами. Помимо этого, для некоторых методов необходимы свои консенсусные последовательности по типу attP-attachment сайтов, опосредующие сайт-специфическую рекомбинацию [38], и особые плазмиды, что увеличивает сложность и трудоемкость работы [39].

Альтернативным подходом к активации молчащих кластеров является редактирование генома непосредственно в штаммах-продуцентах. Такой вариант позволяет вводить мутации в исходный штамм дикого типа, контролировать изменения непосредственно в нем [40]. Проведение генетических манипуляций таким образом позволяет изучить влия-

ние конкретной мутации на другие метаболические пути, не задействованные в биосинтезе конкретного метаболита [41]. Разумеется, в данном методе есть свои сложности, однако разрабатываются подходы к их преодолению, о которых речь пойдет ниже.

ПОДХОДЫ К РЕДАКТИРОВАНИЮ ГЕНОМА АКТИНОМИЦЕТОВ

По сравнению с «традиционными» объектами для генетических модификаций, такими, как *E. coli* и *S. cerevisiae* [42], актиномицеты обладают сложным регуляторным аппаратом, препятствующим эффективной направленной трансформации их генома [43, 44]. Несмотря на это, разработаны подходы для внесения точечных мутаций в генетический аппарат штаммов-продуцентов. Все методы геномного редактирования можно разделить на две категории: спонтанный [45] и сайт-направленный мутагенез [46].

Спонтанный мутагенез

Метод спонтанного мутагенеза обусловлен введением случайным образом точечных мутаций в ДНК с помощью мутагена. Данный подход используется для решения нескольких задач: введения однонуклеотидных замен с целью получения новых продуктов биосинтеза [47], а так же как вспомогательный инструмент для уточнения нуклеотидной последовательности кластеров биосинтеза антибиотиков [48]. В качестве мутагенов используется MNNG (метилнитронитрозогуанидин) [49], вводящий алкильные группы по O⁶ гуанину и O⁴ тимину, что приводит к транзиции между GC- и AT-парами [50], и EMS (этилметансульфонат), приводящий к транзиции между GC- и AT-парами [51] (рис. 2). Помимо транзиций, возникающих между пуриновыми и пиримидиновыми основаниями, под воздействием мутагена возможно и изменение уровня экспрессии конкретных генов [52]. Поскольку такие однонуклеотидные замены вводятся случайным образом, то в различных регионах генома будет происходить алкилирование/метилование азотистых оснований. Так, например, модификация нуклеотидной последовательности в регуляторной области – промоторе – может подавлять экспрессию генов биосинтетического кластера [51], а мутации кодирующего региона BGC могут давать другие генетические продукты и, как следствие, новые вещества [48, 53].

Таким образом, метод спонтанного мутагенеза помогает решить некоторые задачи, связанные с поиском новых молекул, но данный процесс носит вероятностный характер и не гарантирует воспроизведение результатов, что не позволяет создать

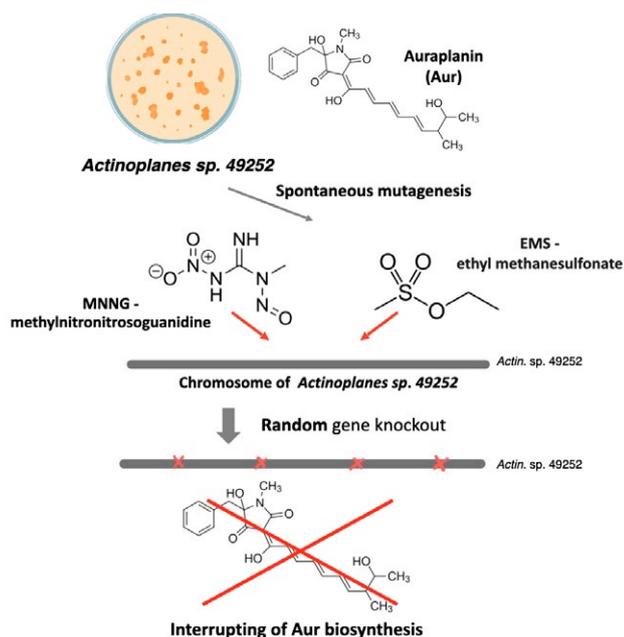


Рис. 2. Схема внесения мутаций в геном актиномицетов с помощью спонтанного мутагенеза посредством химических мутагенов

на его основе полноценный метод получения новых антибиотиков.

Сайт-направленный мутагенез

Ранее отмечалось, что актиномицеты реализуют лишь малую часть своей биосинтетической активности, причем один антибиотик, например, стрептогрицин, может обнаруживаться в каждом десятом изоляте, а такие антибиотики, как тетрациклин и актиномицин Д, встречаются с частотой один на 100–1000 изолятов [1]. Получить новые антибиотики, используя традиционный подход в виде платформы Waksmana [54], и их модификации, необходимо исследовать десятки миллионов изолятов. Такой рутинный вариант достаточно трудоемкий, время- и ресурсозатратный. Важно понимать, что даже известные штаммы скрывают в себе огромное разнообразие молекул с антибактериальной активностью [55], экспрессия генов которых маскируется уже известными антибиотиками, детектируемыми в первую очередь [1].

CuI_r и соавт. предложена концепция, согласно которой нарушение консервативных генов биосинтеза ранее известных антибиотиков, продуцируемых штаммами, может облегчить обнаружение новых метаболитов, чья активность не была замечена ранее [56, 57]. Эту задачу решают с использованием различных генно-инженерных инструментов, на-

правленных в основном на внесение делеций в гены биосинтетических кластеров штаммов-продуцентов. Все методики можно разделить на три большие категории, отличающиеся молекулярными механизмами, которые лежат в их основе.

В качестве инструментов для введения мутаций используются три фундаментальных процесса: гомологичная рекомбинация, лежащая в основе PCR-Targeting System, где используются гомологичные последовательности, необходимые для рекомбинации, и в результате получают делеции. Второй молекулярный механизм – сайт-специфическая рекомбинация, применяемая в Cre-loxP Recombination System и pSAM2 Site-Specific Recombination System. Ключевой особенностью является наличие специальных сайтов: loxP-последовательности для Cre-рекомбиназы и attP-последовательности для системы pSAM2. В данном процессе участвуют не только специфические последовательности, но и ферменты, осуществляющие рекомбинацию в строго определенных участках генома, что повышает точность происходящего процесса. Третий процесс, лежащий в основе сайт-направленного мутагенеза – введение двухцепочечных разрывов такими нуклеазами, как I-SceI-мегануклеаза (I-SceI Meganuclease-Promoted Recombination System) и Cas-никаза (CRISPR/Cas-Based Genome Editing). Введенные в ДНК двухцепочечные разрывы в дальнейшем восстанавливаются системами репарации клетки (рис. 3).

РЕДАКТИРОВАНИЕ ГЕНОМА НА ОСНОВЕ ПРОЦЕССА РЕКОМБИНАЦИИ

PCR-Targeting System

Первая система редактирования генома, разработанная для клеток *E. coli*, основана на гомологичной рекомбинации, осуществляемой с помощью λ-Red-системы [58]. Процесс гомологичной рекомбинации [59] – широко распространенное биологическое явление, происходящее в клетках живых организмов. Этот процесс носит высококонсервативный характер и включает разрыв и репарацию двухцепочечной ДНК (дцДНК) [60, 61]. Кроме того, гомологичная рекомбинация является инструментом для внесения точечных мутаций в геном бактерии [62]. На основе этого процесса разработан PCR-опосредованный метод геномного редактирования, суть которого заключается в замене целевого региона в геноме клетки на амплифицированный фрагмент гена селективного маркера (табл. 1).

Для успешного прохождения гомологичной рекомбинации необходимы фланкирующие последовательности в районе 2 т.п.н. Используя PCR-

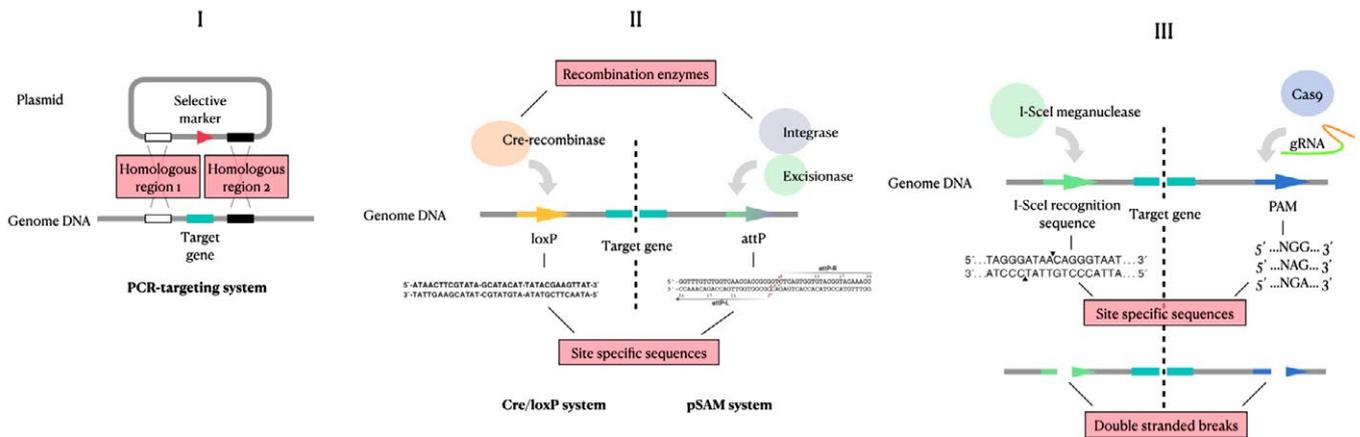


Рис. 3. Схема молекулярных механизмов, лежащих в основе генно-инженерных методов введения мутаций в геном клеток. I процесс — гомологичная рекомбинация для осуществления делеций; II процесс — сайт-специфическая рекомбинация для осуществления делеций; III процесс — действие нуклеаз, приводящих к двухцепочечным разрывам, с последующим их восстановлением

Таблица 1. Селективные маркеры для генетической инженерии актиномицетов

№ п/п	Ген устойчивости	Устойчивость	Антибиотик	Плаزمида
1.	<i>aac(3)IV – aminoglycoside N(3)-acetyltransferase</i>	Устойчивость к антибиотикам, содержащим 2-дезоксистрептаминовое кольцо	Апрамицин	pCRISPomyces [63]; pStreptoBAC V [1]
2.	<i>aph(3)III – aminoglycoside modifying enzyme</i>	Устойчивость к аминогликозидным антибиотикам	Канамицин А и В, неомицин В и С	pCAP01 [64]; pESAC13 [65]
3.	<i>aadA – aminoglycoside (3rd) adenyltransferase</i>	Устойчивость к стрептограминам и аминогликозидам	Стрептомицин, спектиномицин	pIJ778 [66]
4.	<i>vph – phosphotransferase</i>	Устойчивость к виомицину	Виомицин	pIJ780 [66]
5.	<i>ermE – methyltransferase - erythromycin resistance gene</i>	Устойчивость к макролидным антибиотикам	Эритромицин	pBF24 [67]
6.	<i>hyhB – hygromycin resistance gene</i>	Устойчивость к аминогликозидным антибиотикам	Гигромицин Б	pBF27 N [67]

опосредованный метод, впервые внесли делецию в гены биосинтетического кластера геосмина у штамма *St. coelicolor* A3(2) [66, 68] (рис. 4).

Такая контролируемая генная инженерия позволяет создавать антибиотики за счет комбинаторного биосинтеза в штамме-продуценте. Из штамма удаляют гены основных эндогенных вторичных метаболитов (в случае *St. avermitilis* это авермектин и филипин), гены транспозонов [69], а также IS-последовательности [70], которые не влияют на темпы роста штамма, но способствуют стабильности генома.

Несмотря на удачные результаты [66, 68], PCR-опосредованный метод геномного редактирования имеет свои ограничения, связанные с неуниверсальностью для разных штаммов актиномицетов.

Cre-loxP Recombination System

Метод Cre-loxP-рекомбинации используется для внесения крупных делеций в геном бактериальных клеток [71, 72] с использованием Cre-рекомбиназы [73, 74]. Для внесения мутации необходимы две последовательности loxP (locus of crossing (x) over, P1), фланкирующие целевой ген, для осуществления сайт-специфической рекомбинации при участии рекомбиназы Cre (рис. 5) [75].

Механизм внесения мутации включает в себя последовательные этапы рекомбинации. Вначале в геном актиномицетов вводятся две loxP-последовательности таким образом, чтобы окаймлять целевой ген. Этот процесс опосредуется двумя актами гомологичной рекомбинации [68]. Далее происходит экспрессия гена белка Cre, рекомбина-

за распознает введенные loxP-последовательности и осуществляет сайт-специфическую рекомбинацию [60], приводящую к делеции целевого гена. По окончании процесса в геноме актиномицетов сохраняется одна из последовательностей loxP.

С помощью такого метода получена делеция порядка 1.4 млн п.н. в генах биосинтетического кластера геосмина в геноме *St. avermitilis* [68]. Данный метод более точен, чем PCR-опосредованный подход, где процесс рекомбинации обусловлен внутренней машинерией клетки и проходит по гомологичным фланкирующим областям целевого гена [59], что носит вероятностный характер. Специфичность и точность Cre/loxP-подхода основаны на наличии loxP-фланкирующих последовательностей, которые специфично распознаются рекомбиназой Cre [76]. Причем последовательность гена *cre* находится под индуцируемым промотором в отдельной плазмиде и тем самым экспрессия Cre-рекомбиназы носит контролируемый характер [77]. Негативной стороной такой системы является сохранение loxP-фрагментов в геноме с изменением геномного контента помимо целевой мутации – делеции.

pSAM2 Site-Specific Recombination System

В основе системы pSAM2 [78], как и в Cre-loxP-подходе, лежит процесс сайт-специфической рекомбинации [79]. Но в данном случае специфичность обусловлена не активностью рекомбиназы, а определенными последовательностями в геноме – attachment-сайтами: attP (в плазмиде pSAM2) и attB (в геномной ДНК бактерии) [80–82]. Данные области attB, кодируемые нерепликативной плазмидой pSAM2, вводятся в геном актиномицетов посредством гомологичной рекомбинации [59]. Важно отметить, что при снятии селективного давления данная плаزمиды будет элиминироваться из клеток актиномицетов. Введенные в геномную последовательность att-сайты фланкируют целевой ген по обе стороны.

Процесс введения мутации посредством системы на основе pSAM2 включает в себя следующие этапы. На первом этапе происходит рекомбинация по сайтам attP/attB, сопровождаемая интеграцией плазмиды в геном актиномицетов. Далее осуществляется делеция целевого гена, опосредованная эксцизионазой Xis. Ген белка Xis находится в самореплицирующейся плазмиде и при снижении селективного давления удаляется из клеток актиномицетов [83, 84] (рис. 6).

Такой подход применили для делеции биосинтетического кластера рифампицина, размером 90 т.п.н. в клетках *A. mediterranei* DSM 40773 [78]. К основным достоинствам данного метода относится то, что мутантные штаммы содержат дополнительные

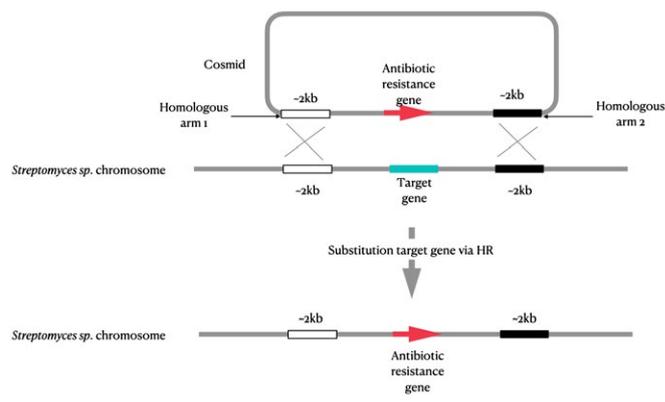


Рис. 4. Схема внесения мутаций в геном актиномицетов с помощью PCR-опосредованного метода геномного редактирования

вставки в районе 30–40 п.н. в геномной последовательности, что не нарушает рамку считывания [85].

РЕДАКТИРОВАНИЕ ГЕНОМА НА ОСНОВЕ ДЕЙСТВИЯ НУКЛЕАЗ

I-SceI Meganuclease-Promoted Recombination System

Следующий метод редактирования генома основан на введении двухцепочечных разрывов посредством I-SceI Meganuclease-Promoted Recombination System [86]. В данном случае мегануклеаза I-SceI вносит двухцепочечный разрыв, распознавая уникальную последовательность из 18 п.н. и запускает процесс рекомбинации [87]. Мегануклеаза I-SceI была впервые найдена в митохондриях *S. cerevisiae* [88].

На практике для внесения делеций или замен в нуклеотидную последовательность штаммов актиномицетов необходима кодон-оптимизированная последовательность гена мегануклеазы I-SceI [89, 90], а также чувствительная к температуре плаزمиды pHZ1358 и ее производные (pKC1139 и pJTU1278) (рис. 7). Кроме того, необходима вставка 18 п.н. в геном штамма-продуцента. С помощью этого метода из клеток *St. coelicolor* A3(2) делетировали ген актинородина (*Act*) [86, 91].

Процесс включает в себя ряд актов гомологичной рекомбинации, необходимых для введения I-SceI сайт-специфической 18-нуклеотидной последовательности в геном актиномицетов. Данные сайты кодируются самореплицирующейся плазмидой pKMUSD. Далее происходит контролируемая экспрессия гена белка I-SceI, направляемая индуцибельным промотором *tipA* [92]. Мегануклеаза распознает специфическую последовательность в геноме актиномицетов и вносит двухцепочечные разрывы,

Ключевой недостаток подхода на основе мегануклеазы I-SceI – отсутствие в некоторых штаммах гена *tipA* для индукции генов нуклеазы. Кроме того, этот процесс сопровождается двухцепочечными разрывами ДНК, поэтому ошибки в репарационном аппарате могут приводить к мутациям, которые не связаны с целевой делецией. К положительным сторонам данного метода относится сохранение геномного контента без дополнительных нуклеотидных последовательностей по завершению генетических манипуляций.

CRISPR/Cas-Based Genome Editing

Технология на основе кластерной регулярно взаимосвязанной системы коротких палиндромных повторов CRISPR/Cas, особенно системы CRISPR/Cas9, стала перспективным инструментом генной инженерии штаммов актиномицетов [95–97].

CRISPR/Cas – естественная система защиты клеток прокариот от чужеродной ДНК [98–100]. Эта технология широко используется для редактирования генома организмов, относящихся к самым разным таксономическим группам. В отличие от редактирования генома на основе мегануклеазы I-SceI [101], технология на основе CRISPR/Cas не требует предварительной интеграции в целевой геном уникальной последовательности, распознаваемой ферментом, а использует транскрибируемую направляющую РНК (sgРНК, химера crРНК и tracrРНК) или только crРНК, чтобы селективно связывать белки Cas в любом участке генома [102, 103]. Комплекс Cas9/crРНК/tracrРНК может нацеливаться на любую последовательность ДНК, известную как протоспейсер, при условии, что на 3'-конце присутствует необходимый три-нуклеотидный мотив, прилегающий к протоспейсеру (PAM) [104, 105], например, NGG в случае *Streptococcus pyogenes*, где N – любой нуклеотид [106].

Для редактирования генома стрептомицетов в основном используются два типа Cas-нуклеаз: Cas9 из *Str. pyogenes*, относящаяся к классу 2 типа II [107], а также Cpf1, также известная как Cas12a из *Francisella novicida*, относящаяся к классу 2 типа V (рис. 8) [103, 108, 109].

По сравнению с другими технологиями редактирования генома система CRISPR/Cas имеет явные преимущества: высокую эффективность, легкость в работе и быстрый результат [110].

Cas9-Based Genome Editing. На основе системы CRISPR/Cas9 разработаны две версии плазмид для манипуляций с геномом стрептомицетов: pCRISPOmyces-1 и pCRISPOmyces-2 [63].

pCRISPOmyces-1 включает последовательности генов crРНК и tracrРНК, а также ген *cas9*. pCRISPOmyces-2 включает химерную кассету sgРНК и ген *cas9*. В обоих случаях для экспрессии элементов CRISPR/Cas используются сильные конститутивные промотеры, а также оптимизированная последовательность гена *cas9* для лучшей экспрессии в *Streptomyces* [111, 112].

Используя данный инструмент, Cobb и соавт. успешно получили делеции ДНК различных размеров 20–31.4 т.п.н., включая отдельные гены и кластеры биосинтеза антибиотиков с эффективностью 21–100% в трех разных видах стрептомицетов [63]. Внесение таких делеций в кластеры биосинтеза стрептомицина и стрептотрицина позволило идентифицировать в ранее известных штаммах-производителях новые антибиотики: тиолактомицин, амицетин, фенантровиридин, 5-хлор-3-формилиндола [113].

Кроме делеций, система CRISPR/Cas позволяет вносить мутации в промотеры. Таким образом удалось активировать молчащие гены биосинтетических кластеров разных классов в пяти штаммах *Streptomyces*, а также идентифицировать уникальные метаболиты, включая новый пятичленный циклический поликетид типа II в *St. viridochromogenes* [114].

Несмотря на очевидные преимущества, система pCRISPOmyces имеет ряд недостатков, связанных с токсичностью белка Cas9 для бактериальной клетки. Это обусловлено расщеплением нецелевой ДНК (off-target-эффект) [115, 116], а также затруднением ее применения у стрептомицетов с низкой трансформирующей эффективностью ДНК [94]. Wang и соавт. создали модифицированную CRISPR/Cas9-систему на основе плазмиды pWHU2653, где ген белка Cas9 находится под индуцируемым промотором, что обеспечивает контроль синтеза белка

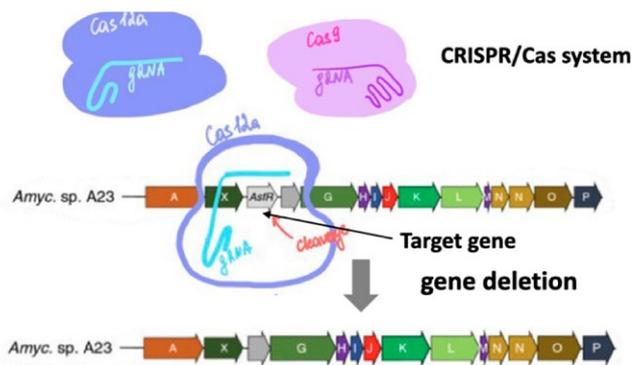


Рис. 8. Схема внесения мутаций в геном актиномицетов CRISPR-Cas-опосредованным методом геномного редактирования

[117]. Кроме того, процесс репарации двухцепочечных разрывов является АТФ-зависимым, поэтому в плазмиду рWNU2653 для повышения эффективности редактирования был введен ген *AtpD*, кодирующий β -субъединицу АТФ-синтазы (табл. 2) [94].

Cpf1-Assisted Genome Editing. Помимо указанных недостатков, система CRISPR/Cas9 обладает рядом ограничений. Как упоминалось ранее, геном актиномицетов имеет GC-богатый контент [118], а для распознавания белком Cas9 целевой последовательности необходима G-обогащенная (PAM) последовательность (5'-NGG-3'), так, например, у *St. coelicolor* это 260 мишеней на 1000 п.н. [119, 120]. Система на основе белка Cas12a из *F. novicida* обходит это ограничение, поскольку для внесения двухцепочечных разрывов нужна T-обогащенная PAM-последовательность (5'-TTV-3) [121], что повышает специфичность процесса [97]. Используя *Cpf1*-нуклеазу, Yeо и соавт. добились делеции гена в штамме *St. hygrosopicus* SIPI-KF, синтезирующем 5-оксомилбемицин А3/А4, который не мог быть отредактирован с помощью Cas9 из-за его высокой токсичности [120]. Таким образом, *Cpf1* и альтернативные технологии редактирования генома хорошим дополнением текущие инструменты на базе CRISPR/Cas и облегчают обнаружение новых биологически активных веществ у *Streptomyces* spp., а также у представителей других родов актиномицетов (табл. 2) [93].

CRISPR-BEST (CRISPR-Base Editing System). Методы геномного редактирования на основе нуклеаз требуют внесения двухцепочечных разрывов в ДНК, что может приводить к нестабильности генома в связи с неэффективной работой систем репарации [122]. David Liu's разработал альтернативный метод на основе системы CRISPR/Cas, не требующей DSB. Этот метод заключается во введении точечных мутаций, приводящих к появлению стоп-кодона в кодирующей последовательности [123]. Он основан на использовании двух типов дезаминаз: цитидиндезаминаза [124] превращает цитозин в тимин, а адениндезаминаза [125] приводит к трансции, например А-G, С-T. Используя это различие, получены две разновидности генетических конструкций: CRISPR-cBEST, содержащая вариант гена цитидиндезаминазы *APOBEC1* крысы (*rAPOBEC1*), и CRISPR-aBEST с адениндезаминазой, контролируемой индуцируемым промотором *tipA* (*thiostrepton-responsive activator*) [124], поэтому ключевой момент – это наличие гена *tipA* в целевом штамме [125]. Кроме того, обе плазмиды содержат ген *nicA* Cas9 [126] и кодон-оптимизированную

последовательность sgРНК [103]. Использование данных плазмид приводит к экспрессии генов дезаминаз и к трансциям. При дезаминировании аденина в А:Т-паре или цитозина в С:G-паре в одной цепи ДНК возникают новые пары – I:T и U:G. Во время репликации в новой паре U:G урацил будет распознаваться как тимин, а в паре I:T инозин как гуанин; такое несоответствие приводит к активации систем репарации клетки [96, 127].

В первом случае действует урацил-ДНК-гликозилаза (UDG) [128], запускающая механизм эксцизионной репарации [129, 130], либо восстановление исходных пар происходит посредством системы мисматч-репарации [129, 131, 132]. Таким образом исходные пары восстанавливаются в дальнейшем процессе репликации и DSB не требуются.

Важно отметить, что эта система показала хорошие результаты на модельных штаммах *St. coelicolor*, а также на *St. griseofuscus* (табл. 2).

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Геномный майнинг и манипуляции с геномом, особенно с генетическими кластерами антибиотиков, обладают огромным потенциалом для выявления новых молекул с антибактериальной активностью. Важно отметить, что открытие новых ВГС в геноме актиномицетов открывает широкие возможности для их редактирования, однако, приходится считаться с рядом ограничений, связанных с методами и инструментами для изменения метаболической активности штаммов.

Каждый из описанных подходов может использоваться для конкретных генно-инженерных задач. Так, например, спонтанный мутагенез находит свое применение в качестве дополнительного инструмента для идентификации ВГС потенциально нового антибиотика. Введение случайных мутаций в геном штамма-продуцента может изменять биосинтетическую активность исследуемого метаболита, а последующий геномный анализ позволяет выявить конкретный участок гена в биосинтетическом кластере, в котором произошло изменение. К ключевым преимуществам сайт-направленного мутагенеза относятся его мишень-ориентированность и эффективность: этот подход применяется на уже известных генных кластерах с целью изменения их экспрессии и последующей идентификации ранее замаскированных молекул в известных изолятах.

Как сказано ранее, большинство методов сайт-направленного мутагенеза, за исключением CRISPR-BEST, объединяет процесс рекомбинации. Причем рекомбинация может происходить либо за счет внутренних систем клетки, как в случае PCR-опосредованного метода, либо за счет

Таблица 2. Методы сайт-направленного мутагенеза в геноме актиномицетов

№ п/п	Метод	Преимущества	Недостатки	Эффективность
1.	PCR-Targeting System	Для введения мутаций не нужны дополнительные инструменты, кроме PCR.	Сложность протоколов, времязатратность, универсальность для разных штаммов актиномицетов, делеция сопровождается внесением в геном селективного маркера.	Эффективность показана только на BGC геосмина, модельного штамма <i>St. coelicolor</i> .
2.	Cre-loxP Recombination System	Возможность делетировать крупные участки генов порядка 1.4 млн п.н. [16]. Большая специфичность за счет участия Cre-рекомбиназы.	Времязатратность, изменение геномного контента, помимо целевой мутации (делеции), в результате сохранения <i>loxP</i> -фрагментов.	Положительный результат показан только на BGC геосмина в штамме <i>St. avermitilis</i> .
3.	pSAM2 Site-Specific Recombination System	Делеция целых BGC, минимальное изменение рамки считывания после эксцизии генетической конструкции.	Времязатратность, сохранение небольших последовательностей в геноме бактерии.	Подход эффективен не только на модельных штаммах стрептомицетов, но и на представителях таких редких родов, как <i>Actinoplanes mediterranei</i> . Метод показал результативность на BGC антибиотиков порядка 90 т.п.н. (кластер рифампицина).
4.	I-SceI Meganuclease-Promoted Recombination System	Осуществление делеций без дополнительного изменения геномного контента.	Для редактирования генома необходима кодон-оптимизированная последовательность гена мегануклеазы I-Sce, а также термочувствительная плаزمиды pKC1139.	Эффективность показана на модельном штамме <i>St. coelicolor</i> на BGC актинородина.
5.	Cas9-Based Genome Editing	Возможность вносить геномные делеции до 30 т.п.н. [16]; метод позволяет вносить мутации в последовательность промоторов.	Токсичность белка Cas9, вследствие эффекта off-target. Для внесения DSB необходима G-обогащенная PAM-последовательность (5'-NGG-3'). Внесенные DSB не всегда могут быть элиминированы внутриклеточными системами репарации.	Эффективность составляет от 21 до 100% как на модельных штаммах стрептомицетов, так и на трех представителях редких родов [16]. Широко используется для редактирования BGC антибиотиков различной длины.
6.	Cpf1-Assisted Genome Editing	Высокая специфичность, так как для внесения DSB нужна T-обогащенная последовательность PAM (5'-TTV-3).	Внесенные DSB не всегда могут быть элиминированы внутриклеточными системами репарации.	Эффективность системы показана на различных штаммах актиномицетов. Белок Cpf1 проявляет специфичность к T-обогащенной PAM-последовательности, что понижает вероятность off-target-эффекта на 26%, увеличивая тем самым результативность от 47 до 100% [44, 60].
7.	CRISPR-BEST (CRISPR-Base Editing System)	Для редактирования генома не требуются DSB, вводятся точечные мутации для появления стоп-кодона.		Метод применим как для модельных штаммов актиномицетов, таких, как <i>St. coelicolor</i> , так и для представителей редких родов. Этот метод относительно новый, его апробируют на известных BGC как актиноридин.

специальных ферментов: Cre-рекомбиназы, Xis-эксцизионазы и Int-интегразы. Несомненно, ферменты и распознаваемые ими специфические последовательности добавляют точности, но вместе с тем изменяют геномный контент.

Ряд методов сайт-направленного мутагенеза основан на введении двухцепочечных разрывов с последующим восстановлением DSB. К таким методам относятся система на основе мегануклеазы I-Sce и вариации CRISPR-Cas (Cas9-Based Genome

Editing и Cpf1-Assisted Genome Editing). Все три подхода могут использоваться для редактирования BGC актиномицетов. Однако геномные особенности этих бактерий накладывают ряд ограничений на использование CRISPR-Cas9, учитывая off-target-эффект и токсичность белка Cas9, а ограничение на применение I-Sce связано с оптимизацией генома для создания 18-нуклеотидной консенсусной последовательности для мегануклеазы. CRISPR-Cas-система на основе нуклеазы Cas12 (Cpf1) распознает иную T-обогащенную PAM-последовательность, что снижает вероятность случайного внесения двухцепочечных разрывов. Помимо специфического взаимодействия нуклеазы с целевой последовательностью, немаловажную роль играет внутренняя клеточная система репарации, связанная с восстановлением двухцепочечных разрывов.

Важно отметить, что для всех вышеописанных методов необходимы свои генетические конструкции с соответствующими нуклеотидными последовательностями, которыми трансформируют штаммы стрептомицетов. Отдельной проблемой всех этих подходов может быть низкая трансформируемость конкретного штамма. Тем не менее, несмотря на все ограничения описанных методологий, они помогли достичь хороших результатов: открыть новые антибиотики и повысить биосинтетический потенциал актиномицетов. Так, в 2003 году с использованием PCR-опосредованного метода редактирования проведены манипуляции на кластере геосмина модельного штамма *St. coelicolor* [36]. Через 7 лет после этого с помощью метода на основе Cre-рекомбиназы также в кластере геосмина получена делеция порядка 1.4 млн п.н., но в штамме *St. avermitilis* [46]. Говоря о сайт-специфическом подходе, нужно упомянуть еще и систему pSAM2. Несмотря на то, что данная плазида создана еще в 1989 году [12], удачный результат с ее использованием получен в 2022 году: была внесена мутация в кластер рифампицина в клетках *A. mediterranei* DSM 40773

[87]. С помощью подхода на основе мегануклеазы I-SceI в 2014 году была получена мутация в кластере актинородина в клетках *St. coelicolor* A3(2) [30]. Возможность применения всех описанных методов для манипуляций на геноме показана пока лишь для актиномицетов; самым эффективным оказался подход CRISPR-Cas, который не только показал результативность, связанную с введением мутаций, но и позволил выявить новые молекулы. Так, в 2019 году, используя метод на основе CRISPR-Cas9, была выявлена способность ранее изученных штаммов-продуцентов стрептомицина синтезировать новые молекулы антибиотиков – тиолактомицин, фенантровиридин, 5-хлор-3-формилиндола [21].

Дальнейшие перспективы использования методов геномного редактирования связаны с возможностью идентифицировать в геномах охарактеризованных штаммов BGC новых антибиотиков и индуцировать их с помощью направленного мутагенеза. Для этого необходимы сочетания предсказательных биоинформатических алгоритмов определения потенциальных BGC вторичных метаболитов и надежного инструментария для направленных мутаций регуляторных участков, введения индуцибельных промоторов и делеции генов-репрессоров. Перспективной представляется и возможность переноса BGC целевых антибиотиков в штаммы, более удобные для экспрессии. Особенно эффективным такой подход может быть в рамках крупномасштабного биотехнологического производства, когда продукцию целевого метаболита увеличивают с использованием специально созданного генно-инженерного штамма, что будет повышать рентабельность производства. ●

Финансирование работы осуществлялось Министерством науки и высшего образования Российской Федерации (соглашение № 075-10-2021-093; проект [BTH-RND-2127]).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Aminov R. // *Bioc. Pharm.* 2017. V. 133. P. 4–19.
- Barka E.A., Vatsa P., Sanchez L., Gaveau-Vaillant N., Jacquard C., Klenk H.P., Clément C., van Wezel G.P. // *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 2016. V. 80. № 1. P. 1–43.
- Wright G.D. // *ACS Infect. Dis.* 2015. V. 1. № 2. P. 80–84.
- Cox G., Sieron A., King A.M., De Pascale G., Pawlowski A.C., Koteva K., Wright G.D. // *Cell. Chem. Biol.* 2017. V. 24. № 1. P. 98–109.
- Blin K., Shaw S., Steinke K., Villebro R., Ziemert N., Lee S.Y., Medema M.H., Weber T. // *Nucl. Acid. Res.* 2019. V. 47. № W1. P. W81–W87.
- Baltz R.H., Miao V., Wrigley S.K. // *Nat. Prod. Rep.* 2005. V. 22. № 6. P. 717–741.
- Ochi K. // *Microbiol. Res.* 2017. V. 1. P. 189–203.
- Tomm H.A., Ucciferri L., Ross A.C. // *J. Ind. Microbiol. Biotech.* 2019. V. 46. № 9–10. P. 1381–1400.
- Matilla M.A. // *Microbiol. Biotech.* 2022. V. 15. № 2. P. 392–394.
- Maglangit F., Fang Q., Kyeremeh K., Sternberg J.M., Ebel R., Deng H.A. // *Mol.* 2020. V. 25. № 2. P. 256.
- Onaka H. // *J. Antib.* 2017. V. 70. № 8. P. 865–870.
- Wang B., Guo F., Dong S.H., Zhao H. // *Nat. Chem. Bio.* 2019. V. 15. № 2. P. 111–114.
- Zou X., Wang L., Li Z., Luo J., Wang Y., Deng Z., Du S., Chen S. // *Med. Res. Rev.* 2018. V. 38. № 1. P. 229–260.
- Mitousis L., Thoma Y., Musiol-Kroll E.M. // *Antib.* 2020. V. 9. № 8. P. 494.

15. Rutledge P.J., Challis G.L. // *Nat. Rev. Microbiol.* 2015. V. 13. № 8. P. 509–523.
16. Ochi K. // *J. Antib.* 2017. V. 70. № 1. P. 25–40.
17. Mao D., Okada B.K., Wu Y., Xu F., Seyedsayamdost M.R. // *Cur. Opin. Microbiol.* 2018. V. 45. P. 156.
18. Cimmino T., Metidji S., Labas N., Le Page S., Musso D., Raoult D., Rolain J.M. // *New. Microbiol. Infec.* 2016. V. 12. P. 1–5.
19. Cornell C.R., Marasini D., Fakhr M.K. // *Fron. Microbiol.* 2018. V. 9. P. 2282.
20. Ventura M., Canchaya C., Tauch A., Chandra G., Fitzgerald G.F., Chater K.F., van Sinderen D. // *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 2007. V. 71. № 3. P. 495–548.
21. Blaha G.M., Wade J.T. // *An. Rev. Gen.* 2022. V. 56. P. 187–205.
22. Martin J.F. // *J. Indst. Microbiol.* 1992. V. 9. P. 73–90.
23. Walsh C.T., Fischbach M.A. // *J. Amer. Chem. Soc.* 2010. V. 132. № 8. P. 2469–2493.
24. Donadio S., Monciardini P., Sosio M. // *Nat. Prod. Rep.* 2007. V. 24. № 5. P. 1073–1109.
25. Schwecke T., Aparicio J.F., Molnar I., König A., Khaw L.E., Haydock S.F., Oliynyk M., Caffrey P., Cortés J., Lester J.B. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1995. V. 92. № 17. P. 7839–7843.
26. Tillett D., Dittmann E., Erhard M., von Döhren H., Börner T., Neilan B.A. // *Chem. Biol.* 2000. V. 7. № 10. P. 753–764.
27. Ziemert N., Jensen P.R. // *Meth. Enzym.* 2012. V. 517. P. 161–182.
28. Della Sala G., Mangoni A., Costantino V., Teta R. // *Fron. Chem.* 2020. V. 8. P. 397.
29. Zhu C., Kang Q., Bai L., Cheng L., Deng Z. // *App. Micr. Biot.* 2016. V. 100. P. 1811–1821.
30. An Z., Tao H., Wang Y., Xia B., Zou Y., Fu S., Fang F., Sun X., Huang R., Xia Y., et al. // *Synt. Syst. Biot.* 2021. V. 6. № 4. P. 292–301.
31. Seyedsayamdost M.R. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2014. V. 111. № 20. P. 7266–7271.
32. Li T., Du Y., Cui Q., Zhang J., Zhu W., Hong K., Li W. // *Mar. Drug.* 2013. V. 11. № 2. P. 466–488.
33. Myronovskiy M., Luzhetsky A. // *Nat. Prod. Rep.* 2019. V. 36. № 9. P. 1281–1294.
34. Tocchetti A., Donadio S., Sosio M. // *FEMS Microbiol. Lett.* 2018. V. 365. № 9. P. fny064.
35. Zhang J.J., Yamanaka K., Tang X., Moore B.S. // *Meth. Enzym.* 2019. V. 621. P. 87–110.
36. Pyeon H.R., Nah H.J., Kang S.H., Choi S.S., Kim E.S. // *Microbiol. Cell Fact.* 2017. V. 16. № 1. P. 1–9.
37. Li X., Heyer W.D. // *Cell. Res.* 2008. V. 18. № 1. P. 99–113.
38. Astumian J.H., Waldman A.S., Scoocca J.J. // *J. Bact.* 1989. V. 171. № 3. P. 1747–1750.
39. Hume B.C., D'Angelo C., Smith E.G., Stevens J.R., Burt J., Wiedenmann J. // *Sci. Rep.* 2015. V. 5. № 1. P. 1–8.
40. Zhu H., Sandiford S.K., van Wezel G.P. // *J. Indst. Microbiol. Biotech.* 2014. V. 41. № 2. P. 371–386.
41. Sprusansky O., Zhou L., Jordan S., White J., Westpheling J. // *J. Bact.* 2003. V. 185. № 20. P. 6147–6157.
42. Orr-Weaver T.L., Szostak J.W., Rothstein R.J. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1981. V. 78. № 10. P. 6354–6358.
43. Bernheim A., Sorek R. // *Natr. Rev. Micr.* 2020. V. 18. № 2. P. 113–119.
44. Sánchez J., Barbès C., Hernandez A., de los Reyes Gavilán C.R.G., Hardisson C. // *Cand. J. Microbiol.* 1985. V. 31. № 10. P. 942–946.
45. Smith K.C. // *Mut. Res. Rev. Gen. Toxic.* 1992. V. 277. № 2. P. 139–162.
46. Riley L.A., Guss A.M. // *Biotech. Biof.* 2021. V. 14. P. 1–17.
47. Volff J.N., Altenbuchner J. // *Mol. Microbiol.* 1998. V. 27. № 2. P. 239–246.
48. Stonesifer J., Baltz R.H. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1985. V. 82. № 4. P. 1180–1183.
49. Gichner T., Velemínský J. // *Mut. Res. Rev. Gen. Toxic.* 1982. V. 99. № 2. P. 129–242.
50. Thiab R.S., Jasim H.M. // *Iraqi J. Biotech.* 2009. V. 8. № 1. P. 496–504.
51. Sega G.A.A. // *Mut. Res. Rev. Gen. Toxic.* 1984. V. 134. № 2–3. P. 113–142.
52. Drake J.W., Baltz R.H. // *Ann. Rew. Biotech.* 1976. V. 45. № 1. P. 11–37.
53. Ikenaga M., Ichikawa-Ryo H., Kondo S. // *J. Mol. Biol.* 1975. V. 92. № 2. P. 341–356.
54. Lewis K. // *Nature.* 2012. V. 485. № 7399. P. 439–440.
55. De Simeis D., Serra S. // *Antibiot.* 2021. V. 10. № 5. P. 483.
56. Culp E.J., Yim G., Waglechner N., Wang W., Pawlowski A.C., Wright G.D. // *Nat. Biotech.* 2019. V. 37. № 10. P. 1149–1154.
57. Letzel A.C., Pidot S.J., Hertweck C.A. // *Natr. Prod. Rep.* 2013. V. 30. № 3. P. 392–428.
58. Datsenko K.A., Wanner B.L. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2000. V. 97. № 12. P. 6640–6645.
59. Petit M.A. // *Trend. Micr.* 2009. V. 17. № 6. P. 226–232.
60. Smith G.R. // *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 2012. V. 76. № 2. P. 217–228.
61. Szostak J.W., Orr-Weaver T.L., Rothstein R.J., Stahl F.W. // *Cell.* 1983. V. 33. № 1. P. 25–35.
62. Thomason L., Court D.L., Bubunenko M., Costantino N., Wilson H., Datta S., Oppenheim A. // *Curr. Protoc. Mol. Biol.* 2007. V. 78. № 1.16. P. 1–1.16.
63. Cobb R.E., Wang Y., Zhao H. // *ACS Synt. Biol.* 2015. V. 4. № 6. P. 723–728.
64. Yamanaka K., Reynolds K.A., Kersten R.D., Ryan K.S., Gonzalez D.J., Nizet V., Dorrestein P.C., Moore B.S. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2014. V. 111. № 5. P. 1957–1962.
65. Custodio A.B., Alcantara E.P. // *Asia-Pacific J. Mol. Biol. Biotech.* 2019. V. 27. № 2. P. 56–63.
66. Gust B., Challis G.L., Fowler K., Kieser T., Chater K.F. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2003. V. 100. № 4. P. 1541–1546.
67. Fayed B., Ashford D.A., Hashem A.M., Amin M.A., El Gazayerly O.N., Gregory M.A., Smith M.C. // *App. Envir. Microbiol.* 2015. V. 81. № 24. P. 8402–8413.
68. Komatsu M., Uchiyama T., Omura S., Cane D.E., Ikeda H. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2010. V. 107. № 6. P. 2646–2651.
69. Babakhani S., Oloomi M. // *J. Bas. Microbiol.* 2018. V. 58. № 11. P. 905–917.
70. Ooka T., Ogura Y., Asadulghani M., Ohnishi M., Nakayama K., Terajima J., Watanabe H., Hayashi T. // *Gen. Res.* 2009. V. 19. № 10. P. 1809–1816.
71. Campo N., Daveran-Mingot M.L., Leenhouts K., Ritzenthaler P., Le Bourgeois P. // *App. Envir. Microbiol.* 2002. V. 68. № 5. P. 2359–2367.
72. Yoon Y.G., Cho J.H., Kim S.C. // *Gen. Anal. Biom. Engin.* 1998. V. 14. № 3. P. 89–95.
73. Hallet B., Sherratt D.J. // *FEMS Microbiol. Rev.* 1997. V. 21. № 2. P. 157–178.
74. Jayaram M., Grainge I. // *Dynm. Bact. Gen.* 2005. V. 2. № 2. P. 33–81.
75. Kühn R., Torres R. // *Transg. Techn. Princ. Prot.* 2002. V. 180. P. 175–204.
76. Tian X., Zhou B. // *J. Biol. Chem.* 2021. V. 296. P. 1–15.
77. Marx C.J., Lidstrom M.E. // *Biotech.* 2002. V. 33. № 5. P. 1062–1067.
78. Santos L.D., Caraty-Philippe L., Darbon E., Pernodet J.L. //

- Microorg. 2022. V. 10. № 4. P. 828.
79. Parks A.R., Peters J.E., Wells R.D. // *Mol. Life. Sci.* 2018. V. 1. P. 119–127.
80. Boccard F., Smokvina T., Pernodet J.L., Friedmann A., Guerineau M. // *EMBO J.* 1989. V. 8. № 3. P. 973–980.
81. Raynal A., Friedmann A., Tuphile K., Guerineau M., Pernodet J.L. // *Microbiol.* 2002. V. 148. № 1. P. 61–67.
82. Smokvina T., Mazodier P., Boccard F., Thompson C.J., Guérineau M. // *Gene.* 1990. V. 94. № 1. P. 53–59.
83. Combes P., Till R., Bee S., Smith M.C. // *J. Bact.* 2002. V. 184. № 20. P. 5746–5752.
84. Raynal A., Tuphile K., Gerbaud C., Luther T., Guérineau M., Pernodet J.L. // *Mol. Microbiol.* 1998. V. 28. № 2. P. 333–342.
85. August P.R., Tang L., Yoon Y.J., Ning S., Müller R., Yu T.W., Taylor M., Hoffmann D., Kim C.G., Zhang X., et al. // *Chem. Biol.* 1998. V. 5. № 2. P. 69–79.
86. Fernández-Martínez L.T., Bibb M.J. // *Sci. Rep.* 2014. V. 4. № 1. P. 1–6.
87. Ouedraogo J.P., Arentshorst M., Nikolaev I., Barends S., Ram A.F. // *App. Microbiol. Biotech.* 2015. V. 99. P. 10083–10095.
88. Monteilhet C., Perrin A., Thierry A., Colleaux L., Dujon B. // *Nucl. Acid. Res.* 1990. V. 18. № 6. P. 1407–1413.
89. Niu Y., Tenney K., Li H., Gimble F.S. // *J. Mol. Biol.* 2008. V. 382. № 1. P. 188–202.
90. Siegl T., Petzke L., Welle E., Luzhetskyy A. // *App. Microbiol. Biotech.* 2010. V. 87. P. 1525–1532.
91. Lu Z., Xie P., Qin Z. // *Acta Biochim. Biophys. Sin.* 2010. V. 42. № 10. P. 717–721.
92. Murakami T., Holt T.G., Thompson C.J. // *J. Bact.* 1989. V. 171. № 3. P. 1459–1466.
93. Zhao Y., Li G., Chen Y., Lu Y. // *Biomol.* 2020. V. 10. № 5. P. 734.
94. Muth G., Nußbaumer B., Wohlleben W., Pühler A. // *Mol. Genl. Gen. MGG.* 1989. V. 219. P. 341–348.
95. Li D., Zhou H., Zeng X. // *Cell Biol. Toxic.* 2019. V. 35. P. 403–406.
96. Li L., Wei K., Zheng G., Liu X., Chen S., Jiang W., Lu Y. // *App. Envir. Microbiol.* 2018. V. 84. № 18. P. 18.
97. Tao W., Yang A., Deng Z., Sun Y. // *Front. Microbiol.* 2018. V. 9. P. 1660.
98. Barrangou R., Marraffini L. // *Cell.* 2014. V. 54. P. 234–244.
99. Barrangou R., Brouns S.J., Charpentier E., Haft D.H., Horvath P., Moineau S., Mojica F.J., Terns R.M., Terns M.P., White M.F., et al. // *Nat. Rev. Microbiol.* 2015. V. 13. № 11. P. 722–736.
100. Yosef I., Goren M.G., Qimron U. // *Nucl. Acid. Res.* 2012. V. 40. № 12. P. 5569–5576.
101. Ouedraogo J.P., Arentshorst M., Nikolaev I., Barends S., Ram A.F. // *App. Microbiol. Biotech.* 2015. V. 99. P. 10083–10095.
102. Jinek M., Chylinski K., Fonfara I., Hauer M., Doudna J.A., Charpentier E.A. // *Sci.* 2012. V. 337. № 6096. P. 816–821.
103. Knott G.J., Doudna J.A. // *Sci.* 2018. V. 361. № 6405. P. 866–869.
104. Gleditsch D., Pausch P., Müller-Esparza H., Özcan A., Guo X., Bange G., Randau L. // *RNA Biol.* 2019. V. 16. № 4. P. 504–517.
105. Karvelis T., Gasiunas G., Young J., Bigelyte G., Silanskas A., Cigan M., Siksnys V. // *Gen. Biol.* 2015. V. 16. P. 1–13.
106. Yñíguez-Gutierrez A.E., Bachmann B.O. // *J. Med. Chem.* 2019. V. 62. № 18. P. 8412–8428.
107. Wei Y., Terns R.M., Terns M.P. // *Gen. Devel.* 2015. V. 29. № 4. P. 356–361.
108. Fonfara I., Richter H., Bratovič M., Le Rhun A., Charpentier E. // *Nature.* 2016. V. 532. № 7600. P. 517–521.
109. Wiedenheft B., Sternberg S.H., Doudna J.A. // *Nature.* 2012. V. 482. № 7385. P. 331–338.
110. Kormanec J., Rezuchova B., Homerova D., Csolleiova D., Sevcikova B., Novakova R., Feckova L. // *App. Microbiol. Biotech.* 2019. V. 103. P. 5463–5482.
111. Leskiw B.K., Bibb M.J., Chater K.F. // *Mol. Microbiol.* 1991. V. 5. № 12. P. 2861–2867.
112. Shao Z., Rao G., Li C., Abil Z., Luo Y., Zhao H. // *ACS Synt. Biol.* 2013. V. 2. № 11. P. 662–669.
113. Culp E.J., Yim G., Waglechner N., Wang W., Pawlowski A.C., Wright G.D. // *Nature Biotech.* 2019. V. 37. № 10. P. 1149–1154.
114. Zhang M.M., Wong F.T., Wang Y., Luo S., Lim Y.H., Heng E., Ang E.L., Zhao H. // *Nature Chem. Biol.* 2017. V. 13. № 6. P. 607–609.
115. Fu Y., Foden J.A., Khayter C., Maeder M.L., Reyon D., Joung J.K., Sander J.D. // *Nature Biotech.* 2013. V. 31. № 9. P. 822–826.
116. Hsu P.D., Scott D.A., Weinstein J.A., Ran F.A., Konermann S., Agarwala V., Li Y., Fine E.J., Wu X., Shalem O., et al. // *Nature Biotech.* 2013. V. 31. № 9. P. 827–832.
117. Wang K., Zhao Q.W., Liu Y.F., Sun C.F., Chen X.A., Burchmore R., Burgess K., Li Y.Q., Mao X.M. // *Front. Bioengin. Biotech.* 2019. V. 7. P. 304.
118. Cimmino T., Metidji S., Labas N., Le Page S., Musso D., Raoult D., Rolain J.M. // *New Microb. New Infect.* 2016. V. 12. P. 1–5.
119. Karvelis T., Gasiunas G., Young J., Bigelyte G., Silanskas A., Cigan M., Siksnys V. // *Gen. Biol.* 2015. V. 16. P. 1–13.
120. Yeo W.L., Heng E., Tan L.L., Lim Y.W., Lim Y.H., Hoon S., Zhao H., Zhang M.M., Wong F.T. // *Biotech. Bioengin.* 2019. V. 116. № 9. P. 2330–2338.
121. Chen P., Zhou J., Wan Y., Liu H., Li Y., Liu Z., Wang H., Lei J., Zhao K., Zhang Y., Wang Y., Zhang X., Yin L. // *Gen. Biol.* 2020. V. 21. № 1. P. 1–13.
122. Hoff G., Bertrand C., Piotrowski E., Thibessard A., Leblond P. // *Sci. Rep.* 2018. V. 8. № 1. P. 1–11.
123. Tong Y., Whitford C.M., Robertsen H.L., Blin K., Jørgensen T.S., Klitgaard A.K. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2019. V. 116. P. 20366–20375.
124. Holmes D.J., Caso J.L., Thompson C.J. // *EMBO J.* 1993. V. 12. № 8. P. 3183–3191.
125. Murakami T., Holt T.G., Thompson C.J. // *J. Bact.* 1989. V. 171. № 3. P. 1459–1466.
126. Gaded V., Anand R. // *RSC Advan.* 2018. V. 8. № 42. P. 23567–23577.
127. Sklenak S., Yao L., Cukier R.I., Yan H. // *J. Amer. Chem. Soc.* 2004. V. 126. № 45. P. 14879–14889.
128. Venkatesh J., Kumar P., Krishna P.S.M., Manjunath R., Varshney U. // *J. Biol. Chem.* 2003. V. 278. № 27. P. 24350–24358.
129. Morita R., Nakane S., Shimada A., Inoue M., Iino H., Wakamatsu T., Fukui K., Nakagawa N., Kuramitsu S. // *J. Nucl. Acid.* 2010. V. 2010. P. 1–32.
130. Wozniak K.J., Simmons L.A. // *Nat. Rev. Microbiol.* 2022. V. 20. № 8. P. 465–477.
131. Schaaper R.M. // *J. Biol. Chem.* 1993. V. 268. № 32. P. 23762–23765.
132. Schormann N., Ricciardi R., Chattopadhyay D. // *Prot. Sci.* 2014. V. 23. № 12. P. 1667–1685.

УДК 571.27

Тирозинфосфатаза CD45 – регулятор иммунитета и потенциальный эффектор CAR T-терапии

Д. В. Волков, В. М. Степанова, Ю. П. Рубцов, А. В. Степанов, А. Г. Габиров*

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

*E-mail: gabibov@gmail.com

Поступила в редакцию 10.08.2023

Принята к печати 12.09.2023

DOI: 10.32607/actanaturae.25438

РЕФЕРАТ Общий лейкоцитарный антиген CD45 – рецепторная тирозинфосфатаза и один из самых представленных антигенов на поверхности клеток крови – ключевой участник ранних этапов передачи сигналов от рецепторов большинства типов иммунных клеток. Нарушения экспрессии гена и дисбаланс изоформ CD45 часто являются причиной иммунодефицитных, аутоиммунных и онкологических заболеваний. Несмотря на долгую историю изучения структуры и функций CD45, молекулярные механизмы участия CD45 в передаче сигнала T-клеточного рецептора и химерных антигенных рецепторов изучены не полностью. Понимание структурных особенностей CD45, а также роли фосфатазы в регуляции активации клеток иммунной системы крайне важно для изучения молекулярного патогенеза онкологических заболеваний и вклада CD45 в функционирование лимфоцитов и T-клеток, модифицированных химерными антигенными рецепторами.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА CD45, T- и B-лимфоциты, T-клеточный рецептор, онкологические заболевания, химерный антигенный рецептор.

ВВЕДЕНИЕ

Тирозинфосфатазу человека CD45 (Protein tyrosine phosphatase, PTP) кодирует ген *PTPRC*, который содержит 35 охарактеризованных экзонов, три из которых (4–6) [1, 2] имеют гомологичные энхансеры и сайленсеры альтернативного сплайсинга пре-мРНК. Несмотря на теоретически большое разнообразие возможных вариантов, у человека обнаружены только шесть изоформ CD45: RO (экзоны 3, 7, 8), RA (экзоны 3, 4, 7, 8), RB (экзоны 3, 5, 7, 8), RAB (экзоны 3, 4, 5, 7, 8), RBC (экзоны 3, 5–8) и RABC (экзоны 3–8) (рис. 1А). Изоформы CD45 представлены на всех клетках гемопоэтического происхождения (за исключением безъядерных эритроцитов и тромбоцитов), причем количество CD45 коррелирует со степенью дифференцировки клеток [3, 4] (рис. 1Б).

Внеклеточная часть CD45 состоит из пяти структурных областей. N-Концевая область вытянута и сильно гликозилирована. Именно она определяет изоформу рецептора. Остальные участки внеклеточного домена CD45, общие для всех изоформ, – это три домена фибронектина типа III и об-

ласть, содержащая пять консервативных остатков цистеина. Важно отметить, что изоформа CD45 регулирует чувствительность T-клеток к активации при распознавании антигена. Предполагают, что из-за большого объема и структурной «жесткости» CD45 выталкивается из центральной области при формировании иммунологического синапса (ИС) при сближении мембран антигенпрезентирующих (АПК) и T-клеток [5]. Количество и тип изоформ CD45 в T-клетках изменяются в зависимости от степени их дифференцировки – в наивных и покоящихся клетках преимущественно представлены более крупные изоформы CD45. В свою очередь, активированные T-клетки синтезируют изоформы CD45, в которых отсутствует большинство или все домены, кодируемые вариabельными экзонами [2]. Гликопротеин CD45 содержит один трансмембранный домен (рис. 1В) и три внутриклеточных: клиновидный, D1 и D2. Frederick C.A. и соавт. показали, что фосфатазной активностью обладает только проксимальный домен D1 (ранее установили, что D2 необходим для функционирования фосфатазы в живых клетках) [6, 7].

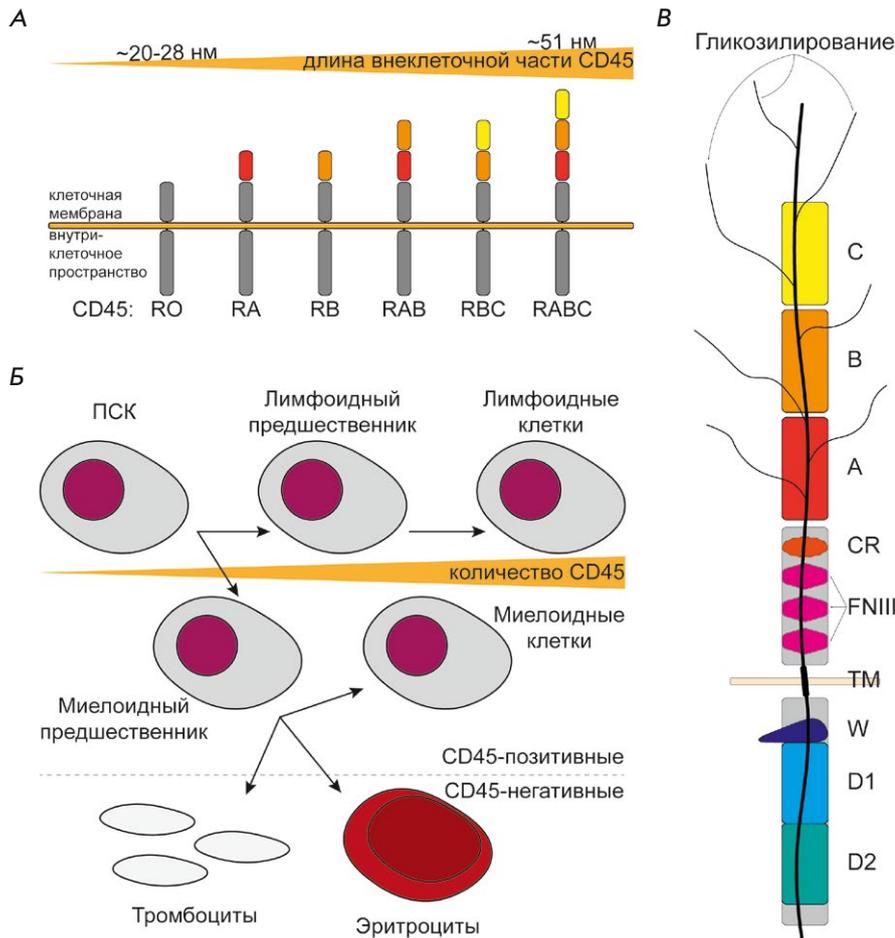


Рис. 1. Структура и распространенность изоформ CD45 в клетках крови. А – у человека найдены 6 основных изоформ CD45, которые отличаются по составу внеклеточной части в результате альтернативного сплайсинга пре-мРНК гена *PTPRC*; Б – CD45 локализован на мембране всех клеток гемopoэтического происхождения, за исключением тромбоцитов и эритроцитов. В процессе дифференцировки клеток количество рецептора увеличивается; В – структура CD45RABC. ПСК – плюрипотентная стволовая клетка; А, В, С – внеклеточные участки CD45, которые определяют изоформу; CR (cysteine rich region) – богатая цистеином область; FNIII (fibronectin type III) – домены фибронектина типа III; TM – трансмембранный домен; W – клиновидный домен; D1 – домен с фосфатазной активностью; D2 – домен, необходимый для функционирования CD45 в клетке

ФУНКЦИИ CD45 В КЛЕТКАХ ИММУННОЙ СИСТЕМЫ

Роль и функции CD45 в Т-клетках

Участие CD45 в активации клеток иммунной системы впервые было продемонстрировано для сигнального каскада Т-клеточного рецептора (ТКР). Анализ Т-клеток, не экспрессирующих CD45, показал, что эта фосфатаза важна на начальной стадии передачи сигнала от ТКР [8] (рис. 2). В неактивированной Т-клетке CD45 дефосфорилирует тирозинкиназу Lck (Protein tyrosine kinase, PTK) и субъединицу CD3 ζ комплекса CD3/ТКР. Lck – основной субстрат фосфатазы CD45, которая может дефосфорилировать как ингибирующий тирозин (Y505) на С-конце киназы, так и активирующий тирозин (Y394) [9, 10]. При дефосфорилировании ингибирующего тирозина Y505 CD45 конкурирует с тирозинкиназой Csk, которая ингибирует Lck [11]. A. Courtney с коллегами исследовали двоякую функцию фосфатазы и пришли к выводу, что CD45 регулирует силу и частоту поступающего через ТКР сигнала, действуя на разные субстраты. Изменяя активность CD45, они обнаружили, что фосфатаза поддерживает значительное

количество Lck в активном состоянии, но препятствует активации CD3 ζ . Детальное изучение динамики формирования иммунного синапса показало, что перед активацией комплекс ТКР имеет неактивную конформацию и не взаимодействует с главным комплексом гистосовместимости (Major histocompatibility complex, MHC) I или II класса. В это время CD45 ингибирует привлечение киназы Csk [12], а также дефосфорилирует CD3 ζ и Lck (рис. 2А). При взаимодействии клеток молекулы CD45 и Lck сначала привлекаются в центральный надмолекулярный кластер активации (Central supramolecular activation cluster, cSMAC) с помощью ТКР. Однако в процессе формирования ИС, CD45 «выталкивается» в дистальный надмолекулярный кластер активации (Distal supramolecular activation cluster, dSMAC) [13–17] (рис. 2Б). По-видимому, исключение CD45 из ИС связано с размерами молекулы, а также с высоким гликозилированием и сиализированием [18–20] (при этом сокращение эктодомена CD45 увеличивает совместную локализацию фосфатазы и ТКР и снижает активность последнего [5, 20–23]). Кроме того, удаление CD45 из центра ИС необходи-

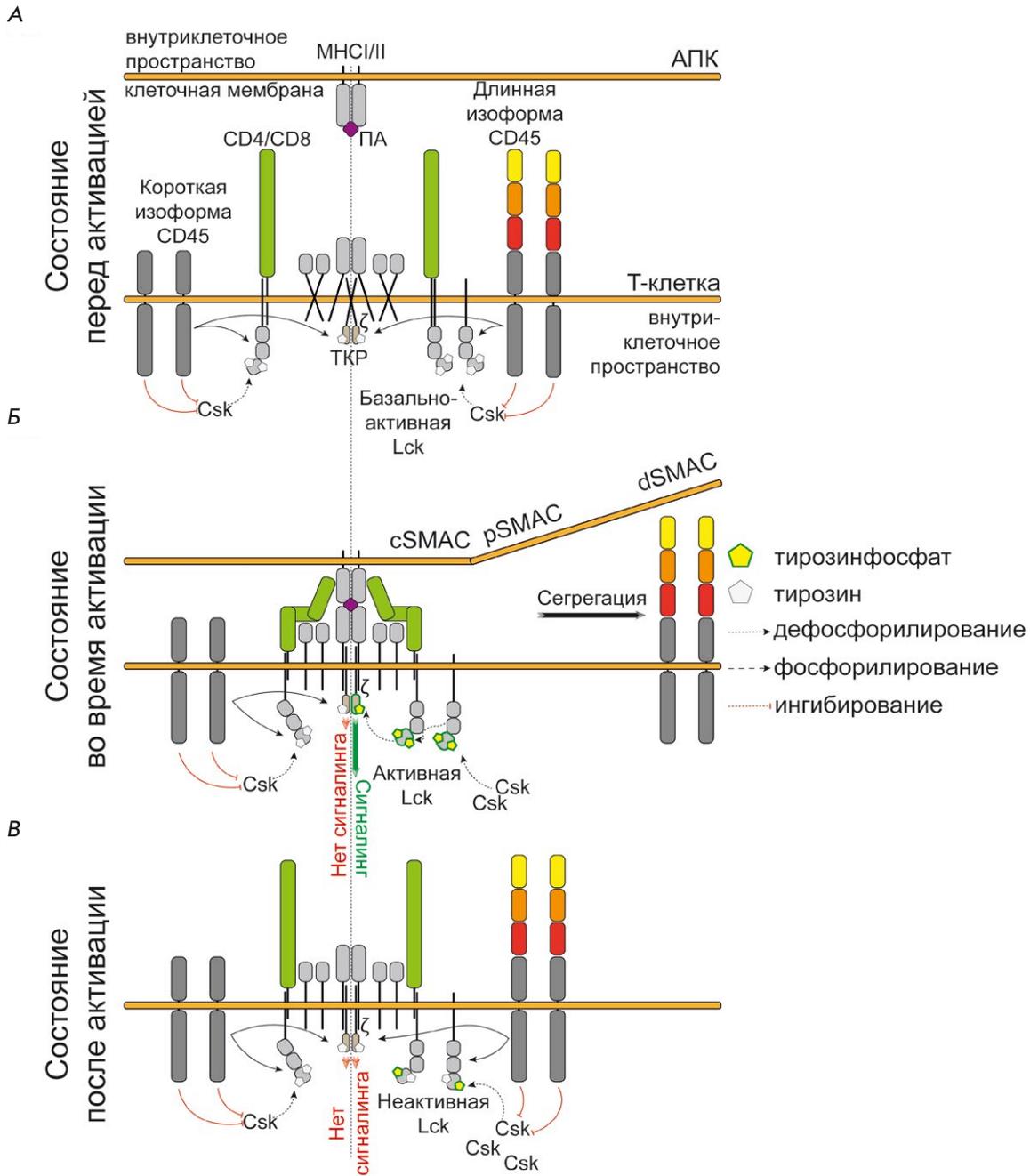


Рис. 2. Роль CD45 в передаче сигнала активации Т-клеточного рецептора. Показаны стадии активации Т-клетки – до активации (А), активация (Б) и завершение активации (В). В процессе цикла активации меняется состав и фосфорилирование участников ИС – в начале (А) киназа Lck находится в состоянии базальной активности за счет дефосфорилирования фосфатазой CD45, превалирующего над фосфорилированием киназой Csk; в состоянии активации (Б) CD45 «сегрегируется» в dSMAC, за счет ригидной и объемной структуры (длинные изоформы), а Lck переходит в активную форму благодаря аутофосфорилированию и превалирующей над Csk концентрации, тем самым фосфорилируется CD3 ζ , что обеспечивает дальнейший сигналинг; в это время синтезируются короткие изоформы CD45, постепенно проникающие в cSMAC, и там же накапливается Csk, что приводит к переходу Lck в неактивную форму и окончанию сигналинга (В). МНС I/II – главный комплекс гистосовместимости I или II класса; АПК – антигенпрезентирующая клетка; ПА – презентированный антиген; ζ – CD3 ζ ; ТКР – Т-клеточный рецептор; Lck, Csk – протеинкиназы; cSMAC, pSMAC, dSMAC – central, peripheral, distal supramolecular activation cluster – центральный, периферический, дистальный надмолекулярный кластер активации

мо, чтобы в центральной части синапса равновесие сдвинулось в сторону киназ. В результате изменения баланса возможным становится фосфорилирование CD3 ζ , что обеспечивает проведение сигнала активации ТКР. Для завершения цикла активации в области ИС начинают скапливаться молекулы Csk и изоформа CD45RO [2], которая постепенно проникает в центральную область ИС и смещает равновесие между киназами и фосфатазами в сторону фосфатаз, дефосфорилирует CD3 ζ и активирующий тирозин Lck (рис. 2B). Сигнал ослабевает, и состав изоформ CD45 меняется в сторону увеличения их длины и объема, а Lck снова возвращается в состояние базальной активности.

