

# Acta Naturae

Животные модели митохондриальных заболеваний, вызванных мутациями в ядерных генах



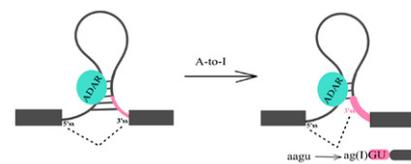
ЭКСПРЕССИЯ RIPK3  
В ФИБРОБЛАСТАХ В МОДЕЛИ  
КОЖНОЙ РАНЫ *IN VIVO* И *IN VITRO*:  
ПРОТИВОРЕЧИВЫЙ РЕЗУЛЬТАТ  
СТР. 65

ПРОТИВОВИРУСНАЯ АКТИВНОСТЬ  
*IN VITRO* НОВОГО ПРОИЗВОДНОГО  
ИНДОЛ-3-КАРБОНОВОЙ КИСЛОТЫ  
В ОТНОШЕНИИ SARS-CoV-2  
СТР. 83

## Кооперация и конкуренция вторичной структуры и РНК-белковых взаимодействий в регуляции альтернативного сплайсинга

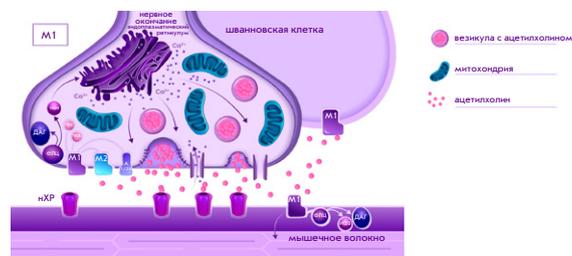
М. А. Воробьева, Д. А. Скворцов, Д. Д. Первушин

Регуляция альтернативного сплайсинга в клетках эукариот осуществляется за счет скоординированного действия большого числа факторов, включающих в РНК-связывающие белки и структуру РНК. Структура РНК оказывает влияние на альтернативный сплайсинг, блокируя цис-регуляторные элементы, а также приближая или отдаляя их друг от друга. В сочетании с РНК-связывающими белками вторичная структура способствует образованию конформаций транскриптов, необходимых для получения нужных сплайс-изоформ. Однако связывание регуляторных белков зависит от структуры РНК, и, наоборот, формирование структуры РНК зависит от взаимодействия с регуляторами. Таким образом, структура РНК и РНК-связывающие белки являются неотделимыми компонентами общих регуляторных механизмов. В обзоре рассмотрены примеры регуляции альтернативного сплайсинга РНК-связывающими белками, примеры регуляции локальными и дальними взаимодействиями в структуре РНК, а также их совместные действия, кооперация и конкуренция.



Совместное действие вторичной структуры РНК и РНК-белковых взаимодействий

## Мускариновые холинорецепторы в скелетной мышце: локализация и функциональная роль



Схематическое изображение локализации мускариновых холинорецепторов подтипа M1 и сопряженных с ним сигнальных путей в нервно-мышечном синапсе позвоночных