Видимо, за счет такого механизма регуляции ТКР CD45 препятствует спонтанной активации Т-клеток, предотвращая гиперактивацию и ее негативные последствия [24], индуцированные низкоаффинными антигенами или в отсутствие антигена. J. Zikherman с коллегами изменяли уровень синтеза CD45 и Csk и показали, что баланс этих молекул играет ключевую роль в развитии Т-клеток. В процессе созревания клеток в тимусе на этапах позитивной и негативной селекции регулируются базальная и индуцибельная передачи сигналов от ТКР. CD45 играет одновременно позитивную и негативную роли при распознавании антигена. Изменение уровня Csk регулирует только базальную передачу сигнала. При этом одинаковое уменьшение количеств Csk и CD45 разнонаправленно изменяло базальный сигналинг на одну и ту же величину. Таким образом, колебания уровня CD45 необходимы для правильного осуществления двух процессов: регуляции индуцибельного сигналинга при позитивной и негативной селекции и компенсации Csk при поддержании базальной активности Т-клеток [25, 26]. На мышцах с дефицитом CD45, с делетированными экзонами 6 [27], 9 [28] или 12 [29], была показана ведущая роль CD45 в переходе двойных негативных (Double negative, DN, CD4⁻CD8⁻) в двойные позитивные (Double positive, DP, CD4⁺CD8⁺) тимоциты [30]. Начало и постепенные изменения в синтезе корцепторов CD4 и CD8 в процессе дифференцировки тимоцитов зависят от сигналов, генерируемых пре-ТКР и ТКР. Для осуществления этих фенотипических и функциональных изменений необходимо участие CD45. Дефицит Lck, являющейся важным участником ТКР сигналинга под контролем CD45, проявился похожим на отсутствие CD45 образом [31] – у мышей также был нарушен переход Т-клеток из двойных негативных в двойные позитивные [30], а количество зрелых периферических Т-лимфоцитов не превышало 5–10% от уровня животных дикого типа [27, 28].

Роль и функции CD45 в В-клетках

В В-клетках CD45 также играет важную роль в модуляции сигнала, передаваемого через ВКР, и необходим для нормального развития В-клеток и адекватной реакции на антиген. У мышей с дефицитом CD45 нарушено полноценное созревание В-клеток [27, 28, 32]. Интересно, что количество периферических В-клеток при этом не уменьшается, но заметно меняется их фенотип. В селезенке значительно снижается популяция зрелых В-клеток (IgD^{high} IgM^{low}), а также популяция, несущая маркер CD23 и молекулы МНС II класса [32]. При мутации в экзоне 9 CD45 у мышей увеличивается количество периферических незрелых В-клеток (IgM^{high}) [28]. Важно отметить, что В-клетки без CD45 не пролиферировали в ответ на стимуляцию ВКР (поликлональными анти-IgD/анти-IgM-антителами), однако при стимуляции других путей активации (липополисахаридом (ЛПС), интерлейкином 4 (ИЛ-4) и моноклональным анти-CD40-антителом) пролиферация CD45-негативных В-клеток была такой же, как в контрольных клетках.

J. Cyster и соавт. [33] обнаружили, что naive В-клетки, изолированные из мышей с дефицитом CD45, в ответ на стимуляцию антигеном меньше использовали киназный каскад ERK/RSK/EGR1 и показывали низкий уровень мобилизации внутриклеточного Ca²⁺. Проявилась разница и в маркерах активации CD86 и CD54, уровень которых у CD45-негативных В-клеток был ниже, чем у CD45-позитивных. Однако при стимуляции клеток фоболовым эфиром в сочетании с иономицином было показано, что CD45-негативные и CD45-позитивные В-клетки активируются одинаково.

Важно отметить роль CD45 в герминальных центрах и аутоиммунных заболеваниях. Показано, что высокоаффинные аутореактивные В-клетки не проходят селекцию в костном мозге нативных и CD45-дефицитных мышей. Однако потеря CD45 позволила низкоаффинным аутореактивным В-клеткам пройти позитивный отбор. В процессе селекции из-за отсутствия CD45 такие В-клетки не запускали каскад ERK/RSK/EGR1, а мобилизация внутриклеточного Ca²⁺ в ответ на аутоантиген у них была значительно ниже, чем у высокоаффинных, что защитило аутореактивные клетки от элиминирования. Таким образом, CD45 по-разному регулирует активацию ВКР и ТКР. В отличие от ТКР, увеличение количества CD45 оказывает положительный эффект на сигналинг ВКР, усиливает активацию киназных каскадов ERK/RSK/EGR1 и PI3K/АКТ/mTOR, а также мобилизацию внутриклеточного Ca²⁺ [34]. Киназы семейства Src (Src family kinases, SFK), участву-

ющие в каскаде ВКР, при увеличении синтеза CD45 активнее дефосфорилируются по ингибирующему тирозину (Y507), в то время как количество фосфорилированного активирующего тирозина (Y416) у них остается на прежнем уровне [35]. Уменьшение количества CD45 не влияет на уровень Ca^{2+} , так как в В-клетках присутствует фосфатаза CD148, частично дублирующая функции CD45 [35].

Роль и функции CD45 в макрофагах

Адгезией лейкоцитов к внеклеточному матриксу и другим клеткам управляют белки семейства интегринов [36, 37]. В регуляции опосредованного интегрином фагоцитоза, а также дифференцировки и активации макрофагов, вызванных адгезией, принимают участие мишени фосфатазы CD45 – SFK [38–40]. Т. Roach с коллегами показали, что в отсутствие CD45 нарушалась регуляция интегрин-опосредованной адгезии и повышалась активность PTK Hck и Lyn – SFK, активных в клетках миелоидного происхождения [41]. Опосредованная CD45 регуляция киназ Hck и Lyn в макрофагах отличается от регуляции SFK в Т- и В-клетках, где активность CD45 необходима в большей степени для дефосфорилирования ингибирующих тирозинов на С-концах Lck и Fyn и повышения их активности [42–44]. Одновременное увеличение фосфорилирования С-концевых тирозинов и активности SFK в CD45-негативных макрофагах указывает на то, что фосфатаза ингибирует SFK. Вероятно, это происходит за счет дефосфорилирования автокаталитического тирозина.

Роль и функции CD45 в нейтрофилах

В экспериментах на мышцах с дефицитом киназ Hck, Fgr и Lyn [45] показано, что потеря SFK снижает адгезию нейтрофилов и уровень посттрансляционных модификаций белков. Нарушалась Rab27a-зависимая мобилизация эластазы нейтрофилов и везикул, содержащих интегрин $\alpha3\beta1$ и $\alpha6\beta1$. Это привело к нарушению и миграции нейтрофилов через базальную мембрану сосудов, и экстравазации при воспалении [45]. Hck и Fgr вовлечены в хемотаксис-зависимый окислительный стресс и полимеризацию F-актина [46]. SFK также связаны с регуляцией транскрипции мРНК многих важных цитокинов и хемокинов, которые синтезируются нейтрофилами конститутивно или при стимуляции (интерлейкинами-1, -6, -8, -10, -12; фактором некроза опухоли- α (ФНО- α); гранулоцитарно-макрофагальным колониестимулирующим фактором и др.) [47, 48]. W. Liles и соавт. [49] показали, что окислительный стресс, индуцированный активатора-

ми нейтрофилов, усиливался при активации CD45 с помощью антител. В свою очередь, L. Harvath с коллегами [50] продемонстрировали, что CD45 взаимодействует с молекулами, ассоциированными с рецепторами лейкотриена B4 и компонента C5a системы комплемента, и регулирует хемотаксис нейтрофилов в ответ на стимуляцию соответствующими лигандами. Н. Gao с коллегами [51] обнаружили, что колокализация рецепторов CD45 и Fc γ RIIa приводит к снижению антителозависимой цитотоксичности нейтрофилов, но одновременно повышает продукцию ИЛ-6 при активации через Fc γ RIIa. J. Zhu с коллегами [52] показали, что CD45 в нейтрофилах усиливает сигналинг G-белок-связанных рецепторов, повышает мобилизацию Ca^{2+} и активность киназ PI3K и ERK.

Роль и функции CD45 в дендритных клетках

Дендритные клетки (ДК) играют важную роль в обеспечении связи между врожденным и адаптивным иммунитетом. CD45 участвует в формировании этих функциональных различий, так как его специфические изоформы (CD45RB) маркируют разные популяции ДК. Чужеродные молекулы связываются с паттернраспознающими рецепторами (в число этих рецепторов входят TLR), что запускает программу созревания ДК. Этот процесс определяет дальнейшую ДК-опосредованную активацию наивных Т-клеток вместе с их ответом на презентуемый антиген [53]. Предполагают, что ранние этапы сигнальных каскадов TLR регулируют SFK [54]. Сигнал от TLR приводит к увеличению трансляции костимулирующих молекул, которые необходимы для активации наивных Т-клеток, а также секреции провоспалительных цитокинов, таких, как ИЛ-12, ИЛ-6 и ФНО- α , влияющих на тип генерируемых эффекторных Т-клеток [55]. TLR является одним из ключевых компонентов активации ДК. Хотя основные элементы сигнальных путей этих рецепторов известны, вклад SFK подробно не описан. Сравнительный анализ дендритных клеток, изолированных из нативных и CD45-дефицитных мышей [56], показал, что CD45 не требуется для развития ДК, но влияет на их созревание, вызванное агонистами TLR. CD45 влияет на фосфорилирование Lyn, Hck и Fyn и снижает ЛПС-индуцированную активацию Lyn. CD45 позитивно влиял на TLR4-индуцированную секрецию провоспалительных цитокинов и интерферона- β (ИФН- β). Также CD45 по-разному влиял на активацию TLR – негативно (TLR2 и TLR9 или MyD88-зависимая продукция цитокинов) и позитивно (TLR3 и TLR4 или MyD88-независимая секреция ИФН- β) [56].

Роль и функции CD45 в NK-клетках

Многие из известных рецепторов NK-клеток (CD16, NK1.1, NKG2D, NKp44 и др.) ассоциированы с внутриклеточными белками FcεRIγ, DAP10 или DAP12, которые содержат иммунорецепторные тирозиновые мотивы активации (Immunoreceptor tyrosine-based activation motif, ITAM) [57]. CD45 регулирует активность SFK, которые фосфорилируют остатки тирозина в ITAM и иницируют активирующий сигнальный каскад [58]. D. Hesslein с коллегами показали, что CD45-негативные NK-клетки при стимуляции рецепторов Lu49H и NKG2D были лишь на 20% менее цитотоксичными, чем контрольные CD45-позитивные NK, тогда как при стимуляции рецептора CD16 различия отсутствовали. Однако секреция цитокинов и хемокинов была значительно ниже в CD45-негативных NK [59]. Таким образом, CD45 может по-разному влиять на один и тот же сигнальный путь активации. Вероятно, сила и/или продолжительность сигнала определяют вовлеченность CD45. Высвобождение цитотоксических гранул происходит в течение минут после активации рецептора, в непосредственной близости от многих сигнальных компонентов клетки, задействованных в активации. В свою очередь, секреция цитокинов [60] – более длительный процесс, включающий в себя передачу сигнала активации транскрипции, синтез и созревание мРНК, трансляцию и секрецию. Таким образом, высвобождение цитокинов требует устойчивой сигнализации, в то время как для цитотоксического ответа NK достаточно кратковременной стимуляции [61].

Роль CD45 в онкологических заболеваниях

В гемопоэтических опухолевых заболеваниях уровень синтеза CD45 зависит от типа рака. Так, J. Feuillard с коллегами определили, что при хроническом лимфобластном лейкозе (ХЛЛ) атипичные опухолевые клетки и малое количество CD45 на их поверхности являются положительным маркером выживаемости пациентов [62]. Потерю CD45 обнаружили у пациентов с лимфомой Ходжкина [63] и детским острым лимфобластным лейкозом (ОЛЛ) [64]. Более высокий уровень синтеза CD45 у пациентов с ОЛЛ ассоциирован с повышенной вероятностью рецидива опухоли [65]. Участие CD45 в патогенезе множественной миеломы (ММ) остается неясным [66]. У пациентов с ММ одновременно обнаруживались как CD45-позитивные, так и CD45-негативные опухолевые клетки [67]. Увеличение экспрессии CD45 повышает чувствительность клеток ММ к 17-диметиламиноэтиламино-17-деметоксигельданамицину, ингибитору шаперона HSP90 [67], и различным апоптотическим стиму-

лам, например, окислительному стрессу и стрессу эндоплазматического ретикулума [68]. Независимо от наличия CD45 в клетках ММ, стимуляция ИЛ-6 способна запускать сигнальный каскад JAK/STAT, однако пролиферировать после активации способны только CD45-позитивные клетки [69]. Общая выживаемость пациентов с преобладанием CD45-позитивных клеток ММ была ниже, чем при преобладании CD45-негативных клеток [70]. С другой стороны, при диффузной В-крупноклеточной лимфоме (ДВКЛ) роль CD45 охарактеризована существенно лучше. Фосфатаза CD45 служит рецептором галектина 3 [71], транскрипция гена которого повышена в клетках ДВКЛ [72]. Галектин 3 обладает антиапоптотическим действием [73]. Связываясь с CD45, галектин 3 остается закрепленным на клеточной мембране. Показано, что его удаление увеличивает количество апоптотических опухолевых клеток [71].

Решающим фактором устойчивости солидных опухолей к действию иммунитета является иммуносупрессивное микроокружение опухоли (Tumor microenvironment, ТМЕ). В микроокружении опухоли можно выделить несколько слоев, в которые входят клетки разных типов, причем довольно значительную часть их составляют иммунные клетки миелоидного происхождения, которые под действием опухолевых сигналов становятся иммуносупрессивными (Myeloid-derived suppressor cells, MDSC) [74, 75]. Для MDSC характерны поверхностные маркеры CD11b и Gr-1. Основная функция этих клеток – подавление эффекторных функций NK- и Т-клеток [76, 77]. Показано также, что MDSC усиливают иммуносупрессивную активность АПК [78], которые могут подавлять активность Т-клеток. S. van Vliet с коллегами показали, что макрофаги и ДК ингибируют эффекторные Т-клетки с помощью MGL (Macrophage galactose-type lectin), одного из лектиновых рецепторов С-типа [79]. Взаимодействие MGL с CD45 эффекторных Т-клеток снижало их пролиферацию и приводило к апоптозу. Обнаружено также [80], что рецептор маннозы на ДК взаимодействует с CD45 на цитотоксических Т-клетках и приводит к их ингибированию, перепрограммированию и развитию иммунологической толерантности.

ВЛИЯНИЕ CD45 НА АКТИВНОСТЬ CAR

Химерные антигенные рецепторы (Chimeric antigen receptors, CAR) – это рекомбинантные рецепторы, которые позволяют нацеливать клетки иммунной системы на поверхностные опухоль-ассоциированные антигены (Tumor-associated antigen, TAA) [81]. CAR – это трансмембранная молекула, которая

включает антигенраспознающий домен (как правило, это одноцепочечный переменный фрагмент антитела), трансмембранный домен, внутриклеточные костимулирующие домены (наиболее используемые – CD28, 4-1BB, OX40) и сигнальный домен (обычно CD3 ζ) [82]. На данный момент известно несколько поколений CAR, которые различаются количеством костимулирующих доменов либо набором дополнительных внутриклеточных доменов [83]. Несмотря на схожую функциональность, активация CAR и ТКР по-разному влияет на пролиферацию клеток и цитотоксический ответ [84].

Структурные и функциональные различия ТКР и CAR

В отличие от ТКР, которые активируют Т-клетки после распознавания от 1 до 10 молекул МНС, для активации CAR требуется тысячи молекул поверхностного ТАА [84, 85]. Существует множество различий между CAR и ТКР, которые объясняют повышенный порог количества антигена, необходимый для эффективной активации Т-клеток. Во-первых, средство рецептора к лиганду: ТКР связывают МНС с антигеном с микромолярным средством [85], а CAR связывают свои лиганды с наномолярным средством [86]. Повышенная аффинность связывания CAR изменяет кинетику выключения рецептора, способность к многократной активации и механорецепторную функцию – свойства, которые, как считается, вносят свой вклад в способность ТКР воспринимать низкие уровни лиганда [87, 88]. После взаимодействия с антигеном ТКР и связанные с ним CD3 δ , CD3 ϵ , CD3 γ и CD3 ζ собирают многокомпонентные сигнальные комплексы [89, 90]. CAR взаимодействуют с некоторыми сигнальными белками ТКР, однако количественные и качественные изменения в сборке сигнальных комплексов и структуре ИС меняют чувствительность к антигенам [84, 91]. Визуализация синапсов CAR и ТКР показала, что CAR-синапсы в меньшей степени зависят от взаимодействия молекулы межклеточной адгезии 1 с интегрином α L β 2 и для них характерна измененная, по сравнению с ТКР, локализация Lck [92–94]. Актиновые кольца в CAR-синапсе значительно меньше, чем в ТКР, что обуславливает более быструю передачу механических сигналов и диссоциацию CAR Т-клетки от клетки-мишени. Сигнал в CAR-синапсе инициируется быстрее и с большей интенсивностью, в то время как продолжительность сигнала короче, чем у ТКР-синапса. Это ускоряет вовлечение CAR Т-клетки во взаимодействие с клеткой-мишенью, вызывает быстрое высвобождение цитотоксических гранул в ИС и стремительный цитолиз опухолевых клеток [94].

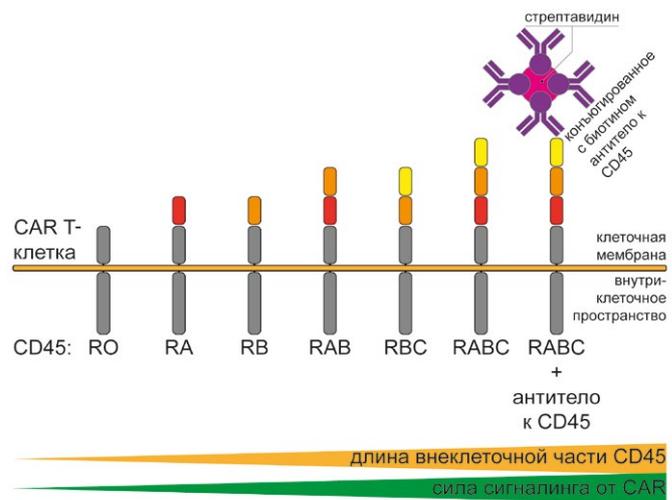


Рис. 3. Влияние длины внеклеточной части CD45 на сигналинг CAR. За счет увеличения длины внеклеточной части CD45 усиливается сегрегация молекулы во время активации CAR Т-клетки и, соответственно, повышается сигналинг CAR. CAR Т-клетка – chimeric antigen receptor modified T cell – Т-клетка, модифицированная химерным антигенным рецептором

Влияние CD45 на проведение сигнала при активации CAR

Выведение молекул CD45 в дистальную область ИС облегчает фосфорилирование Lck и CD3 ζ и обеспечивает тесный контакт комплекса рецептор–антиген [5]. Karlsson и соавт. показали, что исключение CD45 также необходимо для активации CAR19, что аналогично активации ТКР [95]. Логично, что активация и CAR, и ТКР зависит от исключения CD45 из области формирования ИС. И в том, и в другом случае важную роль в проведении сигнала должны играть субстраты CD45 – SFK. Установлено как влияют размер CAR, расстояние до узнаваемого эпитопа ТАА и длина CD45 на проведение сигналов от CAR и активацию CAR19 Т-клеток [96]: при увеличении внеклеточного домена CAR снижается выведение CD45 из области ИС, фосфорилирование участников сигналинга и выброс провоспалительных цитокинов. Причем такая же зависимость наблюдается и при изменении расстояния до узнаваемого эпитопа ТАА. Обратные последствия имеет увеличение длины CD45, причем не важно по какой причине: это верно и для различных изоформ CD45, и в случае увеличения объема молекулы с помощью специфических антител (рис. 3). Полученные данные подтверждают модель кинетической сегрегации для CAR Т-клеток [97], предложенную Karlsson в своих экспериментах [95].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Нарушения фосфорилирования – одна из множества причин опухолевых заболеваний. CD45 и другие фосфатазы играют положительную роль в онкогенезе, регулируя проонкогенные механизмы, поэтому они являются потенциальными кандидатами для таргетного элиминирования опухолей или для повышения их чувствительности к радио- или химиотерапии. Прогресс в исследованиях CD45 продолжается с участием новых методов разработки и скрининга ингибиторов CD45, а также технологий, позволяющих блокировать синтез и менять состав изоформ CD45 в первичных клетках крови человека (CRISPR/Cas9). Известные лиганды CD45 (pUL11, E3/49K) и их аналоги также считаются перспективными мишенями для терапии онкологических заболеваний. Показано значение синтеза CD45 опухолевыми клетками для прогнозирования клинического исхода у пациентов с ХЛЛ, ОЛЛ, ММ и ДВКЛ. Течение многих онкологических заболеваний также может зависеть от активности этой фосфатазы. Важным свойством CD45 является характерный состав изоформ, зависящий от дифференцировки клеток. Т-клетки с наивным фенотипом характеризуются наличием CD45RA, а фенотипы центральной и эффекторной памяти – содержат CD45RO-изоформы. Такое разделение позволяет легко отобрать интересующую популяцию Т-клеток и затем получить CAR

Т-клетки с заданными свойствами. Например, чтобы снизить вероятность возникновения реакции трансплантат против хозяина, можно использовать Т-клетки памяти, у которых отсутствует маркер CD45RA [98, 99]. Распространенность фосфатазы среди лимфоидных и миелоидных клеток, а также высокий уровень рецептора на мембране [4] делают CD45 крайне привлекательной мишенью для CAR Т-клеточной терапии как в случае гемопоэтических опухолей, так и при кондиционировании гемопоэза реципиента перед трансплантацией костного мозга. Наряду с остальными методами контроля активности CAR Т-клеток, идея регуляции активации CAR с помощью изменения длины CD45 является крайне перспективной [100, 101]. Последние разработки указывают на то, что при создании нового CAR необходимо учитывать соотношение размеров химерного рецептора, таргетированного антигена и CD45 [102]. Еще одна потенциальная возможность, связанная с улучшением CAR Т-клетки, – нокаут гена CD45. CD45 крайне важен при развитии и созревании Т-клеток, однако отсутствие CD45 на CAR Т-клетках может повысить безопасность адоптивной иммунотерапии за счет снижения вероятности развития побочных реакций, связанных с сигналингом ТКР. ●

*Работа выполнена при поддержке РФФ
(грант № 17-74-30019).*

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Lynch K.W., Weiss A. // J. Biol. Chem. 2001. V. 276. № 26. P. 24341–24347.
- Tong A., Nguyen J., Lynch K.W. // J. Biol. Chem. 2005. V. 280. № 46. P. 38297–38304.
- Dahlke M.H., Larsen S.R., Rasko J.E.J., Schlitt H.J. // Leuk. Lymphoma. 2004. V. 45. № 2. P. 229–236.
- Hermiston M.L., Xu Z., Weiss A. // Annu. Rev. Immunol. 2003. V. 21. № 1. P. 107–137.
- Chang V.T., Fernandes R.A., Ganzinger K.A., Lee S.F., Siebold C., McColl J., Jönsson P., Palayret M., Harlos K., Coles C.H., et al. // Nat. Immunol. 2016. V. 17. № 5. P. 574–582.
- Nam H.-J., Poy F., Saito H., Frederick C.A. // J. Exp. Med. 2005. V. 201. № 3. P. 441–452.
- Kashio N., Matsumoto W., Parker S., Rothstein D.M. // J. Biol. Chem. 1998. V. 273. № 50. P. 33856–33863.
- Trowbridge I.S., Thomas M.L. // Annu. Rev. Immunol. 1994. V. 12. № 1. P. 85–116.
- D’Oro U., Sakaguchi K., Appella E., Ashwell J.D. // Mol. Cell. Biol. 1996. V. 16. № 9. P. 4996–5003.
- Mustelin T., Taskén K. // Biochem. J. 2003. V. 371. № 1. P. 15–27.
- Chow L.M.L., Fournel M., Davidson D., Veillette A. // Nature. 1993. V. 365. № 6442. P. 156–160.
- Castro-Sanchez P., Teagle A.R., Prade S., Zamoyska R. // Front. Cell Dev. Biol. 2020. V. 8. P. 1–31.
- Dustin M.L. // Cancer Immunol. Res. 2014. V. 2. № 11. P. 1023–1033.
- Freiberg B.A., Kupfer H., Maslanik W., Delli J., Kappler J., Zaller D.M., Kupfer A. // Nat. Immunol. 2002. V. 3. № 10. P. 911–917.
- Leupin O., Zaru R., Laroche T., Müller S., Valitutti S. // Curr. Biol. 2000. V. 10. № 5. P. 277–280.
- Johnson K.G., Bromley S.K., Dustin M.L., Thomas M.L. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 2000. V. 97. № 18. P. 10138–10143.
- Davis S.J., Shaw A.S., Dustin M.L. // Semin. Immunol. 2000. V. 12. № 1. P. 5–21.
- Irles C., Symons A., Michel F., Bakker T.R., van der Merwe P.A., Acuto O. // Nat. Immunol. 2003. V. 4. № 2. P. 189–197.
- Burroughs N.J., Wülfing C. // Biophys. J. 2002. V. 83. № 4. P. 1784–1796.
- Cordoba S.-P., Choudhuri K., Zhang H., Bridge M., Basat A.B., Dustin M.L., van der Merwe P.A. // Blood. 2013. V. 121. № 21. P. 4295–4302.
- Carbone C.B., Kern N., Fernandes R.A., Hui E., Su X., Garcia K.C., Vale R.D. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 2017. V. 114. № 44. P. 9338–9345.
- Burroughs N.J., Lazic Z., van der Merwe P.A. // Biophys. J. 2006. V. 91. № 5. P. 1619–1629.
- Choudhuri K., Wiseman D., Brown M.H., Gould K., van der Merwe P.A. // Nature. 2005. V. 436. № 7050. P. 578–582.
- Courtney A.H., Shvets A.A., Lu W., Griffante G., Mollenauer M., Horkova V., Lo W.-L., Yu S., Stepanek O.,

- Chakraborty A.K., et al. // *Sci. Signal.* 2019. V. 12. № 604. P. 1–14.
25. McNeill L., Salmond R.J., Cooper J.C., Carret C.K., Cassidy-Cain R.L., Roche-Molina M., Tandon P., Holmes N., Alexander D.R. // *Immunity.* 2007. V. 27. № 3. P. 425–437.
26. Zikherman J., Jenne C., Watson S., Doan K., Raschke W., Goodnow C.C., Weiss A. // *Immunity.* 2010. V. 32. № 3. P. 342–354.
27. Kishihara K., Penninger J., Wallace V.A., Kündig T.M., Kawal K., Wakeham A., Timms E., Pfeffer K., Ohashi P.S., Thomas M.L., et al. // *Cell.* 1993. V. 74. № 1. P. 143–156.
28. Byth K.F., Conroy L.A., Howlett S., Smith A.J., May J., Alexander D.R., Holmes N. // *J. Exp. Med.* 1996. V. 183. № 4. P. 1707–1718.
29. Mee P.J., Turner M., Basson M.A., Costello P.S., Zamoyska R., Tybulewicz V.L.J. // *Eur. J. Immunol.* 1999. V. 29. № 9. P. 2923–2933.
30. Pingel S., Baker M., Turner M., Holmes N., Alexander D.R. // *Eur. J. Immunol.* 1999. V. 29. № 8. P. 2376–2384.
31. Molina T.J., Kishihara K., Siderovskid D.P., van Ewijk W., Narendran A., Timms E., Wakeham A., Paige C.J., Hartmann K.-U., Veillette A., et al. // *Nature.* 1992. V. 357. № 6374. P. 161–164.
32. Benatar T., Carsetti R., Furlonger C., Kamalia N., Mak T., Paige C.J. // *J. Exp. Med.* 1996. V. 183. № 1. P. 329–334.
33. Cyster J.G., Healy J.I., Kishihara K., Mak T.W., Thomas M.L., Goodnow C.C. // *Nature.* 1996. V. 381. № 6580. P. 325–328.
34. Zikherman J., Doan K., Parameswaran R., Raschke W., Weiss A. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2012. V. 109. № 1. P. 3–12.
35. Zhu J.W., Brdicka T., Katsumoto T.R., Lin J., Weiss A. // *Immunity.* 2008. V. 28. № 2. P. 183–196.
36. Springer T.A. // *Nature.* 1990. V. 346. № 6283. P. 425–434.
37. Hynes R.O. // *Cell.* 1992. V. 69. № 1. P. 11–25.
38. English B.K., Ihle J.N., Myracle A., Yi T. // *J. Exp. Med.* 1993. V. 178. № 3. P. 1017–1022.
39. Zaffran Y., Escallier J.C., Ruta S., Capo C., Mege J.L. // *J. Immunol.* 1995. V. 154. № 7. P. 3488–3497.
40. Lichtenberg U., Quintrell N., Bishop J.M. // *Oncogene.* 1992. V. 7. № 5. P. 849–858.
41. Roach T., Slater S., Koval M., White L., McFarland E.C., Okumura M., Thomas M., Brown E. // *Curr. Biol.* 1997. V. 7. № 6. P. 408–417.
42. Cahir McFarland E.D., Hurley T.R., Pingel J.T., Sefton B.M., Shaw A., Thomas M.L. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1993. V. 90. № 4. P. 1402–1406.
43. Shiroo M., Goff L., Biffen M., Shivnan E., Alexander D. // *EMBO J.* 1992. V. 11. № 13. P. 4887–4897.
44. Sieh M., Bolen J.B., Weiss A. // *EMBO J.* 1993. V. 12. № 1. P. 315–321.
45. Rohwedder I., Kurz A.R.M., Pruenster M., Immler R., Pick R., Eggersmann T., Klapproth S., Johnson J.L., Alsina S.M., Lowell C.A., et al. // *Haematologica.* 2020. V. 105. № 7. P. 1845–1856.
46. Fumagalli L., Zhang H., Baruzzi A., Lowell C.A., Berton G. // *J. Immunol.* 2007. V. 178. № 6. P. 3874–3885.
47. Cassatella M.A. // *Immunol. Today.* 1995. V. 16. № 1. P. 21–26.
48. Lloyd A.R., Oppenheim J.J. // *Immunol. Today.* 1992. V. 13. № 5. P. 169–172.
49. Liles W.C., Ledbetter J.A., Waltersdorph A.W., Klebanoff S.J. // *J. Immunol.* 1995. V. 155. № 4. P. 2175–2184.
50. Harvath L., Balke J.A., Christiansen N.P., Russell A.A., Skubitz K.M. // *J. Immunol.* 1991. V. 146. № 3. P. 949–957.
51. Gao H., Henderson A., Flynn D.C., Landreth K.S., Ericson S.G. // *Exp. Hematol.* 2000. V. 28. № 9. P. 1062–1070.
52. Zhu J.W., Doan K., Park J., Chau A.H., Zhang H., Lowell C.A., Weiss A. // *Immunity.* 2011. V. 35. № 5. P. 757–769.
53. Janeway C.A., Medzhitov R. // *Annu. Rev. Immunol.* 2002. V. 20. № 1. P. 197–216.
54. Byeon S.E., Yi Y.-S., Oh J., Yoo B.C., Hong S., Cho J.Y. // *Mediators Inflamm.* 2012. V. 2012. P. 1–18.
55. Medzhitov R. // *Nat. Rev. Immunol.* 2001. V. 1. № 2. P. 135–145.
56. Cross J.L., Kott K., Miletić T., Johnson P. // *J. Immunol.* 2008. V. 180. № 12. P. 8020–8029.
57. Lanier L.L. // *Curr. Opin. Immunol.* 2003. V. 15. № 3. P. 308–314.
58. Samelson L.E. // *Annu. Rev. Immunol.* 2002. V. 20. № 1. P. 371–394.
59. Hesslein D.G.T., Takaki R., Hermiston M.L., Weiss A., Lanier L.L. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2006. V. 103. № 18. P. 7012–7017.
60. Valitutti S., Dessing M., Aktories K., Gallati H., Lanzavecchia A. // *J. Exp. Med.* 1995. V. 181. № 2. P. 577–584.
61. Valitutti S., Müller S., Dessing M., Lanzavecchia A. // *J. Exp. Med.* 1996. V. 183. № 4. P. 1917–1921.
62. Rizzo D., Lotay A., Gachard N., Marfak I., Faucher J.-L., Trimoreau F., Guérin E., Bordessoule D., Jaccard A., Feuillard J. // *Am. J. Hematol.* 2013. V. 88. № 9. P. 747–753.
63. Ozdemirli M., Mankin H.J., Aisenberg A.C., Harris N.L. // *Cancer.* 1996. V. 77. № 1. P. 79–88.
64. Ratei R., Sperling C., Karawajew L., Schott G., Schrappe M., Harbott J., Riehm H., Ludwig W.-D. // *Ann. Hematol.* 1998. V. 77. № 3. P. 107–114.
65. Cario G., Rhein P., Mitlöhner R., Zimmermann M., Bandapalli O.R., Romey R., Moericke A., Ludwig W.-D., Ratei R., Muckenthaler M.U. // *Haematologica.* 2014. V. 99. № 1. P. 103–110.
66. Ishikawa H., Mahmoud M.S., Fujii R., Abroun S., Kawano M.M. // *Leuk. Lymphoma.* 2000. V. 39. № 1–2. P. 51–55.
67. Lin H., Kolosenko I., Björklund A.-C., Protsyuk D., Österborg A., Grandér D., Tamm K.P. // *Exp. Cell Res.* 2013. V. 319. № 5. P. 600–611.
68. Liu S., Ishikawa H., Tsuyama N., Li F.-J., Abroun S., Otsuyama K., Zheng X., Ma Z., Maki Y., Iqbal M.S., et al. // *Oncogene.* 2006. V. 25. № 3. P. 419–429.
69. Ishikawa H., Tsuyama N., Kawano M.M. // *Int. J. Hematol.* 2003. V. 78. № 2. P. 95–105.
70. Gonsalves W.I., Timm M.M., Rajkumar S.V., Morice W.G., Dispenzieri A., Buadi F.K., Lacy M.Q., Dingli D., Leung N., Kapoor P., et al. // *Leuk. Res.* 2016. V. 44. P. 32–39.
71. Clark M.C., Pang M., Hsu D.K., Liu F.-T., de Vos S., Gascoyne R.D., Said J., Baum L.G. // *Blood.* 2012. V. 120. № 23. P. 4635–4644.
72. Hoyer K.K., Pang M., Gui D., Shintaku I.P., Kuwabara I., Liu F.-T., Said J.W., Baum L.G., Teitell M.A. // *Am. J. Pathol.* 2004. V. 164. № 3. P. 893–902.
73. Nangia-Makker P., Nakahara S., Hogan V., Raz A. // *J. Bioenerg. Biomembr.* 2007. V. 39. № 1. P. 79–84.
74. Schiavoni G., Gabriele L., Mattei F. // *Front. Oncol.* 2013. V. 3. P. 1–15.
75. Laplane L., Duluc D., Larmonier N., Pradeu T., Bikfalvi A. // *Trends Cancer.* 2018. V. 4. № 12. P. 802–809.
76. Gabrilovich D.I., Nagaraj S. // *Nat. Rev. Immunol.* 2009. V. 9. № 3. P. 162–174.
77. Serafini P., De Santo C., Marigo I., Cingarlini S., Dolcetti L., Gallina G., Zanovello P., Bronte V. // *Cancer Immunol. Immunother.* 2004. V. 53. № 2. P. 64–72.

78. Ostrand-Rosenberg S., Sinha P., Beury D.W., Clements V.K. // *Semin. Cancer Biol.* 2012. V. 22. № 4. P. 275–281.
79. van Vliet S.J., Gringhuis S.I., Geijtenbeek T.B.H., van Kooyk Y. // *Nat. Immunol.* 2006. V. 7. № 11. P. 1200–1208.
80. Schuette V., Embgenbroich M., Ulas T., Welz M., Schulte-Schrepping J., Draffehn A.M., Quast T., Koch K., Nehring M., König J., et al. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2016. V. 113. № 38. P. 10649–10654.
81. Gross G., Waks T., Eshhar Z. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1989. V. 86. № 24. P. 10024–10028.
82. Jayaraman J., Mellody M.P., Hou A.J., Desai R.P., Fung A.W., Pham A.H.T., Chen Y.Y., Zhao W. // *EBioMedicine.* 2020. V. 58. P. 1–12.
83. Fu Z., Zhou J., Chen R., Jin Y., Ni T., Qian L., Xiao C. // *Oncol. Lett.* 2020. V. 20. № 4. P. 1–9.
84. Salter A.I., Ivey R.G., Kennedy J.J., Voillet V., Rajan A., Alderman E.J., Voytovich U.J., Lin C., Sommermeyer D., Liu L. // *Sci. Signal.* 2018. V. 11. № 544. P. 1–35.
85. Watanabe K., Terakura S., Martens A.C., van Meerten T., Uchiyama S., Imai M., Sakemura R., Goto T., Hanajiri R., Imahashi N. // *J. Immunol.* 2015. V. 194. № 3. P. 911–920.
86. Hudecek M., Lupo-Stanghellini M.-T., Kosasih P.L., Sommermeyer D., Jensen M.C., Rader C., Riddell S.R. // *Clin. Cancer Res.* 2013. V. 19. № 12. P. 3153–3164.
87. Feng Y., Brazin K.N., Kobayashi E., Mallis R.J., Reinherz E.L., Lang M.J. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2017. V. 114. № 39. P. 8204–8213.
88. Valitutti S., Müller S., Cella M., Padovan E., Lanzavecchia A. // *Nature.* 1995. V. 375. № 6527. P. 148–151.
89. Voisinne G., Kersse K., Chaoui K., Lu L., Chaix J., Zhang L., Goncalves Menoita M., Girard L., Ounoughene Y., Wang H. // *Nat. Immunol.* 2019. V. 20. № 11. P. 1530–1541.
90. Chakraborty A.K., Weiss A. // *Nat. Immunol.* 2014. V. 15. № 9. P. 798–807.
91. Ramello M.C., Benzaid I., Kuenzi B.M., Lienlaf-Moreno M., Kandell W.M., Santiago D.N., Pabón-Saldaña M., Darville L., Fang B., Rix U. // *Sci. Signal.* 2019. V. 12. № 568. P. 1–31.
92. Gudipati V., Rydzek J., Doel-Perez L., Gonçalves V.D.R., Scharf L., Königsberger S., Lobner E., Kunert R., Einsele H., Stockinger H. // *Nat. Immunol.* 2020. V. 21. № 8. P. 848–856.
93. James J.R., Vale R.D. // *Nature.* 2012. V. 487. № 7405. P. 64–69.
94. Davenport A.J., Cross R.S., Watson K.A., Liao Y., Shi W., Prince H.M., Beavis P.A., Trapani J.A., Kershaw M.H., Ritchie D.S. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2018. V. 115. № 9. P. 2068–2076.
95. Karlsson H., Svensson E., Gigg C., Jarvius M., Olsson-Strömberg U., Savoldo B., Dotti G., Loskog A. // *PLoS One.* 2015. V. 10. № 12. P. 1–20.
96. Xiao Q., Zhang X., Tu L., Cao J., Hinrichs C.S., Su X. // *Sci. Immunol.* 2023. V. 7. № 74. P. 1–30.
97. Davis S.J., van der Merwe P.A. // *Nat. Immunol.* 2006. V. 7. № 8. P. 803–809.
98. Chan W.K., Suwannasaen D., Throm R.E., Li Y., Eldridge P.W., Houston J., Gray J.T., Pui C.-H., Leung W. // *Leukemia.* 2015. V. 29. № 2. P. 387–395.
99. Ukrainskaya V., Molostova O., Shelikhova L., Pershin D., Kulakovskaya E., Volkov D., Rakhteenko A., Muzalevskii Y., Kazachenok A., Brilliantova V., et al. // *Blood Adv.* 2022. V. 6. № 19. P. 5582–5588.
100. Stepanov A.V., Kalinin R.S., Shipunova V.O., Zhang D., Xie J., Rubtsov Y.P., Ukrainskaya V.M., Schulga A., Konovalova E.V., Volkov D.V., et al. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2022. V. 119. № 46. P. 1–8.
101. Kalinin R.S., Petukhov A.V., Knorre V.D., Maschan M.A., Stepanov A.V., Gabibov A.G. // *Acta Naturae.* 2018. V. 10. № 2. P. 16–23.
102. Kulemzin S.V., Kuznetsova V.V., Mamonkin M., Tarantin A.V., Gorchakov A.A. // *Acta Naturae.* 2017. V. 9. № 1. P. 6–14.

УДК 576.356.3, 576.356.2, 576.353.3

Хромосомные aberrации в эмбриональном развитии человека как биологическое явление

А. Д. Иванова*, М. Л. Семёнова

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

*E-mail: ankivanova2@gmail.com

Поступила в редакцию 20.07.2023

Принята к печати 09.08.2023

DOI: 10.32607/actanaturae.25255

РЕФЕРАТ Отличительной чертой раннего эмбрионального развития млекопитающих, особенно человека, являются частые хромосомные аномалии. Анеуплоидии считаются фактором, способствующим неудачной имплантации эмбриона и спонтанным абортam. Влияние хромосомного мозаицизма на способность эмбрионов к нормальному развитию изучено недостаточно. Хотя в настоящее время считается, что значительная доля хромосомных дефектов ранних эмбрионов человека связана с особенностями клинических и лабораторных протоколов, в данном обзоре мы акцентируем внимание на биологических механизмах, ассоциированных с хромосомными аномалиями. В частности, рассмотрены главные события ооцитарного мейоза, процесса, влияющего не только на генетический статус неоплодотворенного ооцита, но и на дальнейшую жизнеспособность эмбриона; также проанализированы особенности первых делений дробления и причины частых хромосомных ошибок в раннем эмбриональном развитии. Кроме того, обсуждаются данные о самокоррекции хромосомного статуса ранних эмбрионов.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА хромосомный мозаицизм, анеуплоидия, преимплантационное развитие.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ ВРТ – вспомогательные репродуктивные технологии; ПГТ – преимплантационное генетическое тестирование; ЭКО – экстракорпоральное оплодотворение; ВКМ – внутренняя клеточная масса; ТЭ – трофэктодерма; МI – мейоз I; МII – мейоз II; SAC – контрольная точка сборки веретена (spindle assembly checkpoint); ИКСИ – интрацитоплазматическая инъекция сперматозоида (ICSI, intracytoplasmic sperm injection); FISH – флуоресцентная гибридизация *in situ*.

ВВЕДЕНИЕ

В 2000-е годы в клиниках вспомогательных репродуктивных технологий (ВРТ) стало широко применяться преимплантационное генетическое тестирование (ПГТ). С помощью методов ПГТ обнаружено, что примерно половина ранних эмбрионов человека содержит хромосомные аномалии, хотя в ранних эмбрионах мыши эта частота составляет всего 1% [1]. По-видимому, эмбриональные хромосомные дефекты являются неотъемлемой частью эволюции *Homo sapiens* и контролируют процесс размножения в течение жизни [2]. Хромосомные дефекты объединяют широкий спектр геномных нарушений разной степени тяжести – от полиплоидии целой хромосомы и больших структурных анеуплоидий до субмикроскопических делеций и дупликаций. Анеуплоидные эмбрионы содержат клетки, имеющие одинаковые нарушения кариотипа. Мозаичные эмбрионы содержат как минимум две клеточные линии, обладающие разными кариотипами.

На преимплантационных стадиях развития хромосомные нарушения невозможно достаточно точно распознать по морфологическим характеристикам эмбрионов [3], но впоследствии они влияют на способность к развитию, поэтому имеют огромное значение в клинической практике ВРТ (рис. 1). Любые хромосомные аномалии вызывают генетический дисбаланс, который оказывает негативное действие на процессы развития после включения собственного генома эмбриона. У человека массивное включение эмбрионального генома (3 сутки развития) совпадает по срокам с часто наблюдаемыми отставанием и остановками развития эмбрионов, что объясняется, вероятно, именно генетическим дисбалансом как следствием хромосомных нарушений [4, 5]. Тем не менее, даже полностью анеуплоидные эмбрионы способны формировать морфологически нормальные бластоцисты. Впоследствии анеуплоидия препятствует имплантации и дальнейшему развитию эмбриона, приводя к самопро-

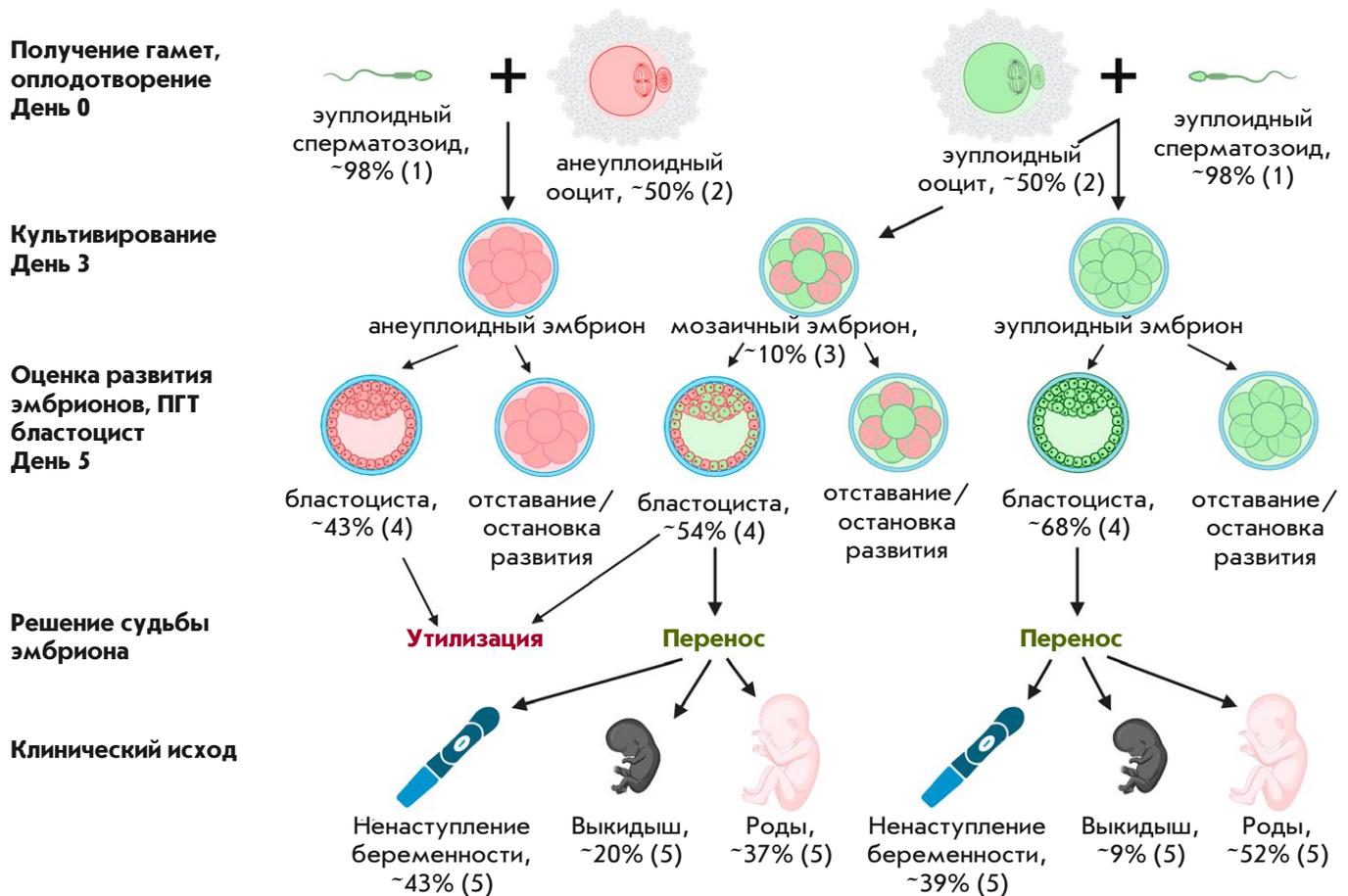


Рис. 1. Результативность циклов ЭКО в зависимости от хромосомного статуса гамет и эмбрионов. Зеленым цветом обозначены эуплоидные клетки, розовым – анеуплоидные. 1) Согласно опубликованным данным, сперматозоиды человека в подавляющем большинстве случаев не несут хромосомных аномалий [23, 24]. 2) Приведена усредненная оценка частоты хромосомных аномалий в ооцитах человека. Доля ооцитов, несущих анеуплоидии, колеблется от 20 до 80–90% в зависимости от возраста женщины (см., например, [80]). 3) Приведена усредненная оценка частоты мозаицизма эмбрионов в соответствии с экспериментальными данными [10, 15, 16]. 4) Частота формирования бластоцист для эмбрионов с различным хромосомным статусом приведена в соответствии с экспериментальными данными [81]. 5) Клинические исходы после переноса эуплоидных и мозаичных эмбрионов приведены в соответствии с экспериментальными данными [19]

извольным абортam на ранних сроках либо к постнатальным аномалиям [6, 7]. Поэтому в современной клинической практике при выявлении методами ПГТ полной анеуплоидии бластоцисты перенос не производится. Считается, что рост частоты эмбриональных анеуплоидий с увеличением возраста женщины является основным фактором, приводящим к постепенному снижению фертильности [8].

Согласно современным данным, частота хромосомного мозаицизма не связана с возрастом матери [9–11]. Хромосомный мозаицизм эмбрионов человека относится к явлениям, которые активно изучаются как научными лабораториями, так и эмбриологами клиник ЭКО. Хотя хромосомный моза-

ицизм в преимплантационных эмбрионах все чаще признается естественным биологическим явлением [12], существует вероятность искусственного повышения общей частоты мозаицизма вследствие влияния клинических факторов [13, 14]. Недавние многоцентровые исследования сообщают, что частота мозаицизма среди эмбрионов, прошедших ПГТ, составляет около 17% [15, 16], хотя в другой работе частота мозаицизма составила всего 2.6% [10], и эти различия, вероятно, связаны с особенностями лабораторных протоколов.

Мозаичные эмбрионы, содержащие эуплоидную клеточную линию (эуплоид–анеуплоидные мозаики), считаются наиболее распространенными

[17] и в некоторых случаях обладают потенциальными возможностями к нормальному развитию. В клинической практике зарегистрированы случаи рождения здоровых детей с нормальными кариотипами после переноса пациенткам мозаичных эмбрионов [6, 18, 19]. В случае обнаружения хромосомного мозаицизма решение о переносе или утилизации бластоцисты зависит от типа мозаицизма, доли анеуплоидных клеток и хромосом, вовлеченных в анеуплоидию. К сожалению, до сих пор нет однозначных данных о том, насколько вероятно вовлечение в хромосомный мозаицизм клеток внутренней клеточной массы (ВКМ), которые дадут начало развитию собственно плода. Существуют данные о различной вероятности вовлечения плода в хромосомный мозаицизм в зависимости от хромосомы – наибольший риск представляет мозаицизм по аутосомам 13, 18, 21 и половым хромосомам [20].

Хорошие клинические исходы после переноса мозаичных эмбрионов могут объясняться как действием неких биологических механизмов, способствующих восстановлению эуплоидности клеточных линий, так и исходно ложным диагнозом мозаицизма. Во-первых, при проведении ПГТ хромосомный статус определяется для ограниченного участка трофобластической оболочки (ТЭ). Согласно результатам исследований, в которых анализировали несколько биоптатов каждого эмбриона, эуплоидия и целых хромосомная анеуплоидия являются достаточно надежными диагнозами, тогда как в случае мозаицизма и сегментарной анеуплоидии единичный анализ биоптата ТЭ часто не отражает хромосомный статус всего эмбриона [21, 22]. Во-вторых, распространяется мнение, что высокая частота мозаичных эмбрионов в некоторых клиниках может быть обусловлена не биологическими причинами, а лабораторными манипуляциями или техническими эффектами [13, 14].

Хотя технические аспекты диагностики мозаичных эмбрионов в настоящее время активно обсуждаются, в данном обзоре подробно рассмотрены только истинно биологические аспекты формирования мозаичных и анеуплоидных эмбрионов, а также возможная самокоррекция их хромосомного статуса.

МЕХАНИЗМЫ ВОЗНИКНОВЕНИЯ АНЕУПЛОИДИИ РАННИХ ЭМБРИОНОВ ЧЕЛОВЕКА

Эмбриональные хромосомные аномалии могут возникать в результате мейотических ошибок оогенеза и сперматогенеза или митотических ошибок раннего развития. Полная анеуплоидия имеет мейотическое происхождение в 90% случаев. Считается, что сперматозоиды вносят вклад всего в 1–2% случаев формирования эмбриональных анеуплоидий, в основном сегментарных [23, 24]. Так, генотипирование 967 био-

птатов эмбрионов показало, что около 70% сегментарных анеуплоидий имеют отцовское происхождение, а анеуплоидии, затрагивающие целую хромосому, в подавляющем большинстве случаев возникают из-за материнской ошибки. Около 70% мейотических трисомий возникают в первом, а 30% – во втором мейотическом делении оогенеза [25].

В ооцитах млекопитающих после стадии пахитены происходит разрушение центриолей [26]. У некоторых видов их функцию в мейозе выполняют ацентриолярные центры организации микротрубочек [27]. В ооцитах мыши при разрушении герминативного пузырька микротрубочки мейотического веретена собираются и стабилизируются вокруг хроматина в виде нескольких пузырьков, затем происходит их ориентация, устанавливаются полюса и биполярность веретена, т.е. происходит сборка мейотического веретена «наизнанку» с помощью множественных ацентриолярных центров организации микротрубочек [26, 27]. В отличие от ооцитов мыши, в ооцитах человека отсутствуют не только центросомы, но и заметные ацентриолярные центры организации микротрубочек. Через несколько часов после разрушения герминативного пузырька микротрубочки образуют небольшую «астру» внутри агрегата хромосом, и еще несколько часов требуется для формирования раннего веретена [28]. Сборка веретена в ооцитах человека основана на градиенте комплекса Ran-GTP вокруг каждой хромосомы. Помимо участия в сборке микротрубочек, Ran-GTP также регулирует активность моторных белков, например, HSET – моторного белка, ответственного за установку полюсов веретена, и Kid – моторного белка, способствующего выравниванию хромосом на метафазной пластинке [29]. Полюса веретена мейоза I (MI) ооцита человека изначально определены нечетко, хромосомы постоянно меняют свое положение на веретене, которое может временно становиться многополярным. В этом случае кинетохоры часто прикрепляются более чем к одному полюсу, что в дальнейшем может приводить к ошибкам сегрегации хромосом [28]. Хромосомы выравниваются на метафазной пластинке через 16 ч, анафаза начинается через 18 ч, и первое полярное тельце отделяется примерно через 20 ч после разрушения герминативного пузырька. Сборка веретена мейоза II (MII) происходит быстрее. Метафазная пластинка MII формируется в ооците спустя приблизительно 24 ч после начала созревания, и ооцит становится готовым к оплодотворению [28]. В отличие от MI, в MII редко встречается стадия многополярности веретена [30], что может объяснять более частые хромосомные ошибки в MI.

Как ни парадоксально, мейоз в отсутствие центросом может быть механизмом защиты от дополнительного роста частоты материнской анеуплоидии. Так, показано, что искусственно увеличенный уровень HSET в ооцитах мыши ускоряет биполяризацию веретена и способствует образованию более сфокусированных полюсов, сходных с митотическими. Этого изменения в морфогенезе мейотического веретена оказалось достаточно для тотального нарушения сегрегации хромосом [31].

Анеуплоидии в ранних эмбрионах человека встречаются на порядок чаще, чем в эмбрионах других видов млекопитающих [1]. Одной из причин этого может быть недостаточный уровень KIFC1, стабилизирующего мейотическое веретено, в ооцитах человека. Так, введение экзогенного KIFC1 в ооциты человека способствует снижению частоты мейотических хромосомных ошибок и, напротив, снижение уровня KIFC1 в ооцитах крупного рогатого скота и мыши приводит к нестабильности веретена и учащению ошибок сегрегации хромосом [32].

Известно, что частота анеуплоидии ранних эмбрионов человека увеличивается с возрастом матери. Ооциты блокируются в профазе МI с эмбрионального периода до момента овуляции. В течение этого длительного периода сцепление хроматид ослабляется из-за истощения молекул когезии, что является основным фактором, способствующим увеличению частоты хромосомных ошибок по мере старения женщины [33]. В МI как гомологичные хромосомы, так и сестринские хроматиды в биваленте удерживаются вместе кольцеобразной структурой из когезина. Когезин, удерживающий гомологичные хромосомы, расщепляется в анафазе МI, тогда как когезин, удерживающий сестринские хроматиды, должен сохраняться дольше, чтобы сестринские хроматиды оставались связанными до анафазы МII. Более 90% мейотических хромосомных ошибок возникают из-за преждевременного разделения сестринских хроматид [34]. В МI может происходить инвертированная сегрегация хромосом, при которой в анафазе расходятся сестринские хроматиды, а не гомологичные хромосомы; частота этого явления в ооцитах человека резко увеличивается с возрастом матери [35]. Инвертированная сегрегация хромосом в МI приводит к нормальному количеству копий ДНК в дочерних клетках, но в МII хроматиды оказываются не связанными друг с другом когезином, что способствует ошибкам сегрегации [36]. Наконец, показано, что с возрастом матери снижается и эффективность SAC (spindle assembly checkpoint) – контрольной точки сборки веретена, ответственной за торможение начала анафазы

до тех пор, пока все кинетохоры хромосом не будут правильно прикреплены к веретену [37, 38].

Ооцитарный мейоз млекопитающих является сложным многоступенчатым процессом, подверженным частым хромосомным ошибкам. Кроме того, корректному прохождению мейоза ооцитом человека препятствуют дополнительные видоспецифичные особенности. Отсутствие центросом и ацентриольярных центров организации микротрубочек, нестабильность полюсов веретена деления, стадии многополярности веретена, недостаточность экспрессии генов, продукты которых стабилизируют веретено и контролируют прохождение стадий мейоза, истощение молекул когезии – все эти факторы в совокупности делают мейоз ооцитов человека крайне уязвимым для возникновения хромосомных aberrаций.

МЕХАНИЗМЫ ВОЗНИКНОВЕНИЯ ХРОМОСОМНОГО МОЗАИЦИЗМА РАННИХ ЭМБРИОНОВ ЧЕЛОВЕКА

Самой частой причиной хромосомного мозаицизма ранних эмбрионов являются постзиготические (митотические) ошибки в сегрегации хромосом. В отличие от анеуплоидии, для хромосомного мозаицизма не выявлено достоверной связи с возрастом матери [9, 10]. Наиболее высокому риску митотических ошибок подвергаются первые клеточные деления [17, 39]. Недавно было показано, что мозаицизм в большинстве случаев возникает уже на двухклеточной стадии [40], хотя раньше считалось, что чаще всего митотические ошибки происходят во втором или третьем делении, вероятно, из-за постепенного истощения материнских транскриптов, участвующих в процессе митоза [41]. Недостаточность или отсутствие экспрессии генов контрольных точек клеточного цикла потенциально увеличивает частоту митотических ошибок. Недавно обнаружили, что первые транскрипционные процессы у эмбриона человека наблюдаются уже на стадии пронуклеусов [42], однако массивная активация генома происходит только после второго-третьего клеточного деления [43, 44]. Водители клеточного цикла интенсивно включаются только на стадии морулы [45]. Кроме того, высказывается предположение, что эффективность SAC может становиться достаточно надежной, только когда в клетках эмбриона восстанавливается ядерно-цитоплазматическое соотношение [46].

Разрушение центросомы сперматозоида также может быть причиной возникновения мозаицизма в ранних эмбрионах человека [47]. Центросома сперматозоида формирует веретено первого деления дробления (яйцеклетка не несет своей центросомы), и митотические деления после оплодотворения требуют ее целостности [48]. В противном случае

происходит неправильное построение веретена, что приводит к ошибкам распределения хромосом между дочерними клетками. Клиническое исследование подтвердило это, показав, что оплодотворение ооцитов методом ИКСИ с использованием механически отсеченных фрагментов сперматозоидов приводит к увеличению частоты хромосомного мозаицизма в эмбрионах [47].

К митотическим ошибкам, приводящим к возникновению мозаицизма в исходно эуплоидном эмбрионе, относятся анафазное отставание, митотическое нерасхождение, эндорепликация, образование триполярных веретен, преждевременное деление клеток перед удвоением ДНК, разрушение хромосом [39, 49].

Анафазное отставание и митотическое нерасхождение считаются самыми частыми причинами возникновения мозаицизма в дробящихся эмбрионах. Анафазное отставание приводит к потере хромосом в клеточной линии без соответствующего увеличения числа хромосом в другой клеточной линии. Это явление подразумевает задержку одной или нескольких хромосом на экваторе митотического веретена после того, как подавляющее большинство сестринских хроматид других хромосом разделились и начали расхождение к полюсам. Самая частая причина анафазного отставания – прикрепление кинетохор к микротрубочкам, исходящим от обоих полюсов веретена (меротелические прикрепления, см. [50]). Кроме того, отстающие хромосомы могут быть недостаточно реплицированы, запутаны или вовсе не захвачены веретеном. В дальнейшем отстающие хромосомы могут включаться в состав микроядер [51].

Митотическое нерасхождение подразумевает неравномерное распределение хроматид между двумя дочерними клетками без потери хромосомного материала, что приводит к увеличению числа копий ДНК в одной клеточной линии и уменьшению в другой. Очевидно, это также связано с аномалиями ориентации кинетохор (т.е. их соединения с полюсами веретена через микротрубочки). В результате поклеточного FISH-анализа 138 мозаичных эмбрионов на стадиях дробления было установлено, что 78% мозаичных хромосомных аномалий по 5–8 хромосомам вызваны именно митотическим нерасхождением (в эмбрионе моносомные и трисомные аномальные клеточные линии) и только 20% – анафазным отставанием (в эмбрионе только моносомные аномальные клеточные линии) [52]. Противоположные результаты получены в недавнем исследовании с использованием 24-хромосомного FISH: суммарно 35.21% хромосом характеризовались моносомией и только 5.64% – трисомией (проана-

лизированных хромосом $n = 5547$, клеток $n = 250$, бластоцист $n = 17$), т.е. преобладающим механизмом возникновения мозаицизма было, предположительно, анафазное отставание с потерей хромосом. Анализ мозаицизма по номерам хромосом показал, что трисомия наблюдается чаще, чем моносомия, только для половых хромосом [53].

Реже возникновение мозаицизма в преимплантационных эмбрионах обусловлено другими митотическими ошибками. Эндорепликация (причина мозаицизма в 1.4% случаев [52]), при которой хромосомы вторично реплицируются без прохождения клеточного деления, приводит к образованию тетраплоидных клеток. Впоследствии хромосомы тетраплоидных клеток могут различными способами перераспределяться в последующих делениях, но в большинстве дочерних клеток число копий хромосом будет превышать норму. Разрушение хромосом и преждевременное деление клеток перед удвоением ДНК приводят к обратной ситуации с уменьшением числа копий хромосом по сравнению с нормой. Кроме того, аномальные триполярные веретена деления, формирующиеся вследствие нарушений центросомного регулятора PLK4, приводят к массовой потере хромосом в возникающих клеточных линиях [54].

Таким образом, возникновение хромосомного мозаицизма в ранних эмбрионах теоретически может быть связано с действием множества различных механизмов. Однако на сегодняшний день все еще нет надежных данных, позволяющих сделать однозначные выводы о преобладании того или иного механизма. Например, исследования, сравнивающие частоту анафазного отставания и митотического нерасхождения, имеют ряд ограничений. Скорость деления клеток различных клеточных линий может отличаться. При исходно равном количестве моносомных и трисомных клеток одна из клеточных линий в момент исследования может быть более заметной из-за высокой скорости деления клеток [55] либо одна из клеточных линий может активнее элиминироваться в ходе развития эмбриона.

ГИПОТЕЗА САМОКОРРЕКЦИИ АНОМАЛЬНЫХ ЭМБРИОНОВ НА РАННИХ СТАДИЯХ РАЗВИТИЯ

В клинической практике зарегистрированы случаи переноса мозаичных эмбрионов пациентам, в ЭКО-циклах которых не были получены эуплоидные эмбрионы. Хотя перенос мозаичных эмбрионов сопровождается повышенным риском негативных клинических исходов по сравнению с переносом эуплоидных эмбрионов [56], в некоторых случаях перенос мозаичных эмбрионов приводит к рождению детей с нормальными кариотипами. Первая

доказательная работа по этому вопросу опубликована в 2015 году. Мозаичные эмбрионы были перенесены 18 пациенткам, последовали 8 клинических беременностей, которые привели к рождению 6 здоровых детей; все доношенные беременности были подвергнуты биопсии ворсин хориона, и во всех случаях кариотип также был нормальным [57]. Эти результаты, а также опубликованные рекомендации PGDIS (Preimplantation Genetic Diagnosis International Society), заявляющие о возможности переноса мозаичных эмбрионов при отсутствии эуплоидных [58], обеспечили появление исследований, проведенных на больших выборках. Одно из последних обширных исследований предоставляет данные об исходах переноса 137 мозаичных эмбрионов. Для 8 из 37 зарегистрированных живорождений предварительно проводилось пренатальное генетическое тестирование, и был выявлен нормальный хромосомный набор [18]. В еще одной публикации сообщается о 29 случаях переноса бластоцист с низким уровнем мозаицизма, которые привели к клинической беременности; при проведении пренатального тестирования обнаружена 100% частота эуплоидии [6]. Положительные клинические исходы получены также в 36 случаях беременности после переноса эмбрионов с различным уровнем и типом мозаицизма: амниоцентез в каждом из этих случаев выявил нормальный кариотип, а беременности привели к рождению здоровых детей [59]. Кроме того, зарегистрированы случаи обнаружения мозаицизма при пренатальном тестировании, за которыми последовали здоровые живорождения с нормальными кариотипами [60]. Интересен и клинический случай рождения ребенка после переноса эмбриона с мозаичной моносомией по хромосоме 2 с уровнем 35%. Результаты анализа периферической крови этого новорожденного выявили мозаичную моносомию по хромосоме 2 с уровнем всего лишь 2% [61].

Безусловно, частично положительные клинические исходы переноса мозаичных эмбрионов могут объясняться низким уровнем истинного биологического мозаицизма, т.е. ложноположительной диагностикой мозаицизма на преимплантационных стадиях. Однако альтернативным объяснением может быть устранение генетических aberrаций, обнаруженных на стадии бластоцисты, на более поздних стадиях развития [12, 13, 62]. Вероятно, процессы самокоррекции активируются в целях предотвращения последствий дисбаланса ассоциированных генов [13].

Существуют три гипотетических модели самокоррекции: преимущественное распределение, клональное истощение, коррекция за счет второй митотической ошибки (рис. 2) [63]. Модель преиму-

щественного распределения предполагает неравномерное расхождение анеуплоидных клеток в ВКМ и ТЭ при разделении раннего эмбриона на две эти клеточные линии. Если большинство аномальных клеток окажутся в составе ТЭ, то влияние мозаицизма на развитие будущего плода будет не столь значимым. Модель клонального истощения предполагает большую скорость деления эуплоидных клеток по сравнению с анеуплоидными, а также наличие апоптотической гибели и элиминации аномальных клеток. Согласно третьей модели самокоррекции, вторая митотическая ошибка может скорректировать хромосомный набор в аномальных клетках до нормы.

Данные о том, что плодный мозаицизм (~0.2% по результатам амниоцентеза) встречается на порядок реже, чем плацентарный (~2% по результатам кариотипирования ворсин хориона) [20, 64], позволили предположить преимущественное распределение аномальных клеток в ТЭ. С другой стороны, изначально соотношение эуплоидных и аномальных клеток в ТЭ и ВКМ может быть сходным, но в ВКМ механизмы элиминации анеуплоидных клеток работают эффективнее. Даже при нормальном развитии в ВКМ эуплоидных эмбрионов наблюдается всплеск запрограммированной клеточной гибели, связанный с выбором судьбы клетками ВКМ и разделением их на гипобласт и эпибласт [65]. Множество исследований, в которых сравнивались образцы ТЭ и ВКМ мозаичных бластоцист человека, не выявили признаков преимущественного распределения анеуплоидных клеток в ТЭ бластоцисты [66–69]. По итогам повременной съемки развития эмбрионов в мышинной модели искусственно вызванного хромосомного мозаицизма преимущественное распределение аномальных клеток в ТЭ также не было зафиксировано [12].

В то же время в вышеупомянутом исследовании [12] выявлены серьезные пролиферативные дефекты линии аномальных клеток в ТЭ и частая апоптотическая гибель анеуплоидных клеток ВКМ. Механизмы клеточной элиминации в эмбрионах млекопитающих начинают работать на поздних стадиях преимплантационного развития. Впервые апоптотическая гибель клеток наблюдается на стадии бластоцисты, причем эти процессы более выражены в клетках ВКМ, чем в клетках ТЭ [70]. Вероятно, этот факт может объяснять более активное действие механизмов самокоррекции путем клонального истощения именно в плодных тканях. В эксперименте с химеризацией эмбрионов показано, что часть мозаичных эмбрионов обладает полным потенциалом развития при условии, что они содержат достаточную долю эуплоидных клеток

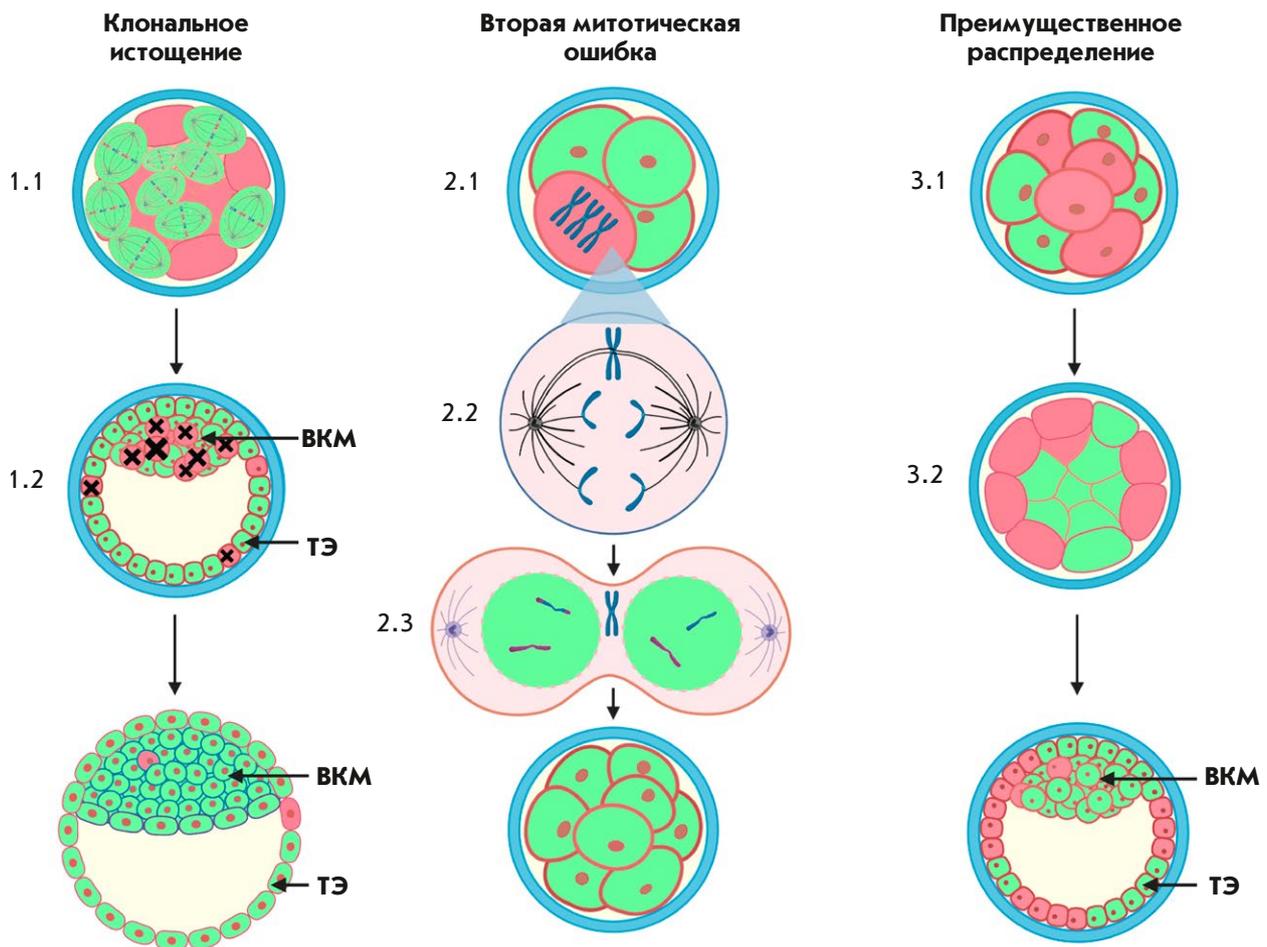


Рис. 2. Модели самокоррекции хромосомного статуса мозаичных эмбрионов. Зеленым цветом обозначены эуплоидные клетки, розовым цветом – анеуплоидные. Веретена деления (1.1) отражают повышение уровня пролиферативной активности в эуплоидных клеточных линиях мозаичных эмбрионов. Черными крестами обозначены апоптотические процессы в анеуплоидных клетках (1.2). Трисомная анеуплоидная клетка эмбриона (2.1) может проходить через корректирующее митотическое деление. Одна из хромосом задерживается на экваторе веретена деления вследствие меротелического прикрепления микротрубочек к кинетохорам (2.2) и впоследствии не включается в ядра дочерних клеток (2.3). На (3.1, 3.2) изображено смещение анеуплоидных клеток к периферии эмбриона в область будущей трофэктодермы

[12]. В сходном исследовании уточнено, что элиминация анеуплоидных клеток основана на р53-зависимых процессах, включающих как аутофагию, так и апоптоз до, во время и после имплантации; в то же время эуплоидные клетки осуществляют компенсаторную пролиферацию в период имплантации [71]. В эмбрионах человека также повышены уровни пролиферации и гибели клеток в мозаичных бластоцистах по сравнению с эуплоидными [67, 69]. В исследовании, проведенном на эмбрионах макака-резуса, продемонстрировано, что процессы самокоррекции мозаицизма могут включать клеточную фрагментацию аномальных бластомеров [51]. Исследования лаборатории И.Н. Лебедева (НИИ

медицинской генетики, г. Томск) показали, что в полости мозаичных бластоцист присутствуют погибшие клетки, причем нарушения кариотипа в них встречаются гораздо чаще, чем в клетках ВКМ и ТЭ этих же бластоцист [72, 73]. Сходные результаты получены и в недавней работе, где сравнивали хромосомный статус биоптатов ТЭ и образцов, состоящих из клеток, оставшихся внутри *zona pellucida* после вылупления бластоцисты («клеточный мусор»). Аномальный кариотип выявлен в 85.7% образцов «клеточного мусора» ($n = 18$), причем в соответствующих биоптатах ТЭ анеуплоидный и эуплоидный статусы выявлены в равном соотношении (9 : 9) [74]. Таким образом, результаты достаточно боль-

шого числа исследований свидетельствуют в пользу существования самокоррекции путем клонального истощения аномальных клеток, причем механизмы действия данной модели могут быть различными.

Модель самокоррекции путем второй митотической ошибки слабо поддерживается современными исследованиями, по крайней мере, в случае цельнохромосомных мозаичных анеуплоидий. Трисомные клеточные популяции теоретически могут самокорректироваться, потеряв дополнительную хромосому [62], однако в этом случае процент однородительских дисомий должен быть достаточно высоким, тогда как на стадии бластоцисты однородительская дисомия встречается крайне редко (0.06%) [75]. Тем не менее, на более поздних стадиях развития частота однородительских дисомий увеличивается. Так, частота однородительских дисомий у плодов с нормальным кариотипом, у которых предварительное кариотипирование ворсин хориона показало наличие мозаицизма, составила 2.1% [64]. Таким образом, нельзя полностью исключить возможность самокоррекции мозаичных эмбрионов путем второй ошибки митоза. В случае сегментарных аномалий такой путь представляется более вероятным. Ацентрические фрагменты хромосом неспособны прикрепиться к веретену митоза, соответственно, они могут утрачиваться [76].

Интересно, что плодный мозаицизм обычно включает аномалии половых хромосом или трисомию по 21, 18 и 16 хромосомам [20, 54], а индивиды с полной анеуплоидией по данным хромосомам являются жизнеспособными. Это наблюдение позволяет предположить, что механизмы самокоррекции более эффективны в случае мозаицизма по хромосомам, анеуплоидный набор которых чаще приводит к летальным исходам. Еще одним любопытным фактом является то, что перенос мозаичных эмбрионов, полученных из ооцитов пациенток молодого возраста, приводит к лучшим клиническим исходам по сравнению с переносом мозаичных эмбрионов пациенток более позднего репродуктивного возраста (от 34 лет и выше), т.е. механизмы самокоррекции, возможно, более эффективны в клетках эмбрионов молодых пациенток.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Актуальность изучения хромосомных аберраций ранних эмбрионов и их влияния на нормальное развитие резко возросла с распространением клиник ВРТ. Механизмы возникновения полной эмбриональной анеуплоидии достаточно хорошо изучены, и анеуплоидия давно признана негативным факто-

ром, отрицательно влияющим на нормальное развитие эмбриона. Механизмы возникновения хромосомного мозаицизма менее изучены, чем для полной анеуплоидии. К тому же митотические ошибки, в отличие от мейотических, могут происходить на разных стадиях развития эмбриона. Решения о судьбе мозаичных эмбрионов, выявленных в клиниках ЭКО, до сих пор принимаются «неуверенно» вследствие отсутствия достаточной базы фундаментальных знаний. С биологической точки зрения потенциал развития мозаичных эмбрионов может зависеть как от доли и локализации аномальных клеток, так и от номеров хромосом, вовлеченных в мозаицизм [6, 20, 76–78]. Однако данные разных исследовательских групп различаются, вероятно, из-за наложения действия лабораторных и технических факторов на реальные биологические события, связанные с хромосомным мозаицизмом. Большинство диагнозов мозаичных эмбрионов могут быть ложноположительными [68, 79], а значит, большинство накопленных данных о клинических исходах после переноса мозаичных эмбрионов теряют актуальность. На сегодняшний день, используя имеющиеся скудные данные, можно однозначно сказать лишь одно: в некоторых случаях перенос мозаичного эмбриона может привести к рождению здорового ребенка. Некоторые данные о самокоррекции мозаичных эмбрионов, рассмотренные в данном обзоре, внушают доверие и дают надежду пациентам, для которых не удалось получить эуплоидные эмбрионы [12, 71]. С другой стороны, необходимо учитывать потенциальные риски. Все пациентки, для которых планируется перенос мозаичного эмбриона, должны получить тщательную генетическую консультацию.

В данном обзоре мы акцентировали внимание на биологических механизмах возникновения хромосомных дефектов и объединили данные о возможных процессах самокоррекции аномалий в ходе развития эмбриона. Однако следует иметь в виду, что массив рассмотренных исследований имеет ряд ограничений, главные из которых – культивирование эмбрионов в условиях *in vitro* и различия в методах диагностики хромосомного статуса, поэтому приведенные данные освещают лишь одну грань вопроса и являются недостаточными для понимания полной картины. Главным образом это касается такого неоднозначного феномена, как хромосомный мозаицизм. В первую очередь, целью дальнейших исследований должно стать четкое разделение «истинного» и «видимого в результатах ПГТ» хромосомного мозаицизма. ●

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Bond D.J., Chandley A.C., Chandlev A. // *Aneuploidy*. 1983. P. 27–54.
2. Viotti M. // *Genes*. 2020. V. 11. № 6. P. 602.
3. Lee C.I., Chen C.H., Huang C.C., Cheng E.H., Chen H.H., Ho S.T., Lin P., Lee M.S., Lee T.H. // *Reprod. Biomed. Online*. 2019. V. 39. № 4. P. 569–579.
4. Munné S., Grifo J., Cohen J., Weier H.U.G. // *Am. J. Hum. Genet.* 1994. V. 55. № 1. P. 150.
5. Campbell A., Fishel S., Bowman N., Duffy S., Sedler M., Hickman C.F. // *Reprod. Biomed. Online*. 2013. V. 26. № 5. P. 477–485.
6. Munné S., Spinella F., Grifo J., Zhang J., Beltran M.P., Fragouli E., Fiorentino F. // *Eur. J. Med. Genet.* 2020. V. 63. № 2. P. 103741.
7. Tiegs A.W., Tao X., Zhan Y., Whitehead C., Kim J., Hanson B., Osman E., Kim T.J., Patounakis G., Gutmann J., et al. // *Fertility, Sterility*. 2021. V. 115. № 3. P. 627–637.
8. Liu K., Case A. // *J. Obstetrics Gynecology Canada*. 2011. V. 33. № 11. P. 1165–1175.
9. Sachdev N.M., Ribustello L., Liu E., McCulloh D.H., Grifo J., Munne S. // *Fertility, Sterility*. 2016. V. 106. № 3. P. e156–e157.
10. Katz-Jaffe M., McReynolds S., De Klerk K., Henry L.N., Schweitz M., Swain J., Schoolcraft W.B. // *Fertility, Sterility*. 2017. V. 108. № 3. P. e87–e88.
11. Gao J., Wei N., Zhu X., Li R., Yan L., Qiao J. // *J. Assisted Reproduction Genet.* 2023. V. 40. № 5. P. 1089–1098.
12. Bolton H., Graham S.J.L., van der Aa N., Kumar P., Theunis K., Fernandez Gallardo E., Voet T., Zernicka-Goetz M. // *Nat. Commun.* 2016. V. 7. № 1. P. 1–12.
13. Capalbo A., Ubaldi F.M., Rienzi L., Scott R., Treff N. // *Hum. Reprod.* 2017. V. 32. № 3. P. 492–498.
14. Practice Committee and Genetic Counseling Professional Group (GCPG) of the American Society for Reproductive Medicine // *Fertility, Sterility*. 2020. V. 114. № 2. P. 246–254.
15. Munné S., Kaplan B., Frattarelli J.L., Child T., Nakhuda G., Shamma F.N., Silverberg K., Kalista T., Handyside A.H., Katz-Jaffe M., et al. // *Fertility, Sterility*. 2019. V. 112. № 6. P. 1071–1079. e7.
16. Capalbo A., Poli M., Rienzi L., Girardi L., Patassini C., Fabiani M., Cimadomo D., Benini F., Farcomeni A., Cuzzi J., et al. // *Am. J. Hum. Genet.* 2021. V. 108. № 12. P. 2238–2247.
17. van Echten-Arends J., Mastenbroek S., Sikkema-Raddatz B., Korevaar J.C., Heineman M.J., van der Veen F., Repping S. // *Hum. Reprod. Update*. 2011. V. 17. № 5. P. 620–627.
18. Zhang Y.X., Chen J.J., Nabu S., Yeung Q.S.Y., Li Y., Tan J.H., Suksalak W., Chanchamroen S., Quangkananurug W., Wong P.S., et al. // *Genes*. 2020. V. 11. № 9. P. 973.
19. Viotti M., Victor A.R., Barnes F.L., Zouves C.G., Besser A.G., Grifo J.A., Cheng E.H., Lee M.S., Horcajadas J.A., Corti L., et al. // *Fertility, Sterility*. 2021. V. 115. № 5. P. 1212–1224.
20. Grati F.R., Gallazzi G., Branca L., Maggi F., Simoni G., Yaron Y. // *Reprod. Biomed. Online*. 2018. V. 36. № 4. P. 442–449.
21. Navratil R., Horak J., Hornak M., Kubicek D., Balcova M., Tauwinklova G., Travnik P., Vesela K. // *Mol. Hum. Reprod.* 2020. V. 26. № 4. P. 269–276.
22. Marin D., Xu J., Treff N.R. // *Prenatal Diagnosis*. 2021. V. 41. № 5. P. 545–553.
23. McCoy R.C., Demko Z.P., Ryan A., Banjevic M., Hill M., Sigurjonsson S., Rabinowitz M., Petrov D.A. // *PLoS Genet.* 2015. V. 11. № 10. P. e1005601.
24. Bell A.D., Mello C.J., Nemes J., Brumbaugh S.A., Wysoker A., McCarroll S.A. // *Nature*. 2020. V. 583. № 7815. P. 259–264.
25. Kubicek D., Hornak M., Horak J., Navratil R., Tauwinklova G., Rubes J., Vesela K. // *Reprod. Biomed. Online*. 2019. V. 38. № 3. P. 330–339.
26. Szollosi D., Calarco P., Donahue R.P. // *J. Cell Sci.* 1972. V. 11. № 2. P. 521–541.
27. Schuh M., Ellenberg J. // *Cell*. 2007. V. 130. № 3. P. 484–498.
28. Holubcova Z., Blayney M., Elder K., Schuh M. // *Science*. 2015. V. 348. № 6239. P. 1143–1147.
29. Ems-McClung S.C., Emch M., Zhang S., Mahnoor S., Weaver L.N., Walczak C.E. // *J. Cell Biol.* 2020. V. 219. № 2. e201906045.
30. Roeles J., Tsiavaliaris G. // *Nat. Commun.* 2019. V. 10. № 1. P. 1–10.
31. Bennabi I., Quéguiner I., Kolano A., Boudier T., Mailly P., Verlhac M.H., Terret M.E. // *EMBO Repts*. 2018. V. 19. № 2. P. 368–381.
32. So C., Menelaou K., Uraji J., Harasimov K., Steyer A.M., Seres K.B., Bucevicius J., Lukinavicius G., Mobius W., Sibold C., et al. // *Science*. 2022. V. 375. № 6581. P. eabj3944.
33. Lee H.L., McCulloh D.H., Hodes-Wertz B., Adler A., McCaffrey C., Grifo J.A. // *J. Assist. Reprod. Genet.* 2015. V. 32. № 3. P. 435–444.
34. Capalbo A., Bono S., Spizzichino L., Biricik A., Baldi M., Colamaria S., Ubaldi F.M., Rienzi L., Fiorentino F. // *Hum. Reprod.* 2013. V. 28. № 2. P. 509–518.
35. Patel J., Tan S.L., Hartshorne G.M., McAinsh A.D. // *Biology Open*. 2016. V. 5. № 2. P. 178–184.
36. Zielinska A.P., Holubcova Z., Blayney M., Elder K., Schuh M. // *Elife*. 2015. V. 4. P. e11389.
37. Musacchio A., Salmon E.D. // *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 2007. V. 8. № 5. P. 379–393.
38. Lagirand-Cantaloube J., Ciabrini C., Charrasse S., Ferrieres A., Castro A., Anahory T., Lorca T. // *Sci. Rept.* 2017. V. 7. № 1. P. 1–14.
39. Taylor T.H., Gitlin S.A., Patrick J.L., Crain J.L., Wilson J.M., Griffin D.K. // *Hum. Reprod. Update*. 2014. V. 20. № 4. P. 571–581.
40. Cavazza T., Takeda Y., Politi A.Z., Aushev M., Aldag P., Baker C., Choudhary M., Bucevicius J., Lukinavicius G., Elder K., et al. // *Cell*. 2021. V. 184. № 11. P. 2860–2877. e22.
41. Baart E.B., Martini E., van den Berg I., Macklon N.S., Galjaard R.H., Fauser B.C.J.M., van Opstal D. // *Hum. Reprod.* 2006. V. 21. № 1. P. 223–233.
42. Asami M., Lam B.Y.H., Ma M.K., Rainbow K., Braun S., VerMilyea M.D., Yeo G.S.H., Perry A.C.F. // *Cell Stem Cell*. 2022. V. 29. № 2. P. 209–216. e4.
43. Leng L., Sun J., Huang J., Gong F., Yang L., Zhang S., Yuan X., Fang F., Xu X., Luo Y., et al. // *Cell Stem Cell*. 2019. V. 25. № 5. P. 697–712. e6.
44. Wells D., Bermudez M., Steuerwald N., Thornhill A., Walker D., Malter H., Delhanty J., Cohen J. // *Hum. Reprod.* 2005. V. 20. № 5. P. 1339–1348.
45. Kiessling A.A. // *Nat. Biotechnol.* 2010. V. 28. № 10. P. 1025–1026.
46. Kyogoku H., Kitajima T.S. // *Developmental Cell*. 2017. V. 41. № 3. P. 287–298. e4.
47. Palermo G.D., Colombero L.T., Rosenwaks Z. // *Rev. Reprod.* 1997. V. 2. P. 19–27.
48. Silber S., Escudero T., Lenahan K., Abdelhadi I., Kilani Z., Munne S. // *Fertility, Sterility*. 2003. V. 79. № 1. P. 30–38.
49. Mantikou E., Wong K.M., Repping S., Mastenbroek S. // *Biochim. Biophys. Acta (BBA)-Mol. Basis Dis.* 2012. V. 1822. № 12. P. 1921–1930.

50. Cimini D., Howell B., Maddox P., Khodjakov A., Degrassi F., Salmon E. // *J. Cell Biol.* 2001. V. 153. № 3. P. 517–528.
51. Daughtry B.L., Rosenkrantz J.L., Lazar N.H., Fei S.S., Redmayne N., Torkenczy K.A., Adey A., Yan M., Gao L., Park B., et al. // *Genome Res.* 2019. V. 29. № 3. P. 367–382.
52. Munné S., Sandalinas M., Escudero T., Márquez C., Cohen J. // *Reprod. Biomed. Online.* 2002. V. 4. № 3. P. 223–232.
53. Ioannou D., Fonseka K.G.L., Meershoek E.J., Thornhill A.R., Abogrein A., Ellis M., Griffin D.K. // *Chromosome Res.* 2012. V. 20. № 4. P. 447–460.
54. Levy B., Hoffmann E.R., McCoy R.C., Grati F.R. // *Prenatal Diagnosis.* 2021. V. 41. № 5. P. 631–641.
55. Munné S., Wells D. // *Fertility, Sterility.* 2017. V. 107. № 5. P. 1085–1091.
56. Viotti M., Greco E., Grifo J.A., Madjunkov M., Li-brach C., Cetinkaya M., Kahraman S., Yakovlev P., Kornilov N., Corti L., et al. // *Fertility, Sterility.* 2023. S0015-0282(23)00716-1.
57. Greco E., Minasi M.G., Fiorentino F. // *N. Engl. J. Med.* 2015. V. 373. № 21. P. 2089–2090.
58. Leigh D., Cram D.S., Rechitsky S., Handyside A., Wells D., Munne S., Kahraman S., Grifo J., Katz-Jaffe M., Rubio C. // *Reprod. Biomed. Online.* 2022. V. 45. № 1. P. 19–25.
59. Lee C.I., Cheng E.H., Lee M.S., Lin P.Y., Chen Y.C., Chen C.H., Huang L.S., Huang C.C., Lee T.H. // *J. Assisted Reprod. Genet.* 2020. V. 37. № 9. P. 2305–2313.
60. Chen C.P., Lin Y.H., Chern S.R., Wu P.S., Chen S.W., Wu F.T., Lee M.S., Chen Y.Y., Wang W. // *Taiwanese J. Obstetrics Gynecol.* 2020. V. 59. № 1. P. 146–149.
61. Kahraman S., Cetinkaya M., Yuksel B., Yesil M., Pirkevi Cetinkaya C. // *Hum. Reprod.* 2020. V. 35. № 3. P. 727–733.
62. Bazrgar M., Gourabi H., Valojerdi M.R., Yazdi P.E., Baharvand H. // *Stem Cells Devel.* 2013. V. 22. № 17. P. 2449–2456.
63. Delhanty J.D.A. // *Hum. Fertility.* 2013. V. 16. № 4. P. 241–245.
64. Malvestiti F., Agrati C., Grimi B., Pompili E., Izzi C., Martinoni L., Gaetani E., Liuti M.R., Trotta A., Maggi F., et al. // *Prenatal Diagnosis.* 2015. V. 35. № 11. P. 1117–1127.
65. Xenopoulos P., Kang M., Puliafito A., Di Talia S., Hadjantonakis A.K. // *Cell Rept.* 2015. V. 10. № 9. P. 1508–1520.
66. Fragouli E., Lenzi M., Ross R., Katz-Jaffe M., Schoolcraft W.B., Wells D. // *Hum. Reprod.* 2008. V. 23. № 11. P. 2596–2608.
67. Capalbo A., Wright G., Elliott T., Ubaldi F.M., Rienzi L., Nagy Z.P. // *Hum. Reprod.* 2013. V. 28. № 8. P. 2298–2307.
68. Popovic M., Dheedene A., Christodoulou C., Taelman J., Dhaenens L., van Nieuwerburgh F., Deforce D., van den Abbeel E., De Sutter P., Menten B., et al. // *Hum. Reprod.* 2018. V. 33. № 7. P. 1342–1354.
69. Victor A.R., Tyndall J.C., Brake A.J., Lepkowsky L.T., Murphy A.E., Griffin D.K., McCoy R.C., Barnes F.L., Zouves C.G., Viotti M. // *Fertility, Sterility.* 2019. V. 111. № 2. P. 280–293.
70. Winiarczyk D., Piliszek A., Sampino S., Lukaszewicz M., Modliński J.A. // *Reproduction, Fertility, Devel.* 2021. V. 33. № 12. P. 725–735.
71. Singla S., Iwamoto-Stohl L.K., Zhu M., Zernicka-Goetz M. // *Nat. Commun.* 2020. V. 11. № 1. P. 1–15.
72. Жигалина Д.И., Скрябин Н.А., Артюхова В.Г., Светлаков А.В., Лебедев И.Н. // *Цитология.* 2016. Т. 58. № 6. С. 488–492.
73. Tšuiiko O., Zhigalina D.I., Jatsenko T., Skryabin N.A., Kanbekova O.R., Artyukhova V.G., Svetlakov A.V., Teearu K., Trosin A., Salumets A., et al. // *Fertility, Sterility.* 2018. V. 109. № 6. P. 1127–1134. e1.
74. Wang X., Zhao J., Yao Z., Xia Q., Chang T., Zeng J., Liu J., Li Y., Zhu H. // *Reproductive Sci.* 2023. P. 1–11.
75. Gueye N.A., Devkota B., Taylor D., Pfundt R., Scott Jr. R.T., Treff N.R. // *Fertility, Sterility.* 2014. V. 101. № 1. P. 232–236.
76. Fragouli E., Alfarawati S., Spath K., Babariya D., Tarozzi N., Borini A., Wells D. // *Hum. Genet.* 2017. V. 136. № 7. P. 805–819.
77. Spinella F., Fiorentino F., Biricic A., Bono S., Rubert A., Cotroneo E., Baldi M., Cursio E., Minasi M.G., Greco E. // *Fertility, Sterility.* 2018. V. 109. № 1. P. 77–83.
78. Martin A., Mercader A., Dominguez F., Quiñonero A., Perez M., Gonzalez-Martin R., Delgado A., Mifsud A., Pellicer A., De Los Santos M.J. // *Front. Mol. Biosci.* 2023. V. 10. P. 264.
79. Fragouli E., Munné S., Wells D. // *Hum. Reprod. Update.* 2019. V. 25. № 1. P. 15–33.
80. Franasiak J.M., Forman E.J., Hong K.H., Werner M.D., Upham K.M., Treff N.R., Scott R.T. // *J. Assist. Reprod. Genet.* 2014. V. 31. № 11. P. 1501–1509.
81. Rubio C., Rodrigo L., Mercader A., Mateu E., Buendia P., Pehlivan T., Vilorio T., Santos D.L., Simon C., Remohi J., et al. // *Prenatal Diagnosis: Published in Affiliation With the International Society for Prenatal Diagnosis.* 2007. V. 27. № 8. P. 748–756.

УДК 577.2:616,577.2:579

Роль аутофагии в развитии патологических состояний организма

У. С. Кенч^{1,2}, С. С. Сологова², В. С. Прасолов^{1*}, П. В. Спирин^{1**}¹Институт молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта Российской академии наук, Москва, 119991 Россия²Институт фармации им А.П. Нелюбина, Первый Московский государственный медицинский университет им. И.М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский университет), Москва, 119991 Россия

*E-mail: prassolov45@mail.ru

**E-mail: spirin.pvl@gmail.com

Поступила в редакцию 28.06.2023

Принята к печати 23.07.2023

DOI: 10.32607/actanaturae.23838

РЕФЕРАТ Аутофагия – это процесс утилизации клеточных органелл, участков цитоплазмы, а также разрушения микроорганизмов, проникающих в клетку, в лизосомах. Аутофагия сопряжена как с гибелью, так и с увеличением выживаемости клеток, а также вовлечена в развитие различных заболеваний, в том числе нейродегенеративных и онкологических, атеросклероза. Все это делает крайне важным поиск молекулярных мишеней, которые могут участвовать в регуляции аутофагии, и факторов, способных влиять на ее связь с патогенезом различных заболеваний. В представленном обзоре рассмотрены потенциальные молекулярные механизмы, участвующие в регуляции аутофагии, и ее вклад в гомеостаз клеток в здоровом организме и при патологиях.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА аутофагия, апоптоз, клеточная гибель, лизосомы.

ВВЕДЕНИЕ

Аутофагия – это механизм, связанный с утилизацией не востребуемых и поврежденных органелл и областей цитозоля клетки, который рассматривают как компенсаторную реакцию, возникающую в результате недостатка питательных веществ в клетках, а также как ответную реакцию на стресс. В ряде случаев активация аутофагии приводит к клеточной гибели. Таким образом, аутофагия, с одной стороны, защищает клетки от неблагоприятных внешних и внутренних воздействий, а с другой – приводит к смерти клеток в случае невозможности их спасения, а также при вирусной или бактериальной инфекции.

1. МЕХАНИЗМЫ РЕГУЛЯЦИИ АУТОФАГИИ

В процессе аутофагии вокруг объекта, подлежащего утилизации, формируется аутофагосома, а затем этот объект подвергается лизису. Условно можно выделить следующие этапы аутофагии: инициация, элонгация, формирование аутофагосомы, формирование аутофаголизосомы с последующей ее деградацией (рис. 1).

Стадия I. Инициация аутофагии начинается с выпячивания участка мембраны шероховатого эндо-

плазматического ретикулума (ЭПР) с его последующим отщеплением. В ходе инициации на внешней стороне мембраны ЭПР собирается белковый ULK-комплекс и изменяется структура мембраны. ULK-комплекс, состоящий из белков ULK1, Atg13, FIP200, Atg101, образуется при дефосфорилировании белков Atg13 и ULK1 и одновременном снижении киназной активности mTORc1-комплекса. Дефосфорилирование белков Atg13 и ULK1 стимулирует сборку активного ULK-комплекса [1]. Дефосфорилированный Atg13, входящий в состав ULK-комплекса, связывает белок Atg14, входящий в PI3KC3-комплекс (Vps34), при этом ULK1 фосфорилирует белки Beclin1 (Atg6) и Vps34, что приводит к их активации (рис. 1).

Beclin1 является основным белком, необходимым для формирования PI3KC3-комплекса, а белок Vps34 вовлечен в образование фосфоинозитолтрифосфата из фосфоинозитолдифосфата (PI2P) на поверхности мембраны ЭПР. PI3P необходим для привлечения других белков, участвующих в формировании фагофора и его дальнейшего развития в аутофагосому.

Стадия II. PI3KC3-комплекс (фосфатидилинозитол-3-киназа класс 3) совместно с ULK-комплексом

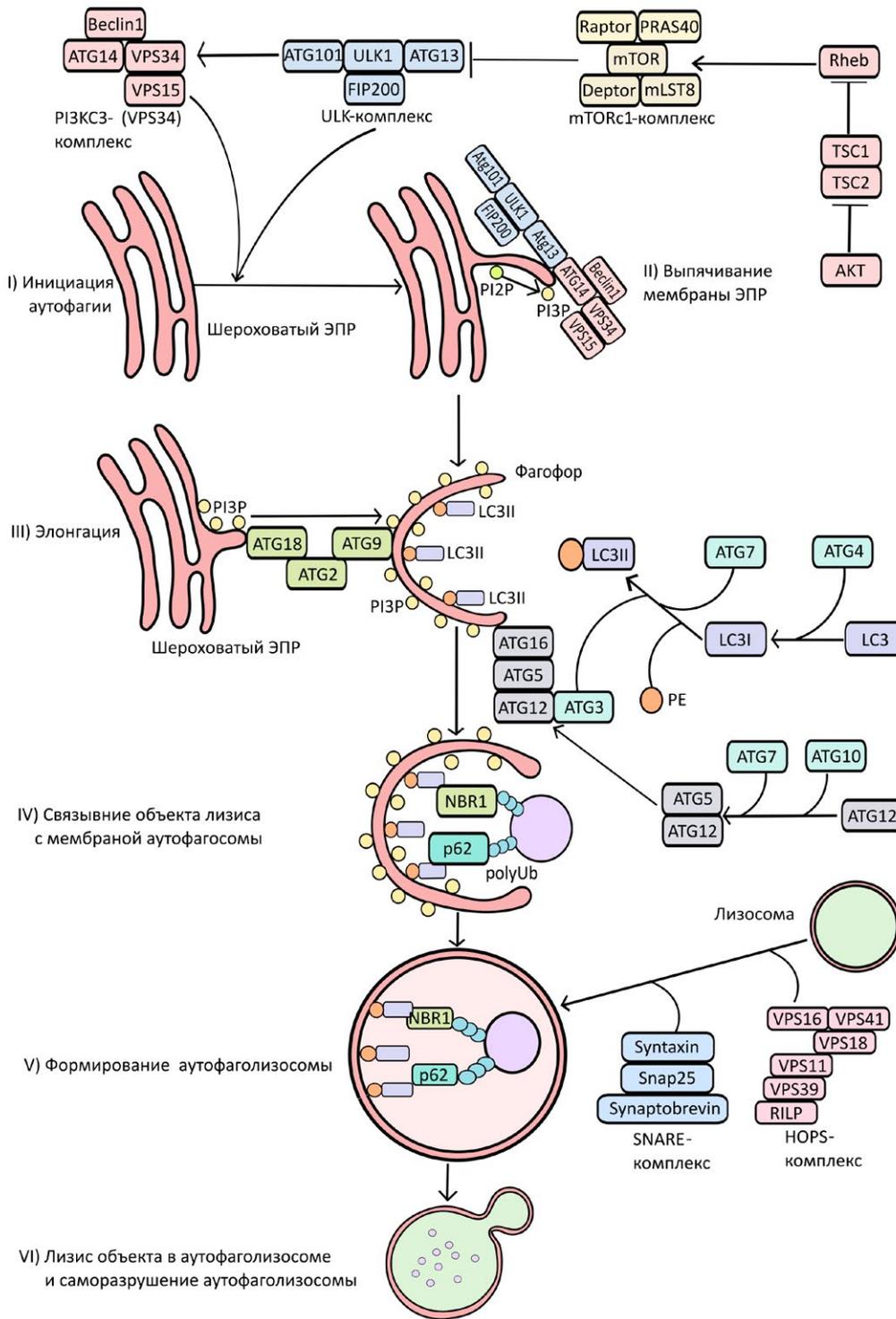


Рис. 1. Схематическое изображение процесса аутофагии. Аутофагия начинается с подавления работы mTORc1-комплекса, препятствующего сборке ULK-комплекса (mTORc1 фосфорилирует белок Atg13, что подавляет сборку активного ULK-комплекса). Стадия I – инициация аутофагии. Стадия II – выпячивание мембраны шероховатого эндоплазматического ретикулула (ЭПР). Стадия III – элонгация. Стадия IV – присоединение лизируемого субстрата к аутофагосоме. Стадии V–VI – формирование аутофаголизисомы и лизис субстрата

способствует выпячиванию фрагмента мембраны ЭПР и ее последующему отщеплению с образованием фагофора [1].

Стадия III. Элонгация фагофора сопряжена с его модификациями (обогащением мембраны фагофора PI3P, присоединением белка LC3II), которые необходимы для присоединения лизируемого

объекта к мембране аутофагосомы. На этом этапе ключевую роль играет главный конъюгирующий Atg12/Atg5/Atg16-комплекс. Образование конъюгирующего комплекса начинается с процессинга убиквитинподобного белка Atg12, осуществляемого E1-убиквитинактивирующим ферментом Atg7 [2] и E2-убиквитинконъюгирующим ферментом Atg10

[3]. К активированному Atg12 присоединяются Atg5 и Atg16 (рис. 1). Конъюгирующий комплекс также необходим для привлечения других белков, участвующих в элонгации и обеспечении изгибания мембраны фагофора [1–3].

Стадия IV. На этой стадии происходит присоединение лизируемого субстрата и его фиксация внутри аутофагосомы при участии белка LC3II – продукта протеолитического расщепления LC3 цистеиновой протеазой Atg4 с образованием промежуточного продукта белка LC3I. При участии Atg7 и Atg3 происходит взаимодействие LC3I с фосфатидилэтаноламином (PE) с последующим образованием LC3II и его закориванием на мембране фагофора [2, 4, 5]. Аналогичными с LC3II функциями обладают белки Atg8 и GABARAP [5].

Параллельно с процессингом LC3II происходит дополнительное обогащение фагофора PI3P, благодаря работе Atg9/Atg2/Atg18-комплекса, переноса PI3P из ЭПР на фагофор (рис. 1, стадия III) [6]. Белок Atg13 инициирует образование Atg9/Atg2/Atg18-комплекса.

Для дальнейшего формирования аутофагосомы от фагофора должны отсоединиться белки, которые уже выполнили свою функцию. Одним из немногих белков, остающихся на мембране фагофора, является LC3II. Для того, чтобы объект, который должен быть разрушен, присоединился к LC3II, необходимы белки-адапторы. Одним из белков-адапторов является p62 (SQSTM1). Белок p62 вовлечен в регуляцию различных сигнальных путей, поскольку может связываться с полиубиквитинированными белками, компонентами ряда сигнальных путей и индуцировать их разрушение в аутофагосоме [7].

Стадия V. Аутофаголизосомы формируются в результате слияния аутофагосомы с лизосомой при участии комплекса белков, основным из которых является HOPS-комплекс, состоящий из белков VPS16, VPS41, VPS18, VPS11, VPS39, RILP, Rab7. Этот комплекс участвует в сближении мембран аутофагосомы и лизосомы [8]. Для слияния мембран необходим также SNARE/SNAP25-комплекс, в состав которого входят белки Syntaxin, SNAP25 (SNAP27) и Synaptobrevin.

Стадия VI. На этой стадии происходит разрушение субстрата внутри аутофаголизосомы при участии лизосомных ферментов. В конечном итоге аутофаголизосома разрушается под действием тех же ферментов, которые осуществляли деградацию объекта.

1.1 Роль mTORc1

Основным регулятором аутофагии является mTORc1-комплекс, в состав которого входят бел-

ки mTOR, PRAS40, Deptor, Raptor, mLST8 (рис. 1). На активность mTORc1 влияет множество сигнальных путей, основной из которых PI3K/АКТ/mTOR. Позитивная регуляция mTORc1 связана с активным белком Rheb, который подавляется комплексом TSC1/2. Белок АКТ, в свою очередь, действует как негативный регулятор TSC1/2 и функционирует, таким образом, в качестве одной из основных киназ, отвечающих за регуляцию аутофагии [9].

1.2 Роль кальция

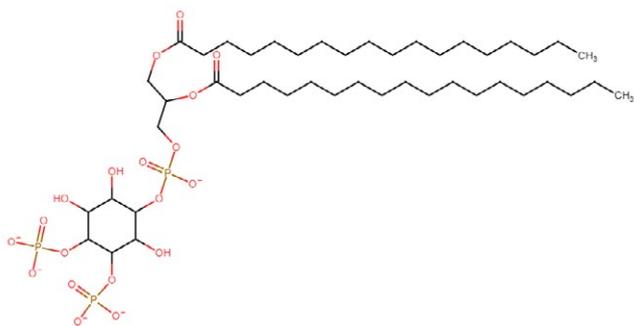
В регуляции аутофагии кальций способен действовать и как индуктор, и как репрессор.

Ингибирующее действие Ca^{2+} реализуется через его способность к активации кальпаина – кальций-зависимой цистеиновой протеазы, которая разрушает белки-инициаторы аутофагии (Atg5, Beclin1, PTEN).

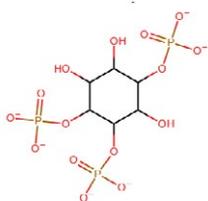
Активация фосфатазы PHLPP1 β , обусловленная повышением уровня кальпаина, приводит к подавлению активности ERK1/2 и АКТ, что нарушает работу лизосом. Естественным ингибитором кальпаина является внутриклеточный белок кальпастина.

Действие Ca^{2+} на аутофагию реализуется через опосредованную киназой CaMKK β активацию белка AMPK. AMPK ингибирует mTORc1-комплекс, а также активирует белки TSC1/2 и ULK1. Еще одна из мишеней кальция – кальмодулин-зависимый белок кальциневрин. Этот белок дефосфорилирует фактор транскрипции TFEB, что приводит к его активации (рис. 2). Активированный TFEB участвует в регуляции экспрессии генов, кодирующих белки, вовлеченные в аутофагию, в том числе LC3, Beclin1, p62. Кальмодулин, в свою очередь, активирует белок Vps34 и кальмодулин-зависимую киназу DAPK – прямой индуктор Beclin1 [10].

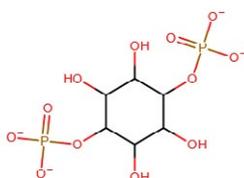
Уровень кальция в цитоплазме определяется активностью кальциевых каналов клетки, в число которых входит IP3R. IP3R – это кальциевый канал ЭПР, работа которого напрямую сопряжена с уровнем IP3, открывающего канал. Это приводит к выходу кальция из ЭПР в цитозоль. IP3R обладает антиаутофагическим эффектом, поскольку способен подавлять диссоциацию комплекса Beclin1/Bcl-2, снижая тем самым уровень свободного активного Beclin1 в клетке. В регуляции внутриклеточной концентрации IP3 участвуют белки PLC и IMP-аза, которые превращают фосфоинозитолдифосфат (PI2P) в инозитолтрифосфат (IP3), а инозитолмонофосфат (IP1) в инозитол соответственно. В свою очередь, инозитол может вернуться в исходное состояние – PI2P [10].



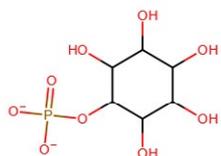
Фосфатидилинозитол-4,5-фосфат (PIP2)



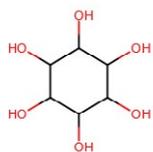
Инозитол-1,4,5-трифосфат (IP3)



Инозитол-1,4-дифосфат (IP2)



Инозитол монофосфат (IP)



Инозитол (Ins)

Особое место в регуляции аутофагии занимает онкосупрессор p53. Белок p53, в зависимости от молекулярных мишеней, с которыми он взаимодействует, может выступать в качестве активатора или ингибитора аутофагии. Известно, что прямое взаимодействие p53 с антиапоптотическими бел-

ками семейства Bcl-2 (Bcl-2, Bcl-X1, Mcl-1) приводит к подавлению их активности и, следовательно, к индукции апоптоза. В частности, взаимодействие p53 с Bcl-2 вызывает диссоциацию Bcl-2/Bcl-1-комплекса с последующим высвобождением Bcl-1 и инициацией аутофагии [11]. В качестве примера индукции аутофагии, опосредованной p53, можно привести активацию белков TSC1/2 и Beclin1 при прямом взаимодействии p53 с DAPK – активатором Beclin1. Белок p53 может также препятствовать инициации аутофагии, нарушая сборку ULK-комплекса, в результате своего присоединения к белку FIP200. Известно также, что p53 может ингибировать белок AMPK – один из важных активаторов аутофагии (рис. 2) [12].

Аутофагия, несмотря на ее адаптивную функцию, может быть причиной клеточной гибели, зависимой от аутофагии (летальная аутофагия), для которой характерно появление значительного количества вакуолей в клетках [13].

Одним из возможных механизмов летальной аутофагии является активация церамидсинтазы 1 (CerS1), образующей керамид на внешней мембране митохондрий, что приводит к их разрушению, так как керамид взаимодействует с рецептором LC3II, локализованным на мембране аутофагосомы. Установлено, что значительное накопление церамида на мембране митохондрий в значительной степени повышает риск индукции летальной аутофагии [13].

Разрушение субстрата может происходить и без образования аутофагосомы и других специфических везикул – путем шаперон-ассоциированной аутофагии [14], которая начинается с формирования трансмембранного канала, формируемого олигомерным лизосомным белком LAMP2A (CD107). Этот канал образуется при появлении в цитозоле так называемого мисфолдинг-белка, имеющего неправильную конформацию и содержащего уникальный мотив KFERQ. Для формирования канала KFERQ-мотив неправильно свернутого белка должен присоединиться к комплексу белков, в состав которых входит белок HSC70, выполняющий функцию шаперона [10, 14]. После этого мисфолдинг-белок проходит через канал LAMP2A в лизосому, где и разрушается.

2. РОЛЬ АУТОФАГИИ В РАЗВИТИИ ЗАБОЛЕВАНИЙ

Аутофагия вовлечена в развитие ряда заболеваний человека (атеросклероз, сахарный диабет, ишемия различной локализации, цирроз, хроническая обструктивная болезнь легких и др.), причем как в развитие патологического процесса, так и в его купирование.

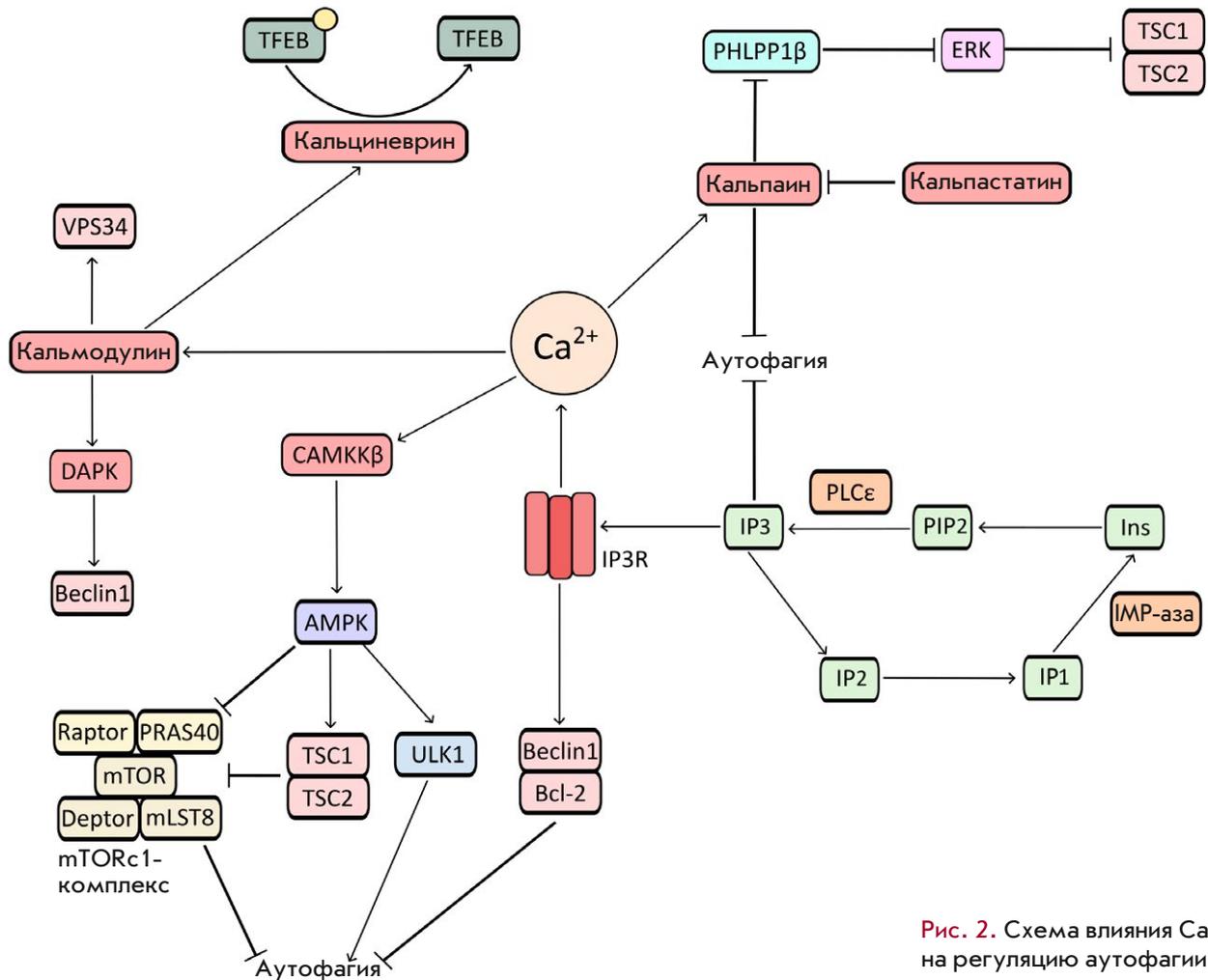


Рис. 2. Схема влияния Ca^{2+} на регуляцию аутофагии

2.1 Аутофагия и нейродегенеративные заболевания

Нейродегенеративные заболевания составляют обширную группу патологических состояний, обусловленных гибелью клеток нервной системы. Механизмы развития таких заболеваний в полной мере не установлены, однако известно, что, как правило, они связаны с появлением и накоплением агрегатов белков с аномальной структурой как в межклеточном пространстве, так и внутри самих клеток. В процесс нейродегенерации, в ходе которого происходит постепенное нарушение моторных, психологических и когнитивных функций, могут вовлекаться клетки как центральной, так и периферической нервной системы.

В клетке существует много механизмов элиминации мисфолдинг-белков, к числу которых относят и аутофагию. Аутофагия может запускаться как путем индукции ЭПР-стресса, в частности, PERK/eIF2A/ATF4-сигнального пути, в ответ на по-

явление мисфолдинг-белков (рис. 3), так и опосредоваться шаперонами [15], и принимать участие в элиминации мисфолдинг-белков, характерных для каждого из нейродегенеративных заболеваний [1]. Нарушение утилизации мисфолдинг-белков приводит к их накоплению и дальнейшей агрегации в тельца и бляшки. При болезни Паркинсона в клетках образуются тельца Леви (α -sinuclein), а при болезни Альцгеймера – сенильные (β -амилоид) и нейрофибриллярные (тау-белок) бляшки.

Нарушение аутофагии при нейродегенеративных заболеваниях сопровождается накоплением лизосом и незрелых аутофагосом в нейронах. Этот феномен связан с нарушением инактивации фактора транскрипции TFEB, который регулирует экспрессию многих генов, кодирующих белки аутофагии (LC3, Beclin1, p62 и т.д.) и белки, участвующие в биогенезе лизосом.

В норме, в регуляции активности фактора транскрипции TFEB значительную роль играет

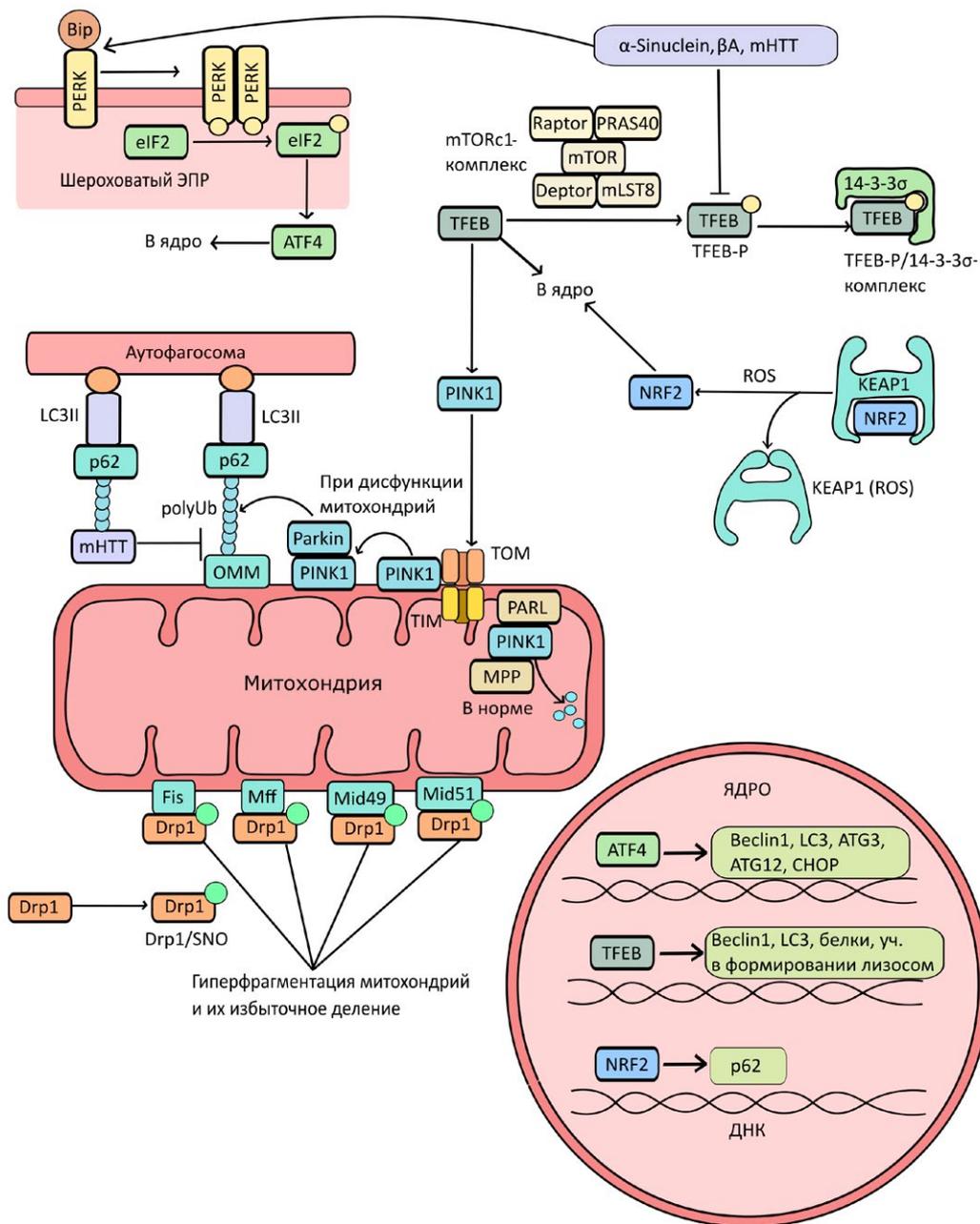


Рис. 3. Влияние мисфолдинг-белков, вызывающих активацию ЭГР-стресса, на регуляцию активности фактора TFEB, и комплекс mTORc1 при нейродегенеративных заболеваниях (α-sinuclein при болезни Паркинсона, β-амилоид и mHTT при болезнях Альцгеймера и Гентингтона). На мембране ЭГР находится гетеродимерный комплекс PERK/Bip. Шаперон Bip связывается с мисфолдинг-белками, что приводит к высвобождению PERK с его последующей димеризацией и активацией. Димер PERK фосфорилирует фактор инициации трансляции eIF2, что приводит к его инактивации и подавлению трансляции многих белков, но не фактора транскрипции ATF4, который мигрирует в ядро и активирует там экспрессию генов аутофагии. Белок Bip связывается с мисфолдинг-белками, что приводит к высвобождению PERK с его последующей димеризацией и активацией. Димер PERK фосфорилирует фактор инициации трансляции eIF2, что приводит к его инактивации и подавлению трансляции многих белков, но не фактора транскрипции ATF4, который мигрирует в ядро и активирует там экспрессию генов аутофагии. Белок Bip связывается с мисфолдинг-белками, что приводит к высвобождению PERK с его последующей димеризацией и активацией. Димер PERK фосфорилирует фактор инициации трансляции eIF2, что приводит к его инактивации и подавлению трансляции многих белков, но не фактора транскрипции ATF4, который мигрирует в ядро и активирует там экспрессию генов аутофагии.

mTORc1-комплекс, который подавляет импорт этого фактора в ядро путем его фосфорилирования с последующим образованием в цитоплазме 14-3-3σ/TFEB(P)-комплекса. При нейродегенеративных заболеваниях наблюдается снижение активности mTORc1-комплекса, что приводит к высвобождению белка TFEB из 14-3-3σ/TFEB(P)-комплекса и его переносу в ядро (рис. 3). Установлено также, что мисфолдинг-белки препятствуют инактивации TFEB, вызывая тем самым значительное увеличение экспрессии контролируемых ими генов. При нейродегенеративных процессах это можно рассматривать

как компенсаторную реакцию клетки на снижение эффективности аутофагии [16].

Фактор транскрипции TFEB также участвует в регуляции белка PINK1 – серин/треониновой киназы, отвечающей за локализацию убиквитинлигазы паркин на внешней мембране митохондрий, вызванную снижением мембранного потенциала поврежденных митохондрий. Белок паркин полиубиквитинирует белки внешней мембраны митохондрий (OMM), что приводит к образованию сложного белкового OMM/polyUb-p62-LC3II-комплекса, необходимого для связывания аутофагосомы с ми-

тохондрией и ее разрушения в аутофаголизосоме. Процесс разрушения митохондрий в аутофаголизосоме получил название митофагия. В норме белок PINK1 переносится в матрикс митохондрий с помощью транслоказ TOM/TIM, где разрушается при участии протеаз PARL и MPP (рис. 3) [16].

2.1.1 Болезнь Гентингтона. Болезнь Гентингтона – аутосомно-доминантное заболевание, на ранней стадии которого наблюдается нейродегенерация базальных структур (стриатума) головного мозга, с последующей прогрессией вплоть до полной атрофии коры больших полушарий. Первые симптомы проявляются в возрасте 35–45 лет. На ранних стадиях возникает нарушение моторных функций, реже когнитивные и психические аномалии. По мере прогрессии заболевания более выраженными становятся психические нарушения, такие, как агрессивность, депрессия, панические атаки и т.д. Усиливаются нарушения памяти и моторные нарушения: брадикинезия, атаксия и снижение рефлексов. Смерть наступает через 15–20 лет после установления диагноза. Лекарственных средств от болезни Гентингтона на сегодняшний день не существует.

Патогенез болезни Гентингтона связан с экспансией числа тринуклеотидных CAG-повторов в гене *HTT*, кодирующем белок гентингтин (Htt). В норме таких повторов должно быть не более шести. Накопление повторов имеет кумулятивный характер, т.е. чем больше повторов в гене *HTT*, тем выше риск развития заболевания, но критичным считается ≥ 40 CAG-повторов [17, 18]. В нормальном состоянии белок гентингтин участвует в аксональном транспорте, являясь адапторным белком к кинезину. Мутантная форма Htt теряет способность к связыванию кинезина с везикулой, что приводит к нарушению везикулярного транспорта вдоль аксона [19]. Известно также, что мутантный белок (mHtt) может взаимодействовать с такими факторами транскрипции, как CREB, CBP, TFIID, p53, SP1 [19], нарушая их ДНК-связывающую активность. Это приводит к снижению образованию белков, важных для жизни клетки. Мутантный белок гентингтин (mHtt), в отличие от Htt дикого типа, может индуцировать экспрессию генов аутофагии через активацию ЭПР-стресса (PERK/eIF2A/ATF4-сигнальный путь) (рис. 3) [15]. Известно, что mHtt может увеличивать дефосфорилирование фактора TFEB, что ведет к повышению транспорта этого фактора в ядро и экспрессии генов, кодирующих белки аутофагии (рис. 3).

Установлено, что mHtt может напрямую связываться с Beclin1, приводя к нарушению сборки ком-

плекса PI3KC3 и, следовательно, к нарушению инициации аутофагии [18]. Таким образом, мутантный белок гентингтин может по-разному влиять на активность аутофагии. Нарушение утилизации mHtt вследствие нарушения аутофагии приводит к его накоплению в цитоплазме клеток с образованием белковых агрегатов, что, в конечном итоге, приводит к более агрессивному течению заболевания [15, 19].

Накопление mHtt в цитоплазме может приводить к его связыванию с p62 и нарушению работы белка LC3II на мембране аутофагосомы. Это влияет на формирование аутофагосомы вокруг объекта утилизации, в результате чего образуются пустые аутофагосомы с возможностью индукции некроптоза клетки [19, 20].

2.1.2 Болезнь Альцгеймера и роль аутофагии в ее развитии. Болезнь Альцгеймера (БА) – наиболее распространенный тип старческой деменции, на ранних стадиях которой наблюдается нарушение краткосрочной памяти и снижение когнитивных функций. В дальнейшем утрачиваются коммуникативные функции, способность к самообслуживанию и нарушение речи, вплоть до полной афазии.

Механизмы патогенеза БА изучены не в полной мере. Существует несколько гипотез, описывающих механизмы развития данного заболевания, в том числе тау-гипотеза и гипотеза накопления сенильных бляшек. Также активно исследуется роль митохондрий в БА.

Роль β -амилоида в патогенезе БА до сих пор не установлена, а недавние исследования поставили под сомнение представления о ведущей роли сенильных бляшек в нейродегенерации [21]. β -Амилоид (β A) представляет собой полипептид, состоящий из 42 аминокислотных остатков, стопки таких полипептидов формируют сенильные бляшки. β A образуется при протеолитическом амилоидогенном расщеплении предшественника β -амилоида (APP), ген которого расположен в хромосоме 21. APP участвует в клеточной адгезии, а также способствует увеличению выживаемости клеток. Расщепление APP с образованием β A опосредовано активностью β -секретазы (BACE1) и γ -секретазы. C-Конец молекулы APP расщепляет γ -секретаза, тогда как β -секретаза действует на N-конец. После протеолитического расщепления APP образуются мономеры β A, которые образуют внеклеточные белковые конгломераты – сенильные бляшки [22]. Эти структуры пространственно препятствуют образованию синаптических связей и инициируют местное воспаление, связанное с выделением многочисленных провоспалительных факторов из клеток микроглии. Такое воспаление вызвано взаимодействием

трансмембранного рецептора TREM2 с амилоидными бляшками, которое приводит к активации белков NF- κ B и Syk-киназы, вовлеченных в активацию цитокинов и других факторов воспаления (IL-2, NO-синтазы), что приводит к гибели нейронов [23].

В патогенезе БА участвует также тау-белок, относящийся к семейству белков MAP, ассоциированных с микротрубочками. Белки MAP обеспечивают необходимую жесткость и прочность микротрубочек. Это связано со способностью тау-белка связываться с тубулином с образованием «ребер жесткости» вдоль всей длины микротрубочки. Эффективность такого связывания зависит от степени фосфорилирования тау-белка. Чем сильнее фосфорилирован тау-белок, тем меньше его сродство к тубулину. В норме в тау-белке фосфорилированы 2–3 аминокислотных остатка, но определенные мутации тау-белка вызывают увеличение фосфорилирования. К примеру, четыре миссенс-мутации (G272V, P301L, V337M и R406W) приводят к сверхфосфорилированию и отсоединению тау-белка от микротрубочек. Отсоединение тау-белка приводит к его накоплению в цитоплазме и его последующему экспорту в межклеточное пространство и агрегации в нейрофибрилярные бляшки [24]. Состояние, при котором происходит данная агрегация, получило название таупатия [25].

В последнее время появляется все больше сведений о роли митохондрий в патогенезе БА. Предшественник β -амилоида (APP) накапливается в митохондриях в результате переноса из цитоплазмы в межмембранное пространство митохондрий с помощью транслоказы TOMM40, где APP блокирует работу цитохромоксидазного комплекса (комплекс IV цепи переноса электронов), что приводит к снижению синтеза ATP [26]. Бета-амилоид связывается также с белком циклофилином D, участвующим в регуляции уровня кальция в митохондриях, а также в экспрессии митохондриальных генов. Вследствие этого нарушение функции циклофилина D приводит к снижению транскрипции митохондриальных генов и нарушению функций митохондрий [27].

Известно, что β A влияет на деление митохондрий. При делении митохондрий белки Drp1 формируют по ее центру кольцо перетяжки. Накопление β A приводит к образованию в клетке индуцибельной NO-синтазы (iNOS), участвующей в S-нитрозилировании Drp1 (Drp1/SNO) (рис. 3). Эта модификация нарушает контроль за олигомеризацией Drp1 на стенке митохондрий, что приводит к аномальной фрагментации и увеличению количества митохондрий [28, 29]. Присоединение Drp1 к мембране митохондрий осуществляется за счет

ассоциации с адапторными трансмембранными белками Fis1, Mff, Mid49/51 (рис. 3) [29].

Аутофагия участвует в разрушении APP в везикулах. Нарушение аутофагии при БА связано с накоплением большого количества незрелых аутофагосом в нейронах в результате нарушения работы ESCRT-III-комплекса (цитозольного комплекса белков), участвующего в образовании мультивезикулярного тельца (MVB). Этот комплекс отвечает за перенос убиквитинированных мембранных белков в MVB. Нарушение формирования MVB приводит к невозможности их слияния с аутофагосомой, невозможности образования поздней эндосомы и дальнейшего разрушения APP в лизосомах [30, 31]. Прямое влияние аутофагии на патогенез БА связывают с белком Atg7, участвующим в транспорте β A в MVB. Таким образом, белок Atg7 участвует в накоплении в везикулах-экзосомах амилоидных агрегатов и в их переносе в межклеточное пространство. Экспериментально показано, что подавление активности белка Atg7 с помощью интерферирующих РНК приводит к уменьшению продукции β A нейронами. Показано также, что дефицит белка Atg7 вызывает значительное накопление гиперфосфорилированного тау-белка. Таким образом, Atg7 активно участвует в деградации тау-белка и, следовательно, может быть непосредственно вовлечен в его оборот [31]. Накопленные данные свидетельствуют о том, что белки, связанные с регуляцией аутофагии, могут участвовать в развитии БА.

Еще одним следствием БА считают накопление в нейронах активных форм кислорода (ROS). Образование ROS связано с NADPH-оксидазой 4 (NOX4), активация которой происходит при взаимодействии трансмембранного белка RAGE с молекулами β A. Важно отметить, что ROS может как активировать, так и ингибировать аутофагию.

Примером положительного воздействия ROS на аутофагию можно считать активацию сигнального пути ROS-KEAP1-NRF2-p62. ROS окисляют остатки цистеина в молекуле белка KEAP1, входящего в гетеродимерный комплекс KEAP1/NRF2. Это приводит к высвобождению фактора транскрипции NRF2, который усиливает экспрессию гена, кодирующего p62 (рис. 3) [32].

Негативное воздействие ROS на аутофагию связано со снижением активности фактора транскрипции HIF-1 α . В активном состоянии этот фактор усиливает транскрипцию генов *LC3*, *BNIP3/NIX* и *REDD*, взаимодействуя с их энхансерами. При накоплении ROS в клетках остатки пролина в структуре HIF-1 α подвергаются окислению, что приводит к полиубиквитинированию HIF-1 α и его дальнейшему протеолизу [33].

2.2 Аутофагия и аутоиммунные заболевания

Причины развития аутоиммунных заболеваний многочисленны. Их развитие связывают, с одной стороны, с возникновением пула зрелых В-лимфоцитов (плазмочитов), продуцирующих аутореактивные антитела, а с другой – с уменьшением активности или количества регуляторных Т-лимфоцитов [34]. Возникновение пула аутореактивных лимфоцитов может быть связано с нарушением селекции всего пула лимфоцитов, находящихся в центральных иммунных органах. Последующая защитная реакция организма от аутореактивных лимфоцитов заключается в их элиминации при взаимодействии с эпителиальными клетками медуллярной зоны стромы тимуса. Такие клетки продуцируют тканеспецифические антитела, взаимодействующие с аутореактивными лимфоцитами, что, в конечном счете, приводит к их гибели. Этот процесс называют ауторезистентностью. Считается, что нарушение ауторезистентности при аутоиммунных заболеваниях приводит к поддержанию пула аутореактивных лимфоцитов.

Помимо сохранения пула аутореактивных лимфоцитов, аномально агрессивных по отношению к нормальным клеткам организма человека, патологический иммунный ответ может быть связан с нарушением эффективной утилизации фрагментов поврежденных или мертвых клеток, компонентов патогенных микроорганизмов и других антигенов и их накоплением в результате нарушения активности аутофагии [35].

Аутофагия также способствует сборке МНС-комплексов, участвующих в презентации антигена на клеточной мембране. Такие комплексы служат сигналами активации иммунного ответа. Нарушение аутофагии приводит к нарушению сборки МНС II, так как не происходит фрагментация патогена в аутофаголизосоме и взаимодействие образующихся фрагментов с МНС II [35].

Существуют также механизмы, при которых аутофагия выступает в качестве негативного регулятора аутоиммунных процессов. В частности, аутофагия влияет на выживаемость и дифференцировку самих иммунных клеток. Об этом говорит тот факт, что дисфункция белка Atg5 в В-лимфоцитах приводит к нарушению дифференцировки про-В-клеток в пре-В-лимфоциты. При этом В-клетки с мутантным неактивным Atg5 менее жизнеспособны, чем клетки с нормальным Atg5. Аутофагия также может влиять на BCR-сигнальный путь, необходимый для активации В-лимфоцитов. Установлено, что в апоптотических В-лимфоцитах, в которых одновременно активирован BCR-сигнальный путь, аномально повышено образование аутофагосом и,

соответственно, наступает их гибель. Это наблюдение указывает на то, что аутофагия может участвовать в подавлении аутореактивных В-лимфоцитов [36, 37].

Аутофагия является одним из факторов, опосредованно влияющих на жизнеспособность Т-лимфоцитов. Известно, что подавление образования компонентов комплекса инициатора аутофагии Р13К3-С1 в Т-лимфоцитах приводит к нарушению утилизации поврежденных органелл, нарушению их дифференцировки и полномасштабной гибели [38]. Также известно, что выживаемость Т-лимфоцитов снижается при дефиците белков Atg7, Atg5 и Atg3.

2.2.1 Болезнь Крона и роль аутофагии в ее патогенезе. Как и в случае многих заболеваний аутоиммунного характера, патогенез болезни Крона, проявляющейся хроническим воспалением толстого кишечника, до конца не выяснен. Слизистая оболочка кишечника при этом выглядит, как «булыжная мостовая», с характерными утолщениями. Симптоматика схожа с обычными диспепсическими расстройствами: боли в животе, диарея, анорексия, тошнота, рвота, потеря веса. Область воспаления может распространиться по всему желудочно-кишечному тракту, вплоть до слизистой оболочки ротовой полости. При воспалении нарушается всасывание питательных веществ в кишечнике. Молекулярный механизм патогенеза болезни Крона не установлен, поэтому отсутствуют эффективные способы ее лечения [39].

В настоящий момент существует несколько гипотез о механизме возникновения и развития болезни Крона. Согласно одной из них, ключевую роль играют мутации в гене, кодирующем рецептор NOD2.

NOD2 – рецепторный цитозольный белок, прикрепленный к внутренней части цитоплазматической мембраны клетки, участвует в антибактериальном иммунном ответе. NOD2 содержит три характерных домена: NOD, LRR и CARD. Лигандом для активации NOD2 служит мурамилпептид (MDP) – компонент пептидогликана клеточной стенки бактерий. Активация рецептора приводит к одновременному взаимодействию MDP с LRR-доменами двух молекул NOD2, что приводит к их димеризации (рис. 4). Это вызывает активацию рецептора NOD2 и связывание двух молекул RIP2 с CARD-доменом. К RIP2 затем присоединяется E3-убиквитинлигазный комплекс, содержащий белки cIAP1/2 и XIAP, что приводит к активации комплекса и образованию полиубиквитина на RIP2. На полиубиквитине образуется комплекс, состоящий из белков TAB1/2 и TAK, инициирующий сборку IKK $\alpha/\beta/\gamma$ -комплекса, участвующего

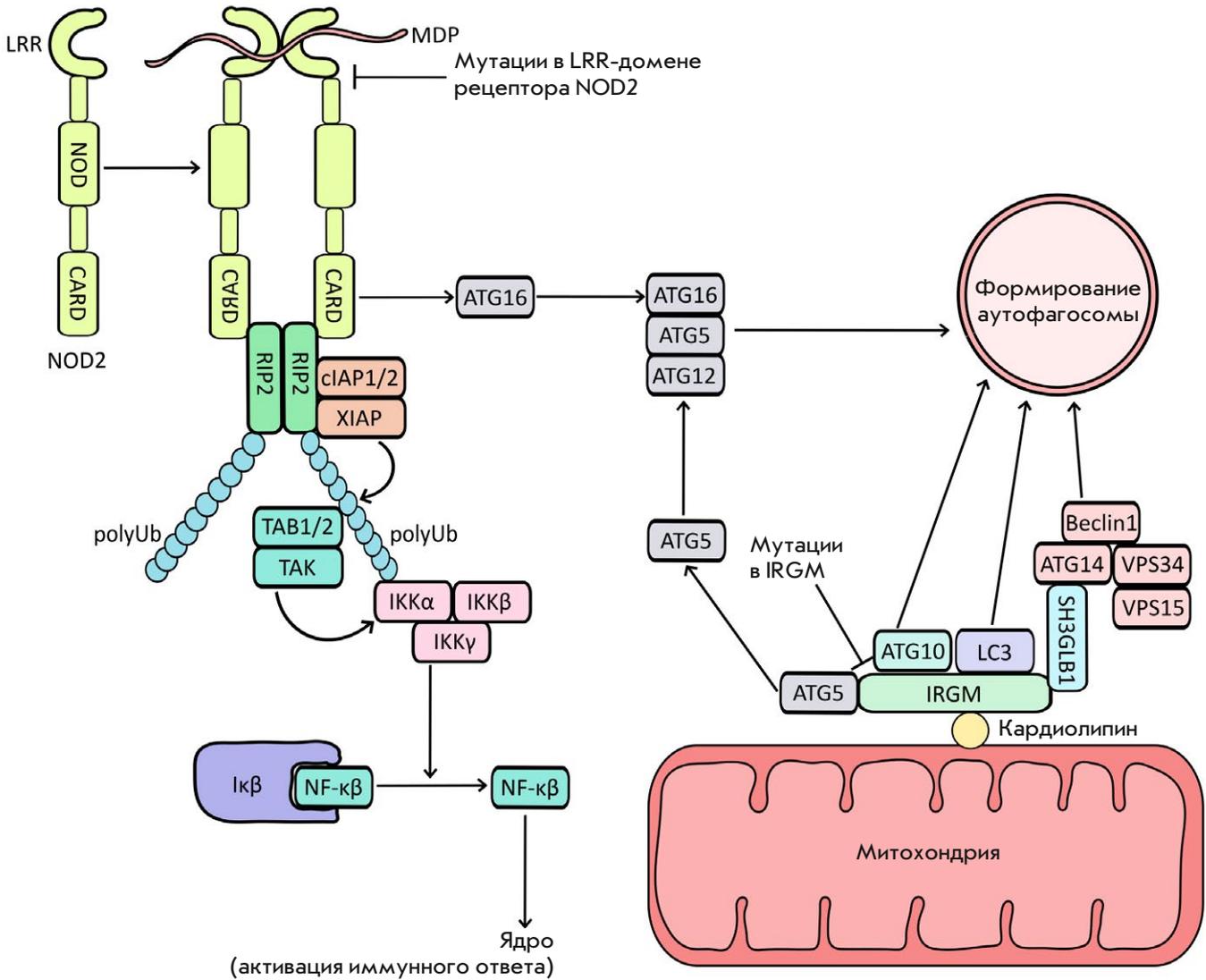


Рис. 4. Болезнь Крона и аутофагия. Схема активации внутриклеточного рецептора NOD2 и сигнальные пути, влияющие на сборку аутофагосомы и связь с митохондриями (пояснения в тексте)

в фосфорилировании белка Iκβ, входящего в состав комплекса с NF-κβ. Это приводит к высвобождению и активации фактора NF-κβ, который мигрирует в ядро [40]. NOD2 регулирует также активность α- и β-дефенсинов, которые образуют «отверстия» на мембране бактерий, приводящие, в конечном счете, к гибели клеток.

Установлено, что мутации в LRR-домене нарушают иммунный ответ и увеличивают выживаемость внутриклеточных патогенных бактерий. В конечном счете происходит увеличение продукции цитокина IL-23, приводящее к усиленному хемотаксису Th17-лимфоцитов в слизистую оболочку кишечника [41, 42].

Связывание Atg16L с NOD2 приводит к образованию Agt12/Atg5/Atg16L-комплекса, необходимого для формирования аутофагосомы, окружающей бактерию, с дальнейшим ее лизисом. Данный подтип аутофагии получил название ксенофагии. При мутации в LRR-домене NOD2 Atg16L не привлекается к мембране. Это приводит к нарушению формирования аутофагосомы и способствует выживанию патогенных бактерий внутри клетки [41, 42].

Другим белком, участвующим в патогенезе болезни Крона, является белок IRGM (immunity-related GTPase family M), обладающий GTP-азной активностью. Этот белок связывается с внешней мембраной митохондрий путем ассоциации с кардиолипином

на ее поверхности. Синтез IFN- γ в клетке, а также заражение клетки грамотрицательными бактериями приводят к увеличению активности IRGM. IRGM вовлечен в регуляцию механизмов внутриклеточного антибактериального иммунитета. Активный IRGM инициирует аутофагию, благодаря его взаимодействию с белками сборки аутофагосомы: Atg5, Atg10, Bif-1, LC3, SH3GLB1, UVRAG, Beclin1, Vps34 (рис. 4) [43].

Известно, что инактивирующие мутации в гене *IRGM* повышают риск развития болезни Крона. Показано, что введение делеции в промоторную область гена, кодирующего IRGM, или увеличение количества микроРНК-196, мишенью которой служит мРНК IRGM, приводят к снижению активности аутофагии [44].

2.3 Аутофагия и злокачественные заболевания

Как и в случае других заболеваний, аутофагия оказывает двоякий эффект на развитие злокачественных патологий. С одной стороны, аутофагия служит одним из источников питательных веществ для быстро делящихся раковых клеток, но с другой – способна тормозить деление или даже вызвать гибель раковых клеток [45].

В результате агрессивного бесконтрольного роста раковых клеток в опухоли развивается состояние гипоксии из-за отсутствия адекватного кровоснабжения. При этом изменяется метаболизм злокачественных клеток и активируются процессы гликолиза с последующим анаэробным катаболизмом. Ключевую роль в адаптации клеток к состоянию тканевой гипоксии играет фактор транскрипции HIF-1 α , который усиливает ангиогенез в опухоли, запускает гликолиз и активирует процессы клеточной адаптации. Нарушение кислородиндуцирующего протеолиза HIF-1 α в раковых клетках приводит к уменьшению его деградации и, как следствие, к его накоплению в цитозоле. Это, в свою очередь, приводит к усилению экспрессии генов, которые кодируют белки (Beclin1 и BNIP3), участвующие в аутофагии [33, 45].

Истощение энергетических запасов в раковых клетках приводит к активации АМР-киназы АМРК, индуцируемой недостатком АТФ. Таким образом, АМРК является «сенсором» недостатка энергетических ресурсов клетки. Активированный белок АМРК фосфорилирует белки Beclin1 и ULK1 в положениях S93, S96 и T388 и в положениях S467, S555, T574 и S637, соответственно, что приводит к их активации. Также АМРК участвует в фосфорилировании белков mTORc1-комплекса, вызывающее его инактивацию (рис. 2). Данные процессы являются реакцией адаптации к недостатку пита-

тельных веществ и ведут к увеличению активности аутофагии и получению питательных веществ за счет разрушения компонентов злокачественной клетки [46].

Белок-адаптер p62 участвует в разрушении в аутофагосоме токсических веществ, которые образуются в процессе метаболизма в раковых клетках (рис. 1). Снижение количества p62 приводит к уменьшению темпа роста злокачественной опухоли. Повышенное содержание p62 выявлено в клетках рака поджелудочной железы, легкого и печени [47].

Помимо положительного влияния аутофагии на выживаемость раковых клеток, существуют и примеры ее негативного действия. Так, аутофагия может подавлять рост злокачественных клеток и вызывать их гибель за счет взаимодействия белка Beclin1 с мутантной рецепторной тирозинкиназой EGFR, вовлеченной в канцерогенез. При взаимодействии Beclin1–mEGFR митотическая активность мутантного рецептора блокируется, что приводит к подавлению роста злокачественной клетки. Также известно, что введение инактивирующей мутации в ген *BECN1*, кодирующий Beclin1, или экспериментальное снижение его экспрессии приводит к усилению роста опухолевых клеток [48]. В злокачественных клетках при раке молочной железы, предстательной железы и яичников нередко обнаруживают моноаллельную делецию гена *BECN1*. Такая мутация встречается в 40–75% случаев всех вышеперечисленных патологий, чаще мутации такого типа наблюдаются при раке молочной железы. Дефицит белка Beclin1 отмечен также при раке почки, немелкоклеточном раке легкого и холангиокарциноме. В различных лимфомах отмечена гиперэкспрессия гена, кодирующего белок Bcl-2, который может образовывать комплекс с Beclin1 (Beclin1/Bcl-2), ингибирующий аутофагию [49].

2.3.1 Фолликулярная лимфома. Лимфома – это заболевание лимфатической системы, развитие которой обусловлено бесконтрольным ростом лимфоцитов в центральных органах иммунной системы и лимфатических узлах. Одним из вариантов фолликулярной лимфомы является неходжкинская лимфома [50]. Это заболевание протекает медленно. Симптоматика проявляется на более поздних стадиях заболевания, наблюдается увеличение лимфоузлов в паховой области, на шее и в подмышечных впадинах, а также боли в пояснице и интоксикации. По мере прогрессирования заболевания происходит вытеснение иммунокомпетентных клеток и развитие иммунодефицитных состояний.

Патогенез фолликулярной лимфомы связан с хромосомной транслокацией t(14;18)(q32; q21), при которой происходит обмен между участком хромосомы 18, кодирующим антиапоптотический белок Bcl-2, и участком хромосомы 14, кодирующим энхансерную область гена тяжелой цепи иммуноглобулина. В результате этой транслокации образуется слитый ген, направляющий синтез Bcl-2 и отличающийся аномально высокой экспрессией. Как уже отмечено ранее, накопление белка Bcl-2 приводит к избыточному связыванию Bcl-2 с Beclin1, BNIP3 и другими белками, вовлеченными в аутофагию. В результате, в клетках с такой мутацией снижаются процессы аутофагии [49]. Одним из основных свойств белка Bcl-2 является его антиапоптотическая активность, поэтому накопление такого белка приводит к снижению апоптоза трансформированных незрелых В-лимфоцитов и разрастанию их пула. Еще одна мутация, которую нередко выявляют при лимфомах, связана с мутацией в гене Bcl-6 t(3;14)(q27;q32). В данном случае происходит обмен фрагментами между хромосомами 3 и 14, в результате которого образуется последовательность гена, кодирующего мутантный Bcl-6, который не выполняет свою функцию, а именно, нормальную дифференцировку В-лимфоцитов [51].

Кроме того, в клетках фолликулярной лимфомы снижается содержание p62 и LC3II, что приводит к подавлению аутофагии и ассоциированной с аутофагией клеточной гибели [52].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, аутофагия играет важную роль в жизни клеток. Нарушение аутофагии связано с развитием различных заболеваний, а ее активность может по-разному влиять на течение различных заболеваний. Необходимо также отметить, что, несмотря на активное изучение роли аутофагии в различных клеточных процессах и в патогенезе ряда заболеваний, вклад отдельных сигнальных путей, связанных с аутофагией, остается недостаточно изученным и представляет существенный интерес. ●

Благодарности. Сбор теоретического материала и написание текста манускрипта выполнено при поддержке Российского научного фонда (грант № 21-14-00355).

Работы по подготовке манускрипта к печати в журнале поддержаны Российским фондом фундаментальных исследований (грант № 20-54-76005).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Cao W., Li J., Yang K., Cao D. // Bull. Cancer. 2021. V. 108. № 3. P. 304–322. <https://doi.org/10.1016/j.bulcan.2020.11.004>
- Xiong J. // Protein & Cell. 2015. V. 6. № 10. P. 722–734. <https://doi.org/10.1007/s13238-015-0195-8>
- Xie K., Liang C., Li Q., Yan C., Wang C., Gu Y., Zhu M., Du F., Wang H., et al. // Cancer. 2016. V. 139. № 7. P. 1564–1573. <https://doi.org/10.1002/ijc.30205>
- Kuma A., Matsui M., Mizushima N. // Autophagy. 2007. V. 3. № 4. P. 323–328. <https://doi.org/10.4161/auto.4012>
- Schaaf M.B.E., Keulers T.G., Vooijs M.A., Rouschop K.M.A. // FASEB. J. 2016. V. 30. № 12. P. 3961–3978. <https://doi.org/10.1096/fj.201600698R>
- Gómez-Sánchez R., Rose J., Guimarães R., Mari M., Papinski D., Rieter E., Geerts W.J., Hardenberg R., Kraft C., Ungermann C., et al. // J. Cell. Biol. 2018. V. 217. № 8. P. 2743–2763. <https://doi.org/10.1083/jcb.201710116>
- Katsuragi Y., Ichimura Y., Komatsu M. // FEBS J. 2015. V. 282. № 24. P. 4672–4678. <https://doi.org/10.1111/febs.13540>
- McEwan D.G., Popovic D., Gubas A., Terawaki S., Suzuki H., Stadel D., Coxon F.P., Miranda de Stegmann D., Bhogaraju S., et al. // Mol Cell. 2015. V. 57. № 1. P. 39–54. doi: 10.1016/j.molcel.2014.11.006
- Dibble C.C., Cantley L.C. // Trends Cell Biol. 2015. V. 25. № 9. P. 545–555. doi: 10.1016/j.tcb.2015.06.002
- Decuyper J.P., Bultynck G., Parys J.B. // Cell Calcium. 2011. V. 50. № 3. P. 242–250. <https://doi.org/10.1016/j.ceca.2011.04.001>
- Tasdemir E., Maiuri M.C., Orhori I., Kepp O., Morselli E., Criollo A., Kroemer G. // Cell Cycle. 2008. V. 7. № 19. P. 3006–3011. <https://doi.org/10.4161/cc.7.19.6702>
- Mrakovic M., Fröhlich L.F. // Biomolecules. 2018. V. 8. № 2. P. 14. <https://doi.org/10.3390/biom8020014>
- Bialik S., Dasari S.K., Kimchi A. // J. Cell Sci. 2018. V. 131. № 18. <https://doi.org/10.1242/jcs.215152>
- Majeski A.E., Dice J.F. // Internat. J. Biochem. Cell Biol. 2004. V. 36. № 12. P. 2435–2444. <https://doi.org/10.1016/j.biocel.2004.02.013>
- Banerjee R., Beal M.F., Thomas B. // Trends Neurosci. 2010. V. 33. № 12. P. 541–549. <https://doi.org/10.1016/j.tins.2010.09.001>
- Dou C., Zhang Y., Zhang L., Qin C. // Animal Models Exp. Med. 2022. V. 6. № 1. P. 10–17. <https://doi.org/10.1002/ame2.12229>
- Moumne L., Betuing S., Caboche J. // Front. Neurol. 2013. V. 4. P. 127. <https://doi.org/10.3389/fneur.2013.00127>
- Saudou F., Humbert S. // Neuron. 2016. V. 89. № 5. P. 910–926. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2016.02.003>
- Croce K.R., Yamamoto A. // Neurobiol. Disease. 2019. V. 122. P. 16–22. <https://doi.org/10.1016/j.nbd.2018.08.010>
- Martin D.D.O., Ladha S., Ehrnhoefer D.E., Hayden M.R. // Trends Neurosci. 2015. V. 38. № 1. P. 26–35. <https://doi.org/10.1016/j.tins.2014.09.003>
- Piller C. // Science. 2022. V. 377. № 6604. P. 358–363. <https://doi.org/10.1126/science.add9993>
- Vettrivel K.S., Thinakaran G. // BBA - Mol. Cell. Biol. Lipids. 2010. V. 1801. № 8. P. 860–867. <https://doi.org/10.1016/j.bbalip.2010.03.007>
- Gratuzze M., Leyns C.E.G., Holtzman D.M. // Mol. Neurodegeneration. 2018. V. 13. № 1. P. 66. <https://doi.org/10.1186/s13024-018-0298-9>
- Iqbal K., Liu F., Gong C.-X., Grundke-Iqbal I. // Curr.

- Alzheimer Res. 2010. V. 7. № 8. P. 656–664. <https://doi.org/10.2174/156720510793611592>
25. Chi H., Sang T.-K., Chang H.-Y. // *Cognitive Disorders*, IntechOpen. 2019. V. 8. <http://dx.doi.org/10.5772/intechopen.73198>
26. Monzio Compagnoni G., Di Fonzo A., Corti S., Comi G.P., Bresolin N., Masliah E. // *Mol. Neurobiol.* 2020. V. 57. № 7. P. 2959–2980. <https://doi.org/10.1007/s12035-020-01926-1>
27. Swerdlow R.H. // *J. Alzheimer's Dis.* 2018. V. 62. № 3. P. 1403–1416. <https://doi.org/10.3233/JAD-170585>
28. Nakamura T., Cieplak P., Cho D.-H., Godzik A., Lipton S.A. // *Mitochondrion*. 2010. V. 10. № 5. P. 573–578. <https://doi.org/10.1016/j.mito.2010.04.007>
29. Losón O.C., Song Z., Chen H., Chan D.C. // *Mol. Biol. Cell.* 2013. V. 24. № 5. P. 659–667. <https://doi.org/10.1091/mbc.E12-10-0721>
30. Babst M., Katzmann D.J., Estepa-Sabal E.J., Meerloo T., Emr S.D. // *Dev. Cell.* 2002. V. 3. № 2. P. 271–282. [https://doi.org/10.1016/s1534-5807\(02\)00220-4](https://doi.org/10.1016/s1534-5807(02)00220-4)
31. Uddin M.S., Stachowiak A., Mamun A.A., Tzvetkov N.T., Takeda S., Atanasov A.G., Bergantin L.B., Abdel-Daim M.M., Stankiewicz A.M. // *Front. Aging Neurosci.* 2018. V. 10. № 4. <https://doi.org/10.3389/fnagi.2018.00004>
32. Wang Y., Mandal A.K., Son Y.O., Pratheeshkumar P., Wise J.T.F., Wang L., Zhang Z., Shi X., Chen Z. // *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 2018. V. 353. P. 23–30. <https://doi.org/10.1016/j.taap.2018.06.003>
33. Choi H., Merceron C., Mangiavini L., Seifert E.L., Schipani E., Shapiro I.M. // *Autophagy*. 2016. V. 12. № 9. P. 1631–1646. <https://doi.org/10.1080/15548627.2016.1192753>
34. Dominguez-Villar M., Hafler D.A. // *Nat. Immunol.* 2018. V. 19. P. 665–673. <https://doi.org/10.1038/s41590-018-0120-4>
35. Yang Z., Goronzy J.J., Weyand C.M. // *J. Mol. Med.* 2015. V. 93. № 7. P. 707–717. <https://doi.org/10.1007/s00109-015-1297-8>
36. Pierdominici M., Vomero M., Barbati C., Colasanti T., Maselli A., Vacirca D., Giovannetti A., Malorni W., Ortona E. // *FASEB J.* 2012. V. 26. № 4. P. 1400–1412. <https://doi.org/10.1096/fj.11-194175>
37. Miller B.C., Zhao Z., Stephenson L.M., Cadwell K., Pua H.H., Lee H.K., Mizushima N., Iwasaki A., He Y.-W., Swat W., et al. // *Autophagy*. 2008. V. 4. P. 309–314. <https://doi.org/10.4161/auto.5474>
38. Yang G., van Kaer L. // *Cell Death Dis.* 2020. V. 11. № 5. P. 334. <https://doi.org/10.1038/s41419-020-2568-z>
39. Torres J., Mehandru S., Colombel J.F., Peyrin-Biroulet L. // *Lancet*. 2017. V. 389. № 10080. P. 1741–1755. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(16\)31711-1](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(16)31711-1)
40. Al Nabhani Z., Dietrich G., Hugot J.P., Barreau F. // *PLoS Pathogens*. 2017. V. 13. № 3. P. e1006177. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1006177>
41. Boyapati R., Satsangi J., Ho G.T. // *F1000Prime Rep.* 2015. V. 7. P. 44. <https://doi.org/10.12703/P7-44>
42. Travassos L., Carneiro L., Ramjeet M., Hussey S., Kim Y.G., Magalhães J.G., Yuan L., Soares F., et al. // *Nat. Immunol.* 2010. V. 11. P. 55–62. <https://doi.org/10.1038/ni.1823>
43. Petkova D.S., Viret C., Faure M. // *Front. Immunol.* 2013. V. 3. P. 426. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2012.00426>
44. Carrière J., Darfeuille-Michaud A., Nguyen H.T. // *World J. Gastroenterol.* 2014. V. 20. № 34. P. 12102–12117. <https://doi.org/10.3748/wjg.v20.i34.12102>
45. Yun C.W., Lee S.H. // *Int. J. Mol. Sci.* 2018. V. 19. № 11. P. 3466. <https://doi.org/10.3390/ijms19113466>
46. Vega-Rubín-de-Celis S. // *Biology*. 2020. V. 9. № 1. P. 4. <https://doi.org/10.3390/biology9010004>
47. Amaravadi R.K., Kimmelman A.C., Debnath J. // *Cancer Discov.* 2019. V. 9. № 9. P. 1167–1181. <https://doi.org/10.1158/2159-8290.CD-19-0292>
48. Rohatgi R.A., Janusis J., Leonard D., Bellve K.D., Fogarty K.E., Baehrecke E.H., Corvera S., Shaw L.M. // *Oncogene*. 2015. V. 34. № 42. P. 5352–5362. <https://doi.org/10.1038/onc.2014.454>
49. Patingre S., Tassa A., Qu X., Garuti R., Liang X.H., Mizushima N., Packer M., Schneider M.D., Levine B. // *Cell*. 2005. V. 122. № 6. P. 927–939. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2005.07.002>
50. Carbone A., Roulland S., Gloghini A., Younes A., von Keudell G., Lopez-Guillermo A., Fitzgibbon J. // *Nat. Rev. Dis. Primers*. 2019. V. 5. № 1. P. 83. <https://doi.org/10.1038/s41572-019-0132-x>
51. Ott G., Rosenwald A. // *Haematologica*. 2008. V. 93. № 12. P. 1773–1776. <https://doi.org/10.3324/haematol.2008.001495>
52. McCarthy A., Marzec J., Clear A., Petty R.D., Coutinho R., Matthews J., Wilson A., Iqbal S., Calaminici M., Gribben J.G., Jia L. // *Oncotarget*. 2014. V. 5. № 22. P. 11653–11668. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.2605>

УДК 575+56

Рюриковичи: первый опыт реконструкции генетического облика правящего рода средневековой Руси по данным палеогеномики

К. В. Жур¹, Ф. С. Шарко¹, Вл. В. Седов², М. В. Добровольская², В. Г. Волков³,
Н. Г. Максимов⁴, А. Н. Сеславин⁵, Н. А. Макаров², Е. Б. Прохорчук^{1*}

¹Федеральный исследовательский центр «Фундаментальные основы биотехнологии»
Российской академии наук, Москва, 119071 Россия

²Институт археологии РАН, Москва, 117292 Россия

³Областное государственное автономное учреждение «Центр татарской культуры», Томск,
634050 Россия

⁴АНО Руниверс, Москва, 119071 Россия

⁵Общероссийская общественная организация «РДС», Москва, 109028 Россия

*E-mail: prokhortchouk@gmail.com

Поступила в редакцию 20.06.2023

Принята к печати 17.08.2023

DOI: 10.32607/actanaturae.23425

РЕФЕРАТ Представители рода Рюриковичей были правителями Руси в течение семи столетий, с IX до конца XVI в. «Повесть временных лет», главный летописный источник о первых веках истории Руси, ведет происхождение этого княжеского рода от варяга Рюрика, призванного на княжение в 862 г., однако прямых генетических свидетельств происхождения ранних Рюриковичей до сих пор не получено. В данной работе впервые проведен полногеномный палеогенетический анализ костных останков представителя рода Рюриковичей – великого князя Владимирского Дмитрия Александровича (?–1294), сына великого князя Киевского и Владимирского Александра Ярославича Невского (1221–1263). Установлено, что его Y хромосома принадлежит к N1a-гаплогруппе. Большинство современных Рюриковичей, принадлежащие, согласно их родословным, к гаплогруппе N1a, обладают максимально похожими вариантами Y хромосом между собой, а также с Y хромосомой князя Дмитрия Александровича. Совокупность полногеномных данных средневековых и современных Рюриковичей может однозначно говорить о том, что их род, начиная по крайней мере с XI в. (со времени великого князя Ярослава Мудрого), характеризуется носительством N1a-гаплогруппы Y хромосомы. Все остальные предполагаемые Рюриковичи как древние, так и современные являются носителями других гаплогрупп (R1a, I2a), обладают высокой гетерогенностью последовательности Y хромосом и не подтверждают единое происхождение. Наиболее вероятными отдаленными предками князя Дмитрия Александровича по мужской линии были мужчины, оставившие могильник Большой Олений остров на побережье Кольского полуострова около 3600 лет назад. Моделирование генома князя Дмитрия Александровича указывает на вклад в его происхождение трех предковых компонент: (1) популяции раннесредневекового населения востока Скандинавии с острова Эланд; (2) представителей степных кочевых народов евразийских степей железного века или раннесредневекового населения Центральной Европы (степные кочевники с территории Венгрии) и (3) древнего сибирского компонента. Достоверные значения статистики также получены при замене жителей Скандинавии на представителей славянского древнерусского населения XI в. Таким образом, впервые на примере древнего Рюриковича показана генетическая составляющая сложного характера межэтнических взаимодействий в формировании знати средневековой Руси.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА Рюриковичи, князь Дмитрий Александрович, полногеномное секвенирование, N1a-гаплогруппа.

СОКРАЩЕНИЯ дДНК – древняя ДНК; ОНП – однонуклеотидный полиморфизм; PCA – метод главных компонент.

ВВЕДЕНИЕ

Применение методов палеогенетики для изучения генетического своеобразия и происхождения элиты средневековой Руси – необходимая составляющая общего арсенала современных научных подходов, способных расширить и верифицировать существующие знания о древнерусском обществе, его этническом составе и политической организации. Между тем, останки Рюриковичей, древнейшего правящего рода, представители которого были важнейшими действующими лицами в истории Руси IX–XVI вв., остаются почти не затронуты палеогенетическими исследованиями. Гаплогруппы Рюриковичей XI–XII вв. реконструированы по генетическим материалам современных индивидов, генеалогия которых, по историческим данным, с разной степенью достоверности восходит к Рюрику [1]. Корректность отбора этих генетических материалов и возможность проверки историко-генеалогических сведений, на основании которых производился отбор, остаются дискуссионными, обсуждаются авторами – специалистами совершенно разных квалификаций и специальностей [2, 3].

Существование «белого пятна» в изучении генетического своеобразия элиты во многом связано со сложностью персональной идентификации останков Рюриковичей и других аристократических родов в некрополях X–XIV вв. Хорошо известно, что имена погребенных до начала XV в. никак не обозначались на погребальных сооружениях, саркофагах и надгробиях. Местоположение княжеских погребений устанавливается по летописным сообщениям, синодикам XVI–XVII вв. с учетом позднейшей традиции церковного почитания многих представителей княжеского рода. Археологические исследования погребений в древнерусских храмах и антропологическое изучение костных останков остаются основными методами идентификации захоронений представителей княжеского рода, однако состояние некрополей далеко не всегда дает возможность подобной идентификации. Длительное использование некрополей, практика помещения новых захоронений в старые погребальные сооружения, перемещение почитаемых останков при их освидетельствовании в XV–XIX вв., наконец, изъятие мощей в ходе антирелигиозной кампании в советское время привели к тому, что значительная часть княжеских останков XI–XIV вв. из погребений в древнерусских храмах оказалась утрачена или не может быть достоверно связана с определенными историческими лицами, могилы которых находились в этих некрополях. Один из примеров использования для генетического исследования Рюриковичей костных останков, принадлежность которых представителю

княжеского правящего рода не может быть верифицирована по археологическим данным, – изучение предполагаемых останков князя Глеба Святославича из Черниговского Спасо-Преображенского собора – черепа, найденного при ремонте храма без археологического документирования [4].

Таким образом, особую ценность приобретают немногочисленные захоронения Рюриковичей с костными останками, принадлежность которых представителям княжеского рода надежно определена согласно археологическому контексту, антропологическим определениям и комплексу исторических свидетельств. К таким достоверным захоронениям относится погребение князя Дмитрия Александровича в Спасо-Преображенском соборе Переславля-Залесского в его юго-восточной части, в южной алтарной апсиде (Приложение 1).

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ**Выделение древней ДНК и приготовление библиотек фрагментов ДНК из костных останков**

Все работы с дДНК проводили в «чистой комнате» – специально оборудованном для этих целей помещении, расположенном на базе ФИЦ Биотехнологии Российской академии наук (Институт биоинженерии им. К.Г. Скрябина).

ДНК выделяли из костных останков, обнаруженных в разрушенном саркофаге Спасо-Преображенского собора Переславля, которые, согласно совокупности исторических сведений о погребении, археологических данных и антропологических определений, принадлежат сыну князя Александра Ярославича Невского – князю Дмитрию Александровичу (Приложение 1). Останки характеризовались хорошей сохранностью костной ткани, которая типична для нахождения останков длительное время после захоронения вне контакта с грунтом, что дает основание предположить довольно поздний эпизод разрушения саркофага. Из образцов, предоставленных для генетического анализа, были получены три навески костной пыли весом 20, 50 и 80 мг – из пястной кости кисти, надколенника и ладьевидной кости стопы соответственно, из которых выделяли ДНК методом магнитной сепарации с использованием буфера Дабни (5 М гидрохлорид гуанидина, 40% (об./об.) 2-пропанола, 0.12 М ацетата натрия, 0.05% (об./об.) Tween 20) и магнитных частиц (G-Biosciences), покрытых диоксидом кремния [5].

Полученную ДНК использовали для приготовления библиотек одноцепочечных фрагментов ДНК с помощью готового набора реагентов ACCEL-NGS 1S Plus DNA Library Kit (Swift Biosciences, США)

в соответствии с оригинальным протоколом с небольшими модификациями: для этапов, обеспечивающих элонгацию цепи и индексацию образцов, использовали полимеразу, способную продолжать синтез в присутствии урацила (КАРА HiFi HS Uracil+RM, США). Для оценки содержания эндогенной ДНК было выполнено тестовое секвенирование сконструированных библиотек фрагментов ДНК с низким покрытием, ориентировочно 3–4 млн одиночных прочтений на образец (длиной 50 п.н.). Для образца с наилучшими показателями сохранности генетического материала (высокая эндогенность и наличие замен С>Т на 5'-концах фрагментов ДНК, так называемых «усов древности») готовили дополнительную библиотеку из того же экстракта ДНК, предварительно обработанного смесью ферментов урацил-ДНК-гликозилазы (УДГ) и эндонуклеазы VIII [6]. Смесью ферментов позволяет удалить урацил из цепей дДНК и превратить полученные абазические сайты в однонуклеотидные разрывы, при этом некоторая часть остатков урацила на концах фрагментов сохраняется, что связано с низкой эффективностью ферментов на этих участках. Удаление остатков урацила повышает качество картирования и предотвращает искажение результатов последующей статистической обработки [7].

Для последующего обогащения по интересующим областям генома использовали набор реагентов MyBaits Expert Human Affinities Prime Plus Kit (Daicel Arbor Biosciences). Бiotинилированные одноцепочечные ДНК-зонды из набора покрывают однонуклеотидные полиморфизмы (ОНП) из панели «1240K capture» [8], 46000 дополнительных уникальных ОНП Y хромосомы известных гаплогрупп согласно классификатору Международного общества генетической генеалогии (англ. International Society of Genetic Genealogy (сокр. ISOGG)) [9] и набор зондов MitoTrio на три различных митохондриальных генома: на обновленную референсную последовательность Кембриджа (rCRS), реконструированную эталонную последовательность Sapiens (RSRS) и митохондриальную последовательность неандертальца Vindija (Genbank NC_011137) [10]. Секвенирование библиотек осуществляли на приборе HiSeq 1500 (Illumina, США) в режиме парных чтений 2 × 150 п.н. для широкогеномного секвенирования и в режиме одиночных чтений длиной 50 п.н. для тестовых библиотек.

Биоинформатическая обработка данных

Для фильтрации контаминирующих ДНК-прочтений применяли программное обеспечение BBDuk [11], входящее в пакет BBMap, с использованием баз данных бактерий, грибов, растений, вирусов и дру-

гих организмов. Выходные данные инструмента BBDuk обрабатывали в программном конвейере PALEOMIX (версия 1.2.14) [12], с помощью которого были обрезаны последовательности адаптеров (программа cutadapt v3.4 [13]), а также выполнено выравнивание чтений на эталонную последовательность генома человека (hg19/GRCh37) с использованием инструмента bwa (версия 0.7.17) [14].

Данные секвенирования для образца NEV2.3 доступны для скачивания по ссылке http://russiangenome.ru/NEV2_3.bam.

Выровненные прочтения отфильтровали для обеспечения минимального качества отображения 20 с помощью samtools view (версия 1.9) [15]. Индексацию, сортировку и удаление дубликатов (rmdup) выполняли инструментом samtools (версия 1.9) [15]. Для вызова генотипов из выровненных прочтений использовали PileupCaller (<https://github.com/stschiff/sequenceTools>) с опцией «-randomHaploid», который вызывает гаплоидные генотипы путем случайного выбора одного основания высокого качества (показатель качества идентификации основания phred ≥ 30) из панели ОНП 1240K (<https://reich.hms.harvard.edu/>).

Паттерны посмертных повреждений ДНК анализировали с помощью программы MapDamage2 [16], которая предлагает несколько инструментов для визуализации и моделирования закономерностей повреждений, наблюдаемых в древних образцах. MapDamage2.0 также позволяет пересчитывать базовые показатели качества, чтобы смягчить влияние посмертного повреждения ДНК на результаты последующих этапов обработки данных.

Для определения генетической кластеризации образца NEV2.3 среди известных на момент проведения исследования древних образцов, представленных в панели Allen Ancient DNA Resource (AADR) [17], использовали программу ADMIXTURE v.1.3.0 [18]. ОНП были обрезаны для сайтов с неравновесным сцеплением с использованием PLINK v.1.9 [19] с размером скользящего окна в 50 вариантов, размером шага – 5 вариантов и порогом r² в 0.2 (-indep-pairwise 50 5 0.2). Было сделано 10 повторов со случайными начальными значениями для числа кластеров (K) от 4 до 12 и выбран прогон с минимальной ошибкой перекрестной проверки для построения графика примесей популяций.

Для анализа главных компонент (PCA) использовали инструмент smartpca из пакета EIGENSOFT. Древние образцы проецировали на первые две компоненты современных образцов, список образцов представлен в *табл. 1* Приложения 2. По умолчанию устанавливали следующие параметры: lsqproject: YES, numoutlieriter: 0, shrinkmode:

YES для анализа smartpca. Для определения митохондриальных гаплогрупп применяли программу HaploGrep [20]. Гаплогруппы Y хромосом определяли с помощью сопоставления аллелей на филогенетическом дереве ISOGG version 15.73. F4-статистика была посчитана с помощью программы qpDstat из пакета программ ADMIXTOOLS с параметрами по умолчанию. Все построения основывались на данных полногеномного секвенирования образцов. Для моделирования генома из компонент предковых популяций мы использовали программу qpWave и qpAdmix с параметром «allsnps: YES», а в качестве right-популяций выбраны «Russia_Yana_UP», «Russia_Sunghir», «Bichon_LP», «Zagros_EN», «Russia_DevilsCave_N», «Alaska_LP», «Russia_Ust_Ishim.DG», «Papuan.DG», «Han.DG», «Chukchi.DG», «Russia_Kostenki14», «ONG», «Yoruba.SDG», «Mbuti.SDG» и «Karitiana.SDG».

Для предсказания цвета глаз, волос и кожи применяли онлайн-инструмент HIrisPlex-S [21–23].

Выделение ДНК и приготовление библиотек фрагментов ДНК из образца крови современного человека

Для контроля влияния метода обнаружения ОНП на результаты настоящего исследования в лаборатории было выполнено секвенирование образца ДНК предполагаемого современного Рюриковича (образец под шифром Olgovich3) согласно его генеалогии. Перед проведением исследования получено и подписано добровольное информированное согласие современного Рюриковича на участие в данном исследовании и использование его деперсонифицированных данных.

Геномную ДНК из образца Olgovich3 выделяли из 200 мкл крови с помощью набора реагентов Magen DNA blood mini kit в соответствии с протоколом и 1 мкг ДНК использовали для фрагментации на приборе Covaris до фрагментов среднего размера (200 нуклеотидов). Библиотеку для последующего полногеномного секвенирования готовили согласно инструкции к набору NEBNext DNA UltraII (NEB). Секвенирование осуществляли на приборе HiSeq1500 (Illumina, США). Итого было сгенерировано 115564028 прочтений длиной 150 нуклеотидов. Картирование выполнено с помощью BWA (v.0.7.17) на референсный геном человека hg19/GRCh37 с последующим удалением ПЦР-дубликатов. Для дальнейшего поиска ОНП использовали 104109318 прочтений с помощью программы bcftools.

Генетическое тестирование предполагаемых современных Рюриковичей выполняли с 2006 г. в коммерческой лаборатории Family Tree DNA в Хьюстоне (США), в лаборатории популяционной

генетики человека Медико-генетического научного центра имени академика Н.П. Бочкова (г. Москва) и в лаборатории эволюционной генетики Научно-исследовательского института медицинской генетики (г. Томск) под руководством А.Н. Сеславина, В.Г. Волкова и Н.Г. Максимова в рамках международного научно-исследовательского проекта «Рюриковичи. Геном русских князей». Часть результатов была представлена в виде bam-файлов (Olgovich1, Yurievich1, Mstislavich1, Mstislavich2, Yurievich2, Olgovich4, Mstislavich3, Mstislavich4, Yurievich3, Mstislavich5), часть в виде списка ОНП Y хромосомы (Olgovich2 и Olgovich5). Все участники дали согласие на использование своих генетических данных в рамках этого проекта.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Обнаружение останков князя Дмитрия Александровича в Спасо-Преображенском соборе в Переславле-Залесском

Архитектурно-археологический отряд Института археологии РАН под руководством Вл.В. Седова обследовал предполагаемое захоронение князя Дмитрия Александровича в Переславле-Залесском. Князь Дмитрий Александрович (?–1294), второй сын великого князя Александра Ярославича Невского, наследовавший после смерти отца (1263 г.) его удел – Переславское княжество, в разные годы занимал новгородское и великое владимирское княжение. Князь умер на Волоке Ламском, возвращаясь в Переславль из Твери, и был похоронен в Переславле. При этом в ряде летописей (в том числе в Новгородской 4-й, Московском летописном своде конца XV в., Воскресенской и Никоновской) содержатся прямые сообщения о погребении его в Спасо-Преображенском соборе Переславля-Залесского (ПСРЛ, т. IV, с. 249; ПСРЛ, т. XXV, с. 157; ПСРЛ, т. VII, с. 181; ПСРЛ, т. XIII, с. 170) [24–28]. Идентификация останков из саркофага в юго-западной части собора как погребения князя Дмитрия Александровича основана на совокупности исторических сведений о погребении, археологических данных и антропологических определений (Приложение 1).

Палеогенетический анализ костных останков из саркофага

Для выделения дДНК были отобраны костные образцы (пястная кость, коленная чашечка и ладьевидная кость стопы), представляющие собой останки взрослого индивида, предположительно князя Дмитрия Александровича (идентификационный номер Nev2). Из образцов получены навески костной

Таблица 1. Результаты полномасштабного секвенирования библиотеки фрагментов ДНК образца Nev2.3

ID-библиотека	Количество входных ридов	Количество ридов после фильтрации	Откартировано ридов на hg19	После удаления ПЦР-дубликатов	Покрытие	Эндогенная ДНК, %	ОНП (для анализа)	Генетический пол	Гаплогруппа мтДНК	Гаплогруппа Y хромосомы
NEV_2.3	15001647	14976811	14299210	3025176	0.06	20.2	532154	М	F1b1	N1a1a1a1a1a1a7a-

пудры с соответствующими идентификационными индексами Nev2.1, Nev2.2 и Nev2.3, из которых была выделена ДНК и приготовлены библиотеки одноцепочечных фрагментов для последующего тестового секвенирования с целью оценить эндогенность. Результаты секвенирования представлены в Приложении 3.

Образец Nev2.3 характеризовался наиболее высоким содержанием эндогенной ДНК и частотой замен цитозина на тимин на 5'-концах фрагментов дДНК («усов древности»), в связи с чем был отобран для дальнейшего полномасштабного секвенирования с предварительным обогащением по интересующим участкам генома (трэппинг). Результаты анализа на наличие «усов древности» в исследуемых библиотеках представлены на рисунке в Приложении 4.

В результате широкогеномного секвенирования библиотеки фрагментов дДНК Nev2.3 сгенерировано более 15 млн чтений, определены 532154 однонуклеотидных полиморфизма (ОНП). В процессе обработки данных секвенирования установлено, что образец принадлежит мужчине с митохондриальной гаплогруппой F1b и гаплогруппой N1a Y хромосомы (табл. 1). Оценка контаминации образца по таким параметрам, как степень гетерозиготности мтДНК и X хромосомы (табл. 1–2 Приложения 5), загрязнение не выявила, соответствующие показатели не выходили за пределы допустимых отклонений.

Предсказание фенотипических признаков князя Дмитрия Александровича на основании генетических данных

В исследуемом образце Nev2.3, принадлежащем предположительно князю Дмитрию Александровичу, сыну князя Александра Ярославича Невского, удалось определить однонуклеотидные полиморфизмы, позволяющие с определенной долей вероятности предсказать фенотип князя: цвет волос, цвет кожи и цвет глаз. С наиболее высокой вероятностью глаза были карими ($P = 0.962$), волосы темными ($P = 0.810$) или коричневыми ($P = 0.555$), оттенок кожи промежуточным (0.635), т.е. не светлый и не темный.

Таблица 2. Результаты предсказания фенотипических свойств образца Nev2.3

Свойство	Вероятность (P)
Карий цвет глаз	0.962
Темный цвет волос	0.810
Промежуточный оттенок кожи	0.635
Коричневый цвет волос	0.555
Черный цвет волос	0.355
Светлая кожа	0.306
Светлый цвет волос	0.190
Светло-русый цвет волос	0.090
Темная кожа	0.053
Промежуточный цвет глаз	0.035
Очень светлая кожа	0.005
Голубой цвет глаз	0.003
Очень темная или черная кожа	0.001
Рыжий цвет волос	0.000

Результаты предсказания фенотипических свойств для образца Nev2.3 представлены в табл. 2.

Анализ последовательностей Y хромосомы князя Дмитрия Александровича и других предполагаемых более поздних представителей рода Рюриковичей

Существующие гипотезы о гаплогруппе Y хромосомы Рюрика и его потомков говорят о трех возможных вариантах – гаплогруппы N1a, R1a и I2a. Гипотезы выдвинуты на основании результатов генетических исследований предполагаемых 43 современных Рюриковичей (являющихся представителями 32 родов из разных ветвей предполагаемых прямых потомков князя Ярослава Мудрого и полоцких Рюриковичей) и трех древних потомков Рюрика [1, 2, 29–32].

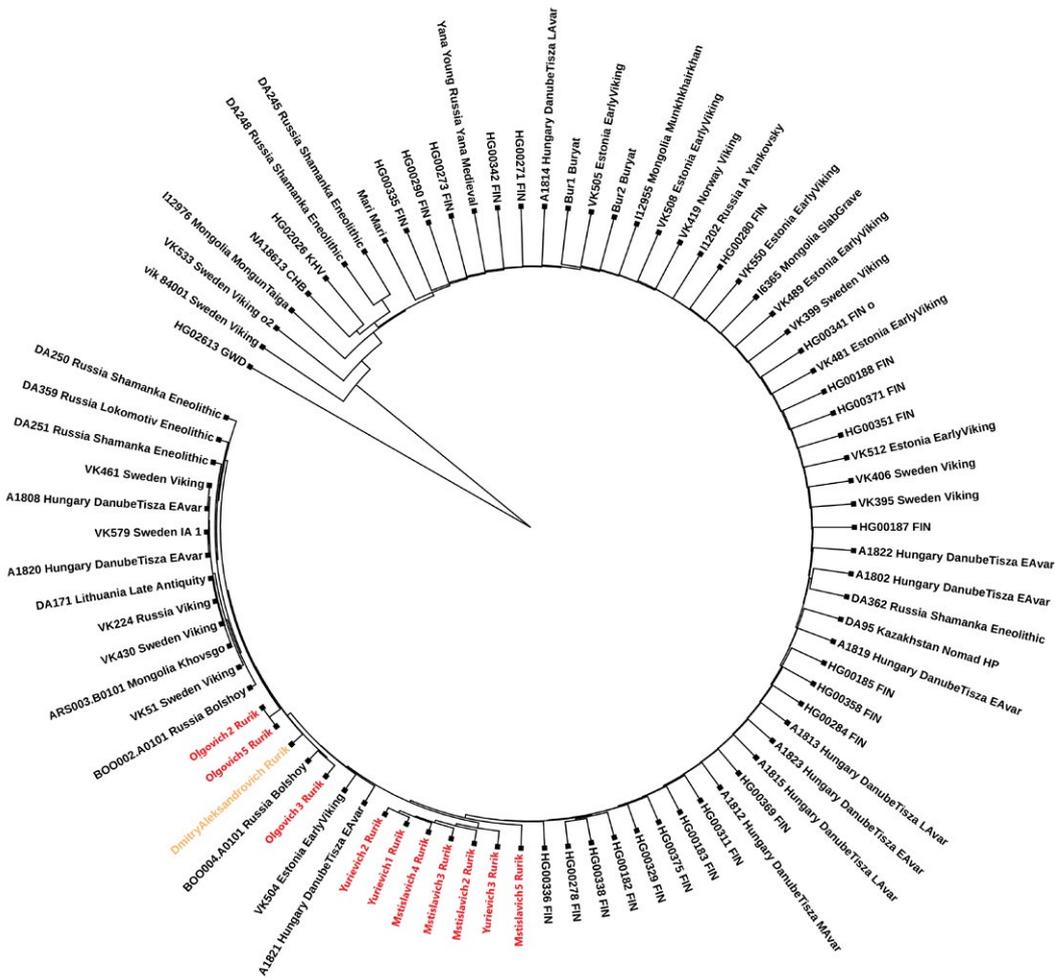


Рис. 1. Филогенетическое дерево Y хромосомы, отражающее родственные взаимосвязи между князем Дмитрием Александровичем (образец отмечен оранжевым цветом), современными представителями рода Рюриковичей (отмечены красным цветом) и образцами из базы данных «The Allen Ancient DNA Resource», принадлежащих к гаплогруппе N1a

Для филогенетического позиционирования Y хромосомы нами были использованы все имеющиеся в базе данных «The Allen Ancient DNA Resource» (AADR) образцы [17], несущие гаплогруппу N1a, а также результаты генотипирования Y хромосом современных Рюриковичей с аналогичной гаплогруппой. Анализ не ставил своей целью установление гаплогруппы с высоким разрешением, а концентрировался на анализе всех выявленных полиморфизмов Y хромосомы образца (51017 ОНП, Приложение 6).

В результате филогенетического позиционирования Y хромосома князя Дмитрия Александровича кластеризовалась с Y хромосомами предполагаемых современных Рюриковичей (рис. 1), которые произошли из различных аристократических родов: образцы Mstislavich2 (M), Mstislavich3 (M), Mstislavich4 (M), Mstislavich5 (M), Yurievich1 (Ю), Yurievich2 (Ю), Yurievich3 (Ю), Olgovich2 (O), Olgovich3 (O), Olgovich5 (O), где M – Мстиславины, потомки Мономаха, ветвь Рюриковичей, произошедшая от великого князя Мстислава Владимировича (1076–1132);

Ю – Юрьевичи, потомки Мономаха, ветвь Рюриковичей от великого князя Киевского Юрия Долгорукого († 1157); О – Ольговичи, черниговские Рюриковичи, потомки князя Олега «Гориславича» Святославича († 1115). Здесь и далее мы будем придерживаться отнесения образцов к генеалогической ветви Рюриковичей символами М, О и Ю (эти ветви воспроизведены в Приложении 7). Детальная генеалогия рода Рюриковичей приведена в Приложении 8.

К трем древним предполагаемым Рюриковичам, гаплогруппы Y хромосом которых были определены ранее другими научными группами, относится образец, принадлежащий предположительно князю Глебу Святославичу Черниговскому (О), идентификационный номер VK542 [4]; образец, принадлежащий предположительно князю Изяславу Ингваревичу Луцкому (М), идентификационный номер VK541 [4]; образец, принадлежащий Беле Ростиславовичу (О), крупному венгерскому феодалу, представителю черниговской линии княжеского рода Рюриковичей [33]. Эти образцы имели следующие Y хромосомные гаплогруппы: Глеб – I2a

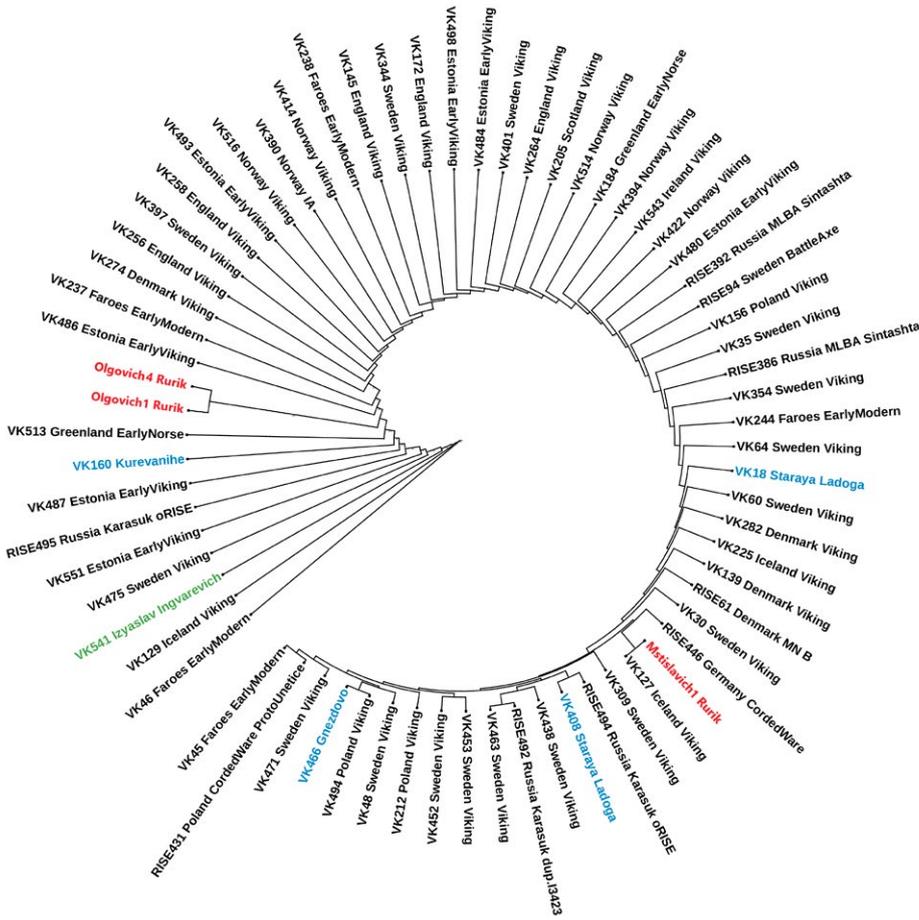


Рис. 2. Филогенетическое дерево Y хромосомы, отражающее родственные взаимосвязи между предполагаемыми современными представителями рода Рюриковичей (отмечены красным цветом) и образцами из базы данных «The Allen Ancient DNA Resource», принадлежащих к гаплогруппе R1a. Зеленым цветом отмечен образец предполагаемого князя Изяслава Ингваревича Луцкого, синим – образцы «викингов» с территории современной России

(полногеномная последовательность), Изяслав – R1a (полногеномная последовательность), Бела – N1a1a1a1a1a1a (по STR-маркерам). Важно отметить, что принадлежность черниговского и луцкого захоронений Рюриковичам не может быть обоснована археологическими данными, что ставит под сомнение и гипотезы, которые вытекают из генетического анализа указанных образцов.

Анализ носителей R1a гаплогруппы современных представителей рода Рюриковичей и образцов из базы данных AADR проведен с использованием того же алгоритма, что и носителей гаплогруппы N1a (рис. 2). Оказалось, что Y хромосома предполагаемого князя Изяслава Ингваревича Луцкого хотя и относится к гаплогруппе R1a, но не кластеризуется с образцами современных нам представителей Рюриковичей: образцами Mstislavich1 (M), Olgovich1 (O) и Olgovich4 (O). Более того, образец Mstislavich1 кластеризуется отдельно от образцов Olgovich1 и Olgovich4. Отметим, что кластеризация с этими образцами отсутствует и у других «викингов» с гаплогруппой R1a, чьи останки обнаружены в Гнездово (VK466), Старой Ладоге (VK408, VK18) и Куреванихе (VK160) [4].

Таким образом, большинство ныне живущих потомков по прямой мужской линии легендарного князя Рюрика (согласно их родословным), имеющие гаплогруппу N1a, обладают максимально похожими вариантами Y хромосомы как между собой, так и с Y хромосомой князя Дмитрия Александровича. Совокупность полногеномных данных средневековых и современных Рюриковичей может однозначно говорить о том, что их род, начиная по крайней мере с XI в. (со времени великого князя Ярослава Мудрого), характеризуется носительством гаплогруппы N1a Y хромосомы. Все остальные предполагаемые Рюриковичи как древние, так и современные, носители других гаплогрупп (R1a, I2a), обладают высокой гетерогенностью нуклеотидной последовательности Y хромосомы и не указывают на единое происхождение по прямой мужской линии.

Поиск археологических образцов с наиболее близкими к князю Дмитрию Александровичу последовательностями Y хромосомы

Y хромосома князя Дмитрия Александровича кластеризуется, помимо современных Рюриковичей,

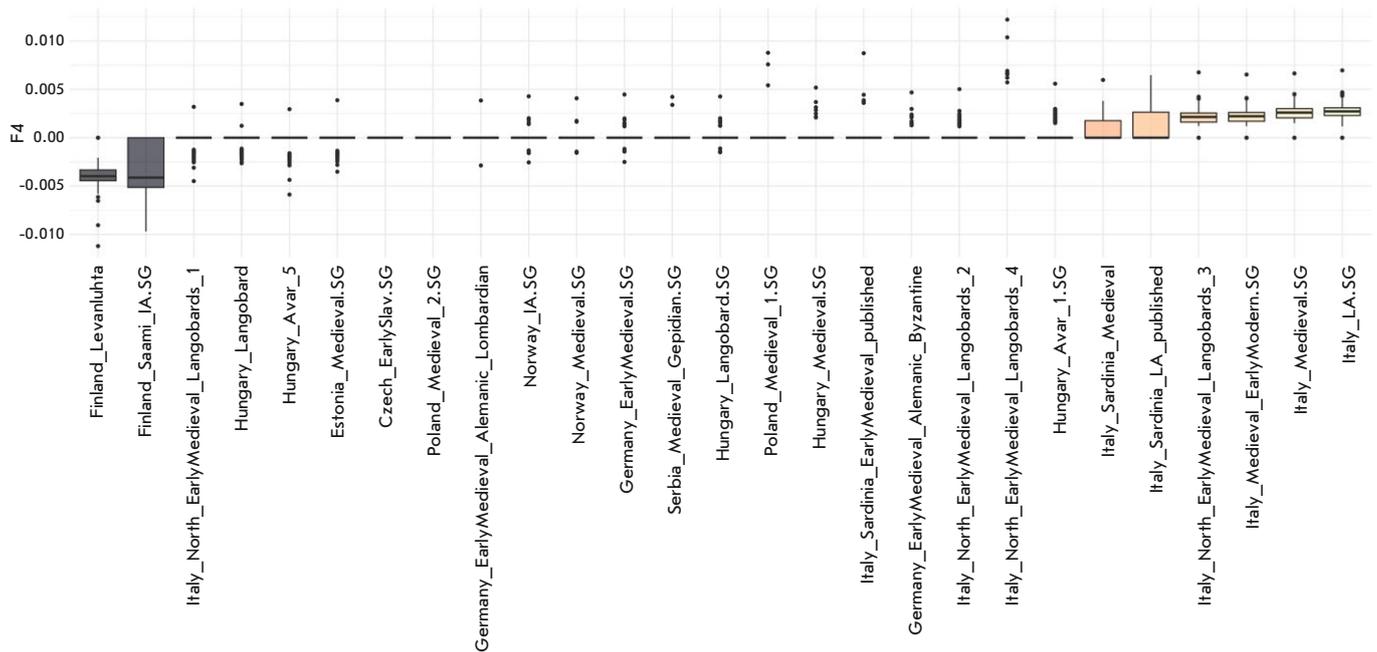


Рис. 3. Значения F4-статистики в конфигурации («викинги», Тест-популяция; Большой Олений остров, Yoruba2). Тестовые популяции отложены по горизонтали. Боксплот отображает значения F4-статистики суммарно для группы «викингов». Статистически достоверные отрицательные значения F4-статистики отмечены серым цветом, желтым показаны положительные значения

в одной ветке с древними людьми Большого Оленьего острова (Russia_Bolshoy), могильника середины II тысячелетия до н.э., расположенного в Кольском районе Мурманской области (рис. 1). Ранее на примере этих образцов был показан поток генов народов Сибири (восточно-евразийский компонент) на Север и Восток Европы [34]. Высокая степень гомологии Y хромосомы представителя русского княжеского рода и людей эпохи раннего металла привела нас к гипотезе о возможном вкладе восточно-евразийского генофонда в формирование североευропейского населения раннего средневековья, поскольку, согласно летописям, русский княжеский род имел с ними генетическую связь.

Мы исследовали вклад генома людей с Большого Оленьего острова в формирование средневекового населения, проживавшего на прибалтийских территориях современных Финляндии, Дании, Швеции и Норвегии, для чего использовали опубликованные в статье Margaryan 2020 года [4] геномы «викингов» (этот термин мы используем не для исторической точности, а для краткости указания на исследуемое население). Все эти образцы имели идентификатор VK и цифровой код. F4-тест в конфигурации (VK, Test; Большой Олений остров, Yoruba) показал, что статистически значимые (z score по модулю больше 3) отрицательные значения ($z > 10$) статистика достигала только при использовании в каче-

стве Test-популяции финнов (Finland_Levanluhta) и саамов (Finland_Saami_IA.SG), а положительные значения – при использовании в качестве Test-популяции южных европейцев, например, образец Italy_Medieval_EarlyModern.SG ($z > 13$). Результаты представлены на рис. 3 и в табл. 1 Приложения 9.

Таким образом, при сравнении пары VK–саамы поток генов происходит от геномов Большого Оленьего острова к саамам. Но при сравнении пары VK–Южная Европа удается детектировать существенный вклад геномов образцов Большого Оленьего острова в формирование генофонда популяций «викингов». Скорее всего, этот поток генов осуществлялся за счет контактов «викингов» с финно-угорским населением прибалтийского региона.

Неожиданное сходство Y хромосом князя Дмитрия Александровича и древних людей Большого Оленьего острова позволило выдвинуть гипотезу о том, что вклад восточно-евразийских генов будет достоверно выше у «викингов» с гаплогруппой N1a по сравнению с «викингами» с гаплогруппой R1a. Действительно, F4-статистика в конфигурации (Викинги_R1a, Викинги_N1a; Большой Олений остров, Yoruba2) указала на значимый поток восточно-евразийских генов в «викингов» с N1a-гаплогруппой ($F4 = -0.00032$, $Z = -3.46$). Результаты представлены в табл. 3. При этом геном князя Дмитрия Александровича не показал су-

Таблица 3. Значения F4-статистики в конфигурации (Викинги_R1a, Викинги_N1a; Большой Олений остров, Yoruba2)

H1	H2	X	O	D	Z
Viking_R1a	Viking_N1a	BolOlen	Yoruba2	-0.000315	-3.463
Viking_R1a	Viking_N1a	BolOlen	Yoruba	-0.000247	-2.737
Viking_R1a	Viking_N1a	BolOlen	Mbuti	-0.00019	-1.988

щественного отличия с точки зрения восточно-евразийской генетической компоненты по сравнению с другими «викингами» с гаплогруппой N1a.

Гипотеза о том, что люди Большого Оленьего острова являются оптимальной прокси популяцией при моделировании «викингов», проверена путем повторения qrAdm-анализа, проведенного в работе Margaryan 2020 [4]. Ряд популяций «викингов», к примеру, Ladoga и EstoniaIA и ряд других, не раскладываются с использованием трех источников – европейских охотников-собирателей, неолитических земледельцев и степных скотоводов (табл. 1 Приложения 10). Для получения достоверного разложения к трем источникам был добавлен четвертый – восточные образцы железного века Xiongnu (около 100 г. до н.э.–50 г. н.э.) или образцы Большого Оленьего острова. Оказалось, что скандинавские популяции одинаково эффективно ($p\text{-value} > 0.05$) моделировались с использованием и образцов Xiongnu [4], и образцов Большого Оленьего острова (табл. 2 Приложения 10), генетический вклад которых в эти популяции составил: Ladoga – 4.7% Xiongnu и 4.7% Большого Оленьего острова; EstoniaIA – 6.5% Xiongnu и 8.4% Большого Оленьего острова.

Таким образом, показано, что генофонд средневековых «викингов», представляющих значительную часть Северной Европы (островной и материковой), формировался частично за счет потока генов из Сибири, а предками князя Дмитрия Александровича по мужской линии с высокой вероятностью были мужчины, оставившие могильник Большой Олений остров на побережье Кольского полуострова около 3600 лет назад.

Анализ мтДНК князя Дмитрия Александровича

Митохондриальная гаплогруппа князя Дмитрия Александровича определена как F1b1. Эту гаплогруппу относят к восточно-евразийскому кластеру и отмечают ее представленность с разной частотой в генофонде большинства исследованных ранее древних и современных популяций Байкальского региона и сопредельных территорий Центральной Азии [35–38]. Также митохондриальная гаплогруппа F обнаружена у трех авар VII в. в Дунайско-Тисском междуречье (F1b1b и два образца с F1b1f),

геномные профили этих индивидов среднего аварского периода соответствуют геномам других представителей элиты раннего аварского периода данного региона и состоят на 90–98% из предкового компонента AR_Xianbei_P_2c, имеющего восточностепное происхождение и выступающего в качестве генетического компонента древних северо-восточных азиат (ancient northeast Asians, ANA). Два из трех захоронений (мужские погребения) характеризовались довольно богатым инвентарем с золотыми и позолоченными предметами, что указывает на их принадлежность к знати [39].

Интерпретировать происхождение митохондриальной гаплогруппы князя Дмитрия Александровича довольно сложно, так как практически во всех исторических эпохах прослеживается повышенная изменчивость и «пестрота» митохондриального состава женской части групп древнего населения. Связано это с тем, что брачные союзы официального и неофициального характера аккумулировали представительниц совершенно разных генетических линий в одном географическом локусе. Исследуя историю династий, важно иметь в виду, что привлечение самых разных по своему происхождению женщин в качестве выгодных или вынужденных политических шагов – широко распространенное явление. Таким образом, митохондриальная группа F1b князя Дмитрия Александровича может быть связана как с древним северным потоком с территории Сибири (восточно-евразийский компонент) [34], так и с миграциями раннесредневековых кочевников [39], при этом исток этой группы может быть, вероятно, одним и тем же.

Результаты PCA-анализа

Генетическую близость генома князя Дмитрия Александровича к другим известным древним и современным популяциям оценили с помощью метода главных компонент (PCA). Результаты PCA-анализа представлены в Приложении 11 (для построения PCA использовано 740 образцов, список образцов представлен в табл. 1 Приложения 2). Упрощенная версия этих результатов воспроизведена на рис. 4 (отображено только 116 образцов, список образцов представлен в табл. 2 Приложения 2). Стоит от-

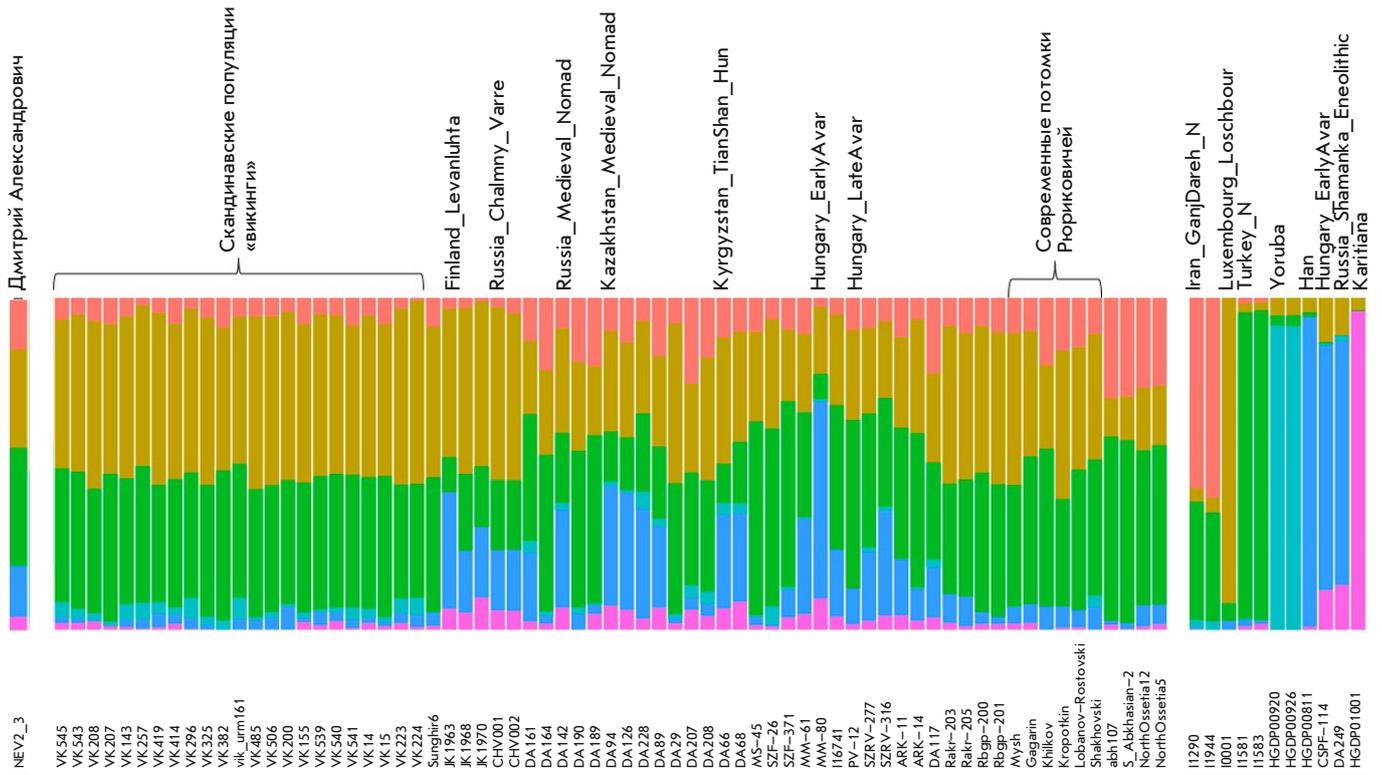


Рис. 5. Результаты Admixture-анализа представителей древних популяций, чьи геномы использованы для оценки генетического происхождения князя Дмитрия Александровича (количество предковых популяций равно шести ($K = 6$))

ций, равно шести ($K = 6$), представлены на рис. 5. Изображены представители древних популяций, чьи геномы использовали для последующего моделирования генетического происхождения князя.

При разложении генома князя Дмитрия Александровича на предковые компоненты следует отметить его генетическое сходство с представителями раннесредневекового населения востока Скандинавии, «викингами», что может свидетельствовать в пользу версии о «варяжском» (скандинавском) происхождении Рюрика, родоначальника княжеского рода, призванного на Русь, о чем прямо говорит Летопись. Здесь и далее мы используем термин «викинги» в кавычках, чтобы показать, что это неоднородная и сложная в своем историческом формировании европейская популяция, объединенная лишь образом жизни и ареалом проживания.

Сравнение генома князя Дмитрия Александровича с геномами скандинавских популяций эпохи «викингов», в том числе с территории современной России [4], указывает на наличие у него в существенном количестве дополнительного восточно-евразийского компонента (обозначенного синим цветом), отсутствующего в таком количестве у подавляющего большинства «викингов». Обозначенный компонент

максимально выражен у нганасан – коренного народа Сибири, финно-угорского народа манси, представителей коренного народа Хань (Han) в Китае (Восточная Азия), у элиты авар из Дунайско-Тисского междуречья (Hungary_DanubeTisza_MLAvar) [41], а также у более древних представителей эпохи раннего неолита Байкала (Russia_Shamanka_Eneolithic.SG) [42] и Монголии (Mongolia_North_N). В меньшей степени этот компонент представлен в образцах раннего средневековья с территории современной Финляндии (Finland_Levanluhta), в синхронном с князем Дмитрием Александровичем образце из Прикаспийской степи (Russia_Medieval_Nomad), а также более древних ираноязычных степных кочевников железного века с территорий современных Казахстана и Кыргызстана (Kazakhstan_TianShan_Saka, Kyrgyzstan_TianShan_Hun). В силу того, что степное и финно-угорское население имеет общее происхождение, данный тип анализа не позволяет специфически отнести этот компонент к одной из этих групп при всех использованных значениях K (от 6 до 12).

Таким образом, на основании данных PCA, Admixture-анализа и информации о митохондриальной ДНК можно утверждать, что в геноме князя Дмитрия Александровича имеется существенный

восточный компонент, что отличает его от ранне-средневекового населения востока Скандинавии, «викингов» и средневекового славянского образца из Владимира (Сунгирь6), но сближает в первую очередь с древним населением Финляндии, Кольского полуострова и ранне-средневекового населения Центральной Европы, включающего в себя известный компонент степных кочевников. Вероятно, этот вклад получен и по мужской, и по женской линиям, что соответствует процессам древней миграции из Сибири на север Европы и миграциям из Сибири в 1 тыс. до н.э.–1 тыс. н.э. по степному евразийскому коридору.

Моделирование генома князя Дмитрия Александровича из геномов предковых популяций

Проанализировав результаты PCA и Admixture-анализа, а также доступные исторические сведения, нами отобраны популяции, представители которых могли участвовать в формировании генома князя Дмитрия Александровича или выступать в качестве прокси популяций: геномы ранне-средневекового населения востока Скандинавии; представителей ираноязычных кочевников евразийских степей железного века, населения раннего средневековья Центральной Европы, включающего в себя известный компонент степных кочевников и образцы индивидов, представляющих древний восточно-евразийский компонент. Для оценки вклада славянского компонента в геном князя Дмитрия Александровича были использованы образцы древнерусского населения XI в. из сельского некрополя поселения Шекшово в Суздальском Ополье и индивида XII в. с территории современного Владимира (Сунгирь6) [43, 44]. Протестированы несколько моделей:

Моделирование генома князя Дмитрия Александровича с использованием геномов «викингов». В результате проведенного qWave-анализа установлено, что минимальное количество независимых предковых популяций, необходимых для моделирования генома князя Дмитрия Александровича, равняется трем (Приложение 13). Последовательный перебор всех возможных комбинаций трех предковых геномов из отобранного списка проводили с помощью инструмента qAdm. Статистически значимые результаты моделирования генома князя Дмитрия Александровича (p -value больше 0.05) представлены в Приложении 14 (табл. 1). Согласно полученным результатам, геном князя Дмитрия Александровича может быть статистически значимо смоделирован из «викингов», степных кочевников и финно-угорских народов. К примеру, одна из представленных моделей включает в себя 46.6% ранне-средневекового на-

селения востока Скандинавии (Sweden_EarlyViking), 39.6% компонента ранне-средневекового населения Центральной Европы, включающего в себя известный компонент степных кочевников (Hungary_LateAvar) и 13.8% компонента Russia_IA (образец железного века с территории Республики Алтай). Достоверная модель получается и в случае замены образца Russia_IA на образцы железного века с территории Финляндии (Finland_Levanluhta) или Большого Оленьего острова в Кольском районе Мурманской области. Образцы, используемые при моделировании в качестве третьего компонента, объединяет присутствие в их геноме древнего восточно-евразийского компонента, который, согласно последним исследованиям, прибыл на Кольский полуостров более 3500 лет назад из Сибири [34] и впоследствии был смешан со многими современными популяциями в регионе, говорящем сегодня на финно-угорских языках. Результаты моделирования представлены на рис. 6А и в Приложении 14 (табл. 1).

Важно отметить, что из всех использованных нами популяций «викингов» максимальный вклад (46.6%) в геном князя Дмитрия Александровича вносит Sweden_EarlyViking. У других представителей «викингов» этот вклад существенно меньше и не превышает 9%. Минимальный вклад вносит популяция Estonia_EarlyViking – он составляет 2.7% (рис. 6Б). Более детальное изучение индивидов, вошедших в популяцию Sweden_EarlyViking, показало, что группа представлена тремя образцами, обнаруженными в деревне Бодэ (Böde) на острове Эланд (Öland) и имеющими датировку 7–8 в. н.э. (с идентификационными номерами VK379, VK382, VK359). Изотопный анализ (изотопы стронция) данных образцов [4] отнес их к категории мигрантов в местечко Бодэ, хотя вопрос о том, были ли они коренными жителями острова Эланд, остается открытым.

Проведенный нами qAdm-анализ выявил существенное генетическое отличие группы Oland_Sweden_EarlyViking от других образцов с острова Эланд, обозначенных как Oland_Sweden_Viking: первые могут быть смоделированы разложением на три источника (p -value = 0.64), в качестве которых были взяты европейские охотники-собиратели, неолитические земледельцы и степные скотоводы (Приложение 14 табл. 2), в то время как для группы Oland_Sweden_Viking разложение на обозначенные компоненты не срабатывает (p -value = 0.01). Также наблюдаются существенные различия в возможности моделирования этих двух групп «викингов» из одного источника, в качестве которых использованы преимущественно популяции железного века с территории Европы и образец древнерусского населения XI в. с территории современного

Владимира (Приложение 14 табл. 3). Популяция Sweden_EarlyViking входит в группу популяций «викингов», общей чертой которых является более ранняя датировка (VI–VIII вв.) и которые моделируются с использованием образца древнерусского населения (Сунгирь6) в качестве единственного источника (Приложение 14 табл. 3). В расширенном анализе все доступные из литературных источников популяционные группы «викингов» были использованы для проверки модели с одним источником для образца Сунгирь6 (рис. 7, табл. 4 Приложения 14). Популяции «викингов», дающие достоверные значения F4-статистики в этой модели, сосредоточены в северной части Европы, Ирландии и Исландии, в то время как ни одна из южных популяций в такую модель не укладывалась. Интересно, что наибольшую достоверность модель одного источника продемонстрировала именно для «викингов» из местечка Бодэ с острова Эланд. Эти результаты подняли вопрос о взаимоотношениях скандинавских групп населения со славянами в период с VI по XI в.

Моделирование генома князя Дмитрия Александровича с использованием геномов ираноязычных кочевников евразийских степей железного века. Статистически достоверная генетическая модель генома князя Дмитрия Александровича получена также при замене раннесредневекового населения Центральной Европы (включающего компонент степных кочевников) на представителей ираноязычных кочевников, евразийских степей железного века (Kazakhstan_TianShan_Saka, Kyrgyzstan_TianShan_Hun). Результаты представлены на рис. 8 и в Приложении 14 (табл. 5). Моделирование срабатывает только при использовании геномов номадов раннего железного века из региона Тянь-Шань, что, вероятно, обусловлено их генетическим профилем: высокой пропорцией (70%) степных скотоводов позднего бронзового века, 25% компонента южносибирских охотников-собирателей и 5% компонента, связанного с неолитическим населением Ирана [45]. Важно отметить, что представители этой группы номадов, согласно результатам f3-outgroup-статистики, генетически ближе к северным европейским популяциям, чем к другим кочевникам раннего железного века из азиатского кластера.

Моделирование генома князя Дмитрия Александровича с использованием геномов славянского древнерусского населения. На следующем этапе генетического моделирования генома князя Дмитрия Александровича в качестве прокси популяций нами был использован древнерусский ком-

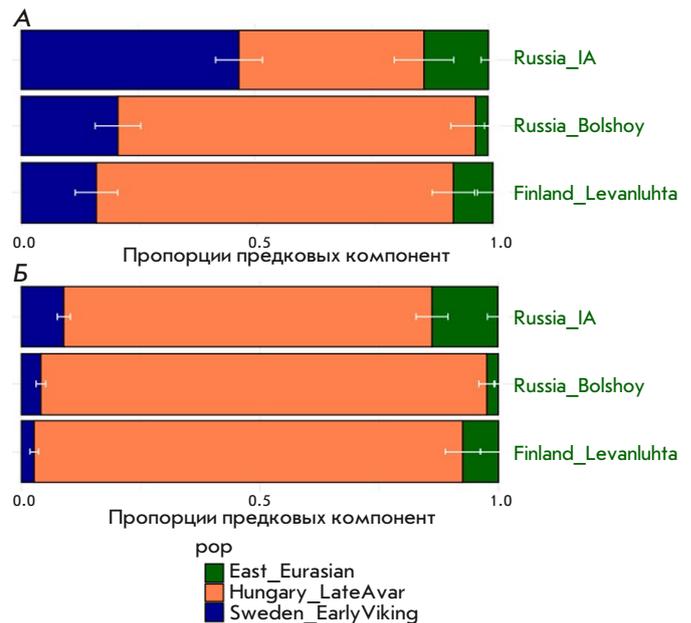


Рис. 6. Результаты моделирования генома князя Дмитрия Александровича из трех предковых компонент («викингов» (синий), раннесредневекового населения Центральной Европы (оранжевый), включающего известный компонент степных кочевников, и древнего восточно-евразийского компонента (зеленый)). В качестве представителей «викингов» в данной иллюстрации показаны ранние «викинги» с территории Швеции (А) и ранние «викинги» с территории Эстонии (Б)

понент. В связи с тем, что до конца X в. языческая славянская традиция предполагала трупосожжение, в данной работе использованы образцы древнерусского населения XI в. из сельского некрополя поселения Шекшово9 в Суздальском Ополе и индивида XI в. с территории современного Владимира (Сунгирь6) [43, 44]. Геном образцов из Шекшово9 отражает результат процесса смешивания центрально-европейского (славянского) и местного (финского) компонента. Сунгирь, в свою очередь, рассматривают как прямое указание на генетическую специфику славянского древнерусского населения. Эти особенности отражены на графике PCA: Сунгирь располагается в кластере европейских (датских, польских, норвежских, украинских и пр.) средневековых образцов, а Шекшово9 смещены «на восток» по оси PC1 (рис. 4).

Результаты генетического моделирования генома князя Дмитрия Александровича с использованием славянского древнерусского населения представлены на рис. 8 и в Приложении 14 (табл. 6). Статистически достоверная модель указывает на максимальный славянский вклад (19.7%) образца Сунгирь6 в геном князя Дмитрия Александровича в комбинации с кочевыми степными народами железного века

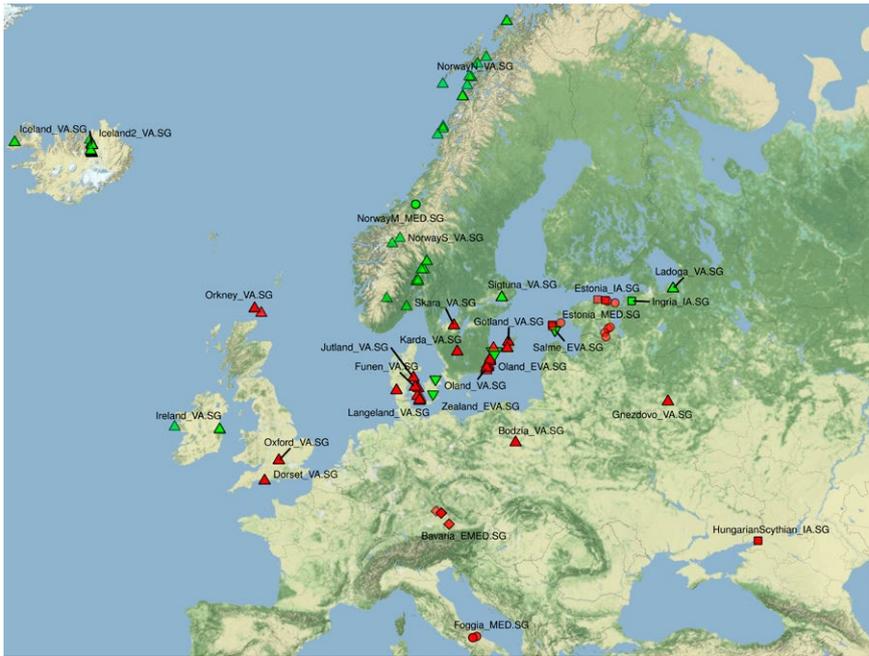


Рис. 7. На карте отмечены места захоронения «викингов», которые подтвердили (зеленый цвет) или не подтвердили (красный цвет) модель одного источника для образца Сунгирь6. Форма метки отражает временную классификацию образцов, расшифровка приведена в легенде справа от рисунка

- Medieval
- IronAge
- ◇ EarlyMedieval
- △ VikingAge
- ▽ EarlyVikingAge

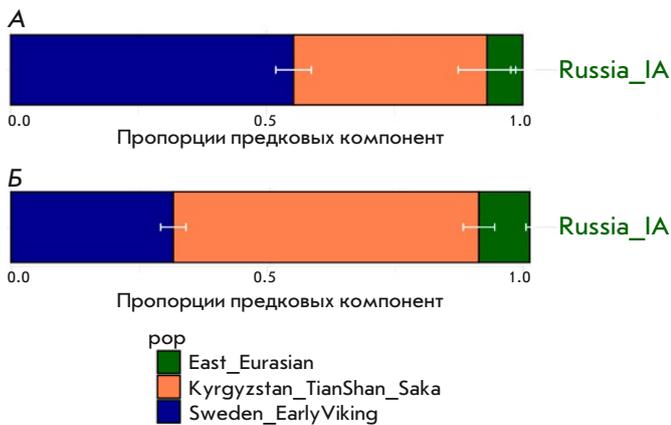


Рис. 8. Результаты моделирования генома князя Дмитрия Александровича из трех предковых компонент: «викингов» (синий), финно-угорских народов (зеленый), кочевников раннего железного века с территории Кыргызстана (А) и Казахстана (Б) (оранжевый)

(Kyrgyzstan_TianShan_Saka 73.8%) и представителями железного века с территории современной Республики Алтай (Russia_IA 6.5%). При использовании образцов из Шекшово9 в качестве источника славянского древнерусского населения данный компонент достигает 18.7%, кочевые степные народы железного века (Kyrgyzstan_TianShan_Saka) – 78.2% и Russia_IA_2 чуть более 3% (рис. 9А). При попытках смоделировать геном князя с использованием раннесредневекового населения Центральной Европы, венгерских авар, максимальный вклад славянского древнерусского населения составил 10.8%, вклад кочевников – 76.2% и 13.1% от Russia_IA (рис. 9Б). Уменьшение вклада славянского компонента в этом

случае можно объяснить частичной компенсацией славянского происхождения используемым для моделирования представителем авар, поскольку его генетический состав указывает на наличие 80% местного восточно-европейского компонента и всего лишь 20% центральноазиатского (ID I16741) [40].

Таким образом, моделирование генома князя Дмитрия Александровича указывает на вклад в его происхождение трех предковых компонент: (1) популяции раннесредневекового населения востока Скандинавии с острова Эланд; (2) представителей степных кочевых народов евразийских степей железного века или раннесредневекового населения Центральной Европы (степные кочевники с территории Венгрии) и (3) восточно-евразийского компонента. Достоверные значения статистики также получены при замене первого источника с жителей Скандинавии на славян, представленных геномами Шекшово9 и Сунгирь6.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Палеогенетика и математическая статистика предоставили возможность предметно обсуждать происхождение предков Рюриковичей и оценивать принадлежность тех или иных останков спорной документации к этому правящему роду. Связь мужской линии предков Рюриковичей с территорией Скандинавии подтверждается результатами палеогенетических исследований. Отсутствие данных о палеогенетических особенностях населения с территории севера Руси в период, непосредственно предшествовавший становлению княжеского правления, не позволяет предметно судить о при-

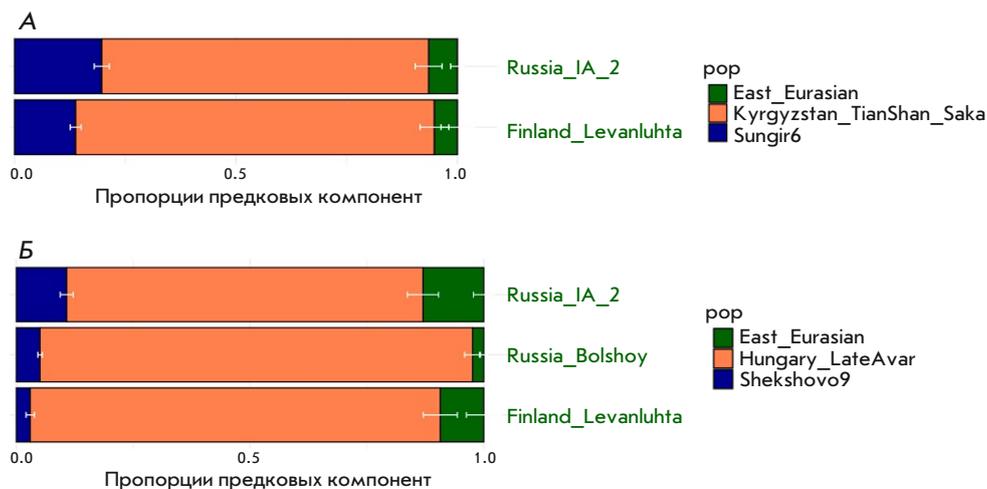


Рис. 9. Результаты моделирования генома князя Дмитрия Александровича из трех предковых компонент: древнерусского славянского населения (синий), древнего восточно-евразийского компонента (зеленый) и представителей степных кочевников (оранжевый) А) раннего железного века или Б) раннесредневекового населения Центральной Европы (степных кочевников с территории Венгрии)

сутствии предков князя Дмитрия Александровича и других Рюриковичей на материковом севере и северо-востоке Европы.

Анализ генеалогического древа Рюриковичей показал, что современные представители этого рода, которые имеют Y хромосому, кластеризующуюся с образцом князя Дмитрия Александровича, относятся к трем разным ветвям этого рода – Ольговичам, Мстиславичам и Юрьевичам. Если признать достоверность этих генеалогий, то можно предположить, что носительство гаплогруппы N1a Y хромосомы характеризует все три исследуемые линии этого рода, восходящие к князю Ярославу Мудрому, как к ближайшему общему предку.

Митохондриальная гаплогруппа князя Дмитрия Александровича определена как F1b1, что может свидетельствовать о вкладе восточных популяций в его генотип. Это подтверждается и аутосомными данными. Согласно результатам PCA и Admixture-анализа, геном Дмитрия Александровича имеет сходство с геномами представителей скандинавских популяций эпохи «викингов», но отличается от них дополнительным восточным компонентом. Наличие восточного компонента в геноме Дмитрия Александровича не противоречит историческим данным, поскольку браки русских князей с дочерьми половецких ханов с конца XI в. были распространенной практикой, скрепляющей союзнические отношения и политическое взаимодействие [46, 47]. Мать Дмитрия, супруга Александра Невского – Александра Брючиславна происходит из рода полоцких Изяславичей. Сведения о женах этих князей скудны, имя и происхождение матери Александры неизвестно. Известно, однако, что представители полоцкой ветви Рюриковичей не избегали брачных союзов с половчанками. Из половецкого рода происходила вторая жена полоцкого князя Святополка Изяславича (1050–1113), Елена, дочь хана Тугоркана

(ПСРЛ, 1997, т. I, стб. 231–232). Циркуляция восточных митохондриальных групп в этой ситуации вполне ожидаема. Но нельзя также исключить, что истоки восточного компонента в геноме Дмитрия Александровича связаны с браками Рюриковичей с представительницами династий Центральной и Южной Европы (сербские Вукановичи, венгерские Арпады). Элиты этих территорий могли в большей степени, чем «простое» местное население, сохранить восточные гены, привнесенные миграционными потоками первого тысячелетия нашей эры [48].

Следует признать, что полученный результат порождает ряд вопросов, ответы на которые могут быть получены лишь после систематического палеогеномного исследования новых надежно документированных палеоантропологических материалов с территории России. Предложенные объяснения присутствия «восточного компонента» в геноме Дмитрия Александровича пока остаются гипотетическими. Специфика палеогенетического подхода состоит в том, что истории популяций и наследование по мужской и женской линиям могут восходить к эпохам глубокой древности, поэтому зачастую решение вопросов средневековой истории кроется не только в анализе прямо предшествующих эпох, но и гораздо более древних. Широкое привлечение сопоставительных данных и применение статистических методов проверки гипотез позволили получить обоснованное суждение о линии мужского наследования в роду Рюриковичей, а также поставили вопрос о генетическом составе предков князя Дмитрия Александровича по женской линии. ●

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

Приложения доступны на сайте <https://doi.org/10.32607/actanaturae.23425>.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Волков В.Г. // Генеалогия допетровского времени: источниковедение, методология, исследования. 2012. С. 11–40.
2. Балановский О.П. // Этнографическое обозрение. 2021. № 4. С. 119–131.
3. Пчелов Е.В. Каким образом исследуют генетику Рюриковичей и что из этого получается // Генофонд.рф. 2016. http://xn--cлассбаафалс.xn--п1аи/?page_id=7053 (дата обращения: 18.06.2023).
4. Margaryan A., Lawson D.J., Sikora M., Racimo F., Rasmussen S., Moltke I., Cassidy L.M., Jørsboe E., Ingason A., Pedersen M.W., et al. // *Nature*. 2020. V. 585. P. 390–396.
5. Rohland N., Glocke I., Aximu-Petri A., Meyer M. // *Nat. Protoc.* 2018. V. 13. P. 2447–2461.
6. Gansauge M.T., Meyer M. // *Nat. Protoc.* 2013. V. 8. P. 737–748.
7. Sharko F.S., Zhur K.V., Trifonov V.A., Prokhortchouk E.B. // *Acta Naturae*. 2023. V. 15. P. 87–96.
8. Mathieson I., Lazaridis I., Rohland N., Mallick S., Patterson N., Roodenberg S.A., Harney E., Stewardson K., Fernandes D., Novak M., et al. // *Nature*. 2015. V. 528. P. 499–503.
9. Y-DNA Haplogroup Tree 2019–2020. <https://isogg.org/tree> (дата обращения: 18.06.2023).
10. Green R.E., Malaspina A.S., Krause J., Briggs A.W., Johnson P.L.F., Uhler C., Meyer M., Good J.M., Maricic T., Stenzel U., et al. // *Cell*. 2008. V. 134. P. 416–426.
11. Bushnell B., Rood J., Singer E. // *PLoS One*. 2017. V. 12. P. e0185056.
12. Schubert M., Ermini L., Der Sarkissian C., Jónsson H., Ginolhac A., Schaefer R., Martin M., Fernandez R., Kircher M., McCue M., et al. // *Nat. Protoc.* 2014. V. 9. P. 1056–1082.
13. Martin M. // *EMB net.journal*. 2011. V. 17. P. 10–12.
14. Li H., Durbin R. // *Bioinformatics*. 2009. V. 25. P. 1754–1760.
15. Li H., Handsaker B., Wysoker A., Fennell T., Ruan J., Homer N., Marth G., Abecasis G., Durbin R. // *Bioinformatics*. 2009. V. 25. P. 2078–2079.
16. Jónsson H., Ginolhac A., Schubert M., Johnson P.L.F., Orlando L. // *Bioinformatics*. 2013. V. 29. P. 1682–1684.
17. Mallick S., Micco A., Mah M., Ringbauer H., Lazaridis I., Olalde I., Patterson N., Reich D. // *bioRxiv*. 2023. doi: 10.1101/2023.04.06.535797
18. Alexander D.H., Novembre J., Lange K. // *Genome Res*. 2009. V. 19. P. 1655–1664.
19. Purcell S., Neale B., Todd-Brown K., Thomas L., Ferreira M.A.R., Bender D., Maller J., Sklar P., de Bakker P.I., Daly M.J., et al. // *Am. J. Hum. Genet.* 2007. V. 81. P. 559–575.
20. Weissensteiner H., Pacher D., Kloss-Brandstätter A., Forer L., Specht G., Bandelt H.J., Kronenberg F., Salas A., Schönherr S. // *Nucl. Acids Res.* 2016. V. 44. P. 58–63.
21. Walsh S., Chaitanya L., Clarisse L., Wirken L., Draus-Barini J., Kovatsi L., Maeda H., Ishikawa T., Sijen T., de Knijff P., et al. // *Forensic Sci. Int. Genet.* 2014. V. 9. P. 150–161.
22. Walsh S., Chaitanya L., Breslin K., Muralidharan C., Bronikowska A., Pospiech E., Koller J., Kovatsi L., Wollstein A., Branicki W., et al. // *Hum. Genet.* 2017. V. 136. P. 847–863.
23. Chaitanya L., Breslin K., Zuñiga S., Wirken L., Pośpiech E., Kukla-Bartoszek M. Sijen T., Knijff P., Liu F., Branicki W., et al. // *Forensic Sci. Int. Genet.* 2018. V. 35. P. 123–135.
24. Полное собрание русских летописей. Т. III. Новгородская первая летопись старшего и младшего изводов. М., 2000. 692 с.
25. Полное собрание русских летописей. Т. IV, ч. 1. Новгородская четвертая летопись. М., 2000. 690 с.
26. Полное собрание русских летописей. Т. VII. Летопись по Воскресенскому списку. М., 2001. 345 с.
27. Полное собрание русских летописей. Т. I. Лаврентьевская летопись. Л., 1926–1928. 496 с.
28. Полное собрание русских летописей. Т. XIII. Летописный сборник, именуемый Патриаршей или Никоновской летописью. М., 2000. 532 с.
29. Volkov V.G., Seslavin N.A. Genetic study of the Rurik Dynasty // Centenary of human population genetics. Conference proceedings. 29–31 May 2019. P. 84–85.
30. Барабанов О.Н. // *Пространство и Время*. 2015. № 3 (21). С. 198–207.
31. Максимов Н.Г. // *Русский Newsweek*. 2006. № 50 (128). С. 68–69.
32. Максимов Н.Г. // *Русский Newsweek*. 2007. № 52 (176). С. 50–58.
33. Borbely N., Mende B.G., Pinhasi R., Cheronet O., Reich D., Takacs A., Hajdu T., Szecsenyi-Nagy A. // 28th EAA Annu. Meet. Budapest, Hungary, 31 August – 3 September 2022. P. 193.
34. Lamnidis T.C., Majander K., Jeong C., Salmela E., Wessman A., Moiseyev V., Khartanovich V., Balanovsky O., Ongyerth M., Weihmann A., et al. // *Nat. Commun.* 2018. V. 9. P. 5018.
35. Yao Y.G., Kong Q.P., Bandelt H.J., Kivisild T., Zhang Y.P. // *Am. J. Hum. Genet.* 2002. V. 70. P. 635–651.
36. Derenko M.V., Grzybowski T., Malyarchuk B.A., Dambueva I.K., Denisova G.A., Czarny J., Dorzhu C.M., Kakpakov V.T., Miščicka-Sliwka D., Woźniak M., et al. // *Ann. Hum. Genet.* 2003. V. 67. P. 391–411.
37. Keyser-Tracqui C., Crubézy E., Ludes B. // *Am. J. Hum. Genet.* 2003. № 73 (2). P. 247–260.
38. Трапезов Р.О., Пилипенко А.С., Молодин В.И. // *Вавиловский журнал генетики и селекции*. 2014. Т. 18. № 3. С. 469–477.
39. Csáky V., Gerber D., Koncz I., Csiky G., Mende B.G., Szeifert B., Egyed B., Pamjav H., Marcsik A., Molnár, et al. // *Sci. Rep.* 2020. V. 10. P. 948.
40. Maróti Z., Neparáczki E., Schütz O., Maár K., Varga G.I.B., Kovács B., Kalmár T., Nyerki E., Nagy I., Latinovics D., et al. // *Curr. Biol.* 2022. V. 32. P. 2858–2870.e7.
41. Gnecci-Ruscione G.A., Szécsényi-Nagy A., Koncz I., Csiky G., Rác Z., Rohrlach A.B., Brandt G., Rohland N., Csáky V., Cheronet O., et al. // *Cell*. 2022. V. 185. P. 1402–1413.e21.
42. de Barros Damgaard P., Martiniano R., Kamm J., Moreno-Mayar J.V., Kroonen G., Peyrot M., Barjamovic G., Rasmussen S., Zacho C., Baimukhanov N. // *Science*. 2018. V. 360. doi: 10.1126/science.aar7711
43. Peltola S., Majander K., Makarov N., Dobrovolskaya M., Nordqvist K., Salmela E., Onkamo P. // *Curr. Biol.* 2023. V. 33. P. 174–182.e10.
44. Sikora M., Seguin-Orlando A., Sousa V.C., Albrechtsen A., Korneliussen T., Ko A., Rasmussen S., Dupanloup I., Nigst P.R., Bosch M.D., et al. // *Science*. 2017. V. 358. P. 659–662.
45. Damgaard P.B., Marchi N., Rasmussen S., Peyrot M., Renaud G., Korneliussen T., Moreno-Mayar J.V., Pedersen M.W., Goldberg A., Usmanova E., et al. // *Nature*. 2018. V. 557. P. 369–374.
46. Плетнева С.А. Половцы. М.: Наука, 1990. 208 с.
47. Литвина А.Ф., Успенский Ф.Б. Русские имена половецких князей: Междинастические контакты сквозь призму антропоники. М.: ПОЛИМЕДИА, 2013. 280 с.
48. Veeramah K.R., Rott A., Groß M., van Dorp L., López S., Kirsanov K., Sell C., Blöcher J., Wegmann D., Link V., et al. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2018. V. 115. P. 3494–3499.

УДК: 618.19-006.6-08-06-037:615.277.3

CNA-ландшафт HER2-негативного рака молочной железы при использовании антрациклинсодержащих схем неoadъювантной химиотерапии

М. К. Ибрагимова^{1,2,3*}, Е. А. Кравцова^{1,2}, М. М. Цыганов^{1,3}, Н. В. Литвяков^{1,2,3}

¹ Научно-исследовательский институт онкологии, Томский национальный исследовательский медицинский центр Российской академии наук, Томск, 634050 Россия

² Национальный исследовательский Томский государственный университет, Томск, 634050 Россия

³ Сибирский государственный медицинский университет Министерства здравоохранения Российской Федерации, Томск, 634050 Россия

*E-mail: imk1805@yandex.ru

Поступила в редакцию 12.05.2023

Принята к печати 28.07.2023

DOI: 10.32607/actanaturae.20377

РЕФЕРАТ Критическая оценка дозировки, сроков и способов включения антрациклинов в предоперационную химиотерапию становится более актуальной в эпоху, когда молекулярно-генетический подход позволяет не только разрабатывать биологически направленные терапевтические средства, но и выбирать пациентов, применение определенных цитотоксических агентов у которых приведет к желаемым эффектам. С целью выявления потенциальных CNA-маркеров объективного ответа и прогностических CNA-маркеров гематогенного метастазирования изучены изменения CNA-генетического ландшафта опухоли молочной железы люминального В HER2-негативного подтипа, вызванные применением антрациклинсодержащих схем неoadъювантной химиотерапии. Сравнение частот CNA в зависимости от ответа на неoadъювантную химиотерапию показало наличие объективного ответа при большем количестве делеций в локусах 11q22.3 и 11q23.1 ($p = 0.004$). Сравнение частот CNA в группах пациенток после лечения показало, что возникновение гематогенного метастазирования наблюдалось при большем количестве амплификаций в локусе 9p22.2 ($p = 0.003$) и большем количестве делеций в локусе 9p21.3 ($p = 0.03$). Выявлены потенциальные предиктивные CNA-маркеры объективного ответа и прогностические CNA-маркеры гематогенного метастазирования при применении антрациклинсодержащих схем неoadъювантной химиотерапии.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА рак молочной железы, CNA-генетический ландшафт опухоли, антрациклинсодержащие схемы, неoadъювантная химиотерапия.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ CNA (copy number aberration) – aberrации числа копий; РМЖ – рак молочной железы; НХТ – неoadъювантная химиотерапия; pCR (complete pathomorphological response) – полный патоморфологический ответ; SNV (single nucleotide variation) – однонуклеотидные варианты; VAF (variant allele frequency) – изменение частот вариантных аллелей; HER2 (human epidermal growth factor receptor 2) – рецептор эпидермального фактора роста типа 2; БВ – безметастатическая выживаемость.

ВВЕДЕНИЕ

Неoadъювантная химиотерапия (НХТ) считается стандартом комплексного лечения при HER2-положительном (HER2+) раке молочной железы (РМЖ), однако подход к лечению локализованного рака молочной железы со статусом ER+/HER2-, при котором химиочувствительность не так сильна, как при других клинических подтипах РМЖ, может быть неоднозначным [1]. Частота полного

патоморфологического ответа (pCR) при HER2-отрицательном (HER2-) РМЖ невысока, а наличие остаточного заболевания не имеет такого же прогностического значения, как при других клинических подтипах [2]. Однако выживаемость больных, достигших полной или частичной регрессии в процессе неoadъювантной химиотерапии, существенно отличается от выживаемости больных, у которых наблюдается стабилизация или прогрессирующая

ние опухолевого процесса [3, 4]. В этой связи актуальным является поиск предиктивных маркеров достижения полной и частичной регрессии HER2-отрицательного РМЖ, а не pCR как при трижды негативном (ТН РМЖ), так и HER2-позитивном молекулярном подтипе.

В настоящее время существует несколько методов лечения пациентов с HER2- или метастатическим РМЖ, однако при этом не выработан золотой стандарт лечения первой линии. Тем не менее, схемы, содержащие антрациклин или таксан, считаются традиционным системным лечением в качестве химиотерапии первой линии или неoadъювантной терапии при данном подтипе заболевания [5].

Учитывая наличие токсических эффектов, связанных с применением антрациклинсодержащих схем НХТ (кардиотоксичность, лейкомогенные эффекты, вторичные злокачественные новообразования) [6–8], и в целях соблюдения основного руководящего принципа медицинской этики – недопущения причинения вреда пациенту – возникает сложнейшая задача не только выявить пациентов, которым химиотерапия может принести наибольшую пользу, но и использовать системный режим, имеющий максимально возможный терапевтический индекс в сочетании с минимальным риском долговременной значительной токсичности, связанной с лечением.

В 2021 г. руководство Национальной комплексной онкологической сети (National Comprehensive Cancer Network Guidelines) исключило терапию на основе антрациклинов из списка «предпочтительных схем» лечения HER2+ РМЖ на ранней стадии, а также из категории «схем выбора» [9]. Однако результаты представленных мета-анализов показывают, что применение антрациклинов оправдано при люминальном В подтипе ER-позитивного/HER2-негативного РМЖ [10].

Таким образом, существуют проблемы в выборе подхода к неoadъювантному лечению при HER2- РМЖ. Вопрос о том, кому и когда следует применять определенную схему НХТ при РМЖ с HER2-статусом, требует дальнейшего обсуждения.

При этом схемы на основе антрациклинов являются важным компонентом лечения при РМЖ, особенно в случае высокого риска рецидива с ТН РМЖ (независимо от поражения подмышечных лимфоузлов) или HER2-/ER+ РМЖ с вовлечением подмышечных лимфоузлов. Поэтому необходимо проводить поиск биомаркеров, предсказывающих реакцию на антрациклины при неoadъювантной терапии рака молочной железы, причем не только pCR, но и частичную регрессию, ассоциированные с благоприятным исходом.

В настоящей работе изучены изменения CNA (copy number aberration)-генетического ландшафта опухоли молочной железы люминального В HER2-негативного подтипа под действием антрациклинсодержащих схем неoadъювантной химиотерапии с целью выявления групп предиктивных CNA-маркеров объективного (pCR+частичная регрессия более 50%) ответа на применяемое лечение и потенциальных CNA-маркеров прогнозирования гематогенного метастазирования.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

В исследование включены 35 больных (25–68 лет (средний возраст 49.3 ± 0.1 лет (Mean \pm SE)) с морфологически верифицированным диагнозом рак молочной железы T₁₋₄N₀₋₃M₀ (стадии IIA–IIIB) люминального В HER2-негативного подтипа. Люминальный В HER2-негативный подтип определяли как ER +, PR + или -, Ki67 > 30%.

В соответствии с Consensus Conference on Neoadjuvant Chemotherapy in Carcinoma of the Breast (April 26–28, 2003, Philadelphia, Pennsylvania) пациенты получали в неoadъювантном режиме 4–8 курсов химиотерапии по схемам FAC (фторурацил, доксорубицин, циклофосфан)/AC (доксорубицин, циклофосфан) и CAH (циклофосфан, доксорубицин, кселода). Эффективность предоперационной химиотерапии оценивали по критериям ВОЗ и Международного противоракового союза (International Union Against Cancer) с помощью ультразвукового исследования (УЗИ) и/или маммографии, которые проводили до лечения, после двух курсов НХТ и перед операцией. Регистрировали полную регрессию (100% уменьшение опухоли), частичную регрессию (уменьшение объема опухоли более чем на 50%), стабилизацию (снижение объема менее чем на 50% или увеличение не более чем на 25%) и прогрессирование (увеличение объема опухоли более чем на 25%). Все случаи полной регрессии подтверждены морфологически. Согласно международным рекомендациям, при проведении предоперационной химиотерапии больные РМЖ со стабилизацией или прогрессированием составляют группу с отсутствием ответа на НХТ, а больные с частичной регрессией – группу с объективным ответом. Получение опухолевого материала для исследования невозможно при полной регрессии опухолевого процесса после НХТ.

В табл. 1 представлены основные клинико-морфологические параметры больных, включенных в исследование.

В качестве исследуемого материала использовали биопсийные опухолевые образцы, взятые до лечения под контролем УЗИ, а также операционный

Таблица 1. Клинико-морфологические параметры больных РМЖ, включенных в исследование

Клинико-морфологический параметр		Число больных (абс. ч., %)
Возраст (лет)	≤45	10 (28.6)
	>45	25 (71.4)
Менструальный статус	Сохранен	22 (62.9)
	Пременопауза	4 (11.4)
	Менопауза	5 (14.3)
	Постменопауза	4 (11.4)
Гистологический тип	Инвазивный протоковый рак	20 (57.1)
	Инвазивный дольковый рак	3 (8.6)
	Инвазивная карцинома неспецифического типа	5 (14.3)
	Другие типы	7 (20.0)
Размер опухоли	T ₁	8 (22.8)
	T ₂	25 (71.4)
	T ₃	1 (2.9)
	T ₄	1 (2.9)
Лимфогенное метастазирование	N ₀	16 (45.7)
	N ₁	14 (40.0)
	N ₂	1 (2.9)
	N ₃	4 (11.4)
Гистологическая форма	Уницентрическая	23 (65.7)
	Мультицентрическая	12 (34.3)
Ответ на НХТ	Прогрессирование	1 (2.9)
	Стабилизация	11 (31.4)
	Частичная регрессия	23 (65.0)
Медиана наблюдения за пациентами, месяц (M ± SE)		80.5 ± 1.1 (min–max: 24–148)
Частота метастазирования		13 (37.1)
Медиана возникновения гематогенного метастазирования, месяц (M ± SE)		45.7 ± 0.4 мес. (min–max: 4–130)
Частота рецидивирования		4 (11.4)
Медиана возникновения рецидива, месяц (M ± SE)		72.5 ± 1.5 мес. (min–max: 52–107)

материал после НХТ. ДНК выделяли из 35 парных образцов опухолевой ткани молочной железы, полученных от каждой женщины до лечения и после НХТ.

Микроматричный анализ проводили на микроматрицах (ДНК-чипах) высокой плотности фирмы Affymetrix (США) CytoScan™ HD Array. Процедуры пробоподготовки, гибридизации и сканирования проводили на системе Affymetrix GeneChip® Scanner 3000 7G (Affymetrix). Результаты обрабатывали с использованием программы «Chromosome Analysis Suite 4.0» (Affymetrix).

Статистическую обработку данных проводили с использованием пакета прикладных программ Statistica 8.0 (StatSoft Inc., США). Критерий χ^2 использовали для оценки различий в частотах (<http://vassarstats.net/index.html>). Выживаемость анализировали с использованием метода Каплана–Майера и logrank test.

Соблюдение прав пациентов и правил биоэтики. Исследование проведено в соответствии с Хельсинкской декларацией 1964 г. (исправленной в 2013 г.). Протокол исследования одобрен комитетом по биомедицинской этике НИИ онкологии Томского национального исследовательского медицинского центра Российской академии наук. Протокол № 1 от 14.01.2013. Все пациентки подписали информированное согласие на участие в исследовании.

РЕЗУЛЬТАТЫ

На первом этапе исследования для оценки изменения CNA-ландшафта (CNA – copy number aberrations, абберации числа копий) опухоли, вызванного антрациклинсодержащей неoadъювантной химиотерапией, описан CNA-ландшафт опухоли до и после лечения (рис. 1) и оценены изменения в частоте CNA в опухоли.

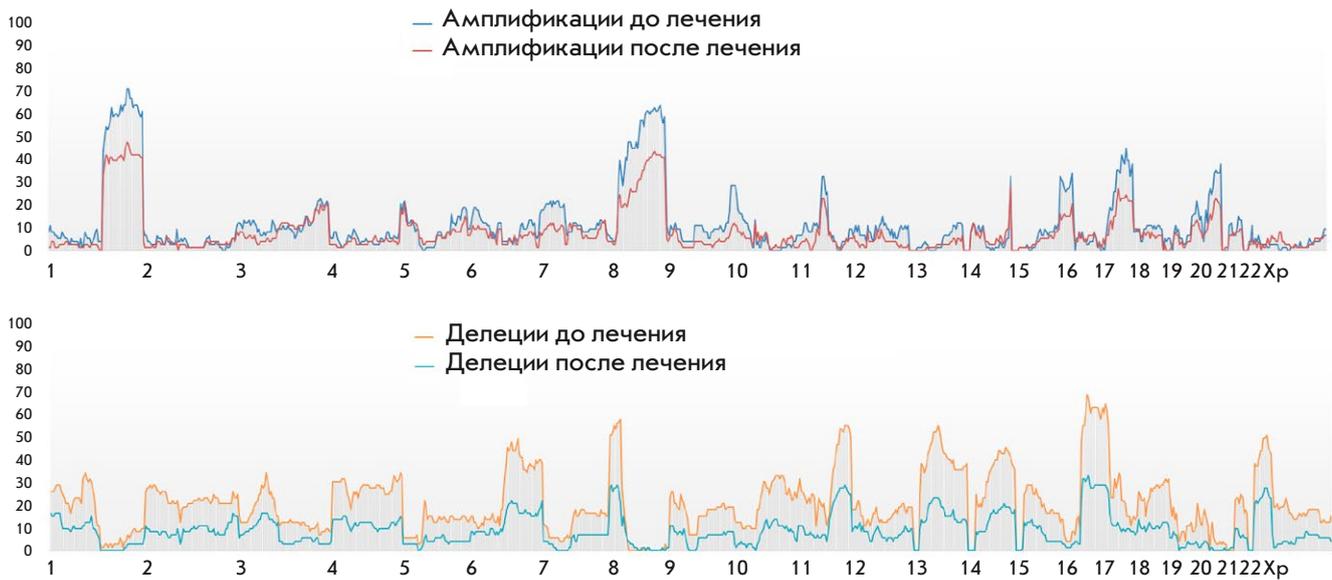


Рис. 1. Частота амплификаций и делеций в каждой хромосоме пациенток, получавших в режиме предоперационной химиотерапии антрациклинсодержащие схемы до и после НХТ

Наибольшее количество амплификаций (68.6%) обнаружено в локусах 1q32.1–32.2, 1q42.12–42.13 и 1q42.2 опухолей пациенток до лечения. Наибольшая частота делеций (68.6%) обнаружена в локусах 17p13.3, 17p13.1 (при полном отсутствии амплификаций). Также на протяженном участке длинного плеча хромосомы 8 при полном отсутствии делетированных регионов обнаружено 62.9% амплификаций в локусах 8q21.3, 8q22.1–22.2, 8q23.3, 8q24.11–24.12 и 8q24.21.

Наибольшее количество амплификаций (48.6%) в опухоли после лечения было в локусах 1q21.3, 1q32.1–1q32.3, 1q41, 1q42.11–1q42.13, 1q42.2–42.3, 8q22.3 и 8q23.3, при этом в локусах 1q21.3, 8q22.3 и 8q23.3 отсутствовали делетированные участки. Наибольшая частота делеций (37.1%) обнаружена в локусах 16q21 и 16q22.1. Также в локусах 11q23.3 и 17p13.3 опухоли после НХТ выявлено 34.3% делеций при полном отсутствии амплифицированных участков.

Определение частоты CNA, связанных с применением антрациклинсодержащих схем НХТ, выявило статистически значимое снижение частоты делеций в локусах 17p13.3 и 17p13.1 – с 68.6 до 34.3% (с 24/35 случаев до лечения до 12/35 после проведения НХТ соответственно) ($p = 0.002$).

На рис. 1 представлена частота амплификаций и делеций в каждой хромосоме пациенток с РМЖ до и после применения антрациклинсодержащих схем НХТ.

Далее с целью поиска потенциальных предиктивных CNA-маркеров объективного ответа на НХТ при применении антрациклинсодержащих схем проанализировали распределение частот CNA в опухоли до лечения в зависимости от ответа на предоперационную химиотерапию.

После проведения НХТ у 23 из 35 больных зарегистрирована частичная регрессия опухоли (группа 1), у 12 – стабилизация или прогрессирование опухолевого процесса (группа 2) (табл. 1).

У пациенток группы 1 наибольшее количество амплификаций (82.6%) обнаружено в локусах 1q32.1–32.2, 1q42.12–42.13, 1q42.2 при отсутствии делеций. Наибольшая частота делеций (78.3%) найдена в локусах 11q23.1, 11q23.3, 17p13.1 при отсутствии амплификаций. У пациенток группы 2 наибольшее количество амплификаций (58.3%) найдено в локусах 1q23.3, 8q21.11–21.13, 8q21.2, 8q21.3, 8q22.1–22.3, 8q23.1–23.3, 8q24.11–24.13, 8q24.21–24.23, 8q24.3 при отсутствии делеций. Наибольшей частота делеций (59.0%) была в локусах 16q21 и 16q22.1 при отсутствии амплификаций.

В результате сравнения частот CNA в данных группах пациенток установлено, что объективный ответ на НХТ в группе 1 наблюдался при большем количестве делеций (18/23 событий (78.3%)) в локусах 11q22.3 и 11q23.1, чем у пациенток группы 2 (3/12 событий (25.0%)) ($p = 0.004$). *Потенциально данные локусы могут служить предиктивными маркерами объективного ответа на применение*

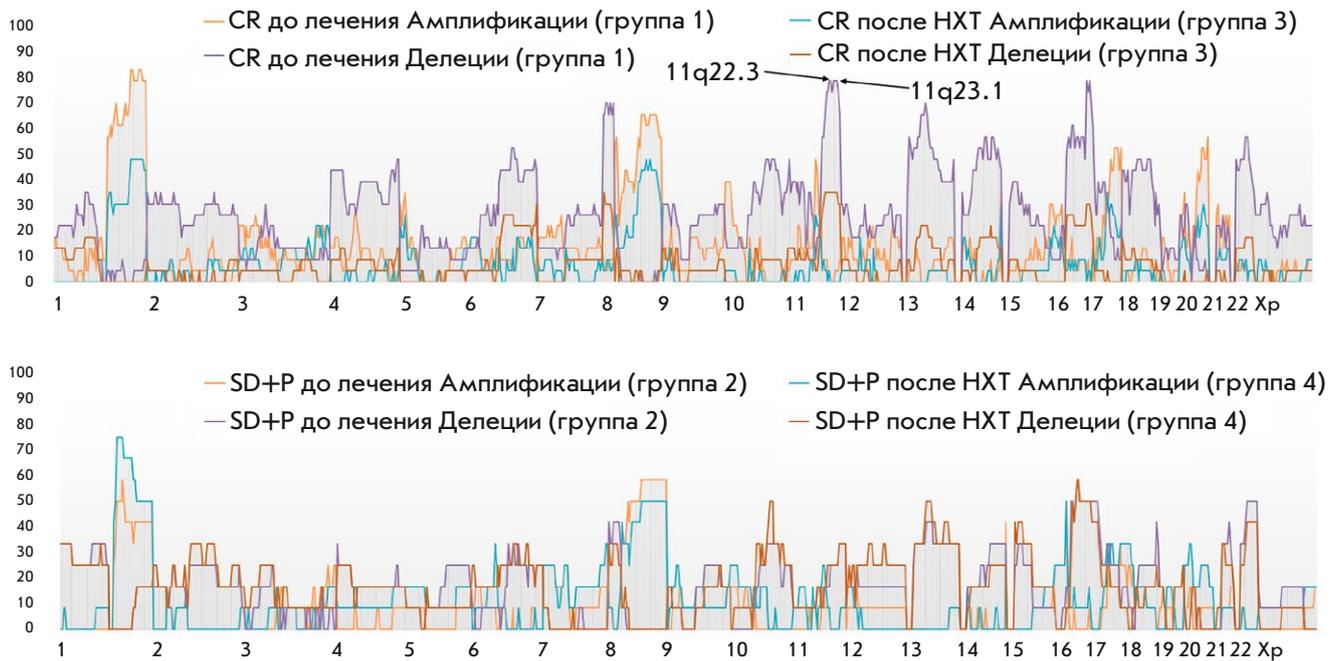


Рис. 2. Частота CNA у больных РМЖ, которым в режиме предоперационной химиотерапии были применены антрациклинсодержащие схемы, до и после лечения в зависимости от эффекта НХТ. Для пациенток группы 1 и 3 с объективным ответом на НХТ (частичная регрессия опухоли, CR) до и после НХТ частота CNA указана как амплификации/делеции 1 и амплификации/делеции 3 соответственно. Для пациенток группы 2 и 4 с отсутствием объективного ответа на НХТ (стабилизация или прогрессирование опухолевого процесса, SD+P) до и после НХТ, частота CNA указана как амплификации/делеции 2 и амплификации/делеции 4 соответственно.

антрациклинсодержащих схем в режиме предоперационной химиотерапии.

Для описания полной картины изменения CNA-ландшафта опухоли в процессе лечения проанализировали распределение частот CNA в зависимости от ответа пациенток на предоперационную химиотерапию после лечения.

В исследуемой когорте пациенток также выделены группы с частичной регрессией опухоли (группа 3 – после НХТ) и со стабилизацией или прогрессированием опухолевого процесса (группа 4 – после НХТ).

У пациенток группы 3 наибольшее количество амплификаций (47.8%) обнаружено в локусах 1q32.1–32.3, 1q41, 1q42.11–42.13, 1q42.2, 1q42.3, 8q22.3, 8q23.3 при отсутствии делеций; делеций (34.8%) – в локусах 8p23.2, 11q21, 11q22.1–22.3, 11q23.1–23.3, 11q24.1, 11q24.2.

Сравнение частот CNA в группе с частичной регрессией опухоли при применении антрациклинсодержащих схем НХТ показало, что в локусах 1q32.1 и 1q32.2 частота амплификаций статистически значимо снизилась с 82.6% до лечения до 41.7% после лечения ($p = 0.0001$). Также в процессе проведения НХТ частота делеций в локусах 17p13.3 и 17p13.1

снизилась (78.3 и 30.4%) до и после НХТ соответственно; $p = 0.0002$.

У пациенток группы 4 наибольшее количество амплификаций (75.0%) выявлено в локусах 1q21.3, 1q22, 1q23.1–23.3 при отсутствии делеций. Наибольшая частота делеций (58.3%) обнаружена в локусах 16q21 и 16q22.1.

Сравнение частот CNA в группе со стабилизацией и прогрессированием опухолевого процесса при применении антрациклинсодержащих схем НХТ показало, что в локусе 6p12.2 частота амплификаций увеличилась с 0% в опухоли до лечения до 25.0% после проведения НХТ ($p = 0.001$). Также в процессе проведения НХТ частота делеций увеличилась в локусе 6p11.1 (0 и 25.0% до и после НХТ соответственно; $p = 0.001$).

На рис. 2 представлена общая картина частоты CNA у больных РМЖ (до и после лечения) в зависимости от эффекта НХТ.

Далее для выявления потенциальных прогностических CNA-маркеров возникновения гематогенного метастазирования при применении антрациклинсодержащих схем НХТ проведен анализ распределения частот CNA в опухоли до лечения в зависимости от статуса гематогенного метастазирования.

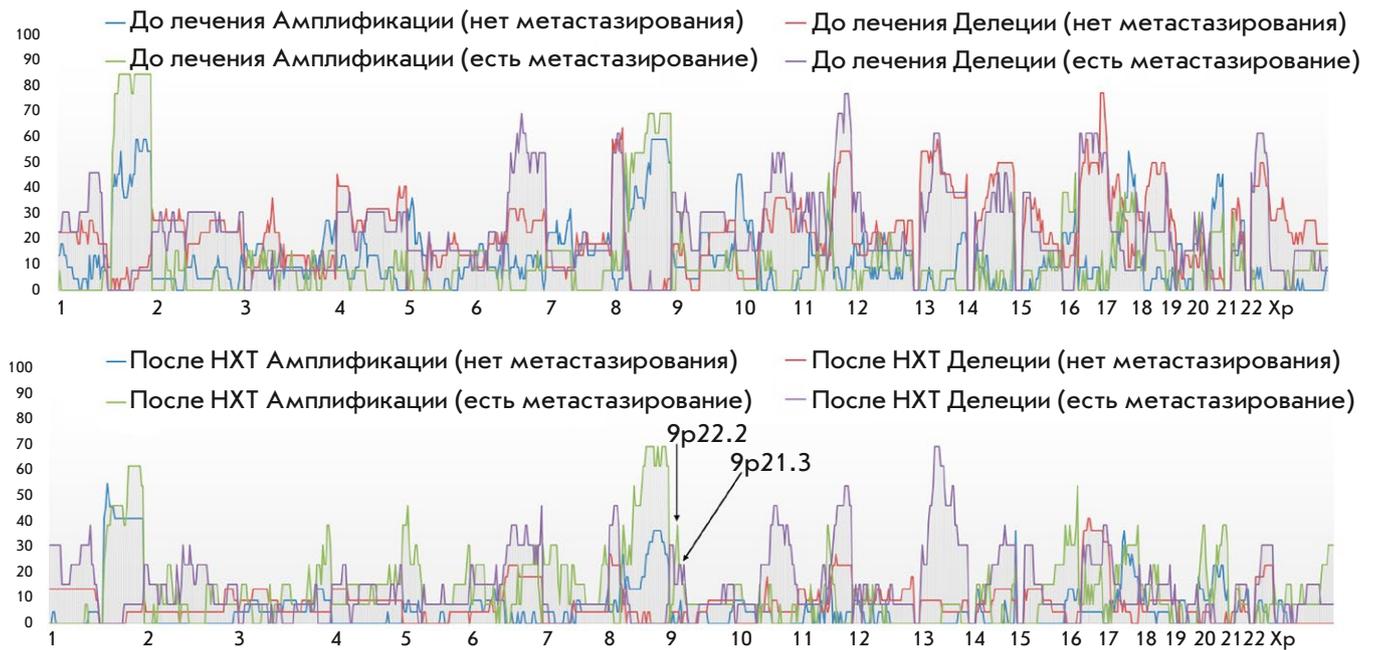


Рис. 3. Частота CNA у больных РМЖ до и после лечения в зависимости от наличия гематогенного метастазирования

У 13 пациенток исследуемой группы зарегистрировано развитие гематогенных метастазов. Выделены группы 5 и 6 – без гематогенного метастазирования (до лечения/после НХТ соответственно) и группы 7 и 8 – с гематогенным метастазированием (до лечения/после НХТ соответственно). В табл. 1 представлена частота гематогенного метастазирования и медиана его возникновения.

У пациенток группы 5 наибольшее количество амплификаций (59.1%) обнаружено в локусах 8q21.3, 8q22.1–22.3, 8q23.1–23.3, 8q24.11–12, 8q24.21 при отсутствии делеций и в локусах 1q32.1–32.2, 1q42.12–42.13, 1q42.2 при частоте делеций до 9.1%. Наибольшая частота делеций (77.3%) выявлена в локусах 17p13.3–13.1 при отсутствии амплификаций.

У пациенток группы 7 наибольшая частота амплификаций (84.6%) детектирована в локусах 1q23.2–23.3, 1q24.1–24.3, 1q25.1–25.3 при отсутствии делеций. Наибольшая частота делеций (76.9%) была в локусах 11q23.3, 11q24.1 и 11q24.2 при отсутствии амплификаций.

В результате сравнения частот CNA в данных группах до лечения показано, что возникновение гематогенного метастазирования наблюдалось при большем количестве амплификаций в локусах 18q11.2, 18q12.1 и 18q12.2. В частности, у 23.0% пациенток с наличием гематогенного метастазирования идентифицирована амплификация в данных локусах при полном отсутствии амплификаций в этих локусах в группе пациенток без гематогенного метастазирования ($p = 0.035$).

У пациенток группы 6 наибольшее количество амплификаций (54.6%) обнаружено в локусе 1q21.3 при отсутствии делеций. Наибольшая частота делеций (40.9%) выявлена в локусах 16q21 и 16q22.1.

У пациенток группы 8 наибольшая частота амплификаций (69.2%) детектирована в локусах 8q21.13, 8q21.2, 8q21.3, 8q22.1–22.3, 8q23.3, 8q24.13, 8q24.21, 8q24.22; делеций (69.1%) – в локусах 13q14.11–14.13 и 13q14.2 при отсутствии амплификаций.

Сравнение частот CNA в данных группах пациенток после лечения показало, что возникновение гематогенного метастазирования связано с большим количеством амплификаций в локусе 9p22.2 (0/22 событий (0%) и 5/13 событий (38.5%) при отсутствии/наличии гематогенного метастазирования соответственно) ($p = 0.002$). Также возникновение гематогенного метастазирования наблюдалось при большем количестве делеций в локусе 9p21.3 (0/22 событий (0%) и 3/13 событий (23.1%) при отсутствии/наличии гематогенного метастазирования соответственно) ($p = 0.053$). *Потенциально эти локусы могут выступать в качестве прогностического маркера возникновения гематогенного метастазирования у больных люминальным В HER2-негативным подтипом РМЖ при назначении антрациклинсодержащих схем НХТ.*

На рис. 3 представлена частота CNA у больных РМЖ, которым в режиме предоперационной химиотерапии были применены антрациклинсодержащие схемы, до и после лечения в зависимости от гематогенного метастазирования.

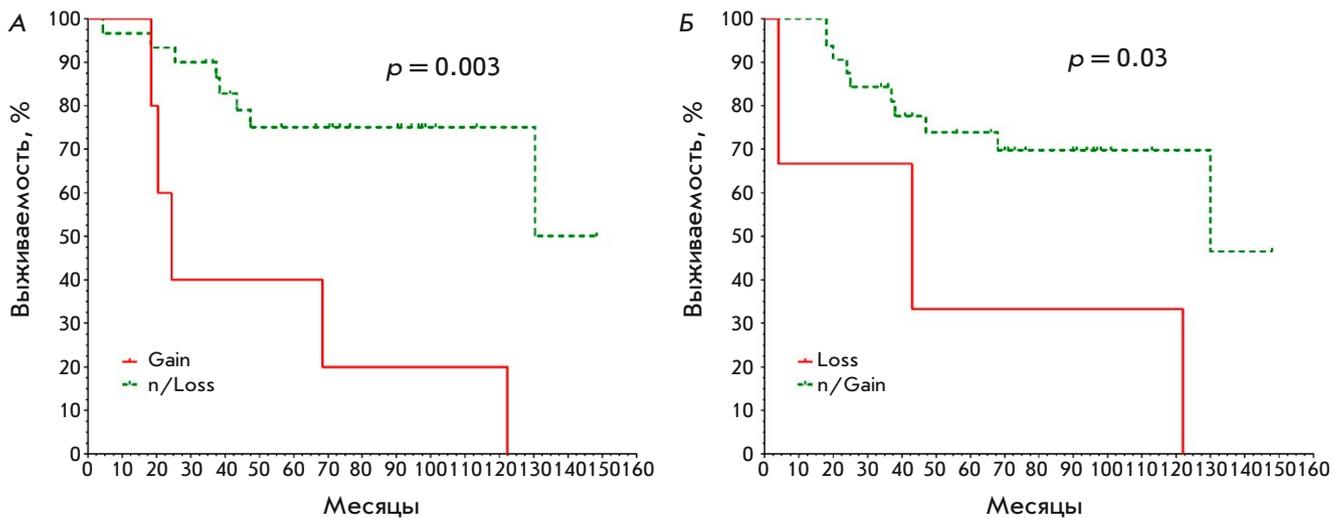


Рис. 4. Показатели безметастатической выживаемости больных раком молочной железы в зависимости от наличия в опухоли амплификаций (Gain) в локусе 9p22.2 (А) и делеций (Loss) в локусе 9p21.3 (Б)

Для оценки показателей безметастатической выживаемости (БВ) в зависимости от выявленных потенциальных прогностических CNA-маркеров возникновения гематогенного метастазирования при применении антрациклинсодержащих схем НХТ были построены кривые выживаемости по методу Каплана–Майера.

На рис. 4 представлены кривые БВ пациенток, включенных в исследование, в зависимости от наличия в опухоли амплификаций в локусе 9p22.2 ($p = 0.003$) и делеций в локусе 9p21.3 ($p = 0.03$).

ОБСУЖДЕНИЕ

Важно отметить, что опубликованы результаты многочисленных исследований, в которых проведен поиск прогностических и предиктивных маркеров при различных схемах адъювантной и неадъювантной химиотерапии известных молекулярных подтипов РМЖ. Данные этих исследований несколько противоречивы и направлены на тщательную переоценку использования известных агентов, в том числе и антрациклинов, при этом основной упор по-прежнему делается на поиск маркеров pCR.

В частности, дупликацию центромеры хромосомы 17 (дупликация *CEP17*) исследовали в качестве маркера чувствительности к антрациклинам. Повышение количества *CEP17* нередко встречается при РМЖ [11, 12]. Анализ образцов РМЖ на наличие дупликации *CEP17* с различными значениями (например, >1.86 *CEP17*/клетку, соотношение $HER2/CEP17 \geq 2.0$), выполненный несколькими группами ученых, привел к получению абсолютно противоречивых результатов – наличие/отсутствие линейной зависимости между отношением $HER2/CEP17$ и pCR [11, 13, 14].

Изучены динамические изменения генетического ландшафта $HER2$ - РМЖ. В частности, проведено проспективное серийное молекулярное профилирование опухолей $HER2$ - РМЖ во время химиотерапии. Биопсии опухоли получены до и после 2 недель химиотерапии (доксорубин/циклофосфамид (ddAC)), опухолевый материал получен интраоперационно, после 8 недель комбинированного лечения. Для оценки однонуклеотидных вариантов (SNV) и изменения количества копий (CNA) 440 опухолеассоциированных генов (ACTOnco®) проведено NGS-секвенирование (по трем временным точкам) ДНК каждого пациента ($n = 34$). Появление новых мутаций, вызванных терапией, отмечено в 13% случаев (после одного цикла лечения). У 72% пациентов изменились частоты вариантных аллелей (VAF) патогенных SNV: 51% этих изменений произошли рано (через 2 недели) и сохранялись в течение 8 недель. Изменения в VAF SNV чаще всего наблюдались в пути PI3K/mTOR/AKT. В опухолях с плохим ответом на лечение изменения VAF SNV возникали с меньшей вероятностью, чем в опухолях с хорошим ответом (у 50% [7/14] против 15% [4/24], $p = 0.029$). При этом не обнаружено существенной разницы в CNA после 2 недель лечения между пациентками с хорошим и плохим ответом (22 [0–100] против 35 [0–106], $p = 0.605$). Однако через 8 недель пациентки с хорошим ответом имели более низкую нагрузку CNA, чем с плохим ответом (12 [3–26] против 32 [15–73], $p = 0.042$) [15].

Представлены результаты интегрированного мультиомного профилирования высокодифференцированного $HER2$ -негативного РМЖ. Идентификация кандидатов-драйверов метастатического поражения

в опухолях стадии III ER+HER2- на основе первичных ($n = 270$) и метастатических заболеваний после лечения ($n = 243$) выявила амплификацию локусов 8q24.13 и 8q24.21 в 44.5% случаев метастазирования [16].

Нами проведен поиск потенциальных предиктивных CNA-маркеров объективного ответа на НХТ и маркеров возникновения гематогенного метастазирования. В частности, в качестве потенциальных предиктивных маркеров объективного ответа пациенток с люминальным В HER2- РМЖ на применение в режиме предоперационной химиотерапии антрациклинсодержащих схем НХТ показано наличие делеций в локусах **11q22.3** и **11q23.1**. У пациенток с делециями в этих локусах статистически значимо чаще наблюдается объективный ответ на НХТ с использованием антрациклинов, чем при отсутствии делеций ($p = 0.004$).

В работе Elin Varnekov и соавт. locus **11q22.3** рассматривается как один из восьми важнейших локусов предрасположенности к раку молочной железы [17]. Этот locus идентифицирован как новый locus риска (наиболее значимый SNP rs228595, $p = 7 \times 10^{-6}$) у носителей мутации *BRCA1* [18]. Locus 11q22.3 содержит несколько генов, включая *ACAT1*, *NPAT* и *ATM* (данные получены с платформы genecards.org).

Важно отметить, что недавние исследования указывают на новые и неожиданные функции гена *ACAT1*, кодирующего ацетил-СоА-ацетилтрансферазу. Так установлено, что *ACAT1* обладает лизин-ацетилтрансферазной активностью, ацетирует пируватдегидрогеназу, что способствует возникновению эффекта Варбурга и пролиферации опухолевых клеток [19]. Согласно последним данным, опосредованное *ACAT1* ацетилирование METTL3 ингибирует миграцию и инвазию клеток при трижды негативном РМЖ [20]. Также показано, что ингибирование *NPAT* (ядерный белок, коактиватор транскрипции) и p-*NPAT* предотвращает вступление РМЖ в S-фазу клеточного цикла в результате снижения синтеза ДНК [21]. Распространенная мутация с.7271T>G в гене *ATM* в 4 раза увеличивает риск развития РМЖ [22]. Значение гена *ATM* при РМЖ достаточно подробно изучено. Обнаружено, что мутации гена *ATM* коррелируют со специфическими клиническими характеристиками РМЖ, такими, как поражение лимфатических узлов и HER2-позитивность. В целом, наличие мутаций *ATM* связано с неблагоприятным прогнозом при РМЖ. Поскольку мутации данного гена участвуют в механизмах репарации ДНК, *ATM*-абберрации также могут повышать чувствительность клеток РМЖ к препаратам платины

или ингибиторам *PARP*. Некоторые данные свидетельствуют о том, что мутации *ATM* могут быть связаны с устойчивостью клеток люминально-положительного РМЖ к ингибиторам CDK4/6 [23]. В нашем исследовании делеция локуса гена *ATM* приводила к повышению чувствительности HER-негативной опухоли молочной железы к антрациклинам.

Нами также показано, что **9p22.2** и **9p21.3** потенциально можно рассматривать как прогностические маркеры риска развития гематогенных метастазов у больных люминальным В HER2-негативным подтипом РМЖ при назначении антрациклинсодержащих схем НХТ.

Амплификации в локусе **9p22.2** считаются неблагоприятным прогностическим маркером, как и наличие делеции в локусе **9p21.3**, в отличие от нормального и амплифицированного состояния локуса ($p = 0.03$).

Показано, что делеции короткого плеча хромосомы 9 связаны с такими признаками агрессивности РМЖ, как высокая степень злокачественности и тенденция к снижению выживаемости. Показано, что делеции 9p обычно включают большие фрагменты или даже все плечо хромосомы [24]. Делеции 9p21 связаны также с неблагоприятным фенотипом опухоли при РМЖ. В частности, делеция 9p21 обнаружена в 15.3% из 1089 анализируемых случаев и связана с неблагоприятными характеристиками опухоли, включая высокую степень злокачественности ($p < 0.0001$), наличие метастазов в лимфатических узлах ($p = 0.0063$), высокий индекс Ki67 ($p < 0.0001$). Наличие делеции 9p21 было связано с плохим исходом заболевания ($p = 0.0720$) [25].

Согласно опубликованным данным, в 15% всех опухолевых заболеваний человека находят гомозиготную делецию локуса 9p21.3 [26]. Недавно Han и соавт. изучили крупномасштабные геномные данные, представленные в Cancer Genome Atlas (TCGA), и показали, что при нескольких типах рака, включая РМЖ, делеция 9p21.3 является маркером неблагоприятного прогноза. Их исследование продемонстрировало четкую связь между гомозиготной делецией 9p21.3 и более короткой общей выживаемостью [27].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В представленном исследовании рассмотрены изменения CNA-генетического ландшафта опухоли молочной железы, вызванные действием антрациклинсодержащих схем неoadъювантной химиотерапии, выявлены потенциальные предиктивные CNA-маркеры объективного ответа (частоты делеций в локусах **11q22.3** и **11q23.1**) и прогности-

ческие CNA-маркеры возникновения гематогенного метастазирования (амплификации в 9p22.2 локусе и делеции в локусе 9p21.3) при применении в режиме предоперационной химиотерапии антрациклин-содержащих схем НХТ у пациенток с люминальным В HER2- РМЖ. Полученные результаты находят частичное подтверждение в литературных данных.

Однако для применения выявленных предиктивных и прогностических маркеров необходимо проведение валидации полученных результатов. ●

Финансирование. Работа поддержана Российским научным фондом (грант № 22-25-00499).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Spring L.M., Bar Y., Isakoff S.J. // J. Natl. Compr. Canc. Netw. 2022. V. 20. № 6. P. 723–734.
- Spring L.M., Fell G., Arfe A., Sharma C., Greenup R., Reynolds K.L., Smith B.L., Alexander B., Moy B., Isakoff S.J., et al. // Clin. Cancer Res. 2020. V. 26. P. 2838–2848.
- LeVasseur N., Sun J., Gondara L., Diocee R., Speers C., Lohrisch C., Chia S. // J. Cancer Res. Clin. Oncol. 2020. V. 146. P. 529–536.
- Yee D., De Michele A.M., Yau C., Symmans W.F., Albain K.S., Yi Chen Y., Krings G., Wei S., Harada S., et al. // JAMA Oncol. 2020. V. 6. № 9. P. 1355–1362.
- Cardoso F., Senkus E., Costa A., Papadopoulos E., Aapro M., André F., Harbeck N., Aguilar Lopez B., Barrios C.H., Bergh J., et al. // Ann. Oncol. 2018. V. 29. P. 1634–1657.
- Melendez G.C., Hundley W.G. // Circ. Cardiovasc. Imaging. 2016. V. 9. № 12. e005797
- Armenian S.H., Lacchetti C., Barac A. // J. Clin. Oncol.: Off. J. Am. Soc. Clin. Oncol. 2017. V. 35. № 8. P. 893–911.
- Wolff A.C., Blackford A.L., Visvanathan K., Rugo H.S., Moy B., Goldstein L.J., Stockerl-Goldstein K., Neumayer L., Langbaum T.S., et al. // J. Clin. Oncol.: Off. J. Am. Soc. Clin. Oncol. 2015. V. 33. № 4. P. 340–348.
- National Comprehensive Cancer Network Clinical Practice Guidelines in Oncology: Breast Cancer. v3.2021. https://www.nccn.org/professionals/physician_gls/pdf/breast.pdf.
- Vuger A.T., Tiscoski K., Apolinario T., Cardoso F. // The Breast. 2022. V. 65. P. 67–76.
- Rakha E.A., Miligy I.M., Quinn C.M., Provenzano E., Shaaban A.M., Marchiò C., Toss M.S., Gallaghy G., Murray C., Walshe J., et al. // Br. J. Cancer. 2021. V. 124. P. 1836–1842.
- Hoda R.S., Brogi E., Xu J., Ventura K., Ross D.S., Dang MC., Robson M., Norton L., Morrow M., Wen H.Y. // Arch. Pathol. Lab. Med. 2020. V. 144. № 5. P. 597–601.
- Bartlett J.M., McConkey C.C., Munro A.F., Desmedt C., Dunn J.A., Larsimont D.P., O'Malley F.P., Cameron D.A., Earl H.M., Poole C.J., et al. // J. Clin. Oncol. 2015. V. 33. P. 1680–1687.
- Greenwell K., Hussain L., Lee D., Bramlage M., Bills G., Mehta A., Jackson A., Wexelman B. // Breast Cancer Res. Treat. 2020. V. 181. P. 249–254.
- Choo J.R.E., Jan Y.H., Ow S.G.W., Wong A., Lee M.X., Ngoi N., Yadav K., Lim J.S.J., Lim S.E., Chan C.W., et al. // Targ. Oncol. 2022. V. 17. P. 355–368.
- Wang K., Li L., Franch-Expósito S., Le X., Tang J., Li Q., Wu Q., Bassaganyas L., Camps J., Zhang X., et al. // Mol. Oncol. 2022. V. 16. № 12. P. 2413–2431.
- Barnekow E., Hasslow J., Liu W., Bryant P., Thutkawkorapin J., Wendt C., Czene K., Hall P., Margolin S., Lindblom A. // Internat. J. Mol. Sci. 2023. V. 24. № 5. P. 44–68.
- Hamdi Y., Soucy P., Kuchenbaecker K.B., Pastinen T., Droit A., Lemaçon A., Adlard J., Aittomäki K., Andrulis I.L., Arason A., et al. // Breast Cancer Res. Treat. 2017. V. 161. P. 117–134.
- Goudarzi A. // Life Sci. 2019. V. 232. P. 116592.
- Zhang G., Huang R., Zhao H., Xia Y., Huang H., Qian M., Fu Y., Cui Y. // Genes Immunity. 2023. V. 24. P. 99–107.
- Ismail A., El-Mahdy H.A., Abulsoud A.I., Sallam A.-A.M., Gomaa Eldeib M., Elsakka E.G.E., Bakr Zaki M., Doghish A.S. // Internat. J. Biol. Macromolecules. 2023. V. 224. P. 1541–1565.
- Hall M.J., Bernhisel R., Hughes E., Larson K., Rosenthal E.T., Singh N.A., Lancaster J.M., Kurian A.W. // Cancer Prev. Res. 2021. V. 14. P. 433–440.
- Stucci L.S., Internò V., Tucci M., Perrone M., Mannavola F., Palmirotta R., Porta C. // Genes. 2021. V. 12. P. 727.
- Jong Y.J., Li L.H., Tsou M.H., Chen Y.J., Cheng S.H., Wang-Wuu S., Tsai S.F., Chen C.M., Huang A.T., Hsu M.T., et al. // Cancer Genet. Cytogenet. 2004. V. 148. P. 55–65.
- Lebok P., Roming M., Kluth M., Koop C., Özden C., Taskin B., Hussein K., Lebeau A., Witzel I., Wölber L., et al. // Oncotarget. 2016. V. 7. P. 81322–81331.
- Beroukhim R., Mermel C.H., Porter D., Wei G., Raychaudhuri S., Donovan J., Barretina J., Boehm J.S., Dobson J., Urashima M., et al. // Nature. 2010. V. 463. P. 899–905.
- Han G., Yang G., Hao D., Lu Y., Thein K., Simpson B.S., Chen J., Sun R., Alhalabi O., Wang R., et al. // Nat. Commun. 2021. V. 12. P. 5606.

УДК 577.2

Анализ ассоциаций гаплотипов гена *Tgfb1* с болезнями печени у детей

Р. М. Курабекова^{1*}, О. Е. Гичкун^{1,2}, О. М. Цирульникова^{1,2}, И. Е. Пашкова¹, В. А. Фомина²,
О. П. Шевченко^{1,2}, С. В. Готье^{1,2}

¹Национальный медицинский исследовательский центр трансплантологии и искусственных органов им. акад. В.И. Шумакова Минздрава России, Москва, 123182 Россия

²Первый Московский государственный медицинский университет им. И.М. Сеченова Минздрава России, Москва, 119991 Россия

*E-mail: kourabr@yandex.ru

Поступила в редакцию 19.05.2023

Принята к печати 28.07.2023

DOI: 10.32607/actanaturae.19425

РЕФЕРАТ Трансформирующий фактор роста $\beta 1$ (TGF- $\beta 1$) – цитокин с иммуносупрессивным и профиброгенным действием, является потенциальным маркером инфекционных заболеваний, отторжения и фиброза трансплантата печени. Уровень TGF- $\beta 1$ в крови и тканях зависит от многих факторов, однако не до конца ясно, насколько важен полиморфизм нуклеотидной последовательности самого гена. В работе определена частота распределения трех однонуклеотидных полиморфизмов (ОНП) гена *Tgfb1* – rs1800469, rs1800470, rs1800471 – у детей с терминальной стадией болезней печени. В исследование включено 225 детей-реципиентов печени в возрасте от 1 до 192 (медиана – 8) месяцев, из них 100 мальчиков и 125 девочек, а также 198 здоровых лиц в возрасте 32.7 ± 9.6 лет (78 мужчин и 120 женщин). Показанием к трансплантации печени детям была терминальная стадия болезней печени, в основном врожденных или наследственных. ОНП определяли в ДНК, выделенной из периферической крови, методом полимеразной цепной реакции в режиме реального времени с помощью зондов TaqMan. Распределение частот изученных ОНП гена *Tgfb1* соответствовало закону Харди–Вайнберга и не различалось у детей с болезнями печени и у здоровых лиц. Анализ распределения частот ОНП в соответствии с моделями взаимодействия аллельных генов не выявил различий у пациентов и здоровых лиц. Оценка неравновесия по сцеплению показала значимое сцепление между изученными ОНП. В обследованной группе найдены семь гаплотипов – вариантов сочетаний изученных полиморфизмов, три из которых представлены примерно у 80% обследованных, и их частоты не различались у пациентов и здоровых лиц. Выявлены статистически значимые различия в частотах более редких гаплотипов – А-А-С, G-G-С и G-A-G (в положении rs1800469, rs1800470, rs1800471 соответственно). Эти гаплотипы у пациентов встречались до 11 раз чаще, чем у здоровых лиц. Возможно, что наличие таких гаплотипов предрасполагает к развитию терминальной стадии болезней печени, что может влиять также на развитие осложнений после трансплантации печени детям.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА врожденные и наследственные болезни печени, атрезия и гипоплазия желчевыводящих путей, дети-реципиенты печени, трансплантация печени.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ TGF- $\beta 1$ – трансформирующий фактор роста $\beta 1$; *Tgfb1* – ген, кодирующий цитокин TGF- $\beta 1$; ОНП – однонуклеотидный полиморфизм; ОШ – отношение шансов; ПЦР – полимеразная цепная реакция; LD – Linkage Disequilibrium (неравновесие по сцеплению); АЖВП – атрезия желчевыводящих путей; ГЖВП – гипоплазия желчевыводящих путей; ДИ – доверительный интервал; HLA – human leukocyte antigen (лейкоцитарный антиген человека).

ВВЕДЕНИЕ

Трансплантация печени является единственным эффективным методом лечения детей с терминальной стадией печеночной недостаточности [1]. Несмотря на прогресс в трансплантологии и высокие показатели выживаемости таких реципиентов, период после трансплантации может сопровождаться разви-

тием таких осложнений, как инфекции, отторжение или фиброз трансплантата. Для предупреждения осложнений необходимо иметь точные методы их прогнозирования и диагностики на основе молекулярно-генетических маркеров.

Существенную роль в развитии осложнений после трансплантации органов может играть транс-

формирующий фактор роста $\beta 1$ (TGF- $\beta 1$), важный компонент иммунной системы, обладающий иммуносупрессивным и профиброгенным действием [2, 3].

Исследования ряда авторов, в том числе и наши работы, показали, что у детей-реципиентов печени уровень цитокина TGF- $\beta 1$ коррелирует с функцией трансплантата и может иметь прогностическое и диагностическое значение [4–6]. Содержание TGF- $\beta 1$ в крови и тканях реципиента может зависеть от многих факторов, в том числе быть генетически детерминированным. Учитывая, что заболевания печени у детей, приводящие к терминальной стадии, являются, главным образом, врожденными или наследственными, генетический фактор может играть определенную роль как в развитии заболевания, так и в развитии осложнений после трансплантации.

Ген *Tgfb1* содержит ряд однонуклеотидных полиморфизмов (ОНП), которые могут быть ассоциированы с различными патологиями [7–9]. Наибольший интерес исследователей в области трансплантации солидных органов вызывают три ОНП в гене *Tgfb1*: rs1800469 – замена цитозина на тимин в промоторной области, C(–509)T; rs1800470 – замена тимина на цитозин в кодоне 10 первого экзона, T(+869)C, что приводит к замене лейцина на пролин в молекуле белка; rs1800471 – замена цитозина на гуанин в кодоне 25 первого экзона, C(+915)G, приводящая к замене аргинина на пролин в белковом продукте. Полиморфизм rs1800469 находится в промоторной области и приводит к изменению связывания с факторами транскрипции, чем нарушает регуляцию транскрипции. ОНП rs1800470 и rs1800471 расположены в первом экзоне и влияют на экспрессию белка. Предполагается, что указанные ОНП могут быть причиной различий в уровне активности TGF- $\beta 1$ в тканях и могут быть ассоциированы с развитием осложнений после трансплантации [10–12]. Роль полиморфизма гена *Tgfb1* в развитии заболеваний печени у детей до настоящего времени не изучали.

Цель настоящего исследования – определение частоты встречаемости трех ОНП гена *Tgfb1* у детей раннего возраста с терминальной стадией болезни печени.

Определение роли полиморфизма генов, определяющих активность про- и противовоспалительных цитокинов, в том числе и TGF- $\beta 1$, в патогенезе различных заболеваний у реципиентов солидных органов позволит, с одной стороны, прогнозировать риск развития патологии и тяжесть ее течения, а с другой – подбирать специфическую терапию для конкретного пациента. Примером использования анализа полиморфизма в клинической практике служит типирование генов главного комплекса гистосовме-

стимости человека и подбор на основе полученных данных совместимого с реципиентом донорского органа для трансплантации. Другим примером является полиморфизм гена *CYP3A5*, кодирующего фермент системы цитохрома P450, который может приводить к нарушению синтеза функционального белка и оказывать существенное влияние на клиренс такролимуса, иммуносупрессивного препарата. Подбор суточной дозы такролимуса с учетом генотипа *CYP3A5* позволяет достичь целевой концентрации этого препарата.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Протокол настоящего исследования одобрен локальным этическим комитетом Центра трансплантологии и искусственных органов им. акад. В.И. Шумакова. Для участия в исследовании пациенты или их опекуны подписали письменное информированное согласие, которое хранится в их истории болезни.

В исследование включено 225 детей-реципиентов печени (100 мальчиков и 125 девочек) в возрасте от 1 до 192 месяцев (16 лет), медиана – 8 месяцев; и 198 здоровых лиц в возрасте 32.7 ± 9.6 лет (78 мужчин и 120 женщин). Данную выборку рассматривали как открытую российскую популяцию, поскольку этническую принадлежность участников исследования не определяли.

Этиология печеночной недостаточности у пациентов включала следующие заболевания: атрезию желчевыводящих путей (АЖВП), синдром Кароли, гипоплазию желчевыводящих путей (ГЖВП), синдром Алажилля, болезнь Байлера и другие редкие заболевания печени, в число которых вошли синдром Криглера–Найяра, синдром Гирке, дефицит альфа1-антитрипсина, тирозинемия, фульминантный и аутоиммунный гепатит, криптогенный цирроз и др. Демографические и клинические характеристики детей-реципиентов печени, включенных в исследование, представлены в *табл. 1*.

Включенным в исследование пациентам была проведена трансплантация фрагмента печени от живого родственного донора. Реципиенты получали 2- или 3-компонентную иммуносупрессивную терапию, в состав которой входили такролимус, кортикостероиды и микофенолаты. Плановое обследование и лечение пациентов проводились в соответствии с клиническими рекомендациями Российского трансплантологического общества и протоколами Центра трансплантологии и искусственных органов им. акад. В.И. Шумакова.

Геномную ДНК выделяли из периферической крови с помощью коммерческого набора QIAamp DNA Blood Mini Kit на автоматическом анализаторе QIAcube™ (Qiagen, Германия) согласно протоколам

Таблица 1. Включенные в исследование пациенты

Характеристика	Значение
Число пациентов, <i>n</i>	225
Возраст, месяцы	8 (1–192)
Пол мужской/женский, число (%)	100 (44)/125(56)
Заболевания, число случаев (%)	
АЖВП	107(48)
ГЖВП	24(11)
Синдром Кароли	11(5)
Синдром Алажилля	12(5)
Болезнь Байлера	10(4)
Другие	61(27)

Примечание: АЖВП – атрезия желчевыводящих путей, ГЖВП – гипоплазия желчевыводящих путей.

производителей. Полиморфные варианты rs1800469, rs1800470, rs1800471 гена *Tgfb1* тестировали методом полимеразной цепной реакции в режиме реального времени с помощью зондов TaqMan (Applied Biosystems, США) на амплификаторе CFX96™ (Bio-Rad, США) в соответствии с инструкцией производителя.

Статистические расчеты проводили с помощью программы Microsoft Excel. Частоты распределения генотипов исследованных ОНП, структуру гаплотипов и попарное неравновесное сцепление анализировали с помощью программы SNPstats [13]. Для подтверждения независимого распределения аллелей изучаемых полиморфизмов проверяли их соответствие закону Харди–Вайнберга. Частоту аллелей рассчитывали по следующей формуле: частота аллеля = $((2 \times \text{число гомозигот}) + \text{число гетерозигот}) / 2 \times \text{общее число индивидов}$. Частоты генотипов или отдельных аллелей в различных группах сравнивали, используя критерий χ^2 Пирсона. Для количественного представления силы влияния возможного генотипа на признак рассчитывались отношения шансов (ОШ) и их 95% доверительные интервалы (ДИ). Для оценки неравновесия по сцеплению рассчитывали *D*-статистику и коэффициент корреляции *r*. Критическое значение уровня значимости принимали равным 0.05.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Проведено генотипирование трех полиморфных вариантов гена *Tgfb1* (rs1800469, rs1800470 и rs1800471) в ДНК включенных в исследование пациентов, рассчитаны частоты встречаемости различных генотипов и аллелей. На рис. 1 представлено распределение генотипов и аллелей у детей с болезнями печени и здоровых лиц.

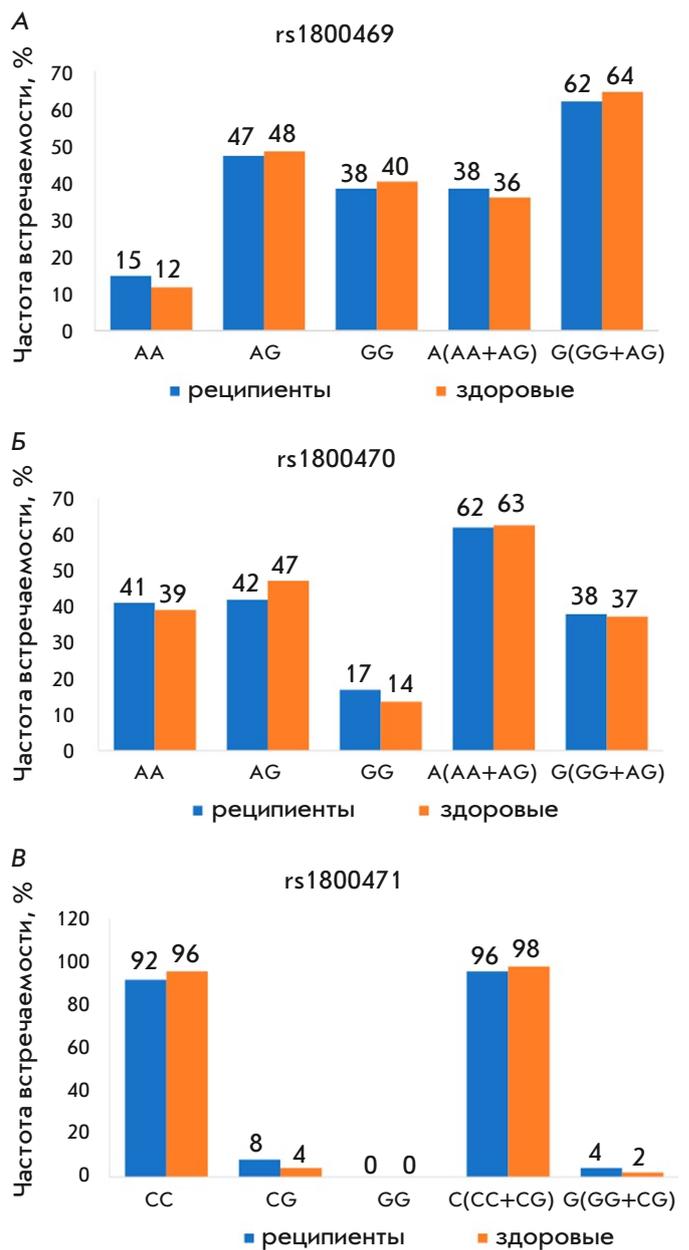


Рис. 1. Частоты встречаемости генотипов и аллелей ОНП гена *Tgfb1* – rs1800469 (А), rs1800470 (Б) и rs1800471 (В), у детей с болезнями печени и здоровых лиц

Сравнительный анализ частот встречаемости изученных генотипов и аллелей у детей с болезнями печени и здоровых лиц не выявил статистически значимых различий.

Не обнаружено также связанных с половой принадлежностью статистически значимых различий в распределении изученных ОНП у пациентов и здоровых лиц. В то же время наблюдались зна-

Таблица 2. Соответствие распределения однонуклеотидных полиморфизмов гена *Tgfb1* у детей с болезнями печени и здоровых лиц закону Харди–Вайнберга

Группа	rs1800469		rs1800470		rs1800471	
	χ^2	<i>p</i>	χ^2	<i>p</i>	χ^2	<i>p</i>
Здоровые лица	0.4779	0.54	0.0166	0.898	0.0842	0.772
Пациенты	0.0013	0.971	2.6579	0.120	0.3925	0.531

Примечание: $p < 0.05$ – не соответствует закону Харди–Вайнберга.

Таблица 3. Сравнение распределения однонуклеотидных полиморфизмов гена *Tgfb1* у детей с болезнями печени и здоровых лиц в разных моделях

Модель	Генотип	Частоты, реципиенты	Частоты, здоровые	ОШ (95% ДИ)	Значение <i>p</i>
rs1800469					
Кодоминантная	G/G	85 (38%)	74 (39.8%)	1.00	0.71
	A/G	106 (47.3%)	90 (48.4%)	1.02 (0.67–1.55)	
	A/A	33 (14.7%)	22 (11.8%)	1.29 (0.69–2.41)	
Доминантная	G/G	85 (38%)	74 (39.8%)	1.00	0.73
	A/G–A/A	139 (62%)	112 (60.2%)	1.07 (0.72–1.60)	
Рецессивная	G/G–A/G	191 (85.3%)	164 (88.2%)	1.00	0.41
	A/A	33 (14.7%)	22 (11.8%)	1.27 (0.71–2.28)	
Сверхдоминантная	G/G–A/A	118 (52.7%)	96 (51.6%)	1.00	0.83
	A/G	106 (47.3%)	90 (48.4%)	0.96 (0.65–1.41)	
rs1800470					
Кодоминантная	A/A	91 (40.8%)	74 (39.8%)	1.00	0.49
	A/G	94 (42.1%)	87 (46.8%)	0.87 (0.57–1.33)	
	G/G	38 (17%)	25 (13.4%)	1.23 (0.68–2.22)	
Доминантная	A/A	91 (40.8%)	74 (39.8%)	1.00	0.81
	A/G–G/G	132 (59.2%)	112 (60.2%)	0.95 (0.64–1.42)	
Рецессивная	A/A–A/G	185 (83%)	161 (86.6%)	1.00	0.32
	G/G	38 (17%)	25 (13.4%)	1.32 (0.76–2.28)	
Сверхдоминантная	A/A–G/G	129 (57.9%)	99 (53.2%)	1.00	0.33
	A/G	94 (42.1%)	87 (46.8%)	0.82 (0.56–1.22)	
rs1800471					
Кодоминантная	C/C	205 (91.9%)	180 (96.3%)	1.00	0.063
	C/G	18 (8.1%)	7 (3.7%)	2.26 (0.92–5.53)	

чимые различия в частоте редкого генотипа C/G rs1800471 между пациентами-девочками и здоровыми женщинами: у девочек этот генотип встречался в 3.96 раза чаще, чем у здоровых женщин – ОШ = 3.96, 95% ДИ 1.09–14.43, $p = 0.01$.

Распределение частот изученных генотипов всех трех полиморфных вариантов соответствовало закону Харди–Вайнберга как в группе пациентов, так и в группе здоровых лиц (табл. 2).

С использованием разных моделей взаимодействия аллелей генов (кодоминантной, доминант-

ной, рецессивной и сверхдоминантной) проведен сравнительный анализ распределения частот генотипов и аллелей трех ОНП гена *Tgfb1* у здоровых лиц и детей-реципиентов печени. В каждой модели рассчитано отношение шансов и величина ошибки при сравнении детей с заболеваниями печени и здоровых лиц (табл. 3).

Не выявлено значимых различий в распределении частот изученных генетических вариантов гена *Tgfb1* у пациентов и здоровых лиц при использовании разных моделей взаимодействия аллельных

Таблица 4. Статистическая оценка неравновесия по сцеплению пар полиморфных вариантов гена *Tgfb1*

Пары ОНП	<i>D</i>	<i>D'</i>	<i>r</i>	Значение <i>p</i>
rs1800469–rs1800470	0.1447	0.6259	0.6184	0
rs1800469–rs1800471	-0.0113	0.9934	-0.136	0.0001
rs1800470–rs1800471	0.0089	0.4628	0.1062	0.0021

генов. Отсутствовали также значимые различия в распределении генотипов, связанные с половой принадлежностью.

В связи с тем, что изучаемые локусы расположены на одной хромосоме, может наблюдаться неравновесие по сцеплению (Linkage Disequilibrium, LD), т.е. совместное наследование локусов и формирование гаплотипов. В *табл. 4* представлены результаты статистической оценки попарного сцепления изученных вариантов гена *Tgfb1* в виде *D*, *D'* и *r*-статистик, а также величины ошибки.

Выявлено статистически значимое сцепление между всеми изученными вариантами и показано, что наибольшее сцепление наблюдается в первой паре локусов rs1800469–rs1800470 и значительно меньшее в двух других парах.

В обследованных группах пациентов и здоровых лиц обнаружены семь сочетаний изученных ОНП. В *табл. 5* представлены выявленные гаплотипы, расположенные в порядке снижения частоты встречаемости, сами частоты различных групп, ОШ между здоровыми и пациентами, а также величина ошибки для ОШ.

Из *табл. 5* видно, что наиболее представлено сочетание аллелей G-A-C (около 50% случаев у пациентов и 60% – у здоровых лиц), распределение которого не различается значимо в этих группах.

Второй по встречаемости гаплотип, A-G-C, представлен примерно у 30% обследованных, его частота также не различалась у пациентов и здоровых лиц, как не различались и частоты пятого по распространенности гаплотипа G-G-G – около 2% случаев в обеих группах. В целом, около 80% обследованных имели три из семи вариантов гаплотипов, частоты которых не различались у реципиентов и здоровых лиц.

Выявлены статистически значимые различия в частотах более редких гаплотипов, более представленных у пациентов, чем у здоровых лиц. Гаплотип № 3 (A-A-C) в 3.12 раза чаще встречался в группе пациентов ($p = 0.0002$), гаплотип № 4 (G-G-C) – в 2.88 раза ($p = 0.0008$), а гаплотип №6 (G-A-G) – в 11.18 раза ($p = 0.025$). В целом, более редкие гаплотипы – № 3, 4 и 6 найдены у 26.84% пациентов и 7.71% здоровых лиц. Самый редкий гаплотип A-G-G (№ 7) практически отсутствовал у здоровых лиц, а у пациентов его частота была менее 1%, что не позволяет проводить сравнение.

ОБСУЖДЕНИЕ

Развитие методов неинвазивной диагностики посттрансплантационных осложнений актуально для детей-реципиентов печени в связи с высоким риском инвазивных вмешательств. Генная диагностика обладает важными преимуществами перед другими методами анализа, такими, как независимость от физиологического состояния, неизменность и однократность выполнения теста. Результаты генетических анализов могут дать информацию о предрасположенностях пациента и позволить проводить персонализированную терапию, подбирая лекарственные препараты в соответствии с индивидуальными особенностями организма пациента.

В настоящей работе проанализированы частоты встречаемости трех наиболее изученных ОНП гена

Таблица 5. Частоты встречаемости гаплотипов гена *Tgfb1* у детей с болезнями печени и у здоровых лиц

№	Нуклеотид			Частоты встречаемости			Отношение шансов (95% ДИ)	Значение <i>p</i>
	rs1800469	rs1800470	rs1800471	всего	пациенты	здоровые		
1	G	A	C	0.5236	0.4680	0.5864	1.00	
2	A	G	C	0.2841	0.2410	0.3190	1.05 (0.75–1.47)	0.76
3	A	A	C	0.0862	0.1340	0.0374	3.12 (1.72–5.67)	0.0002*
4	G	G	C	0.0754	0.1170	0.0371	2.88 (1.56–5.32)	0.0008*
5	G	G	G	0.0180	0.0154	0.0176	1.54 (0.51–4.65)	0.44
6	G	A	G	0.0127	0.0174	0.0026	11.18 (1.37–91.18)	0.025*
7	A	G	G	0.0038	0.0073	0	-	-

* $p < 0.05$.

Tgfb1 у детей с терминальной стадией заболеваний печени и у здоровых лиц в открытой российской популяции. Показано, что распределение этих ОНП гена *Tgfb1* не различалось у пациентов и здоровых людей и соответствовало равновесию Харди–Вайнберга.

Полученные нами данные не выявили связи отдельных ОНП гена *Tgfb1* с болезнями печени у детей. Нами не найдено публикаций, в которых изучали генетический полиморфизм гена *Tgfb1* у детей раннего возраста с врожденными и наследственными заболеваниями печени в российской или в других популяциях. Роль ОНП гена *Tgfb1* в развитии различных патологий печени изучали у взрослых пациентов, но результаты этих исследований не всегда однозначны [7–12]. С одной стороны, есть данные об ассоциации указанных ОНП с развитием отторжения и хронической дисфункции трансплантата [10–12]. В других же исследованиях не удавалось выявить связь полиморфизма гена *Tgfb1* с отторжением трансплантата или фиброзом донорской печени у взрослых пациентов [14–16].

Частоты встречаемости ОНП rs1800469, rs1800470 и rs1800471 у здоровых лиц, определенные в нашей работе, согласуются с данными других российских авторов [17, 18]. Сравнение распределения частот аллелей, изученных в нашей работе, с данными, депонированными в базу биотехнологической информации США (NCBI), также не выявило значимых отличий от частот аллелей гена *Tgfb1* в европейской популяции: rs1800469 – А(37%)/G(63%); rs1800470 – А(56%)/G(44%); rs1800471 – С(94%)/G(6%).

Цитокин TGF-β1 является жизненно необходимым белком, который участвует в регуляции ряда ключевых процессов в клетке, поэтому значительные нарушения его функций могут быть несовместимыми с жизнью [19]. Возможно, что одиночные однонуклеотидные замены могут практически не влиять на функцию белка, тогда как сочетание нескольких замен может иметь заметный эффект. Поэтому анализ гаплотипов из нескольких ОНП может быть более информативным, чем одиночных однонуклеотидных замен.

В обследованной нами группе пациентов и здоровых лиц выявлено неравновесие по сцеплению ОНП rs1800469, rs1800470 и rs1800471, которые формируют семь вариантов гаплотипов. Встречаемость трех наиболее частых гаплотипов практически не различалась у пациентов и здоровых лиц. Изучение аналогичных гаплотипов гена *Tgfb1*, проведенное другими авторами, показало сходную с нашими результатами частоту встречаемости наиболее распространенного гаплотипа G-A-C у здоровых лиц, которая составляла около 50–60% [17, 20].

Более редкие гаплотипы, обнаруженные в нашем исследовании, встречались у пациентов с терминальной стадией болезней печени достоверно чаще, чем у здоровых лиц, что позволяет предполагать участие таких гаплотипов в формировании предрасположенности к развитию болезней печени. Значительная часть заболеваний у обследованных детей являются врожденными или наследственными, а генетическая природа многих из них до конца не изучена, поэтому поиск ассоциированных с заболеванием гаплотипов может иметь научно-практическое значение при трансплантации. Возможно, что выявленные гаплотипы могут не только предрасполагать к развитию болезней печени у детей, но и определенным образом влиять на развитие осложнений после трансплантации печени. Однако для однозначного определения причинно-следственной связи необходимы дополнительные исследования.

Дизайн настоящего исследования основан на методе «случай–контроль», что накладывает определенные ограничения на предположение о причинно-следственных связях выявленных ассоциаций. Следует отметить, что однозначно определить гаплотип по генотипу методом ПЦР не всегда возможно. Точно определить гаплотип позволяет только секвенирование.

Ограниченность вывода статьи о возможной связи исследованных гаплотипов с предрасположенностью к развитию терминальной стадии болезней печени обусловлена также тем, что некоторые патологические состояния могут находиться под влиянием множества генетических факторов/полиморфизмов, каждый из которых вносит лишь небольшой вклад в общий риск развития патологического состояния и значение которых сложно оценить при анализе небольших групп пациентов. Например, функциональная активность TGF-β1 может определяться не только полиморфизмом самого гена, но и генетическими вариантами других факторов, включенных в клеточные пути цитокина, таких, как связывающие белки и его рецепторы. Показано, что у пациентов после трансплантации печени риск развития гепатита С связан с частотой встречаемости однонуклеотидного полиморфизма rs868, который находится в некодирующей 3'-UTR области гена рецептора TGF-β1 (*Tgfb1*) [21]. Кроме того, клиническую значимость может иметь взаимодействие различных генов. Так, у пациентов с таким многофакторным аутоиммунным заболеванием, как сахарный диабет первого типа, при котором важное значение могут иметь полиморфизмы генов главного комплекса гистосовместимости человека, обнаружена взаимосвязь генов *HLA* и генов различных цитокинов, в том

числе и TGF- β 1 [22]. Показано, что у пациентов с диабетом первого типа некоторые сочетания полиморфных вариантов генов цитокинов TNF- α , IFN- γ , IL-6 и TGF- β 1 встречались значимо реже, чем в контроле, что позволило предположить протективное значение таких гаплотипов [22]. Обнаружено также неравновесное сцепление варианта TNF- α , характерного для протективного гаплотипа, с двумя полиморфными вариантами HLA.

Предрасположенность к различным полигенным заболеваниям может также зависеть от этнической принадлежности индивида, что указывает на необходимость проведения исследований в этнически гомогенных группах. Однако мы не определяли этническую принадлежность включенных в наше исследование лиц, поэтому полученные результаты можно отнести к открытой российской популяции.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Уровень многофункционального цитокина TGF- β 1 является потенциальным биомаркером инфекционного заболевания, отторжения и фиброза транс-

плантата. В настоящей работе исследовано распределение трех наиболее значимых полиморфизмов гена *Tgfb1* – rs1800469, rs1800470 и rs1800471, у детей с врожденными и наследственными заболеваниями печени. Показано, что встречаемость каждого отдельного полиморфизма не отличается значимо от встречаемости у здоровых индивидов и соответствует равновесию Харди–Вайнберга.

Однако частота гаплотипов трех изученных полиморфизмов *Tgfb1* статистически значимо различается у пациентов и здоровых лиц. В исследованной группе выявлены семь различных гаплотипов, три из которых встречались от 3 до 11 раз чаще у детей-реципиентов, чем у здоровых лиц. Возможно, что эти гаплотипы – A-A-C, G-G-C и G-A-G, соответствующие rs1800469, rs1800470 и rs1800471, связаны с предрасположенностью к развитию терминальной стадии заболеваний печени у детей. Для понимания роли таких гаплотипов в развитии посттрансплантационных осложнений необходимы дополнительные исследования. ●

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Готье С.В. // Вестн. трансплант. искус. органов. 2017. Т. 19. № 3. С. 10–32.
2. Dudek K., Koziak K., Placha G., Kornaiewicz O., Zieniewicz K., Zurakowski J., Krawczyk M. // *Transplant. Proc.* 2009. V. 41. № 1. P. 240–245.
3. Zhang Y., Wang Y.L., Liu Y.W., Li Q., Yuan Y.H., Niu W.Y., Sun L.Y., Zhu Z.J., Shen Z.Y., Han R.F. // *Transplant. Proc.* 2009. V. 41. № 5. P. 1767–1769.
4. Briem-Richter A., Leuschner A., Krieger T., Grabhorn E., Fischer L., Nashan B., Haag F., Ganschow R. // *Pediatr. Transplant.* 2013. V. 17. № 8. P. 757–764.
5. Hussein M.H., Hashimoto T., Abdel-Hamid Daoud G., Kato T., Hibi M., Tomishige H., Hara F., Suzuki T., Nakajima Y., Goto T., et al. // *Pediatr. Surgery Int.* 2011. V. 27. № 3. P. 263–268.
6. Курабекова Р.М., Цирульникова О.М., Гичкун О.Е., Пашкова И.Е., Олефиренко Г.А., Шевченко О.П. // Вестн. трансплант. искус. органов. 2018. Т. 20. № 4. С. 38–43.
7. Dhaouadi T., Sfar I., Bardi R., Jendoubi-Ayed S., Abdallah T.B., Ayed K., Gorgi Y. // *Transplant. Proc.* 2013. V. 45. № 6. P. 2152–2157.
8. Kim Y.H., Kim T.H., Kang S.W., Kim H.J., Park S.J., Jeong K.H., Kim S.K., Lee S.H., Ihm C.G., Lee T.W., et al. // *Immunol. Invest.* 2013. V. 42. № 4. P. 285–295.
9. Paladino N., Flores A.C., Fainboim H., Schroder T., Cuarterolo M., Lezama C., Ballerga E.G., Levi D., Tanno H., Costanzo G., et al. // *Clin. Immunol.* 2010. V. 134. № 3. P. 305–312.
10. Zhang X.X., Bian R.J., Wang J., Zhang Q.Y. // *Genet. Mol. Res.* 2016. V. 15. № 2. P. 15027599.
11. Arrieta-Bolanos E., Mayor N.P., Marsh S.G., Madrigal J.A., Apperley J.F., Kirkland K., Mackinnon S., Marks D.I., McQuaker G., Perry J., et al. // *Haematologica.* 2016. V. 101. № 3. P. 382–390.
12. Benza R.L., Coffey C.S., Pekarek D.M., Barchue J.P., Tallaj J.A., Passineau M.J., Grenett H.E. // *J. Heart Lung Transplant.* 2009. V. 28. № 10. P. 1057–1062.
13. Solé X., Guinó E., Valls J., Iniesta R., Moreno V. // *Bioinformatics.* 2006. V. 22. № 15. P. 1928–1929.
14. Liu K., Liu X., Gu S., Sun Q., Wang Y., Meng J., Xu Z. // *Oncotarget.* 2017. V. 8. № 37. P. 62463–62469.
15. Eurich D., Bahra M., Boas-Knoop S., Lock J.F., Golembus J., Neuhaus R., Neuhaus P., Neumann U.P. // *Liver Transplant.* 2011. V. 17. № 3. P. 279–288.
16. Ferrarese A., Sartori G., Orrù G., Frigo A.C., Pelizzaro F., Burra P., Senzolo M. // *Transplant. Int.* 2021. V. 34. № 3. P. 398–411.
17. Барсова Р., Титов Б., Матвеева Н., Фаворов А., Рыбалкин И., Власик Т., Тарарак Э., Сухинина Т., Шахнович Р., Руда М. // *Acta Naturae.* 2012. Т. 4. № 2. С. 76–82.
18. Разводовская А.В., Черкашина И.И., Никулина С.Ю., Шестовицкий В.А., Воевода М.И., Максимов В.Н., Аверьянов А.Б. // Бюл. физиол. патол. дыхания. 2014. № 54. С. 23–29.
19. Li M.O., Wan Y.Y., Sanjabi S., Robertson A.K., Flavell R.A. // *Annu. Rev. Immunol.* 2006. V. 24. P. 99–146.
20. Iriyoda T.M.V., Flauzino T., Costa N.T., Lozovoy M.A.B., Reiche E.M.V., Simão A.N.C. // *Clin. Exp. Med.* 2022. V. 22. № 1. P. 37–45.
21. Sajjad E.A., Radkowski M., Perkowska-Ptasińska A., Pacholczyk M., Durlik M., Fedorowicz M., Pietrzak R., Ziarkiewicz-Wróblewska B., Włodarski P., Malejczyk J. // *Annals of Transplantation.* 2017. V. 22. P. 638–645.
22. Kumar R., Goswami R., Agarwal S., Israni N., Singh S.K., Rani R. // *Tissue Antigens.* 2007. V. 69. № 6. P. 557–567.

УДК 578.821

Влияние делеции гена *ati* на патогенные и иммуногенные свойства вируса осповакцины

С. Н. Якубицкий, А. А. Сергеев, К. А. Титова, И. С. Шульгина, Е. В. Старостина,
М. Б. Боргоякова, Л. И. Карпенко, С. Н. Щелкунов*

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

*E-mail: snshchel@rambler.ru

Поступила в редакцию 14.04.2023

Принята к печати 13.07.2023

DOI: 10.32607/actanaturae.17872

РЕФЕРАТ Среди невирионных белков вируса осповакцины (VACV) наиболее представлен поздний белок 94 кДа – укороченная форма белка внутриклеточных телец включения типа А (A-type inclusion, ATI) вируса оспы коров, который имеет размер 150 кДа и кодируется геном *ati*. Этот белок VACV не формирует внутриклеточные ATI, будучи при этом мажорным иммуногеном при инфекции/иммунизации VACV человека или животных, а антитела к этому белку не являются вируснейтрализующими. В представленной работе изучено влияние продукции неструктурного мажорного иммуногенного белка VACV на проявления патогенности и иммуногенности вируса при модельной инфекции мышей линии BALB/c. Для направленного введения делеции в геном VACV LIVP создана рекомбинантная плаزمиды интеграции/делеции $r\Delta ati$ и с ее помощью рекомбинантный вирус LIVP Δati . Патогенность штаммов VACV LIVP и LIVP Δati изучали на 3-недельных мышках. Интраназальное заражение мышак вирусами в дозе 10^7 БОЕ приводило к гибели 50% животных, инфицированных исходным штаммом LIVP, тогда как после заражения штаммом LIVP Δati погибло лишь 20% мышак. Внутрнкожная иммунизация 6–7-недельных мышак вирусом LIVP Δati приводила к достоверному увеличению продукции VACV-специфических IgG по сравнению с внутрнкожной вакцинацией VACV LIVP. При этом не выявлено различий в клеточном иммунном ответе на вакцинацию мышак VACV LIVP или LIVP Δati , оцениваемом методом ELISpot по числу спленоцитов, продуцирующих IFN- γ в ответ на стимуляцию вирус-специфическими пептидами. Интраназальное заражение мышак летальными дозами вируса оспы коров или вируса экстромелии на 60-й день после иммунизации изучаемыми вариантами VACV показало, что мутантный LIVP Δati обуславливает более выраженный протективный эффект по сравнению с родителским LIVP.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА ортопоксвирусы, вирус осповакцины, ген *ati*, внутрнкожная инъекция, иммуногенность, протективность.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ CPXV – вирус оспы коров; ECTV – вирус экстромелии; VACV – вирус осповакцины; БОЕ – бляшкообразующая единица; в/к – внутрнкожно; дни – день после иммунизации; и/н – интраназально.

ВВЕДЕНИЕ

Вирус осповакцины (*Vaccinia virus*, VACV) входит в состав рода *Orthopoxvirus* (семейство *Poxviridae*), который объединяет также такие виды, как вирус натуральной оспы (*Variola virus*, VARV), вирус оспы обезьян (*Monkeypox virus*, MPXV), вирус оспы коров (*Cowpox virus*, CPXV), вирус оспы верблюдов (*Camelpox virus*, CMLV) и некоторые другие [1, 2]. Ортопоксвирусы являются крупнейшими ДНК-содержащими вирусами млекопитающих, весь цикл развития которых проходит в цитоплазме инфицированных клеток.

Представители этого рода по структуре вирионов морфологически неразличимы и антигенно близки друг другу, поэтому заражение одним видом ортопоксвирусов обеспечивает иммунную защиту от других представителей данного рода [3]. Именно поэтому использование живой вакцины на основе разных штаммов VACV позволило искоренить оспу [1, 4].

VACV, как и другие виды ортопоксвирусов, существует в двух инфекционных формах. Подавляющее большинство вирусного потомства составляют вну-

триклеточные зрелые вирионы (IMV), гораздо меньшую часть – внеклеточные, покрытые дополнительной оболочкой вирионы (EEV) [5, 6].

Еще в ранних работах по изучению иммунного ответа на внутрикожную (в/к) инфекцию кроликов вирусом VACV был обнаружен так называемый LS-антиген (единный белок, состоящий из термолабильного (L) и термостабильного (S) антигенных компонентов), против которого активно продуцировались антитела [7]. Высокоиммуногенный LS-антиген, который не относится к вирионным белкам и синтезируется в большом количестве, выделяют из экстрактов инфицированных тканей животных. Антитела, полученные после иммунизации животных LS-антигеном, не обладают вируснейтрализующей активностью, но реагируют в тестах связывания комплемента и иммунопреципитации в геле с клиническими образцами от больных оспой и оспой обезьян [2].

В дальнейшем показали, что LS-антиген VACV размером 94 кДа – это укороченная форма белка, формирующего у CPXV внутриклеточные тельца типа А (A-type inclusion bodies, ATI). Белок ATI CPXV имеет размер 150 кДа [8], накапливается в инфицированных клетках в большом количестве на позднем этапе цикла репликации вируса (до 4% суммарного клеточного белка) и агрегирует с образованием в цитоплазме клеток гелеподобных тел, в которые могут включаться зрелые вирионы [9, 10]. Укороченные на С-конце формы этого белка размером от 92 до 96 кДа в большом количестве синтезируются в VARV, MPXV, CMLV и VACV, не образуя ATI (рис. 1).

Показано, что при иммунизации лабораторных животных или добровольцев VACV формируются антитела на широкий спектр вирионных белков, а также на высокоиммуногенный невирионный ATI-подобный белок [11]. Т-клеточный иммунный ответ на инфекцию VACV индуцируется в основном против ранних невирионных белков [6]. Исключение составляет укороченная форма белка ATI, синтезируемая на позднем этапе цикла репликации вируса, на которую, тем не менее, формируется выраженный Т-клеточный иммунный ответ [12]. По-видимому, это обусловлено тем, что укороченный ген *ati* (A29L в случае VACV-LIVP, см. рис. 1) является одним из наиболее интенсивно экспрессируемых генов VACV, а кодируемый им белок продуцируется в наибольшем количестве среди невирионных белков [9].

Ген *ati* не входит в число генов, жизненно важных для VACV, так как обнаружены природные варианты этого вируса, у которых данный ген делегирован [13, 14]. На примере CPXV показано также,

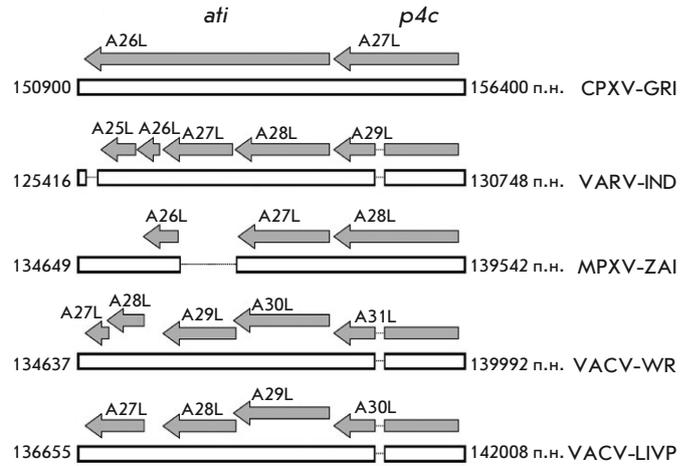


Рис. 1. Сравнение ортопоксвирусных потенциальных открытых рамок считывания (OPT), входящих в состав генов *ati* (OPT A26L) и *p4c* (A27L) CPXV-GRI. Серыми стрелками обозначены размер и направление соответствующих OPT, названия которых приведены над этими стрелками для вирусов CPXV-GRI, VARV-IND, MPXV-ZAI, VACV-WR [2] и VACV-LIVP. Цифрами справа и слева от белых блоков указаны позиции соответствующей области генома вируса. Тонкими линиями обозначены делеции в геномах вирусов относительно последовательности ДНК CPXV-GRI. Укороченная форма белка ATI кодируется OPT A29L VACV-LIVP и соответствующими OPT других вирусов

что делеция гена *ati* не влияет на способность вируса размножаться как *in vitro*, так и *in vivo* [15, 16]. Однако до сих пор не изучено влияние делеции гена *ati* на иммуногенные свойства VACV.

В данной работе изучено влияние делеции гена *ati*, кодирующего мажорный иммуногенный белок VACV, антитела к которому не обладают вируснейтрализующей активностью, на патогенные и иммуногенные свойства вируса.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Бактерии, вирусы и культура клеток

В работе использовали штамм *Escherichia coli* XL2-Blue, клон 14 штамма LIVP VACV, полученный нами ранее методом предельного разведения через бляшку из-под агарозного покрытия [17], а также вирус оспы коров (CPXV) штамм GRI-90 и вирус эктромелии (ECTV) штамм K-1, полученные из коллекции вирусов. Перевиваемая культура клеток почки африканской зеленой мартишки CV-1 получена из коллекции клеточных культур ФБУН ГНЦ ВВ «Вектор» Роспотребнадзора. Вирусы выращивали и титровали на монослойной культуре клеток CV-1 согласно [18].

Животные

В исследованиях использовали инбредных мышей линии BALB/c, полученных из питомника Института цитологии и генетики Сибирского отделения РАН (Новосибирск). Подопытных животных содержали на стандартном рационе с достаточным количеством воды согласно ветеринарному законодательству и в соответствии с требованиями по гуманному содержанию и использованию животных в экспериментальных исследованиях (ГОСТ 33216-2014 «Руководство по содержанию и уходу за лабораторными животными. Правила содержания и ухода за лабораторными грызунами и кроликами»). Исследования и манипуляции на животных проведены с одобрения комитета по биоэтике ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора (Протокол № 02-06.2022 от 28.06.2022 г.).

Оценка патогенности штаммов VACV

В исследованиях по изучению патогенности VACV LIVP и LIVPΔati при интраназальном (и/н) заражении использовали 3-недельных мышей линии BALB/c (по 10 животных в группе). Мышам после ингаляционного наркоза диэтиловым эфиром вводили в полость носа вирусосодержащую жидкость (50 мкл, 10^7 бляшкообразующих единиц (БОЕ)) либо физиологический раствор. За животными наблюдали в течение 22 дней и регистрировали клинические проявления инфекции и гибель.

Использовали балльную оценку выявляемых симптомов заболевания: 0 – нет признаков заболевания, 1 – легкая взъерошенность шерсти, 2 – сильная взъерошенность шерсти, 3 – сильная взъерошенность шерсти, а также сутулая поза или конъюнктивит, 4 – затрудненное дыхание или отсутствие движения, 5 – гибель.

Мышей взвешивали по отдельности каждые 2 дня. Средние арифметические значения массы тела мышей в каждой группе на временную точку рассчитывали и выражали в процентах от начального веса.

Иммунизация мышей и взятие образцов на анализы

Мышей линии BALB/c в возрасте 6–7 недель иммунизировали штаммами LIVP и LIVPΔati VACV: внутрикожная (в/к) инъекция в дорсальную сторону хвоста (около 1 см от основания) как описано ранее [19], используя дозу вируса 10^5 БОЕ/20 мкл/мышь. В качестве отрицательного контроля использовали мышей, которым вводили физиологический раствор.

На 7, 14, 21, 28, 42 и 56 день после иммунизации (дни) анализировали гуморальный иммунный ответ у мышей. В каждой временной точке, указанной

выше, в анализ брали по 6 мышей в группе. Кровь у мышей прижизненно забирали из ретроорбитального венозного синуса с помощью иглы 23G. Забор крови из ретроорбитального синуса не приводит к повреждению органа зрения. Взятие пробы крови является кратковременной, но болезненной процедурой, однако обезболивание не проводили, поскольку показано, что применение известных методов обезболивания или наркоза может влиять на иммунологические показатели крови животных.

Из индивидуальных образцов крови животных получали сыворотку путем осаждения форменных элементов с помощью центрифугирования с относительной центробежной силой 1000 *g* в течение 10 мин. Сыворотки выдерживали при температуре 56°C в течение 30 мин и хранили при температуре минус 20°C.

На 7, 14 и 21 дни после взятия крови мышей умервляли методом цервикальной дислокации, селезенки стерильно извлекали у каждой из 6 мышей изучаемых групп.

Выделение спленоцитов

Спленоциты выделяли путем продавливания каждой селезенки через клеточный фильтр (BD Falcon™, США) с использованием поршня шприца. После удаления эритроцитов с помощью буфера ACK для лизиса эритроцитов (Thermo Fisher Scientific, США), спленоциты промывали и ресуспендировали в питательной среде RPMI-1640 с добавлением 10% эмбриональной телячьей сыворотки и гентамицина (50 мкг/мл).

Определение количества продуцирующих IFN-γ клеток с использованием метода ELISpot

Интенсивность Т-клеточного иммунного ответа у иммунизированных мышей определяли по числу спленоцитов, продуцирующих IFN-γ, с помощью метода IFN-γ ELISpot. Анализ проводили с использованием наборов фирмы MABTECH (Швеция) согласно инструкции производителя. Для стимуляции клеток использовали смесь VACV-специфичных иммунодоминантных для мышей BALB/c пептидов SPYAAGYDL, SPGAAGYDL, VGPSNSPTF, KYGRFLNEI, GFIRSLQTI, KYMWCYSQV (по 20 мкг/мл каждого пептида) [20, 21]. Количество IFN-γ-продуцирующих клеток подсчитывали с помощью ELISpot-ридера фирмы Carl Zeiss (Германия).

Иммуноферментный анализ сывороток крови мышей

Иммуноферментный анализ (ИФА) сывороток крови мышей выполняли согласно [18]. В качестве антигена использовали очищенный центрифугированный

ем через сахарозную подушку препарат вирионов штамма LIVP VACV. Все исследуемые образцы сыворотки крови мышей титровали серией двукратных последовательных разбавлений с разведения 1:100 до разведения 1:12800. Повтор титрования проведен в постановке ИФА на следующий день. Для определения титров IgM и IgG использовали растворы с пероксидазными конъюгатами анти-IgM мыши и анти-IgG мыши (Sigma, США) соответственно. Титры IgM и IgG определяли в каждом образце сыворотки крови (отдельно в каждом повторе, а затем усредняли). Вычисляли средние геометрические значения логарифмов обратного титра VACV-специфических IgG или IgM по экспериментальным группам, рассчитывали доверительные интервалы для уровня 95% вероятности совпадения каждой выборки с генеральной совокупностью.

Оценка уровня протективности у иммунизированных мышей

На 60-й дни группы иммунизированных VACV LIVP или LIVP Δ ati и контрольных животных и/н заражали CPXV GRI-90 в дозе 2.0×10^6 БОЕ/50 мкл/мышь (6 животных в каждой группе) или ECTV K-1 в дозе 2.2×10^3 БОЕ/50 мкл/мышь (6 животных в каждой группе). За животными наблюдали в течение 14 дней и регистрировали у них клинические проявления инфекции и гибель. Каждую мышь взвешивали каждые 2 дня. Средние арифметические значения массы тела мышей каждой группы на временную точку рассчитывали и выражали в процентах от начального веса.

Получали данные для групп животных, в/к иммунизированных VACV LIVP или LIVP Δ ati, а также групп не иммунизированных мышей и не инфицированных (отрицательный контроль) или зараженных CPXV GRI-90 или ECTV K-1 (положительный контроль).

Статистический анализ данных

Статистическую обработку и сравнение результатов проводили стандартными методами, используя пакет компьютерных программ Statistica 13.0 (StatSoft Inc. 1984-2001). Значение *P* менее 0.05 считали статистически значимым.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Создание вируса LIVP Δ ati

Направленное введение делеции в геном VACV LIVP (GenBank: KX781953.1) проводили в соответствии со схемой, приведенной на рис. 2. На первом этапе конструирования рекомбинантной плазмиды интеграции/делеции р Δ ati с использованием ком-

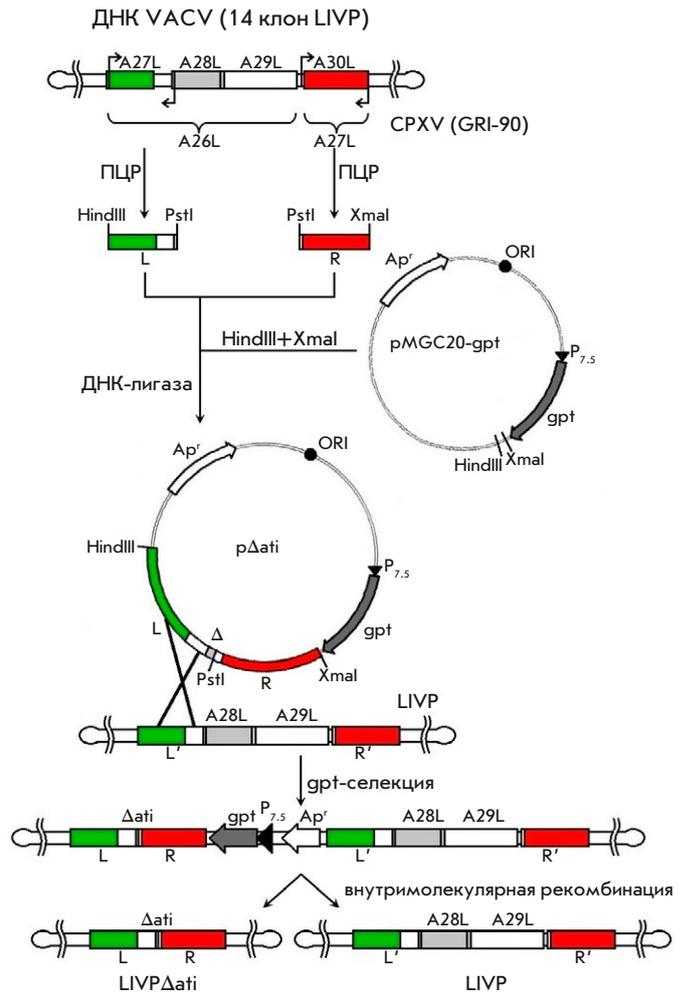


Рис. 2. Схема конструирования плазмиды р Δ ati и VACV LIVP Δ ati (см. объяснения в тексте). L и R – левая и правая фланкирующие ген *attI* области вирусного генома

пьютерной программы Oligo (версия 3.3) (Borland International, США) рассчитали и синтезировали олигонуклеотидные праймеры для проведения ПЦР и амплификации последовательностей ДНК VACV LIVP, фланкирующих слева и справа делетируемый участок вирусного генома (ОПТ A28L–A29L, положение на геноме 137618–140470 п.н.) (рис. 1, 2).

Левый фланкирующий фрагмент (L) получали с использованием пары праймеров 5'-AAGCTTGTT-TGGTAGTAGATACATATCAATATCATC-3' (HindIII) и 5'-CTGCAGGCTGACTCAATTGCATGAAGAT-3' (PstI), правый фланкирующий фрагмент (R) – праймеров 5'-CTGCAGGGGTAATTATAAGATCGTAGATCTCC-3' (PstI) и 5'-CCCGGGATGGCGAACAT-TATAAATTTATGG-3' (XmaI), а также полимеразу с редактирующими свойствами Platinum Taq DNA High Fidelity Polymerase (Invitrogen, США), а в качестве ДНК-матрицы использовали ДНК клона 14

штамма LIVP VACV. Полученные целевые фрагменты L и R очищали, используя QIAquick Gel Extraction Kit (QIAGEN, Нидерланды), встраивали в векторный HindIII–XmaI-фрагмент pMGC20-gpt (рис. 2) и клонировали, используя трансформацию компетентных клеток *E. coli* штамм XL2-Blue и ампициллин в качестве селективного маркера. Правильность структуры рекомбинантной плазмиды p Δ ati подтверждали секвенированием.

На следующем этапе работы монослой клеток CV-1 инфицировали VACV LIVP и трансфицировали рекомбинантной плазмидой p Δ ati в условиях gpt-селекции рекомбинантов VACV как описано ранее [17]. В результате единичного кроссинговера плазмиды интеграции и вирусной ДНК образовывался рекомбинантный вирусный геном, содержащий как селективный ген *gpt*, так и последовательности, представляющие собой сегмент вирусного генома с целевой делецией и этот же сегмент без делеции (рис. 2). Такая генетическая конструкция с длинными прямыми повторами (R, R' и L, L') нестабильна и может существовать лишь под селективным давлением. После снятия селективного давления по гену *gpt* и внутримолекулярной рекомбинации по районам R-R' образовался рекомбинантный вирус LIVP Δ ati (рис. 2). Клоны данного варианта вируса выявляли ПЦР-анализом с последующим секвенированием вирусной ДНК.

Оценка патогенности вирусов LIVP и LIVP Δ ati при интраназальном заражении мышей

При изучении патогенности штаммов VACV LIVP и LIVP Δ ati использовали 3-недельных мышей линии BALB/c. Осуществляли и/н заражение мышей (10 животных в группе) вирусами в дозе 10^7 БОЕ. За животными наблюдали в течение 22 дней, каждые 2 дня каждую мышь взвешивали и регистрировали клинические проявления инфекции и гибель. У мышей, зараженных VACV LIVP, выраженные клинические проявления инфекции выявляли, начиная с 4-го дня с максимумом на 6-й день, выздоровление наступало после 10-го дня (рис. 3Б). Заболевание сопровождалось существенным снижением массы тела (рис. 3А). Вирус LIVP Δ ati в тех же условиях вызывал менее выраженные клинические проявления инфекции (рис. 3Б) и меньшее снижение массы тела по сравнению с группой мышей, инфицированных LIVP (рис. 3А), хотя и без статистически значимых различий. Заражение мышей штаммом LIVP приводило к гибели 50% животных, тогда как после заражения штаммом LIVP Δ ati погибло лишь 20% мышей (рис. 4).

Полученные результаты указывают на снижение патогенности VACV LIVP с делецией гена *ati* (рис. 2).

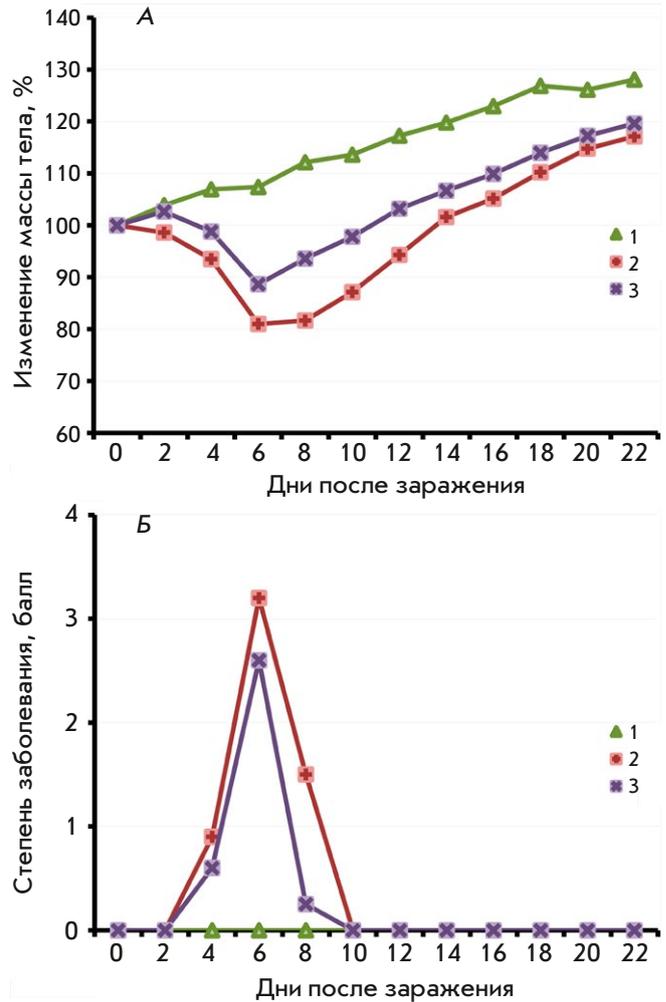


Рис. 3. Динамика изменения массы тела мышей (А) и клинических проявлений инфекции (Б) после и/н заражения вирусами LIVP (2) или LIVP Δ ati (3) в дозе 10^7 БОЕ. Приведены данные для групп из 10 животных, зараженных соответствующими вирусами, а также контрольной группы (1)

Анализ развития клеточного иммунного ответа на вакцинацию мышей вариантами VACV

Интенсивность клеточного иммунного ответа у мышей, в/к иммунизированных LIVP или LIVP Δ ati, определяли на 7, 14 и 21 дни по числу спленоцитов, продуцирующих IFN- γ в ответ на стимуляцию вирус-специфическими пептидами, с помощью метода IFN- γ ELISpot. В каждой временной точке анализировали по 6 животных в группе. Результаты, представленные на рис. 5, показывают, что высокий уровень клеточного иммунного ответа наблюдался уже на 7 дни, пик которого приходился на 14 дни со значительным снижением к 21 дни. Динамика и уровень клеточного иммунного ответа совпадали у обоих штаммов VACV.

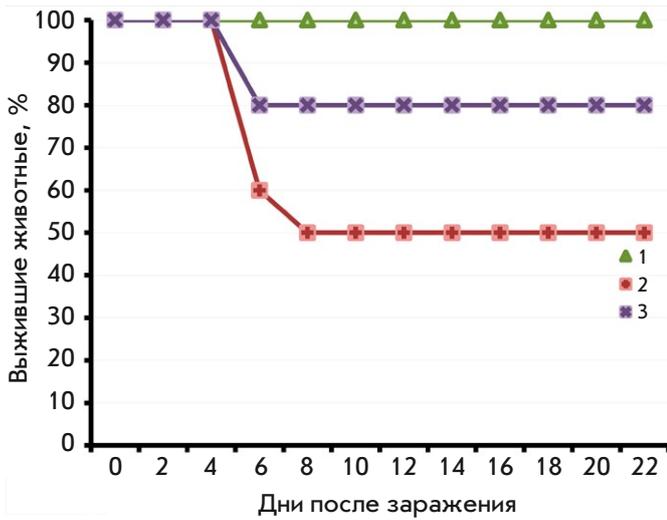


Рис. 4. Динамика гибели мышей, и/н зараженных вирусами L1VP (2) или L1VPΔati (3) в дозе 10⁷ БОЕ. Контрольная группа – неинфицированные животные (1)

Сравнение динамики развития гуморального иммунного ответа на вакцинацию мышей вирусами L1VP и L1VPΔati

Уровень VACV-специфичных IgM и IgG в сыворотках крови мышей, в/к иммунизированных L1VP или L1VPΔati, определяли методом ИФА на 7, 14, 21, 28, 42 и 56 дни.

На 7 дни выявлен относительно высокий уровень IgM, который достигал максимума на 14 дни, а затем снижался. По динамике и уровню продукции вирион-специфичных IgM оба штамма VACV не различались (рис. 6А).

Активный синтез VACV-специфичных IgG наблюдали на 14 дни с последующим увеличением уровня антител на 21–28 дни, который оставался высоким все время наблюдения (до 56 дни, рис. 6Б) у мышей, иммунизированных L1VPΔati, но снижался у мышей, вакцинированных L1VP. По среднегеометрическим значениям обратных титров IgG на 28, 42 и 56 дни L1VPΔati заметно превосходил L1VP, и эти различия были статистически значимыми на 42 и 56 дни (рис. 6Б).

Оценка защитного эффекта вакцинации мышей вариантами VACV от повторной инфекции летальными дозами гетерологичных ортопоксвирусов

На 60-й дни мышей, в/к иммунизированных VACV L1VP или L1VPΔati, а также контрольных (неиммунизированных) и/н заражали либо CPXV (в дозе 2.0×10⁶ БОЕ/мышь), либо ECTV (в дозе 2.2×10³ БОЕ/мышь) (по 6 животных в группе). В течение 14 дней наблюдали за клиническими проявлениями

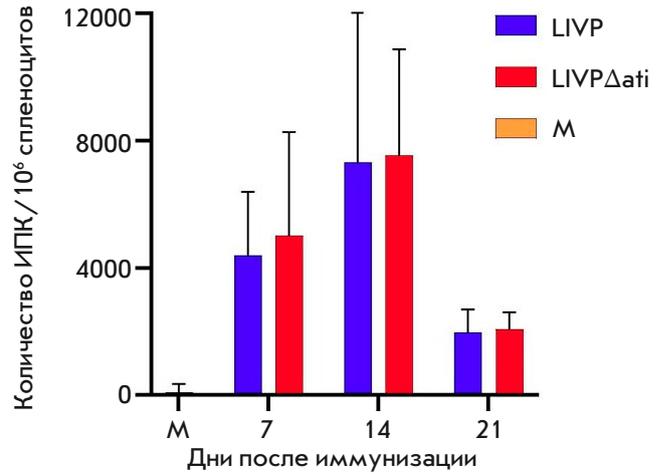


Рис. 5. ELISpot-анализ VACV-специфичного клеточного ответа на иммунизацию мышей линии BALB/c. ИПК – интерферон-γ-продуцирующие клетки, М – неиммунизированные мыши

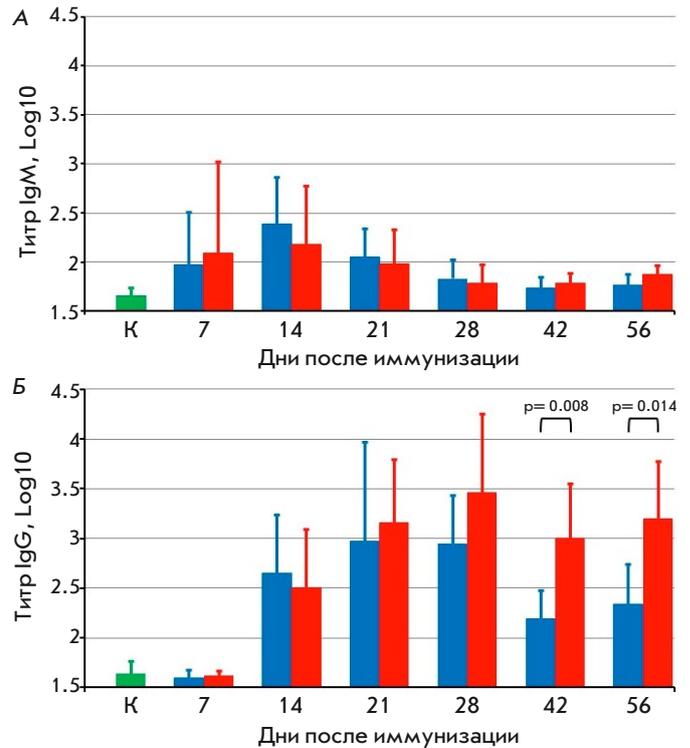


Рис. 6. Титры VACV-специфичных IgM (А) и IgG (Б) в сыворотках мышей, иммунизированных вирусами L1VP (синие столбики) или L1VPΔati (красные столбики). К – сыворотки крови мышей, которым вводили физраствор

и гибелью мышей. Использовали критерий развития VACV инфекции по величине снижения массы тела.

При заражении CPXV все мыши контрольной группы погибли через 6 дней, а животные, иммунизированные обоими вариантами VACV, выжили.

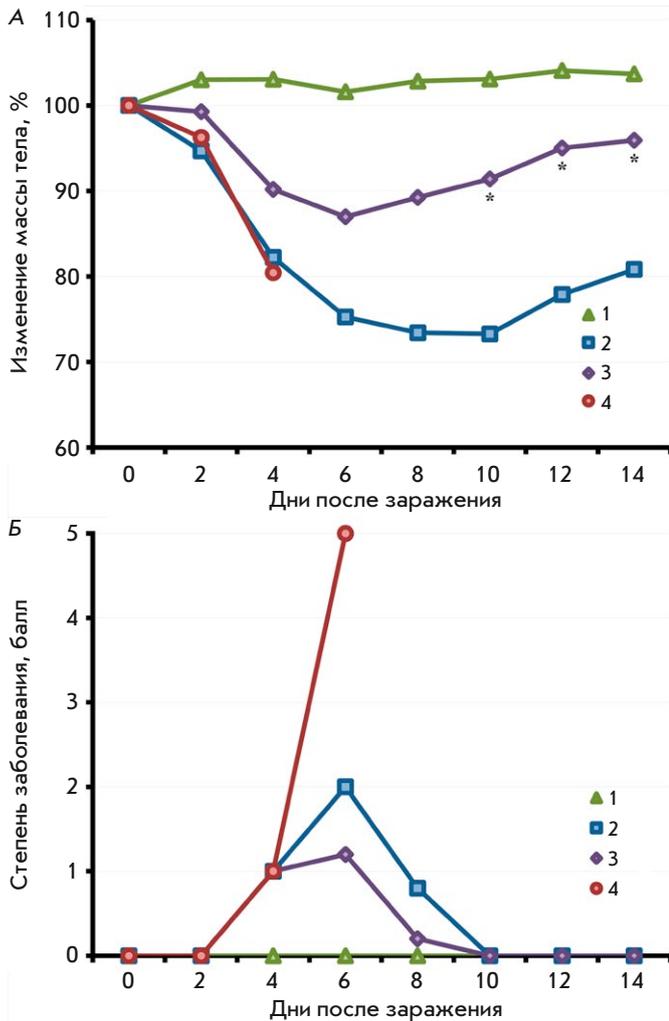


Рис. 7. Динамика изменения массы тела (А) и клинических проявлений инфекции (Б) после и/н заражения CPXV-GRI мышей, вакцинированных LIVP (2) или LIVPΔati (3), на 60-й день после иммунизации. Приведены данные для групп из 6 животных. В качестве контрольных использованы группы невакцинированных мышей как не инфицированных CPXV-GRI (1), так и зараженных этим вирусом (4). Звездочкой обозначены временные точки, в которых среднее значение массы тела в процентах от первоначального веса в группе иммунизированных LIVPΔati достоверно отличается от значений в группе мышей, иммунизированных LIVP. Сравнение проводили с помощью *t*-критерия Стьюдента для независимых выборок

При этом обнаружили менее выраженное снижение массы тела и менее существенные клинические проявления у мышей, вакцинированных LIVPΔati, по сравнению с мышами, вакцинированными LIVP (рис. 7). На 10–14 дни после заражения CPXV различия в снижении массы тела между группами вакцинированных мышей были статистически значимыми (рис. 7А).

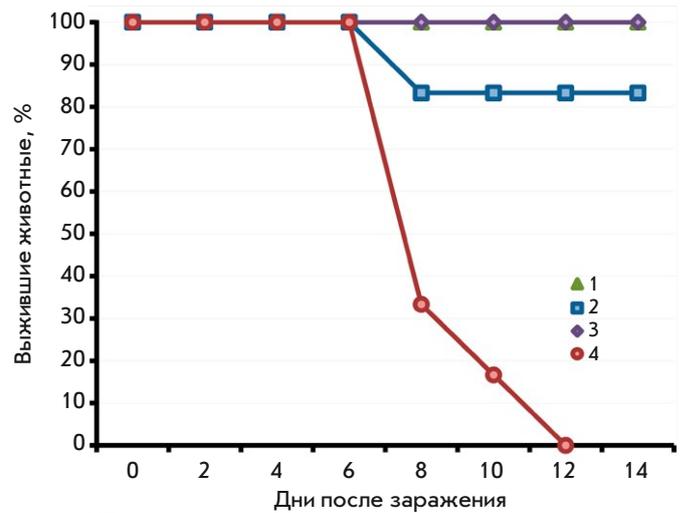


Рис. 8. Динамика гибели мышей, вакцинированных LIVP (2) или LIVPΔati (3), после и/н заражения ECTV-K1 на 60-й день после вакцинации. Приведены данные для групп из 6 животных. В качестве контрольных использованы группы невакцинированных мышей как не инфицированных ECTV-K1 (1), так и зараженных этим вирусом (4)

При заражении иммунизированных мышей вирусом ECTV различия между группами животных были более выраженными. Все контрольные мыши погибли через 12 дней после заражения ECTV; в группе, вакцинированной LIVP, выжило 83% животных, а в группе LIVPΔati – все животные (рис. 8). При этом в группе LIVPΔati проявления инфекции были очень слабо выраженными и практически не сопровождалось снижением массы тела (рис. 9). В то же время у мышей, вакцинированных LIVP, клинические признаки инфекционного процесса наблюдали на 6–12 дни после заражения ECTV. Выявлено значительное снижение массы животных и достоверные отличия по этому показателю от группы мышей, вакцинированных LIVPΔati, на 8–14 дни после заражения ECTV (рис. 9А).

ОБСУЖДЕНИЕ

Наиболее активно из невирионных белков VACV синтезируется укороченная форма белка АТ1 – белок 94 кДа, который не формирует внутриклеточные АТ1, но является мажорным иммуногеном при инфекции/иммунизации VACV человека или животных [11]. При этом антитела против этого белка не обладают вируснейтрализующей активностью. Влияние продукции данного неструктурного мажорного иммуногенного белка на проявление патогенности и иммуногенности VACV до сих пор не исследовано. Поэтому цель данной работы со-

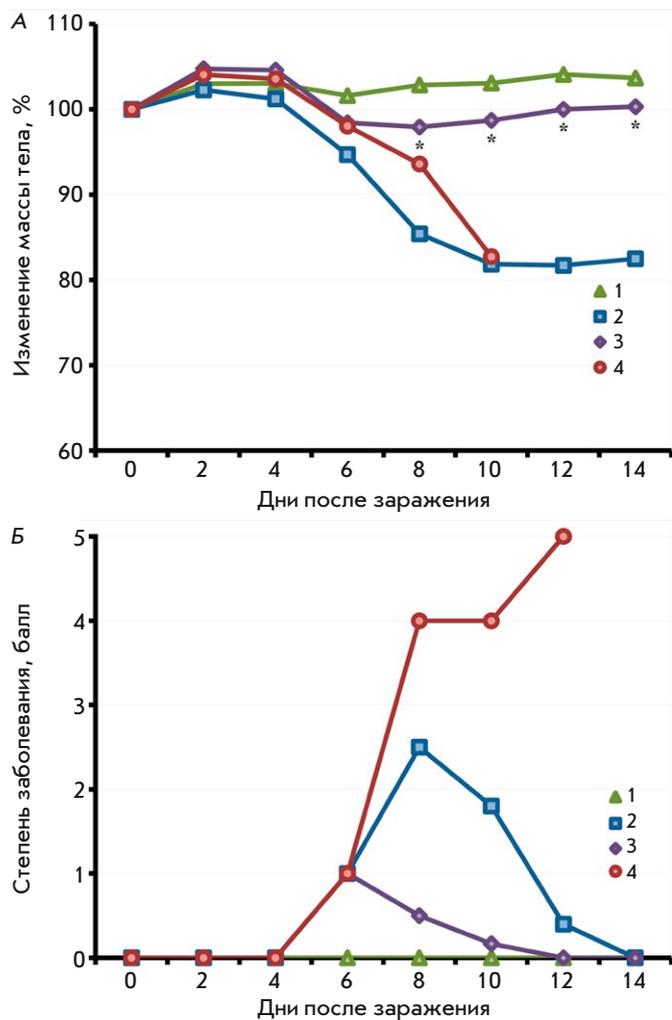


Рис. 9. Динамика изменения массы тела (А) и клинических проявлений инфекции (Б) после и/н заражения ECTV-K1 мышей, вакцинированных LIVP (2) или LIVPΔati (3), на 60-й день после иммунизации. Приведены данные для групп из 6 животных. В качестве контрольных использованы группы невакцинированных мышей, не инфицированных ECTV-K1 (1) и зараженных этим вирусом (4). Звездочкой обозначены временные точки, в которых среднее значение массы тела в процентах от первоначального веса в группе иммунизированных LIVPΔati мышей достоверно отличается от значения в группе мышей, иммунизированных LIVP. Сравнение проводили с помощью *t*-критерия Стьюдента для независимых выборок

стояла в получении VACV с направленно удаленным геном *ati* и изучении свойств этого вируса на мышах.

В качестве объекта исследования использовали ранее охарактеризованный клоновый вариант LIVP VACV [17]. У LIVP ген *ati* (A26L у CPXV-GRI) распадается на три короткие потенциальные открытые

рамки считывания, из которых ген A29L кодирует мажорный иммуногенный белок A29 (94 кДа) (рис. 1).

Плазмида интеграции/делеции pΔati, а затем штамм LIVPΔati получены согласно схеме, представленной на рис. 2.

На первом этапе сравнили патогенность штаммов LIVP и LIVPΔati. Чувствительность мышей к ортопоксвирусам существенно зависит от их возраста [2], поэтому использовали молодых (возраст 3 недели) мышей линии BALB/c. Животных (по 10 особей в группе) и/н инфицировали вирусами, поскольку этот способ имитирует естественный путь заражения и обуславливает наибольшую чувствительность мышей к данной инфекции [22, 23].

Оказалось, что при и/н заражении молодых мышей в дозе 10^7 БОЕ штамм LIVP индуцировал развитие клинически выраженной инфекции (рис. 3) с гибелью 50% животных (рис. 4), тогда как штамм LIVPΔati вызывал менее выраженные признаки заболевания (рис. 3) и вызывал гибель 20% мышей (рис. 4). Таким образом, удаление гена *ati* у VACV LIVP привело к его аттенуации по сравнению с исходным вариантом вируса. Это согласуется с ранее сформулированным предположением, что сниженная патогенность некоторых природных штаммов VACV может быть обусловлена спонтанной делецией у них гена *ati* [13], хотя это и не доказано экспериментально.

Иммуногенность VACV LIVP и LIVPΔati изучали на взрослых мышах (возраст 6–7 недель) со сформированной иммунной системой. Развитие VACV-специфичного клеточного иммунного ответа на в/к вакцинацию мышей оценивали с помощью метода ELISpot по числу спленоцитов, продуцирующих IFN-γ в ответ на стимуляцию пептидами. На 7 дни уже наблюдался высокий уровень клеточного иммунного ответа, пик которого приходился на 14 дни со значительным снижением к 21 дни (рис. 5). При этом делеция гена *ati* у VACV LIVP не сказывалась на динамике развития и уровне клеточного иммунного ответа мышей на вакцинацию.

Известно, что наибольший вклад в развитие адаптивного иммунного ответа на VACV-вакцинацию вносит антительный ответ [3, 24], поэтому с помощью ИФА оценили динамику синтеза IgM и IgG, специфичных к вирионным белкам VACV, после в/к вакцинации мышей штаммами LIVP или LIVPΔati в дозах 10^5 БОЕ.

На 7 дни выявлен относительно высокий уровень IgM, который достигал максимума на 14 дни, а затем снижался. По динамике и уровню продукции вирионспецифичных IgM оба штамма VACV не различались (рис. 6А).

Активный синтез VACV-специфичных IgG наблюдали, начиная с 14 дпи, с последующим увеличением уровня антител на 21–28 дпи. По среднегеометрическим значениям обратных титров IgG на 28, 42 и 56 дпи LIVPΔati заметно превосходил LIVP, при этом на 42 и 56 дпи – с высокой статистической значимостью (рис. 6Б). Одной из вероятных причин этого может быть тот факт, что отсутствие синтеза мажорного позднего неструктурного белка A29 у LIVPΔati «не отвлекает» иммунную систему на синтез IgG к этому белку и обуславливает больший синтез антител, специфичных к вирионным белкам VACV.

В ряде работ показано, что наибольший вклад в защиту от повторной ортопоксвирусной инфекции вносит гуморальный иммунный ответ [3, 6, 24, 25], поэтому важно было оценить протективный иммунитет, развившийся в ответ на в/к вакцинацию мышшей VACV LIVP и LIVPΔati. С этой целью на 60-й дпи по 6 мышшей каждой группы и/н инфицировали летальными дозами CPXV GRI-90 или ECTV K-1. Оказалось, что в обоих случаях защитный эффект вакцинации LIVPΔati был выше, чем вакцинации родительским штаммом LIVP (рис. 7–9), что подтверждает ранее сделанные заключения о ключевой

роли антительного ответа в формировании защиты организма от ортопоксвирусной инфекции.

Таким образом, можно заключить, что делеция участка генома VACV LIVP в районе гена *ati* привела к снижению патогенных свойств вируса LIVPΔati при и/н инфицировании мышшей линии BALB/c и увеличению продукции вирионспецифичных IgG в ответ на в/к вакцинацию мышшей данным мутантным вирусом, что привело (по сравнению с родительским LIVP) к формированию более высокого уровня защиты мышшей от последующей летальной инфекции гетерологичными ортопоксвирусами CPXV и ECTV. Поэтому штамм LIVPΔati можно рассматривать в качестве перспективного вектора для создания поливалентных рекомбинантных вакцин против различных инфекционных заболеваний. ●

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда (грант № 19-14-00006-П).

Авторы выражают благодарность И.В. Колосовой за препараты VACV LIVP, Д.Н. Кисакову и С.А. Пьянкову – за статистическую обработку результатов экспериментов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Fenner F., Henderson D.A., Arita I., Jezek Z., Ladnyi I.D. Smallpox and Its Eradication. World Health Organization. Geneva, Switzerland, 1988. 1460 p.
- Shchelkunov S.N., Marennikova S.S., Moyer R.W. Orthopoxviruses Pathogenic for Humans. New York, USA: Springer, 2005. 425 p.
- Moss B. // Immunol. Rev. 2011. V. 239. P. 8–26.
- Shchelkunova G.A., Shchelkunov S.N. // Acta Naturae. 2017. V. 9. P. 4–12.
- Payne L.G. // J. Gen. Virol. 1980. V. 50. P. 89–100.
- Shchelkunov S.N., Shchelkunova G.A. // Acta Naturae. 2020. V. 12. P. 33–41.
- Shedlovsky T., Smadel J.E. // J. Exp. Med. 1942. V. 75. № 2. P. 165–178.
- Funahashi S., Sato T., Shida H. // J. Gen. Virol. 1988. V. 69 (Pt 1). P. 35–47.
- de Carlos A., Paez E. // Virology. 1991. V. 185. № 2. P. 768–778.
- Katsafanas G.C., Moss B. // J. Virol. 2020. V. 94. № 4. e01671–19.
- Jones-Trower A., Garcia A., Meseda C.A., He Y., Weiss C., Kumar A., Weir J.P., Merchinsky M. // Virology. 2005. V. 343. № 1. P. 128–140.
- Moutafsi M., Tschärke D.C., Vaughan K., Koelle D.M., Stern L., Calvo-Calle M., Ennis F., Terajima M., Sutter G., Crotty S., et al. // Future Microbiol. 2010. V. 5. № 2. P. 221–239.
- Marques J.T., Trindade G.D., Da Fonseca F.G., Dos Santos J.R., Bonjardim C.A., Ferreira P.C., Kroon E.G. // Virus Genes. 2001. V. 23. № 3. P. 291–301.
- Leite J.A., Drumond B.P., de Souza Trindade G., Bonjardim C.A., Ferreira P.C.P., Kroon E.G. // Virus Genes. 2007. V. 35. № 3. P. 531–539.
- Leite J.A., da Fonseca F.G., de Souza Trindade G., Abrahao J.S., Arantes R.M., de Almeida-Leite C.M., dos Santos J.R., Guedes M.I., Ribeiro B.M., Bonjardim C.A., et al. // Arch. Virol. 2011. V. 156. № 4. P. 617–628.
- Kastenmayer R.J., Maruri-Avidal L., Americo J.L., Earl P.L., Weisberg A.S., Moss B. // Virology. 2014. V. 452–453. P. 59–66.
- Yakubitskiy S.N., Kolosova I.V., Maksyutov R.A., Shchelkunov S.N. // Acta Naturae. 2015. V. 7. P. 113–121.
- Shchelkunov S.N., Yakubitskiy S.N., Bauer T.V., Sergeev A.A., Kabanov A.S., Bulichev L.E., Yurganova I.A., Odnoshevskiy D.A., Kolosova I.V., Pyankov S.A., et al. // Acta Naturae. 2020. V. 12. P. 120–132.
- Shchelkunov S.N., Yakubitskiy S.N., Sergeev A.A., Starostina E.V., Titova K.A., Pyankov S.A., Shchelkunova G.A., Borgoyakova M.B., Zadorozhny A.M., Orlova L.A., et al. // Viruses. 2022. V. 14. P. 1453.
- Oseroff C., Peters B., Pasquetto V., Moutafsi M., Sidney J., Panchanathan V., Tschärke D.C., Maillere B., Grey H., Sette A. // J. Immunol. 2008. V. 180. P. 7193–7202.
- Russell T.A., Tschärke D.C. // Immunol. Cell Biol. 2014. V. 92. P. 466–469.
- Hughes L.J., Townsend M.B., Gallardo-Romero N., Hutson C.L., Patel N., Dotty J.B., Salzer J.S., Damon I.K., Carroll D.S., Satheshkumar P.S., et al. // Virology. 2020. V. 544. P. 55–63.
- Shchelkunov S.N., Yakubitskiy S.N., Sergeev A.A., Kabanov A.S., Bauer T.V., Bulichev L.E., Pyankov S.A. // Viruses. 2020. V. 12. № 8. P. 795.
- Belyakov I.M., Earl P., Dzutsev A., Kuznetsov V.A., Lemon M., Wyatt L.S., Snyder J.T., Ahlers J.D., Franchini G., Moss B., et al. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 2003. V. 100. P. 9458–9463.
- Lambert P.H., Laurent P.E. // Vaccine. 2008. V. 26. P. 3197–3208.

Attenuating Neuronal Autophagy Alleviates Inflammatory Injury in OGD-Deprived Co-culture of HT22 with BV2

Z. W. Huang¹, Y. Y. Liu¹, X. M. Chen¹, C. L. Yu^{2*}, H. Y. He^{2**}, Y. H. Deng^{1***}

¹Department of basic medicine, Medical School, Kunming University of Science and Technology, Kunming, 650500 China

²Anning First People's Hospital Affiliated to Kunming University of Science and Technology, Kunming, 650300 China

E-mail: * – yuchunlei1828820@163.com; ** – 511869321@qq.com; *** – 827821533@qq.com

Received October 10, 2022; in final form, July 10, 2023

DOI: 10.32607/actanaturae.11830

ABSTRACT Neuronal CX3CL1 suppressed microglial inflammation by binding to its receptor CX3CR1 expressed on microglia. Neuronal autophagy was prominently activated by cerebral ischemia, whereas CX3CL1 expression in autophagic neurons was conversely down-regulated to exacerbate microglial inflammation. Accordingly, this study was meant to investigate whether ischemia-activated microglial inflammation could be repressed by promoting CX3CL1 expression via the attenuation of neuronal autophagy. Immunofluorescence showed that autophagy predominantly occurred in neurons but barely in microglia. Western blot and immunofluorescence demonstrated that attenuating HT22 autophagy significantly increased its CX3CL1 expression and subsequently mitigated the BV2-mediated inflammatory responses, as indicated by decreased inflammatory factors of NF- κ B-p65, IL-6, IL-1 β , TNF- α , and PGE2. Meanwhile, CCK-8, Nissl staining, and FJC staining showed that an OGD (Oxygen-glycogen deprivation)-created neuronal injury was greatly alleviated by CX3CL1-suppressed microglial inflammation. Contrarily, elevating HT22 autophagy markedly decreased its CX3CL1 expression, which consequently worsened microglial inflammation and the neuronal injury. Our data suggests that attenuating neuronal autophagy may be an effective method to alleviate a microglial inflammatory injury after an ischemic stroke.

KEYWORDS Ischemic stroke, neuronal autophagy, CX3CL1 expression, microglial inflammation, neuroprotection.

INTRODUCTION

Cerebral stroke, a serious cerebrovascular disease, remains the main cause of disability and the second leading cause of death worldwide. Approximately 87% of patients suffer from an ischemic stroke [1]. The pathogenesis of cerebral ischemia has been investigated for decades, but means to alleviate post-stroke neurological injury remain troublingly few. A cascade of pathological processes causes neuronal death after an ischemic stroke, such as nutrient and energy depletion, release of reactive oxygen species, intracellular calcium overload, neuro-excitotoxicity, etc. [2]. Cerebral ischemia simultaneously activates a microglial inflammation and autophagic signaling. Microglia maintain cellular homeostasis by monitoring the microenvironment for responding to an injurious stimulus, such as ischemia. However, microglia-mediated inflammatory responses have been confirmed to be excessively amplified and, thereby, to accelerate the pathological aftershocks of an ischemic stroke [3]. A growing body of evidence demonstrates that au-

tophagy remains prominently activated at the acute phase of a stroke. Yet this activated autophagy is predominantly displayed in neurons but seldom in microglia at the penumbra [4]. Recent studies have shown that there are close interactions between neuronal autophagy and a microglial inflammation [3]. Thus, understanding the mutual regulations between them might offer more clues for stroke treatment.

The chemokine fractalkine/CX3CL1 is a unique member of the CX3C family of chemokines. It is crucial in mediating the inflammatory response in the central nervous system [5]. Studies have revealed that communication between neurons and microglia is established via CX3CL1–CX3CR1 signaling [6]. CX3CL1 is only expressed on the membranes of neurons, while its receptor CX3CR1 is for the most part located on microglia [7]. Microglia are native inflammatory cells in the brain and are kept quiescent through conjugation with neurons by the CX3CL1–CX3CR1 contact under physiological conditions [8]. Thus, microglial activity is kept at an appropriate level to avoid trig-

gering an excessive inflammatory response that can lead to neurological injury [9]. Thus, the CX3CL1–CX3CR1-mediated interaction between neurons and microglia was critical in maintaining normal brain function [10]. However, the inhibitory effects of neurons on the microglial inflammation are likely disrupted if the CX3CL1 and/or CX3CLR expressions are altered under a pathological state, such as cerebral ischemia [11]. Therefore, this study is meant to investigate what and how the CX3CL1-repressed microglial inflammation is disturbed, using an ischemia model of a co-culture of HT22 neurons with BV2 microglia.

Autophagy is a metabolic process by which damaged organelles, old proteins, superfluous cytoplasmic ingredients, and waste substrates to lysosomes are delivered for degradation [12]. At the same time, excessive autophagy accelerates cell death due to the uncontrolled autophagy initiation [13]. Autophagic/lysosomal signaling is prominently activated by cerebral ischemia [14]. Meanwhile, both reported studies and our previous investigations demonstrated that autophagy in neurons is excessively elevated by ischemic ischemia, leading to a massive accumulation of autophagic cargo within cells. Ultimately, the neurons at the penumbra suffer from autophagic cell death [15]. Intriguingly, more evidence shows that autophagy predominantly occurs in neurons, but seldom in microglia after an acute ischemic stroke [1]. Based on the CX3CL1–CX3CR1-mediated crosstalk mechanism, we asked ourselves whether the CX3CL1 expression could be changed in autophagic neurons, thereby subsequently weakening the suppressive effect of neurons on a microglial inflammation [5]. Consequently, the microglia-triggered inflammation response can be amplified to increase neuronal death [16]. To verify this hypothesis, a rat model of ischemic stroke was prepared to attempt to better understand the correlation between neuronal autophagy and microglial inflammation in our previous study [16]. The results showed that ischemia-induced neuronal autophagy leads to a reduction of the CX3CL1 expression. Moreover, further autophagy decreases the CX3CL1 expression and, consequently, aggravates the microglial inflammation and neurological injury. Conversely, attenuating autophagy significantly elevates the CX3CL1 expression of neurons, which in turn alleviates the microglial inflammatory injury and brain damage. These data support the contention that neuronal autophagy aggravates the microglial inflammatory injury by down-regulating the CX3CL1 expression on neurons. However, the study failed to elucidate the direct regulative mechanism of neuronal autophagy on a microglial inflammation after cerebral ischemia.

To investigate the direct crosstalk mechanism between neuronal autophagy and a microglial inflamma-

tion, an OGD co-culture of HT22 neurons with BV2 microglia was first prepared in this study. Thereafter, the culture condition was made to meet the requirement that autophagy is mostly induced in HT22, but rarely in BV2. Based on this understanding, the autophagy level in the neurons is pharmacologically altered to reveal the exact effect of neuronal autophagy on the microglial inflammatory response. The effect of a autophagy-regulated microglial inflammation on a neuronal injury is correspondingly explored. Through our study, the correlative regulation between neuronal autophagy and a microglial inflammation after cerebral ischemia ought to be fully elucidated.

1. MATERIAL AND METHODS

1.1. Cell culture

Mouse hippocampal neuron (HT22) and mouse microglial cells (BV2) were purchased from Wuhan Procell Life Technology Co., Ltd (Wuhan, China). HT22 and BV2 cells were firstly cultured in a high glucose DMEM medium (Hyclone, UT, USA) containing 10% fetal bovine serum (Biological Industries, CT, USA), respectively. After 2 days of separated culture, the HT22 and BV2 cells were collected and counted, and they were seeded into T25 culture flasks at a ratio of 9 : 1 for co-culture. After 24 h of co-culture, the model of oxygen-glucose deprivation/reoxygenation (OGD/R) was ready.

1.2. Oxygen-glycogen deprivation/reoxygenation (OGD/R)

To prepare the model of cell ischemia *in vitro*, the complete co-culture medium of HT22 with BV2 was replaced with a serum-free, sugar-free medium (glucose deprivation). The culture plates were placed in 95% N₂ and 5% CO₂ chambers (oxygen deprivation). After 1.5 h of OGD, the culture medium was replaced with a complete DMEM medium (resupply of glucose) and the plates were moved into the incubator with 5% CO₂ (reintroduction of oxygen). In this way, a OGD cell model mimicking the microenvironment in the ischemic brain tissues was created. The main objective of our study was to establish the correlation between neuronal autophagy and a microglial inflammation. For this reason, the culture conditions had to be adjusted to account for the fact that autophagy is mostly induced in neurons but little in microglia. Following this, the autophagy level in the HT22 and BV2 cells, respectively, was measured by double immunofluorescence.

We investigated how neuronal autophagy affects its CX3CL1 expression, which subsequently regulates the microglial inflammatory response by altering CX3CL1–CX3CR1 signaling. The autophagy inducer

Tat-Beclin1 and inhibitor 3-methyladenine (3-MA, 15 μ M) were additionally added into the co-culture medium. Our preliminary study had confirmed that a dose of 15 μ M Tat-Beclin1 could further promote autophagy in HT22 cells upon OGD, whereas the same dose of Tat-Beclin1 had little effect on the autophagy level in BV2 in the co-culture.

1.3. Western blot

The total proteins of the co-cultured cells were extracted using a protein extraction kit (Beyotime Biotechnology, Shanghai, China). After quantification by the BCA method, the proteins were separated by molecular weight using a polyacrylamide gel before being transferred onto PVDF membranes (Millipore Corporation, Ma, USA). Nonspecific proteins were blocked with 10% nonfat milk for 2 h at room temperature. After washing with TBST, the PVDF membranes were incubated with rabbit primary antibodies against mouse LC3 (1 : 10000, Sigma, MO, USA), beclin1 (1 : 1000, ABclonal, Wuhan, China), CX3CL1 (1 : 2000, GeneTex, CA, USA), NF- κ B-p65 (1 : 1000, GeneTex, CA, USA), and β -actin (1 : 10000, Abclonal, Wuhan, China) overnight at 4°C. After the washing step, the secondary antibodies were labeled for 2 h at room temperature. The fluorescence signal intensity was analyzed by Image J, and the band density values were normalized to β -actin.

1.4. Immunofluorescence

The co-cultured cells were seeded onto six-well plates coated with polylysine. Thereafter, the cells were permeabilized with 0.2% Triton-X100 for 5 min and washed with PBS. After blocking with 10% BSA (Beyotime Biotechnology, Shanghai, China) for 1 h at room temperature, the rabbit primary antibodies against rat LC3 (1 : 400, Sigma, MO, USA), NeuN (1 : 400, Abcam, Cambs, UK), Iba-1 (1 : 400, Abcam, Cambs, UK), CX3CL1 (1 : 400, GeneTex, Texas, USA), and NF- κ B-p65 (1 : 400, GeneTex, TX, USA) were incubated overnight at 4°C. After washing, they were labeled with Alexa Fluor-coupled secondary antibodies (1 : 1000, Jackson ImmunoResearch Laboratories, INC. PA, USA) in the dark. Finally, the cells were washed and fixed with DAPI (1 : 2000, Sigma, MO, USA). The results were represented in the form of fluorescence intensity. Under high magnification (\times 200), the fluorescence density was calculated by Image J and the fluorescence density values required background removal.

1.5. Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)

The HT22 and BV2 co-cultured cells were collected by centrifugation, and the culture medium was

also obtained for the measurement of inflammatory factors. The concentrations of TNF- α , IL-6, IL-1 β , and PGE2 in the co-culture medium were measured by an ELISA kit (Biotech & Jingmeibio, Beijing, China), according to the instructions provided by the manufacturer. The detected values were quantified according to the standard curve.

1.6. Nissl staining

The co-cultured cells seeded on the six-well plates were firstly fixed with 4% paraformaldehyde and then dehydrated by 70% ethanol for 1 min. Following that, they were immersed in a Cresyl violet Stain solution (Leagene, Beijing, China) at 56°C for 1 h and then rinsed with deionized water. Thereafter, the Nissl Differentiation solution (Leagene, Beijing, China) was added to incubate for 2 min. Finally, rapid dehydration using ethanol, as well as verification using xylene, was conducted. The staining was observed and photographed with a stereoscopic microscope (Nikon Instruments Co., Ltd., Tokyo, Japan). The result was expressed as the number of Nissl bodies in 10 randomly selected non-overlapping fields under high magnification (\times 200). Five plates had to be counted for each group.

1.7. Fluoro-Jade C (FJC) staining

A Fluoro-Jade C (FJC) Staining Kit (ThermoFisher, MA, USA) was used to detect the necrotic neurons, according to the instructions provided by the manufacturer. The co-cultured cells were processed with sodium hydroxide from Solution A for 5 min and incubated with 70% ethanol for 2 min, then washed in distilled water for 2 min. The cells were further incubated with potassium permanganate from the working solution B for 10 min. After washing with distilled water, the cells were stained with Fluoro-Jade C from the working solution C for 10 min. After the washing, the cells were permeabilized with xylene and examined with a fluorescent microscope (Nikon Instruments Co., Ltd., Tokyo, Japan). The result was expressed in the number of FJC-stained cells in 6 randomly selected non-overlapping fields under high magnification (\times 200). Five plates had to be counted for each group.

1.8. Cell Counting Kit-8 (CCK-8) kit

The cell viability was measured by a CCK-8 kit (Beyotime Biotechnology, Shanghai, China), according to the instructions provided by the manufacturer. Absorbance at a 450-nm wavelength was detected using a microplate reader. Cell viability was calculated using the formula of the survival rate: $[(As - Ab)/(Ac - Ab)] \times 100\%$. Meanwhile, the inhibition

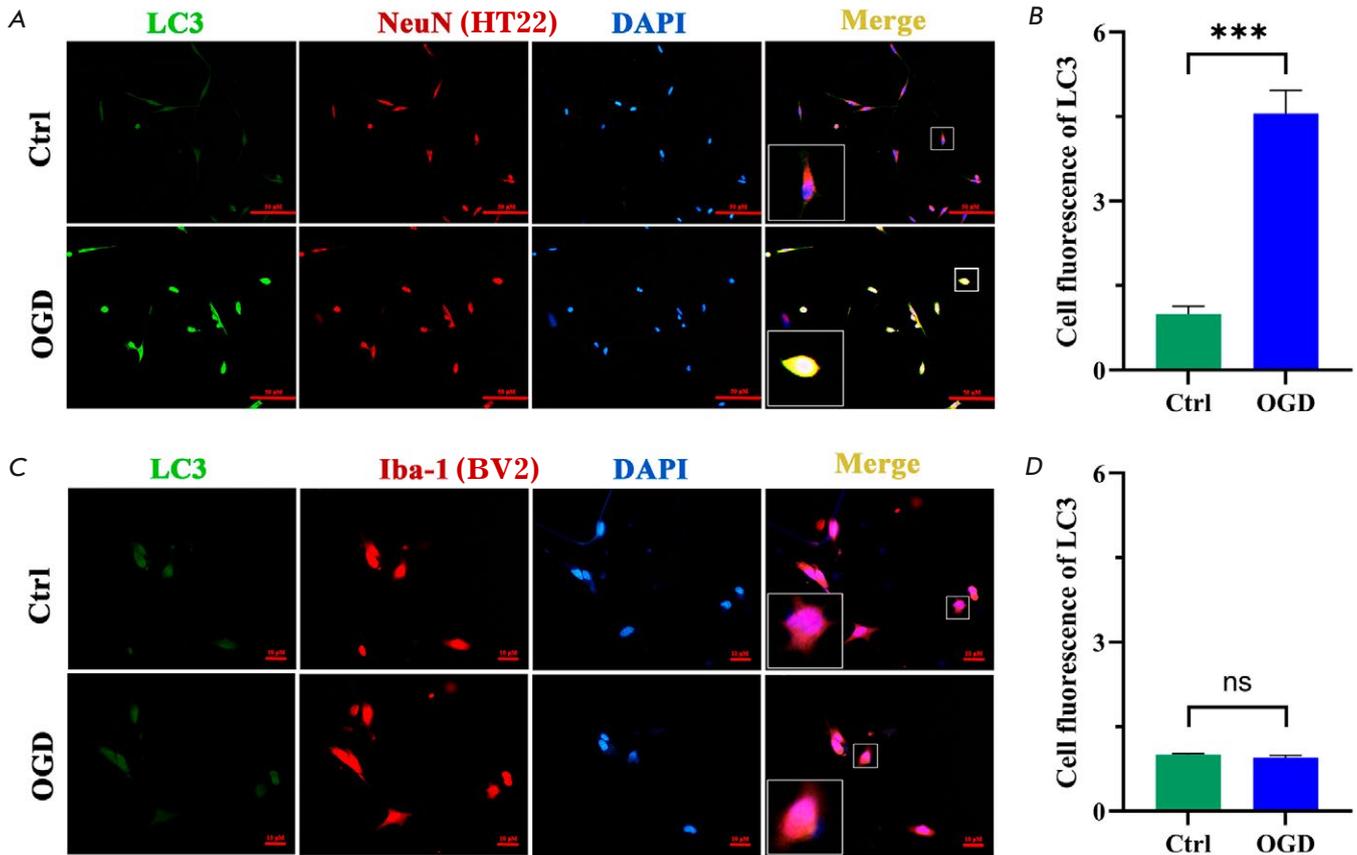


Fig. 1. Immunofluorescence was performed to identify the co-culture condition that meets the requirement that autophagy is mostly induced in HT22 cells but barely in BV2 upon OGD. By Screening, 1.5 h of OGD followed by 2 h of reoxygenation was recognized to meet the requirement that autophagy mainly occurs in neurons but seldom in microglia. (A, C) Immunofluorescence images of LC3 (green) / NeuN (red), and Iba-1 (red) / DAPI (blue) co-localization. (B, D) Cell fluorescence of LC3. Bar: 50 μ m, $n = 6$. *** $p < 0.001$, ns

rate was calculated using the formula $[(Ac - As) / (Ac - Ab)] \times 100\%$. As: Autophagy intervention group, Ac: OGD group, Ab: Sham group.

1.9. Statistical analysis

All the data in this study were subjected to one-way ANOVA or the t-test for statistical differences by SPSS 24.0, and values of $P < 0.05$ were considered statistically significant. The statistical analyses were expressed as a mean \pm SEM. Western blot strips were analyzed using Image J, bar statistical histograms were drawn using GraphPad Prism 9, and immunofluorescence graphs were processed using Adobe Photoshop CC 2022.

2. RESULT

2.1. The condition of autophagy predominantly occurs in neurons but barely so in microglia

An OGD co-culture model of HT22 neurons with BV2 microglia was prepared. In order to establish

the correlation between neuronal autophagy and a microglial inflammation, a culture condition was created firstly so as to meet the requirement that autophagy is mostly induced in HT22, while scarcely so in BV2 cells. Double immunofluorescence demonstrated that 1.5 h of OGD, followed by 2 h of reoxygenation, was the appropriate culture condition in which autophagy is predominantly induced in HT22 cells but barely so in BV2 (Fig. 1A–D).

2.2. OGD-induced neuronal autophagy decreased its CX3CL1 expression

Autophagy was for the most part induced in HT22 neurons 2 h after OGD, as mentioned above. Thus, the variation in CX3CL1 expression could be directly observed in the HT22 neurons that had suffered from autophagy. Western blot showed that the ratio of LC3-II/LC3-I and the Beclin1 expression were prominently high in the co-cultured cells of HT22 with BV2 (Fig. 2C,D), whereas the CX3CL1 expression was conversely low (Fig. 2E) in the OGD group compared

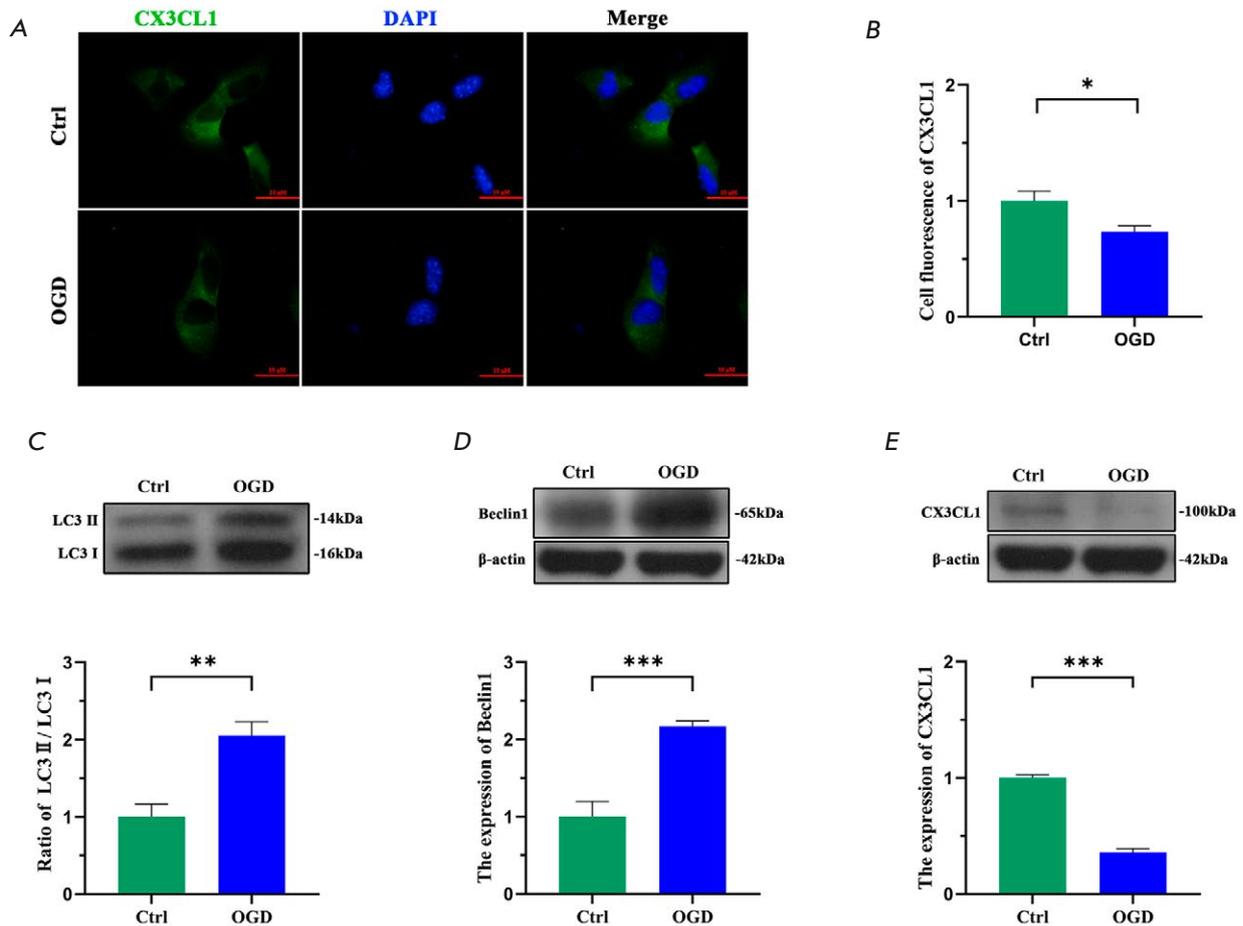


Fig. 2. OGD-induced autophagy in HT22 led to decreased CX3CL1 expression. (A) Immunofluorescence images of CX3CL1 (green) / DAPI (blue) localization. (B) Cell fluorescence of CX3CL1 (green) from image. (C–E) Western blot images of LC3, Beclin1, CX3CL1, and β -actin expression. Quantitative analysis of the immunoblotted proteins by Image J. Bar: 50 μ m, $n = 6$. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$

with those in the control group. Furthermore, double immunofluorescence demonstrated that OGD significantly elevated the autophagy level in the HT22 cells. However, the CX3CL1 expression was contrarily decreased in the OGD HT22 neurons (Fig. 2A,B). These results seem to indicate that neuronal autophagy down regulates CX3CL1 expression.

2.3. Attenuating HT22 autophagy suppresses BV2 inflammatory activation

The OGD-elevated autophagy in HT22 cells resulted in decreased CX3CL1 expression, which likely weakened the efficacy of their suppressive action on the microglial inflammatory response, due to a disruption of the CX3CL1–CX3CR1 cross-talk. We, therefore, inquired whether the BV2-mediated inflammation could be abated by increasing the CX3CL1 expression via the attenuation of autophagy in HT22 cells. To alter the autophagy level, the autophagy inducer Tat-Beclin1 and its inhibitor 3-MA, respectively,

were added into the co-culture medium upon OGD. Western blot showed that both the Beclin1 expression and the ratio LC3-II/LC3-I could be effectively altered by the autophagic agents (Fig. 3A,B). The promoted autophagy further decreased CX3CL1 expression in the OGD+Tat group, compared with that in the OGD group (Fig. 3C). By contrast, decreasing autophagy increased the CX3CL1 expression in our example (Fig. 3C). Meanwhile, western blot demonstrated that 15 μ M of Tat-Beclin1 greatly boosts autophagy in HT22 neurons (Fig. 3A,B). Moreover, Tat-Beclin1-promoted HT22 autophagy markedly reduced its CX3CL1 expression (Fig. 4C). Conversely, 3-MA-inhibited autophagy greatly increased its CX3CL1 expression in the OGD+3-MA group (Fig. 3C), compared with that in the OGD group. We further investigated the effect of the altered CX3CL1 expression in the HT22 neurons on microglial inflammatory signaling. The result indicates (Fig. 4A–D) that the inflammatory signaling of NF- κ B-p65 was prominently reinforced

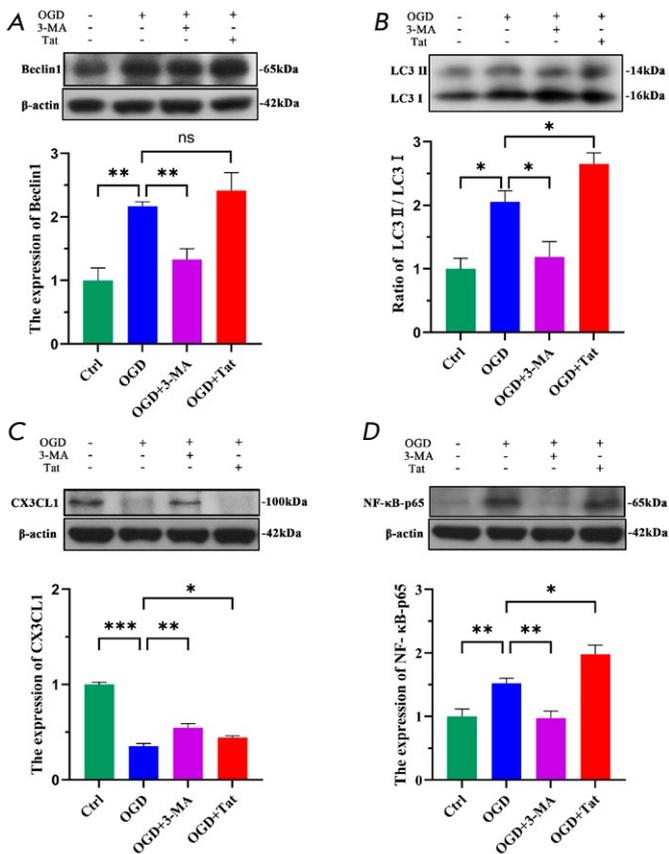


Fig. 3. Inhibiting HT22 autophagy suppressed BV2 inflammatory activation. (A–D) Western blot images of LC3, Beclin1, CX3CL1, NF-κB-p65, and β-actin expression. Quantitative analysis of the immunoblotted proteins by Image J. $n = 6$. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, ns

by the autophagy-decreased CX3CL1 (Fig. 4C,D). Contrarily, the increased CX3CL1 expression through autophagy inhibition proved effective in mitigating the microglial activation.

2.4. Inhibiting neuronal autophagy repressed the microglial inflammatory response

To explore whether the microglial inflammatory response could be suppressed by inhibiting neuronal autophagy, the presence of the inflammatory factors IL-6, IL-1β, TNF-α, and PGE2 was assessed by measuring their concentrations in the OGD co-culture medium. The results (Fig. 5A–D) showed that Tat-Beclin1-elevated autophagy in HT22 cells noticeably aggravated the OGD-induced microglial inflammatory response, as was reflected by increased concentrations of IL-6, IL-1β, TNF-α, and PGE2. By contrast, inhibiting autophagy in HT22 cells proved effective in suppressing the inflammation in the OGD+3-MA group, compared with that in the OGD+Tat group or OGD group.

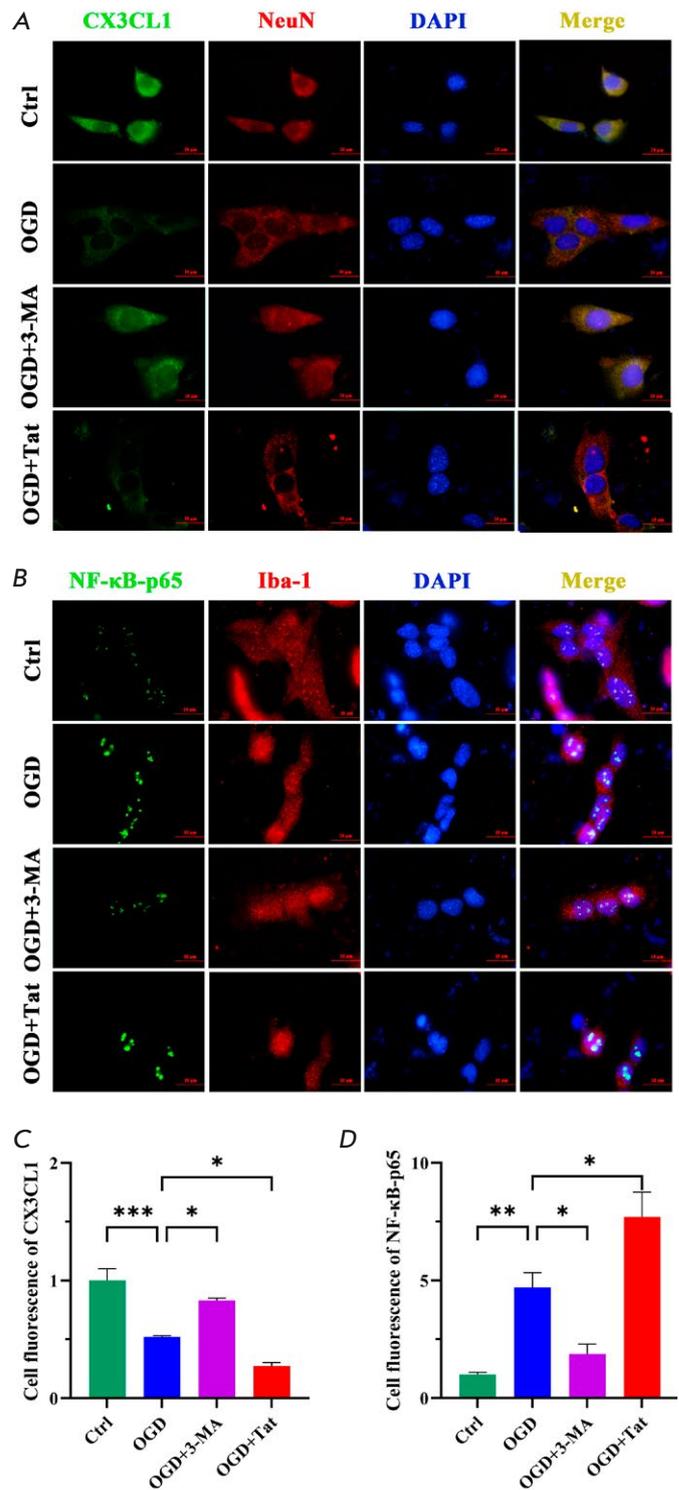


Fig. 4. Reducing HT22 autophagy suppressed BV2 inflammatory activation. (A, B) Immunofluorescence images of CX3CL1 (green) / NeuN (red), NF-κB-p65 (green) / Iba-1 (red), and DAPI (blue). (C, D) Cell fluorescence of CX3CL1 and NF-κB-p65 (green). Bar: 50 μm, $n = 6$. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$

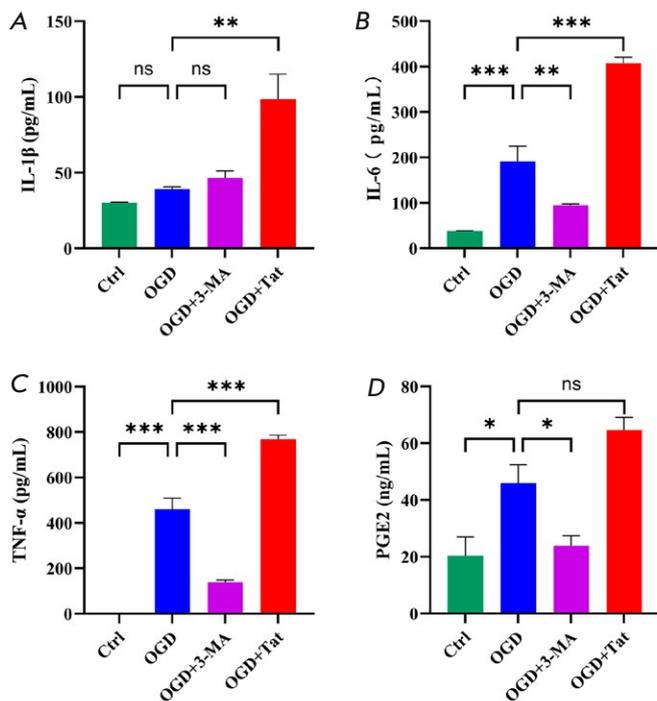


Fig. 5. Attenuation of autophagy in HT22 cells repressed the BV2-mediated inflammatory response. ELISA analysis of inflammatory factors including IL-1 β (A), IL-6 (B), TNF- α (C), and PGE2 (D) converted from the standard curve by measurement of the OD_{450nm} value. $n = 6$. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, ns

2.5. Autophagy inhibition-suppressed microglial inflammation benefited neuron survival

To determine whether the CX3CL1-suppressed microglial inflammation could alleviate the OGD-induced neuronal injury, with the CCK-8 kit, Nissl staining and FJC staining were performed to evaluate cell viability, neuron survival, and cell death, respectively. The results showed that cell viability (Fig. 6A,C) and neuron survival (Fig. 6E,F) were significantly improved, while the cell death rate was correspondingly decreased in the OGD+3-MA group, compared with those in the OGD+Tat group, or in the OGD group. Conversely, the OGD-induced neuronal injury was further aggravated in the OGD+Tat group (Fig. 6B,D), compared with that in the OGD group.

3. DISCUSSION

Ischemic stroke caused by cerebrovascular occlusion is a fatal disease that threatens human beings [17]. The pathological mechanism underlying ischemic stroke has been extensively investigated in recent years, and yet the recombinant tissue plasminogen activator (rtPA) remains the only approved agent for stroke treatment [18]. Its clinical application can

reduce the likelihood of disability by 25%. However, the therapeutic efficacy of rtPA rapidly drops past the 4.5 h that follow an ischemic stroke [19]. Besides, rtPA administration frequently increases the risk of a hemorrhage, which, as we know, aggravates brain injury [19]. Thrombectomy is another efficacious way to remove an infarction, but it may lead to more serious damage to the brain than the cerebral ischemia itself, because of the ischemia/reperfusion injury induced by the instantaneous complete blood resupply [20]. The neurons at the ischemic core rapidly die within several minutes after an ischemic stroke, but the cell death at the penumbra (the peripheral area around the core) lags, due to the milder ischemia by the blood supply with the arterial collateral anastomoses [21]. Mounting evidence points to the fact that neurons that have suffered from autophagy can be rescued back to life by modulation targeting at autophagic/lysosomal signaling [22]. However, neurons and glial cells coexist within penumbra tissues. Thus, this study particularly concerned itself with whether the fate of autophagic neurons is regulated by microglia, using a co-culture of neurons with microglia *in vitro*. This study might provide more clues as to how to improve stroke treatment.

Microglia are native immune cells that are responsible for neuroinflammation and are prominently activated by cerebral ischemia to maintain cellular homeostasis [23]. A modest microglial inflammation benefits neuroprotection, while an amplified immune response leads to neurological injury. CX3CL1, a chemokine anchored to the membranes on neurons, is efficacious in suppressing a microglial inflammation by binding to its receptor CX3CR1 expressed on microglia [6]. Under normal conditions, the microglial inflammatory response can be limited by neurons through the CX3CL1–CX3CR1 signaling pathway [24]. Studies have shown that neuronal autophagy at the penumbra is excessively activated, resulting in aggravated ischemic brain damage [25]. Furthermore, our previous study [16] established that the CX3CL1 expression was significantly reduced on autophagic neurons. We, therefore, looked into whether this reduced CX3CL1 on neurons weakened its suppressive effects on the microglial inflammatory response, resulting in the worsened neurological injury after an ischemic stroke. Based on the CX3CL1–CX3CR1 regulative mechanism, the correlation between neuronal autophagy and the microglial inflammation was investigated using an OGD co-culture of HT22 neurons with BV2 microglia.

Our study demonstrated that 1.5 h of OGD followed by 2 h of reoxygenation was the ideal culture condition under which autophagy was mostly induced

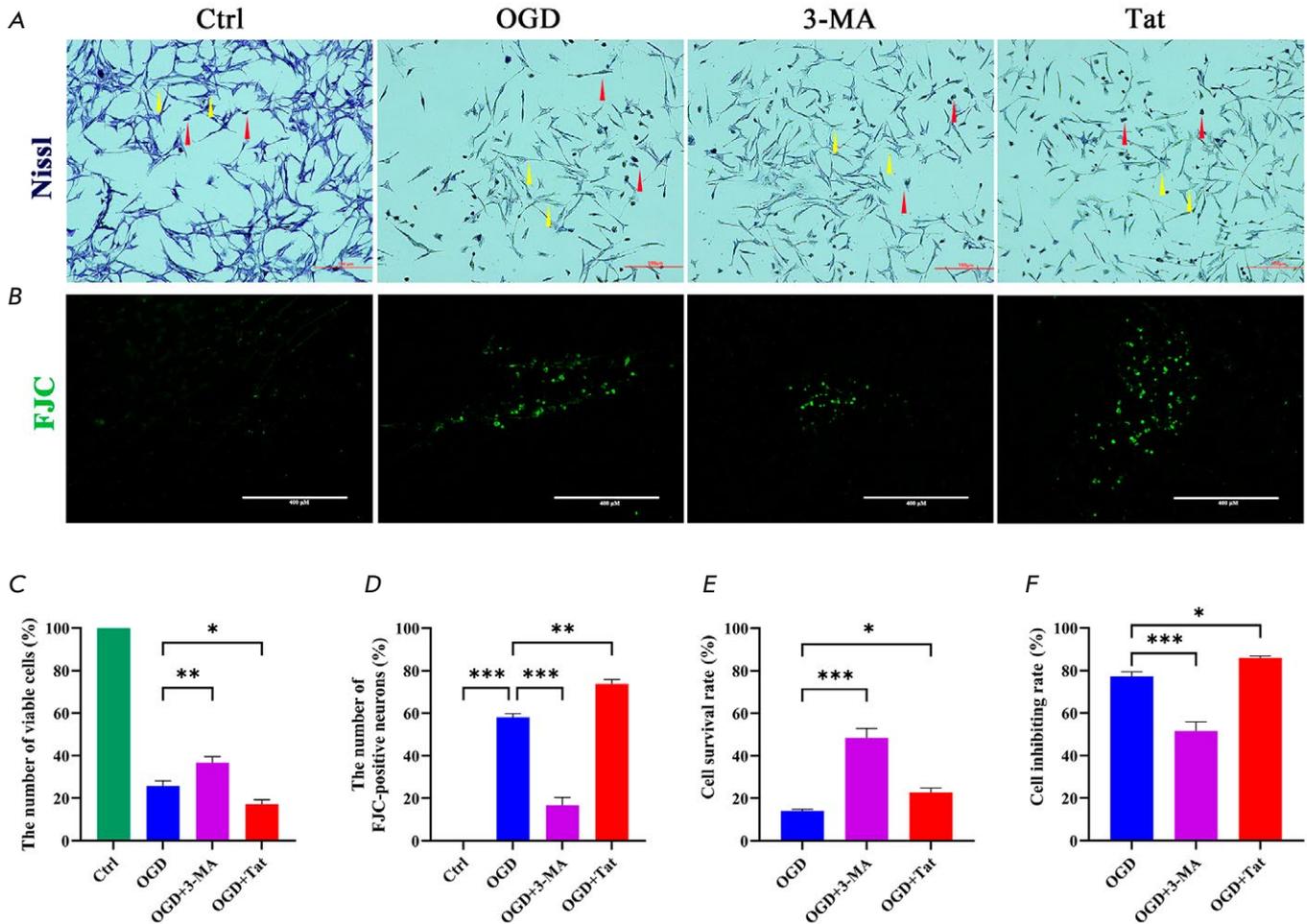


Fig. 6. Autophagy inhibition-suppressed microglial inflammation alleviated the neuronal injury after OGD. (A) Nissl staining images of pyknotic neurons (red arrows) and viable neurons (yellow arrows). (B) FJC staining images of degenerative neurons. (C) The number of FJC-positive cells was statistically analyzed. (D) The number of viable cells was statistically analyzed. (E) Statistical analysis of the cell survival rate detected by the CCK-8 kit. $n = 6$. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$

in HT22 cells but barely in BV2 (Fig. 1A,B). The same study also indicated that neurons were more susceptible to ischemia than microglia, similarly to what was reported in [16]. CX3CL1 was uniquely expressed on neurons. We wondered whether its expression was altered in autophagic neurons. The results demonstrated that the significantly elevated autophagic activity was coupled with a markedly reduced CX3CL1 expression, suggesting that CX3CL1 expression is negatively regulated by autophagy in OGD HT22 neurons. Studies have indicated that a microglial inflammation could be suppressed by neurons through CX3CL1–CX3CR1 signaling [25]. Therefore, we discussed whether the microglial inflammatory injury was aggravated by the down-regulated CX3CL1 expression in OGD HT22 cells. Under OGD condition, the co-cultured cells were

treated with the autophagy inhibitor 3-MA and the inducer Tat-Beclin1, respectively. The results showed that attenuation of HT22 autophagy significantly restored CX3CL1 expression (Fig. 3C). Consequently, the microglial inflammatory signaling of NF- κ B-p65 was greatly suppressed (Fig. 3D). Meanwhile, the inflammatory factors of IL-6, IL-1 β , TNF- α , and PGE2 were also attenuated (Fig. 5). By contrast, promoting HT22 autophagy further reduced its CX3CL1 expression and, in turn, exacerbated the inflammatory response. Moreover, the neuronal autophagy-worsened microglial inflammation led to increased death amongst HT22 cells (Fig. 6B). Conversely, down-regulation of autophagy alleviated the inflammatory injury and subsequently promoted neuron survival in OGD HTT cells (Fig. 6A). Our data collectively suggest that

neuronal autophagy aggravated the microglial inflammatory injury by reducing its CX3CL1, due to the disruption in CX3CL1–CX3CR1 communication that took place after ischemia. Contrarily, promotion of CX3CL1 on neurons by attenuating autophagy could have enhanced its suppressive effects on the microglial inflammatory response and, thereby, alleviate the ischemic injury in the neurons.

In summary, the main purpose of our study was to investigate the correlation between neuronal autophagy and microglial inflammation in a co-culture of neurons with microglia, based on the suppressive impact of neurons on the microglial inflammatory response through CX3CL1–CX3CR1 signaling. The results showed that the OGD-induced neuronal autophagy significantly decreases its CX3CL1 expression, which consequently exacerbates the microglial inflammatory response and neurological injury. Furthermore, promoting neuronal autophagy upon OGD further lessens its CX3CL1 expression and, in turn, worsens the microglial inflammation. Conversely, inhibiting autophagy effectively alleviates the microglial inflammatory injury by up-regulating CX3CL1 expression and, thereby, improving neuronal survival.

Our data suggest that inhibiting neuronal autophagy might be a reliable way to alleviate the microglial inflammatory injury after an ischemic stroke. ●

Huang Z.W. designed and performed the experiments.

Liu Y.Y., and Chen X.M. performed part of the experiments, collected the data, and did the statistical analysis. He H.Y. and Deng Y.H. provided the ideal, supervised and corrected the research strategies, wrote and revised the manuscript. All authors have read and agreed to the published version of this manuscript.

The authors declare that they have no conflict of interest.

This work was supported by grants from the National Natural Science Foundation of China (Nos. 81960418, 82160240, 82160241), and Yunnan Ten Thousand Talents Plan Young & Elite Talents Project (No. YNWR-QNBJ-2018-034), and Yunnan Applied Basic Research Projects Fund of Yunnan Provincial Department of Science & Technology (No. 202001AT070049).

REFERENCE

1. Wang P., Shao B.Z., Deng Z., Chen S., Yue Z., Miao C.Y. // *Prog. Neurobiol.* 2018. V. 163. P. 98–117.
2. Iadecola C., Anrather J. // *Nat. Med.* 2011. V. 17. № 7. P. 796–808.
3. Su P., Zhang J., Wang D., Zhao F., Cao Z., Aschner M., Luo W. // *Neuroscience.* 2016. V. 319. P. 155–167.
4. Berglund R., Guerreiro-Cacais A.O., Adzemovic M.Z., Zeitelhofer M., Lund H., Ewing E., Ruhrmann S., Nutma E., Parsa R., Thessen-Hedreul M., et al. // *Sci. Immunol.* 2020. V. 5. № 52. P. 5077.
5. Lu M., Zhao W., Han S., Lin X., Xu T., Tan Q., Wang M., Yi C., Chu X., Yang W., et al. // *Sci. Adv.* 2022. V. 8. № 26. P. 8048.
6. Mendiola A.S., Church K.A., Cardona S.M., Vanegas D., Garcia S.A., Macklin W., Lira S.A., Ransohoff R.M., Kokovay E., Lin C-HA., et al. // *J. Neurochem.* 2022. V. 162. № 5. P. 430–443.
7. Chen X., Jiang M., Li H., Wang Y., Shen H., Li X., Zhang Y., Wu J., Yu Z., Chen G. // *J. Neuroinflammation.* 2020. V. 17. № 1. P. 209–224.
8. Lauro C., Chece G., Monaco L., Antonangeli F., Peruzzi G., Rinaldo S., Paone A., Cutruzzola F., Limatola C. // *Front. Cell Neurosci.* 2019. V. 13. P. 414.
9. Xu S., Lu J., Shao A., Zhang J.H., Zhang J. // *Front. Immunol.* 2020. V. 11. P. 294.
10. Subbarayan M.S., Joly-Amado A., Bickford P.C., Nash K.R. // *Pharmacol. Ther.* 2022. V. 231 P. 107989.
11. Liu M., Xu Z., Wang L., Zhang L., Liu Y., Cao J., Fu Q., Liu Y., Li H., Lou J., et al. // *J. Neuroinflammation.* 2020. V. 17. № 1. P. 270.
12. Campbell B.C.V., Khatri P. // *Lancet.* 2020. V. 396. № 10244. P. 129–142.
13. Zhang Y., Wu Z., Huang Z., Liu Y., Chen X., Zhao X., He H., Deng Y. // *Brain Res.* 2022. V. 1778. P. 147768.
14. Camargos Q.M., Silva B.C., Silva D.G., Toscano E.Cd.B., Oliveira B.d.S., Bellozi P.M.Q., Jardim B.L.d.O., Vieira É.L.M., de Oliveira A.C.P., Sousa L.P., et al. // *Brain Res. Bull.* 2020. V. 155. P. 1–10.
15. Ermine C.M., Bivard A., Parsons M.W., Baron J.-C. // *Int. J. Stroke.* 2021. V. 16. № 5. P. 497509.
16. He H.Y., Ren L., Guo T., Deng Y.H. // *Neural. Regen. Res.* 2019. V. 14. № 2. P. 280–288.
17. Wu Z., Zhang Y., Liu Y., Chen X., Huang Z., Zhao X., He H., Deng Y. // *Life (Basel).* 2021. V. 11. № 9. P. 948.
18. Ajoalabady A., Wang S., Kroemer G., Penninger J.M., Uversky V.N., Pratico D., Henninger N., Reiter R.J., Bruno A., Joshipura K., et al. // *Pharmacol. Ther.* 2021. V. 225. P. 107848.
19. Barthels D., Das H. // *Biochim. Biophys. Acta Mol. Basis Dis.* 2020. V. 1866. № 4. P. 165260.
20. Al-Mufti F., Amuluru K., Roth W., Nuoman R., El-Ghanem M., Meyers P.M. // *Neurosurgery.* 2018. V. 82. № 6. P. 781–789.
21. Yu S., Yu M., Bu Z., He P., Feng J. // *Front. Cell Neurosci.* 2020. V. 14. P. 193.
22. Lingling D., Miaomiao Q., Yili L., Hongyun H., Yihao D. // *Brain Res. Bull.* 2022. V. 184. P. 24–33.
23. Lian L., Zhang Y., Liu L., Yang L., Cai Y., Zhang J., Xu S. // *Front. Mol. Neurosci.* 2020. V. 13. P. 612439.
24. Cipriani R., Villa P., Chece G., Lauro C., Paladini A., Micotti E., Perego C., De Simoni M.G., Fredholm B.B., Eusebi F., et al. // *J. Neurosci.* 2011. V. 31. № 45. P. 16327–16335.
25. Mao M., Xu Y., Zhang X.Y., Yang L., An X.B., Qu Y., Chai Y.N., Wang Y.R., Li T.T., Ai J. // *J. Neuroinflammation.* 2020. V. 17. № 1. P. 244.

A DNA Replication Stress-Based Prognostic Model for Lung Adenocarcinoma

S. Shi¹, G. Wen¹, C. Lei¹, J. Chang¹, X. Yin¹, X. Liu¹, S. Huang^{2*}

¹Department of Cardiothoracic Surgery, The People's Hospital of Dazu District, Chongqing, 402360 China

²Department of Orthopedics, The People's Hospital of Dazu District, Chongqing, 402360 China

*E-mail: cqslhuang@163.com

Received: July 08, 2023; in final form, September 25, 2023

DOI: 10.32607/actanaturae.25112

ABSTRACT Tumor cells endure continuous DNA replication stress, which opens the way to cancer development. Despite previous research, the prognostic implications of DNA replication stress on lung adenocarcinoma (LUAD) have yet to be investigated. Here, we aimed to investigate the potential of DNA replication stress-related genes (DNARs) in predicting the prognosis of individuals with LUAD. Differentially expressed genes (DEGs) originated from the TCGA-LUAD dataset, and we constructed a 10-gene LUAD prognostic model based on DNARs-related DEGs (DRSDs) using Cox regression analysis. The receiver operating characteristic (ROC) curve demonstrated excellent predictive capability for the LUAD prognostic model, while the Kaplan-Meier survival curve indicated a poorer prognosis in a high-risk (HR) group. Combined with clinical data, the Riskscore was found to be an independent predictor of LUAD prognosis. By incorporating Riskscore and clinical data, we developed a nomogram that demonstrated a capacity to predict overall survival and exhibited clinical utility, which was validated through the calibration curve, ROC curve, and decision curve analysis curve tests, confirming its effectiveness in prognostic evaluation. Immune analysis revealed that individuals belonging to the low-risk (LR) group exhibited a greater abundance of immune cell infiltration and higher levels of immune function. We calculated the immunopheno score and TIDE scores and tested them on the IMvigor210 and GSE78220 cohorts and found that individuals categorized in the LR group exhibited a higher likelihood of deriving therapeutic benefits from immunotherapy intervention. Additionally, we predicted that patients classified in the HR group would demonstrate enhanced sensitivity to Docetaxel using anti-tumor drugs. To summarize, we successfully developed and validated a prognostic model for LUAD by incorporating DNA replication stress as a key factor.

KEYWORDS DNA replication stress, lung adenocarcinoma, prognostic model, immunotherapy response, anti-tumor drug prediction.

INTRODUCTION

Lung cancer (LC) is a highly heterogeneous and lethal malignancy, representing a significant contributor to cancer incidence and mortality rates [1]. Lung adenocarcinoma (LUAD) stands as the predominant subtype of LC [2]. Surgery and radiation therapy offer hope for curing LUAD patients, while chemotherapy, targeted therapy, and immunotherapy can maximize the improvement of tumor prognosis. However, the prognosis for patients with LUAD still poses a significant challenge, with a relatively low long-term survival rate [3]. Parameters such as tumor size, TNM staging, and tumor grading cannot meet the demands of prognosis prediction and more precise treatment guidance, and finding new evaluation methods is a pressing need for precision medicine.

The establishment of robust prognostic risk models holds the potential to significantly enhance our ability to forecast the prognosis of individuals diagnosed with LUAD.

The preservation of genome integrity heavily relies on the integrity and accuracy of DNA replication. However, the DNA replication process constantly faces challenges from various intrinsic and extrinsic stresses, including DNA damage and other factors, which can pose threats to overall genomic stability [4]. Various obstacles that delay, prevent, or terminate DNA replication are defined as DNA replication stress [5]. DNA replication stress activated by oncogene abnormalities is an important factor affecting cancer progression. On the one hand, it abets genomic instability, advancing cancer development. On the

other hand, it retards cell proliferation and triggers anti-cancer defense mechanisms to induce cell apoptosis or senescence [6]. Tumor cells frequently exhibit a prominent characteristic of chronic replication stress, which arises from the persistent presence of replication stress sources due to impaired replication stress responses, diminished repair protein activity, and ongoing proliferation signal transduction. This chronic replication stress contributes significantly to the genomic instability and aberrant cell proliferation observed in tumor cells [7]. Previous studies have found that the DNA replication stress-related genes POLQ, PLK51, RAD6, CLASPIN, and CDC14 can predict the prognosis of early and mid-stage non-small cell LC (NSCLC) patients [8]. Additionally, DNA replication stress is an important mechanism for the chemotherapy and targeted therapy of LC. The integration of immunotherapy with these therapies represented a compelling strategy to augment the efficacy of LC treatment [9]. Therefore, the value of DNA replication stress-related genes (DNARs) lies in their potential to be valuable prognostic markers and aid in predicting drug efficacy in the context of LUAD.

The proportion of immune cell infiltration in the tumor microenvironment (TME) affects cancer patient survival and the immunotherapy response [10, 11]. The expression levels of immune checkpoint inhibitors (ICIs) like cytotoxic T lymphocyte-associated protein 4 (CTLA4) and programmed cell death protein 1 (PD1)/programmed cell death ligand 1 (PD-L1) are usually significantly increased in hypoxic malignant tumors, and ICIs are more effective for a small proportion of LC patients [12]. However, there are currently no tools available for forecasting the efficacy of immunotherapy in LUAD individuals.

We hereby used bioinformatics analysis to assess LUAD feature genes related to DNA replication stress and analyzed their roles in predicting the prognosis and drug efficacy for LUAD individuals.

MATERIALS AND METHODS

Data collection

Gene expression datasets of LUAD with complete clinical data, including age, gender, tumor grade, and TNM staging, were provided by The Cancer Genome Atlas (TCGA, <https://portal.gdc.cancer.gov/>) and Gene Expression Omnibus (GEO, <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) databases. The TCGA-LUAD dataset (539 cancer tissue samples and 59 normal tissue samples) was utilized as the training set, while the GSE26939 dataset (116 LUAD cancer tissue samples, platform number GPL9053) was used as the validation set.

Twenty-one DNA replication stress features were obtained from references, including 982 DNARs (*Table 1*) [13, 14].

We collected the gene sequencing data of 119 tumor samples from individuals with urothelial cancer treated with atezolizumab (anti-PD-L1) from the IMvigor210 immune therapy cohort [15]. The GSE78220 dataset (platform number GPL11154) contained tumor samples from melanoma patients treated with anti-PD-1 therapy and was supplied by the GEO database [16].

Differential analysis

The R package “edgeR” [17] was used to conduct a differential analysis on LUAD tissue specimens and normal tissue specimens in the training set, and the differentially expressed genes (DEGs) of LUAD were selected along the criteria of standard FDR < 0.05 and $|\log(\text{FC})| > 1$. The intersection of DEGs and DNARs was used to obtain the LUAD differential genes associated with DNA replication stress (DRSDs).

Prognostic model construction and evaluation

We first screened LUAD tumor patient specimens with a survival time greater than 30 days from the training set based on clinical data. Then, the univariate Cox regression analysis was tapped utilizing the R package “survival” (<https://CRAN.R-project.org/package=survival>) to select the genes in DRSDs significantly associated with the overall survival (OS) of LUAD individuals. To mitigate the risk of overfitting in the statistical model, we employed the LASSO Cox analysis to identify a subset of feature genes from the larger pool of identified genes, utilizing the R packages “glmnet” [18] and “survival.” Feature genes were subjected to a multivariate Cox regression analysis to establish the LUAD prognostic model, using R packages “survival” and “survminer” (<https://rdocumentation.org/packages/survminer/versions/0.4.9>). The formula for calculating the Riskscores was

$$\text{Riskscore} = \sum \text{Coefficient (gene)} \times \text{Expressionvalue (gene)}.$$

Coefficient is the coefficient of the gene. Expressionvalue is the relative expression level of gene standardized by Z-score.

Riskscore was calculated for each LUAD patient sample in both the training and validation sets, and the samples were separated as high-risk (HR) and low-risk (LR) groups as per the median value. The distribution of Riskscore scores, patient survival status, and expression levels of feature factors in the two risk groups of LUAD patient specimens in the train-

ing set were analyzed. Kaplan-Meier survival curves were constructed utilizing the R package “survival” to compare the difference in the survival rates between the patients in the two groups. Receiver operating characteristic (ROC) curves were constructed using the R packages “timeROC” [19] and “survival” to calculate the area under the curve (AUC) and test the prognostic performance of the model.

Independent prognostic analysis, nomogram construction, and evaluation

The Riskscore from the training set was used as the single feature and combined with clinical data to perform univariate Cox and multivariate Cox regression analyses, evaluating the independent ability of the model to predict the patient survival chances. A LUAD prognostic nomogram was constructed using clinical factors and Riskscore, and a calibration curve was utilized to evaluate the disparity between the predicted event rate and the actual event rate. The R packages “rms” [20] and “survival” were used for this analysis. The ROC curves were depicted utilizing the R packages “timeROC” [19] and “survival” to evaluate the performance of the model in forecasting the prognosis of LUAD patients based on nomogram, Riskscore, age, gender, tumor grade, and TNM staging. The standardized net benefit of the nomogram was analyzed using the decision curve analysis (DCA).

Tumor immune analysis

Immune infiltration analysis was done utilizing the R packages “GSVA” [21] and “estimate” (<https://R-Forge.R-project.org/projects/estimate/>). The ssGSEA method was used to analyze immune cell infiltration and function in the HR and LR groups, and the expression of human leukocyte antigen (HLA)-related genes was evaluated. The differences between different risk groups were compared using the Wilcoxon test.

Prediction of immunotherapy response

To forecast the response of the HR and LR groups to immunotherapy, a series of studies were conducted. Immune checkpoints expression was analyzed in the two groups. The immunophenoscore (IPS) demonstrates high accuracy in predicting the response to anti-CTLA-4 and anti-PD-1 therapies, making it a valuable tool for determining the tumor’s likelihood of responding to ICI therapy. The IPS score of each patient was obtained from The Cancer Immunome Atlas (TCIA, <https://tcia.at>), and the differences in IPS scores between the two groups were compared. Tumor Immune Dysfunction and Exclusion (TIDE) can forecast the response to immunotherapy by simu-

lating the main mechanisms of tumor immune escape. We employed TIDE score to predict the response of the two groups to ICI immunotherapy.

Furthermore, we used the Imvigor210 immune therapy cohort of individuals with urothelial cancer treated with the anti-PD-L1 inhibitor atezolizumab and the GSE78220 transcriptome dataset of melanoma individuals treated with anti-PD1 to test the effectiveness of the model in predicting the response to immunotherapy, including treatment efficacy and survival.

Anti-tumor drug screening

To identify potential targets and effective drugs, we used the CellMiner database (<https://discover.nci.nih.gov/cellminer/>) and R package “pRRophetic” (<https://github.com/paulgeeleher/pRRophetic/>) to screen for anti-tumor drugs related to the IC₅₀ of feature genes. Different drug IC₅₀ values were predicted in the two groups, with lower IC₅₀ values indicating a more effective cancer treatment [22].

RESULTS

Identification of DRSDs

This study’s training set included expression data from 539 LUAD cancer tissue specimens and 59 normal tissue specimens. DEGs of the LUAD differential gene sets were obtained through a differential analysis, including 6,005 genes. Among the analyzed genes, we observed differential upregulation in 4,217 genes and differential downregulation in 1,788 genes (*Fig. 1A, Table 2*). Intersection of the DNARs with 982 genes and DEGs was taken to obtain the Venn diagram of DRSDs, which contained 279 genes (*Fig. 1B*).

Establishment of a prognostic model

To develop robust risk features for clinical use, a series of Cox regression analyses were conducted. First, 163 genes that may affect OS were identified from the 279 genes in DRSDs through univariate Cox analysis. Then, 10 candidate genes were determined using LASSO regression (*Fig. 2A,B*). Multivariate Cox analysis showed that the coefficients of 10 feature genes were non-zero, with NT5E being a prognostic risk factor and GTF2H4 being a protective factor. The model was established ground on 10 genes (*Fig. 2C*). The 10-gene LUAD prognostic risk model based on DNA repair stress is shown below:

$$\begin{aligned} \text{Riskscore} = & 0.05 \times \text{HMMR} + 0.03 \times \text{TEX15} + \\ & 0.04 \times \text{PLK1} + 0.10 \times \text{EX01} + 0.09 \times \text{H2BC4} + \\ & 0.21 \times \text{H2AX} - 0.08 \times \text{GTF2H4} + 0.19 \times \text{NME4} + \\ & 0.09 \times \text{UCK2} + 0.16 \times \text{NT5E} \end{aligned}$$

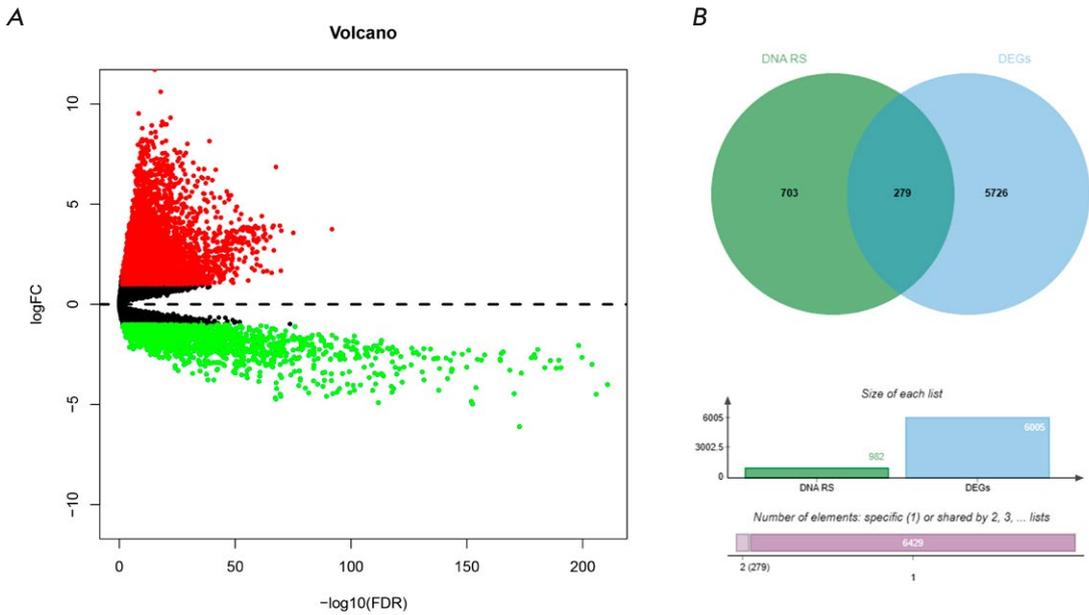


Fig. 1. Screening of DRSDs. (A) Volcano plot of DEGs related to LUAD. (B) Venn diagram of the intersection between DEGs and DNARSs, corresponding to DRSDs

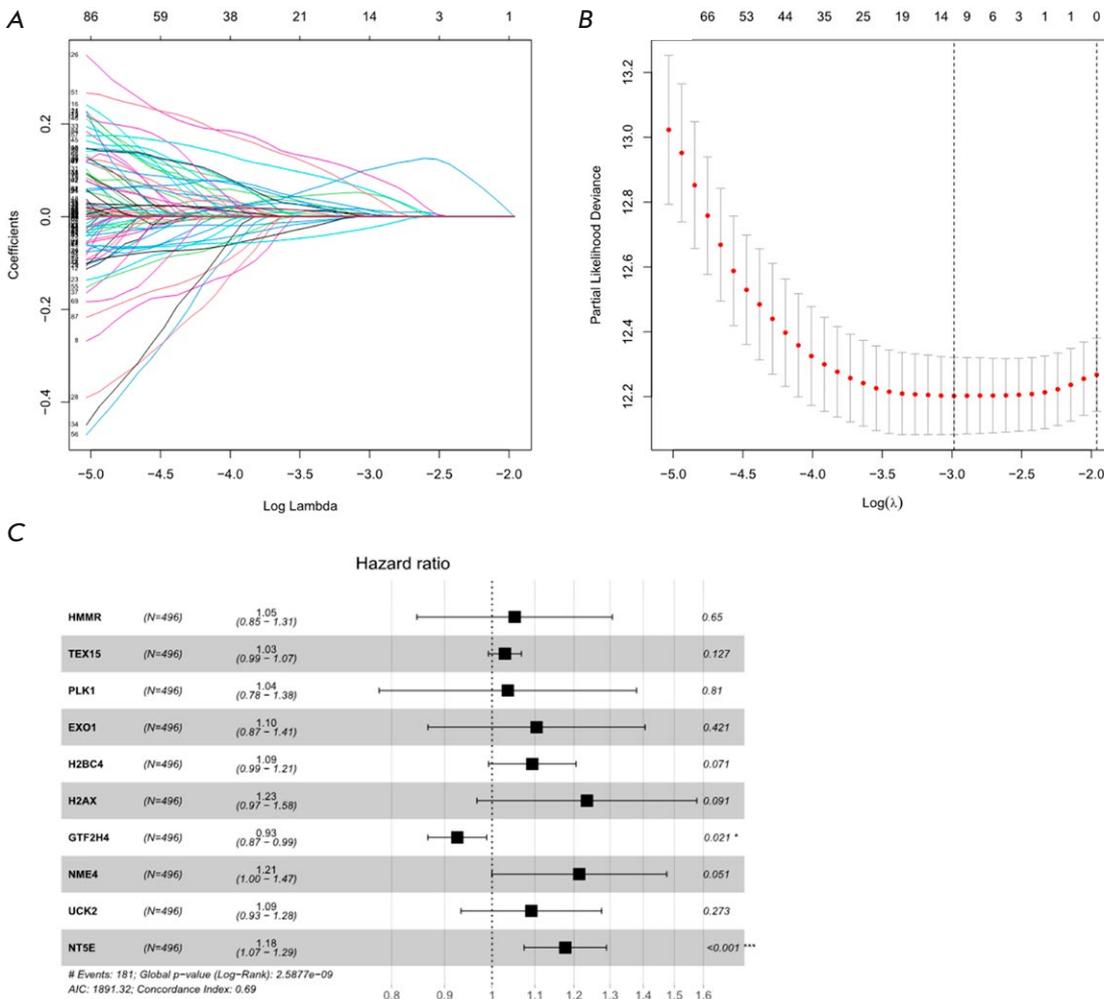


Fig. 2. Construction of a LUAD prognostic model using DRSDs. (A) Cross-validation plot of the logarithmic (λ) sequence in the LASSO model, with the selection of the best parameter (lambda) indicated by the first black dotted line. (B) LASSO coefficient spectrum of 10 OS-related genes. (C) Forest plot of the multivariate Cox regression analysis based on the 10 feature genes in DRSDs

Evaluation of the prognostic model

The Riskscore of LUAD samples in both the training and validation sets were computed by utilizing the LUAD prognostic risk model, and specimens were divided into HR and LR groups accordingly. The distribution of Riskscore values and survival status within the training set revealed that patients in the HR group exhibited a higher mortality rate (Fig. 3A,B). The heatmap of feature gene expression in the training set samples showed that all genes except GTF2H4 were highly expressed in the HR group (Fig. 3C). From the training set, we found that the survival rate of HR patients was lower ($P < 0.05$), indicating better overall prognosis for LR individuals (Fig. 3D). The ROC curve of the training set showed that the AUC values for 1-, 3-, and 5-year were between 0.67 and 0.74, indicating good sensitivity and specificity of the risk model (Fig. 3E). External validation of the validation set showed that patients in the HR group had a lower survival rate than those in the LR group ($P < 0.05$) (Fig. 3F). The ROC curve of the validation set showed the AUC values for 1-, 3-, and 5-year were between 0.69 and 0.73, proving that the risk model also did well in the validation set (Fig. 3G). In summary, the LUAD prognostic model based on DRSDs exhibits high accuracy and reliability in predicting patient likelihood of survival.

Independent prognostic analysis

To examine the independent impact of Riskscore on the survival of LUAD patients, we conducted both univariate and multivariate Cox analyses. These analyses involved incorporating the patients' Riskscore along with other relevant clinical-pathological indicators. The findings revealed that Riskscore independently served as a prognostic factor for LUAD patients' OS (Fig. 4A,B). Then, we combined Riskscore with prognostic clinical features to construct a nomogram for a more comprehensive prediction of patient chances of survival (Fig. 4C). According to the calibration curve, the nomogram predicted the OS of LUAD individuals at 1-, 3-, and 5-year with little difference from the ideal model (Fig. 4D–F). The ROC curve illustrated that the AUC values of Riskscore and the nomogram were 0.7 and 0.73, respectively, higher than those of other clinical factors, indicating good prognostic predictive ability (Fig. 4G). We analyzed the clinical net benefit of the nomogram via DCA curve analysis, which showed that the nomogram was of clinical utility in forecasting the prognosis of LUAD individuals (Fig. 4H). Therefore, the nomogram established here helped predict the survival probability of LUAD patients.

Tumor immune cell infiltration

Tumor immune cell infiltration is tightly linked to tumor progression [23]. By analyzing the immune cell infiltration and immune-related functional pathways between the two groups, we probed the disparities in the immune activity status between the two groups (Fig. 5A,B). The proportions of immune cell infiltration of dendritic cells (aDCs, iDCs), B_cells, Mast_cells, Neutrophils, T_helper_cells, and TIL were tellingly downregulated in the HR group ($P < 0.05$) (Fig. 5A). The immune-related pathway APC_co-inhibition was notably upregulated, while HLA and Type_II_IFN_Response were significantly downregulated in the same group ($P < 0.05$) (Fig. 5B). In addition, most HLA genes were significantly downregulated in the same group ($P < 0.05$) (Fig. 5C). In summary, the proportion of immune cell infiltration in HR LUAD patients was lower compared to that in the LR group.

Prediction of immunotherapy response

The Riskscore of LUAD individuals is tightly linked to their immune function, suggesting that the HR and LR groups may have different responses to immunotherapy. Therefore, we further explored the ability of the prognostic model to predict the immunotherapy response of cancer individuals. Expression of most immune checkpoints was notably higher in the LR group, with significant differences ($P < 0.05$) (Fig. 6A). The IPS score indicated that individuals in the LR group exhibited a better response to CTLA-4 and anti-PD-1 treatment, denoting that LR LUAD individuals had stronger immunogenicity and were more likely to benefit from immune therapy ($P < 0.05$) (Fig. 6B). LR LUAD individuals with lower TIDE scores indicated a weaker inclination to evade the immune system and a stronger inclination to benefit from immune therapy, with significant differences ($P < 0.05$) (Fig. 6C). Since there is currently no transcriptome data on the response of LUAD individuals to ICI treatment, we used other cancer data to ascertain the performance of the model in predicting the immunotherapy response. Using the IMvigor210 and GSE78220 datasets to verify the response of the HR and LR groups, we found that the samples responsive to immunotherapy in the LR group were higher than those in the HR group (Fig. 6D–E), and that OS of the LR group was tellingly better than that of the HR group, showing a better survival trend (Fig. 6F–G). In summary, LR LUAD patients displayed a greater likelihood of responding to immunotherapy than HR patients and had a better prognosis.

Prediction of potential anti-cancer drugs

To mine the response of LUAD patients to anti-cancer drug treatment, we dissected the linkage between

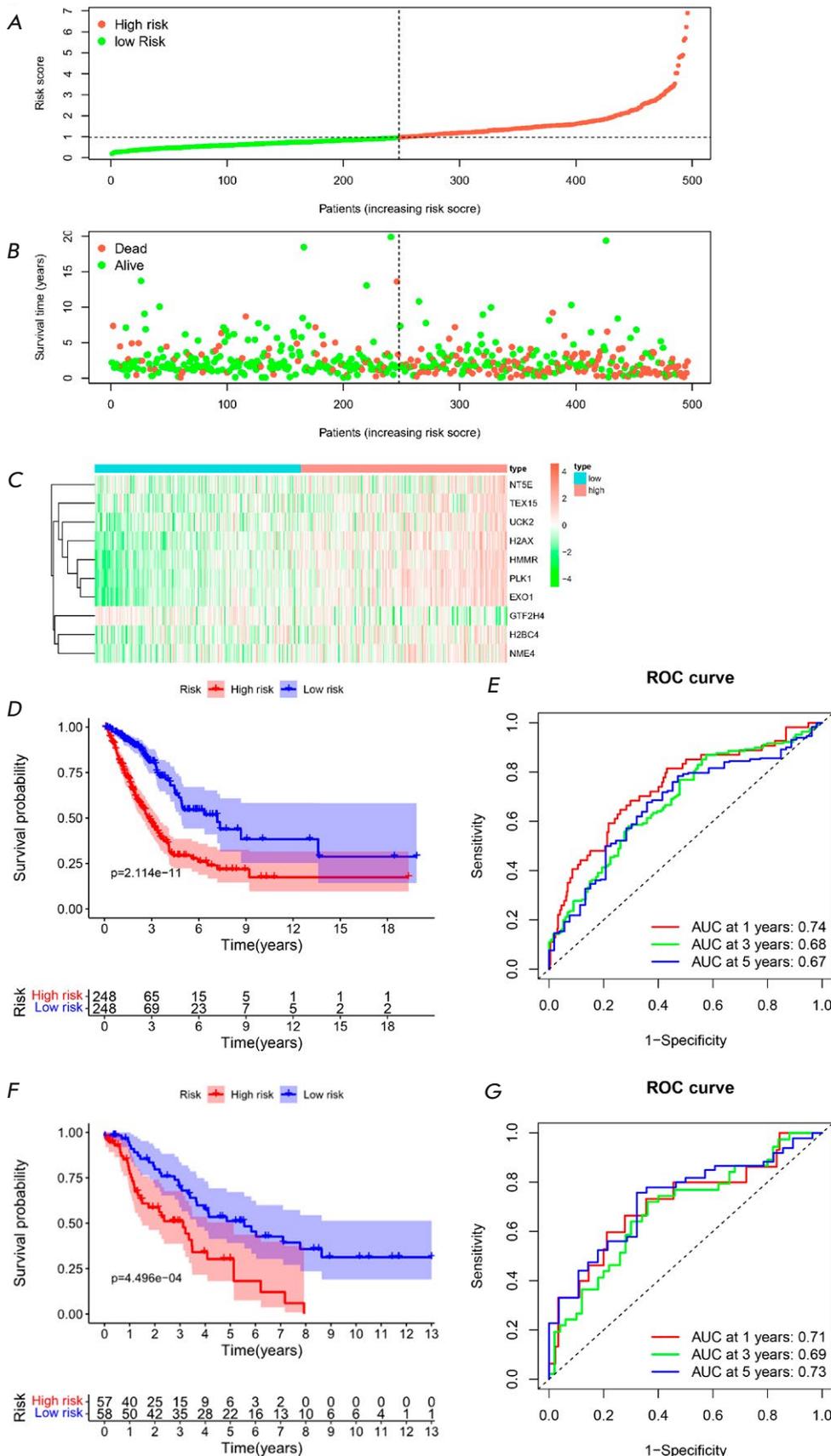


Fig. 3. Performance evaluation of the prognostic model in predicting the prognosis risk of LUAD patients. (A) Distribution of Riskscore values in the TCGA training set, with the dotted line indicating the optimal threshold between the LR and HR groups. (B) Distribution of survival status in the TCGA training set, with the dotted line indicating the optimal threshold between the LR and HR groups. (C) Heatmap of the expression levels of the 10 feature genes in the TCGA training set. (D) Kaplan-Meier survival curve in the TCGA training set. (E) ROC curve in the TCGA training set. (F) Kaplan-Meier survival curve in the GEO validation set. (G) ROC curve in the GEO validation set

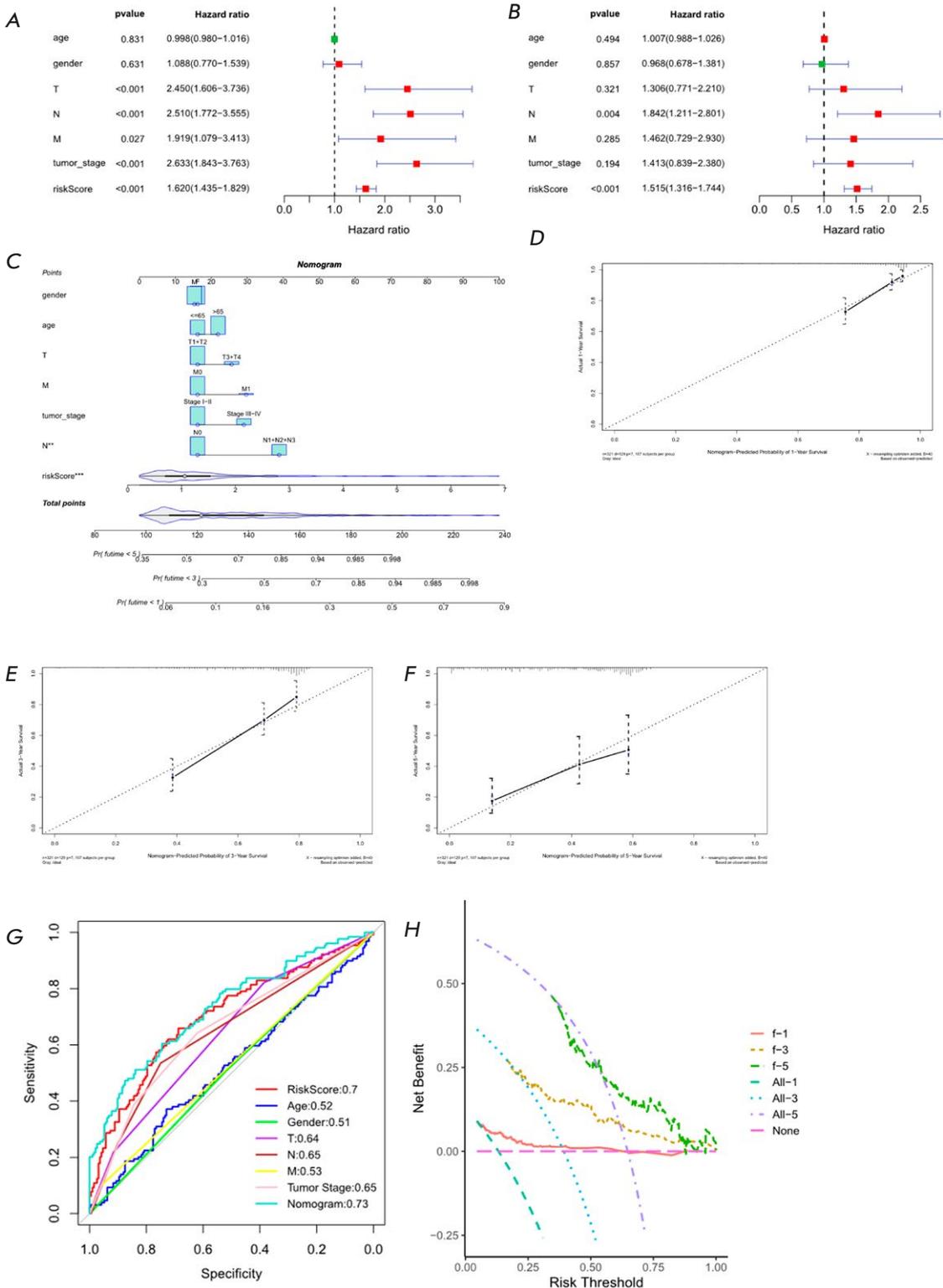


Fig. 4. Independent prognosis analysis of Riskscore in LUAD patients in the TCGA training set. (A) Forest plot of the univariate Cox regression analysis combining Riskscore with clinical information. (B) Forest plot of the multivariate Cox regression analysis combining Riskscore and clinical information on LUAD patients. (C) Nomogram constructed by combining Riskscore and clinical information. (D), (E), and (F) Calibration curves for predicting the risk of 1-, 3-, and 5-year death, respectively. (G) Clinical features, Riskscore, and ROC curve used to diagnose Nomograms. (H) DCA curve for diagnosing Nomograms

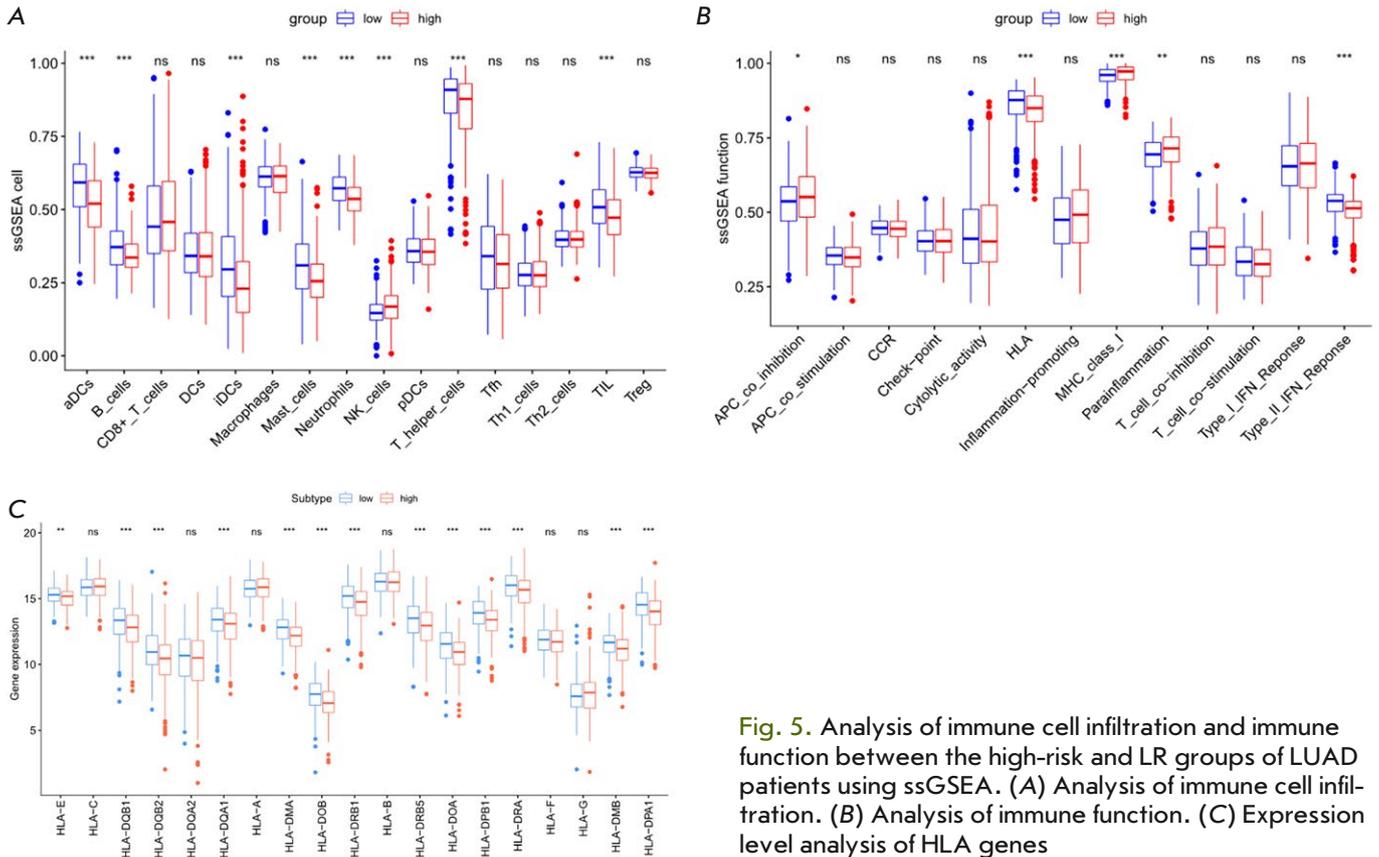


Fig. 5. Analysis of immune cell infiltration and immune function between the high-risk and LR groups of LUAD patients using ssGSEA. (A) Analysis of immune cell infiltration. (B) Analysis of immune function. (C) Expression level analysis of HLA genes

the expression of prognostic feature genes and the IC₅₀ values of drug antagonists, with results displaying a significant positive linkage between the expression of the PLK1 and IC₅₀ value of 5-Fluoro deoxy uridine 10mer (cor = 0.510), while the expression level of NT5E showed a significant negative linkage with the IC₅₀ values of Idarubicin (cor = -0.510), XR-5944 (cor = -0.501), and Fluorouracil (cor = -0.499) (Fig. 7A). Furthermore, we investigated the association between the prognostic risk and drug sensitivity. The findings revealed that the HR group, characterized by a poor OS, exhibited heightened sensitivity to the drugs FTI-277, JNK Inhibitor VIII, CCT018159, and Docetaxel (*P* < 0.001) (Fig. 7B).

CONCLUSION

Despite the availability of various treatments like surgery, radiotherapy, chemotherapy, targeted therapy, and immunotherapy, the mortality rate of LUAD remains high. DNA replication abnormalities are the main cause of genomic instability leading to tumor initiation and progression [24]. DNA replication stress not only affects the autonomous cell response of cancer patients, but also alters the cellular microenvironment, activates innate immune responses, and

helps the organism to protect itself against proliferating damaged cells [25]. Here, we developed a LUAD prognosis model grounded in DNARSSs. In the training and validation cohorts, our novel LUAD prognosis model showed a reliable prognostic prediction performance and can serve as an independent prognostic tool for LUAD patients. The nomogram grounded in the Riskscore and clinical factors exhibits reliability and accuracy in forecasting the survival probability of LUAD individuals. The LR group of LUAD patients is characterized by high anti-tumor immune cell infiltration and high immune activity status.

Based on the Cox regression analysis, we obtained ten DNA replication stress biomarkers that impact the prognosis for LUAD individuals, including HMMR, TEX15, PLK1, EXO1, H2BC4, H2AX, NME4, UCK2, NT5E, and GTF2H4. The expression levels of HMMR, TEX15, PLK1, EXO1, H2BC4, H2AX, NME4, UCK2, and NT5E increased with increase in Riskscore. High expression of HMMR fosters malignant behaviors in LUAD individuals [26]. PLK1 mediates the phosphorylation of SKA3 and enhances the stability of the SKA3 protein, thereby promoting the malignant progression of LC [27]. The high expression of the EXO1 gene is an independent risk factor for a poor

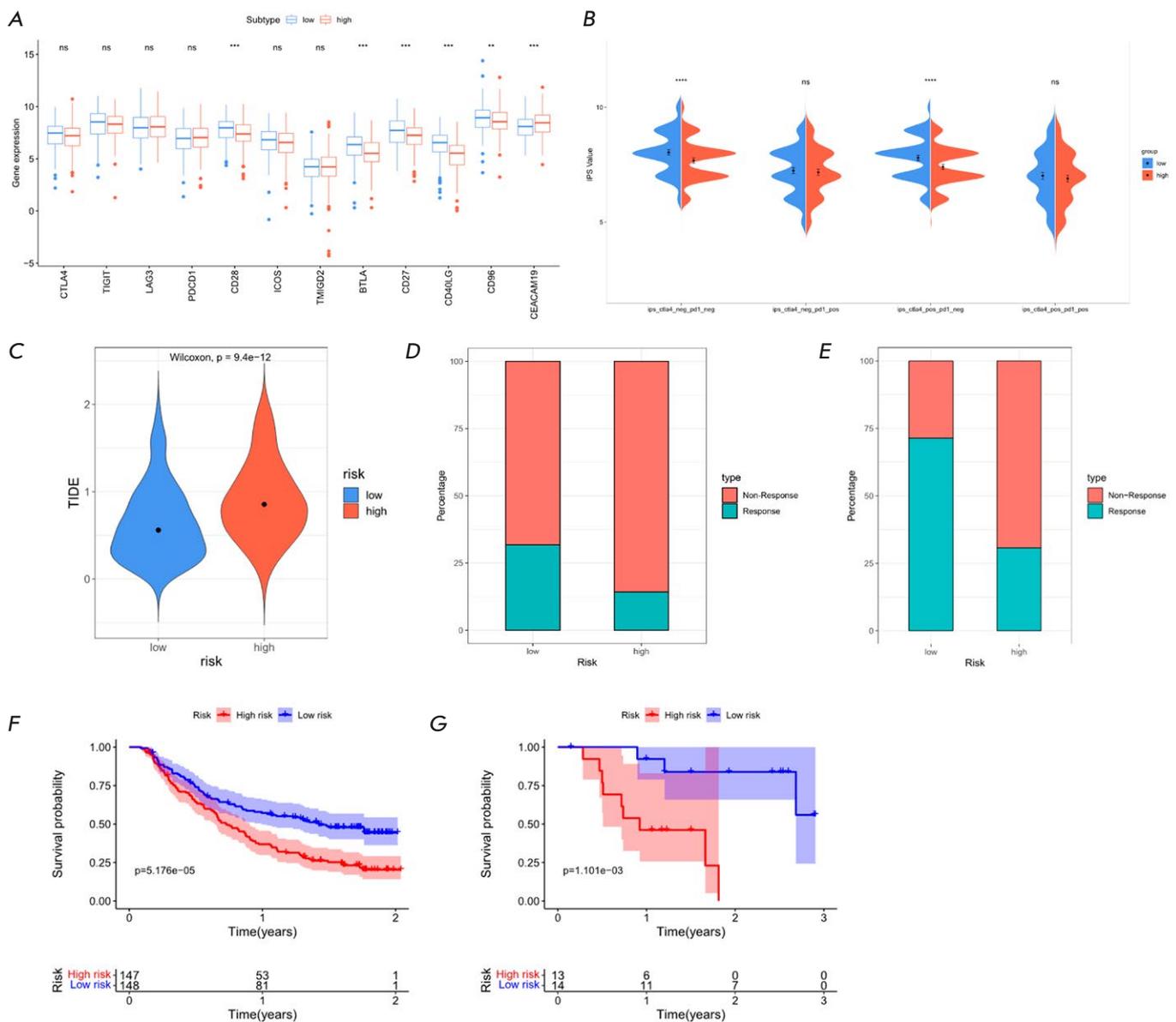


Fig. 6. Analysis of the immunotherapy response in the HR and LR groups of LUAD patients. (A) Boxplot of immune checkpoint expression levels in the HR and LR groups of LUAD patients. (B) Violin plot of IPS scores in the HR and LR groups of LUAD patients. (C) Violin plot of TIDE scores in the HR and LR groups of LUAD patients. (D) ICI treatment response of the HR and LR groups of LUAD patients in the iMvigor210 cohort. (E) ICI treatment response of the HR and LR groups of LUAD patients in the GSE78220 cohort. (F–G) Kaplan-Meier survival curve of the HR and LR groups of LUAD patients in the iMvigor210 (F) and GSE78220 cohorts (G), respectively

prognosis of LUAD, and EXO1 can also predict the response to chemotherapy [28–30]. Phosphorylated γ H2AX at Ser-139 is a cellular response to DNA double-strand breaks and DNA damage, which features in tumor cell apoptosis. Studies have reported that the expression of γ H2AX can predict the efficacy of ICI treatment in LUAD [31, 32]. NME4 affects NSCLC by overcoming cell cycle arrest and enhancing cell proliferation [33]. UCK2 is a rate-limiting enzyme in

the pyrimidine salvage synthesis pathway, which promotes LC cell proliferation and migration [34, 35]. The NT5E gene encodes CD73, which promotes LUAD proliferation and metastasis via the EGFR/AKT/mTOR axis [36, 37]. Additionally, an upregulation in the expression of GTF2H4 results in a corresponding decrease in Riskscore. As research has revealed, a decreased expression of GTF2H4 is associated with a decreased DNA repair capacity. Genetic variations in

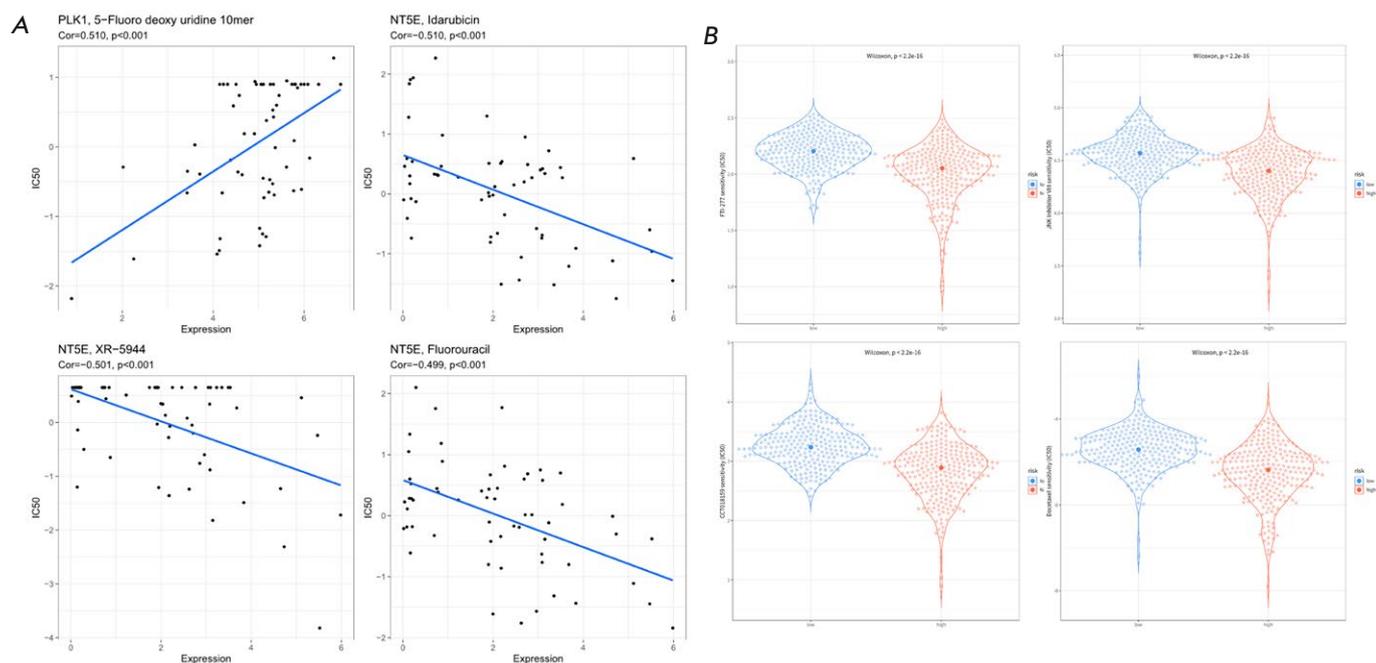


Fig. 7. Prediction of the response of LUAD patients to anticancer drug inhibitors. (A) Correlation between the expression levels of feature genes in LUAD and the IC_{50} values of patients to drug inhibitors. (B) Prediction of the treatment response of LUAD patients to FTI-277, JNK Inhibitor VIII, CCT018159, and Docetaxel in the HR and LR groups of LUAD patients

GTF2H4 raise the risk of LC, and GTF2H4 is a potential predictor of clinical outcomes of platinum-based chemotherapy in NSCLC patients [38, 39]. Although the effects of TEX15 and H2BC4 on LUAD are unknown, the effects of other DNA replication stress biomarkers on the risk of LUAD patient prognosis echo the findings of this study.

ICI therapy has greatly improved the dilemma of cancer treatment, but the probability of a response to ICI therapy in LUAD individuals remains comparatively low, while the majority of cancer patients may not derive substantial benefits from immunotherapy drugs [40]. Compared with HR LUAD patients, LR individuals have higher IPS and significantly lower TIDE scores, indicating that LR LUAD individuals display a greater likelihood of benefiting from immunotherapy. In addition, based on prognostic genes and prognostic risk grouping, it is helpful to highlight the efficacy of chemotherapy drugs widely used in the clinical treatment of LUAD. Idarubicin is an anthracycline chemotherapy drug commonly used to treat malignant tumors like LC and leukemia [41]. Our results showed that LUAD patients with high expression of NT5E were more sensitive to Idarubicin. Docetaxel belongs to the taxane class of chemotherapy drugs and is utilized to treat non-small cell lung cancer. They stabilize microtubules by preventing depolymerization

and cause cell death [42]. Research has shown that LUAD individuals with a high Riskscore are more sensitive to Docetaxel. In addition, research found that the DNA-targeted drugs XR5944 [43], HSP90, and DDX39B inhibitor CCT018159 [44], farnesyl transferase inhibitor FTI-277 [45], and the JNK inhibitor VIII [46] with potential cancer therapeutic effects are related to the risk score of LUAD individuals. In summary, the LUAD prognostic risk score calculated using DNA replication stress biomarkers had the potential to predict the drug treatment response.

In conclusion, we have established a new DRSDs feature with the potential to forecast the immunotherapy response of LUAD individuals. Undeniably, limitations exist. Although the prognostic value of the DRSDs feature we established has been fully validated in the TCGA and GEO cohorts, the retrospective and potential biases of this study still need attention. Secondly, this study only conducted analyses based on public databases, and it is necessary to attempt more *in vitro* and *in vivo* experiments to study the molecular mechanisms of DNARSs affecting LUAD. In addition, external clinical studies are needed to determine the potential estimation accuracy of the DRSDs feature for the prognosis of LUAD individuals who have not received or have received immunotherapy. ●

Huang S. and Shi S. conceived and designed the study. Wen G. collected the data. Lei C. and Liu X. analyzed and interpreted the data. Chang J. and Yin X. contributed to the manuscript writing and editing.

All authors read and approved the final manuscript.

The authors declare that they have no conflicts of interest with the contents of this article.

Tables are available on the website <https://doi.org/10.32607/actanaturae.25112>.

REFERENCES

1. Sung H., Ferlay J., Siegel R.L., Laversanne M., Soerjomataram I., Jemal A., Bray F. // *CA Cancer J. Clin.* 2021. V. 71. № 3. P. 209–249.
2. Chen J.W., Dhahbi J. // *Sci. Rep.* 2021. V. 11. № 1. P. 13323.
3. Hao C.C., Xu C.Y., Zhao X.Y., Luo J.N., Wang G., Zhao L.H., Ge X., Ge X.F. // *J. Exp. Clin. Cancer Res.* 2020. V. 39. № 1. P. 256.
4. Saxena S., Zou L. // *Mol. Cell.* 2022. V. 82. № 12. P. 2298–2314.
5. Maiorano D., El Etri J., Franchet C., Hoffmann J.S. // *Int. J. Mol. Sci.* 2021. V. 22. № 8. P. 3924.
6. Bianco J.N., Bergoglio V., Lin Y.L., Pillaire M.J., Schmitz A.L., Gilhodes J., Lusque A., Mazieres J., Lacroix-Triki M., Roumeliotis T.I., et al. // *Nat. Commun.* 2019. V. 10. № 1. P. 910.
7. Ubhi T., Brown G.W. // *Cancer Res.* 2019. V. 79. № 8. P. 1730–1739.
8. Allera-Moreau C., Rouquette I., Lepage B., Oumouhou N., Walschaerts M., Leconte E., Schilling V., Gordien K., Brouchet L., Delisle M.B., et al. // *Oncogenesis.* 2012. V. 1. № 10. P. e30.
9. Baillie K.E., Stirling P.C. // *Trends Cancer.* 2021. V. 7. № 5. P. 430–446.
10. Zuo S., Wei M., Wang S., Dong J., Wei J. // *Front Immunol.* 2020. V. 11. P. 1218.
11. Sun S., Guo W., Wang Z., Wang X., Zhang G., Zhang H., Li R., Gao Y., Qiu B., Tan F., et al. // *Cancer Med.* 2020. V. 9. № 16. P. 5960–5975.
12. Hu M., Li Y., Lu Y., Wang M., Li Y., Wang C., Li Q., Zhao H. // *PeerJ.* 2021. V. 9. P. e11306.
13. Huang R.H., Hong Y.K., Du H., Ke W.Q., Lin B.B., Li Y.L. // *J. Transl. Med.* 2023. V. 21. № 1. P. 20.
14. Dreyer S.B., Upstill-Goddard R., Paulus-Hock V., Paris C., Lampraki E.M., Dray E., Serrels B., Caligiuri G., Rebus S., Plenker D., et al. // *Gastroenterology.* 2021. V. 160. № 1. P. 362–377.
15. Bala A.V., Galsky M.D., Rosenberg J.E., Powles T., Petrylak D.P., Bellmunt J., Lorient Y., Necchi A., Hoffman-Censits J., Perez-Gracia J.L., et al. // *Lancet.* 2017. V. 389. № 10064. P. 67–76.
16. Hugo W., Zaretsky J.M., Sun L., Song C., Moreno B.H., Hu-Lieskovan S., Berent-Maoz B., Pang J., Chmielowski B., Cherry G., et al. // *Cell.* 2016. V. 165. № 1. P. 35–44.
17. Robinson M.D., McCarthy D.J., Smyth G.K. // *Bioinformatics.* 2010. V. 26. № 1. P. 139–140.
18. Friedman J., Hastie T., Tibshirani R. // *J. Stat. Softw.* 2010. V. 33. № 1. P. 1–22.
19. Blanche P., Dartigues J.F., Jacqmin-Gadda H. // *Stat. Med.* 2013. V. 32. № 30. P. 5381–5397.
20. Huang C., Liu Z., Xiao L., Xia Y., Huang J., Luo H., Zong Z., Zhu Z. // *Front. Oncol.* 2019. V. 9. P. 1159.
21. Hanzelmann S., Castelo R., Guinney J. // *Bioinformatics.* 2013. V. 14. P. 7.
22. Qu X., Zhao X., Lin K., Wang N., Li X., Li S., Zhang L., Shi Y. // *Front. Immunol.* 2022. V. 13. P. 994019.
23. Lv W., Tan Y., Zhou X., Zhang Q., Zhang J., Wu Y. // *Front. Immunol.* 2022. V. 13. P. 989928.
24. Sun Y., Cheng Z., Liu S. // *Mol. Med.* 2022. V. 28. № 1. P. 128.
25. Ragu S., Matos-Rodrigues G., Lopez B.S. // *Genes (Basel).* 2020. V. 11. № 4. P. 409.
26. Wang Q., Wu G., Fu L., Li Z., Wu Y., Zhu T., Yu G. // *Mutation Research.* 2023. V. 826. P. 111811.
27. Ning G., Lu C., Chen Y., Jiang M., Si P., Zhang R. // *Anti-cancer Drugs.* 2023. V. 34. № 7. P. 866–876.
28. Wang S., Cai W., Li J., An W., Zheng H., Liao M. // *Biochem. Genet.* 2022. V. 60. № 6. P. 1934–1945.
29. He J., Wang Z., Wang Y., Zou T., Li X.P., Chen J. // *Dis. Markers.* 2022. <https://doi.org/10.1155/2022/3306189>.
30. Hong M.J., Park J.E., Lee S.Y., Lee J., Choi J.E., Kang H.G., Do S.K., Jeong J.Y., Shin K.M., Lee W.K., et al. // *J. Cancer.* 2022. V. 13. № 15. 3701–3709.
31. Panneerselvam J., Srivastava A., Mehta M., Chen A., Zhao Y.D., Munshi A., Ramesh R. // *Cancers (Basel).* 2019. V. 11. № 12. P. 1879.
32. Sakurai E., Ishizawa H., Kiriya Y., Michiba A., Hoshikawa Y., Tsukamoto T. // *Int. J. Mol. Sci.* 2022. V. 23. № 12. P. 6679.
33. Wang W., Dong M., Cui J., Xu F., Yan C., Ma C., Yi L., Tang W., Dong J., Wei Y. // *Mol. Med. Rep.* 2019. V. 20. № 2. P. 1629–1636.
34. Wu Y., Jamal M., Xie T., Sun J., Song T., Yin Q., Li J., Pan S., Zeng X., Xie S., et al. // *Cancer Sci.* 2019. V. 110. № 9. P. 2734–2747.
35. Fu Y., Wei X.D., Guo L., Wu K., Le J., Ma Y., Kong X., Tong Y., Wu H. // *Front. Oncol.* 2022. V. 12. P. 904887.
36. Kowash R.R., Akbay E.A. // *Front. Immunol.* 2023. V. 14. P. 1130358.
37. Zhang H., Cao Y., Tang J., Wang R. // *Biomed. Res. Int.* 2022. V. 2022. P. 9944847.
38. Song X., Wang S., Hong X., Li X., Zhao X., Huai C., Chen H., Gao Z., Qian J., Wang J., et al. // *Sci. Rep.* 2017. V. 7. № 1. P. 11785.
39. Wang M., Liu H., Liu Z., Yi X., Bickeboller H., Hung R.J., Brennan P., Landi M.T., Caporaso N., Christiani D.C., et al. // *Carcinogenesis.* 2016. V. 37. № 9. P. 888–896.
40. Attili I., Tarantino P., Passaro A., Stati V., Curigliano G., de Marinis F. // *Lung Cancer.* 2021. V. 154. P. 151–160.
41. Capeloa T., Benyahia Z., Zampieri L.X., Blackman M., Sonveaux P. // *Semin. Cell Dev. Biol.* 2020. V. 98. P. 181–191.
42. Borghaei H., Gettinger S., Vokes E.E., Chow L.Q.M., Burgio M.A., de Castro Carpeno J., Pluzanski A., Arrieta O., Frontera O.A., Chiari R., et al. // *J. Clin. Oncol.* 2021. V. 39. № 7. P. 723–733.
43. Buric A.J., Dickerhoff J., Yang D. // *Molecules.* 2021. V. 26. № 14. P. 4132.
44. Tu Q., Liu X., Yao X., Li R., Liu G., Jiang H., Li K., Chen Q., Huang X., Chang Q., et al. // *J. Exp. Clin. Cancer Res.* 2022. V. 41. № 1. P. 274.
45. Tateishi K., Tsubaki M., Takeda T., Yamatomo Y., Immano M., Satou T., Nishida S. // *J. BUON.* 2021. V. 26. № 2. P. 606–612.
46. Heslop K.A., Rovini A., Hunt E.G., Fang D., Morris M.E., Christie C.F., Gooz M.B., DeHart D.N., Dang Y., Lemasters J.J., et al. // *Biochem. Pharmacol.* 2020. V. 171. P. 113728.

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 Редакцией 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.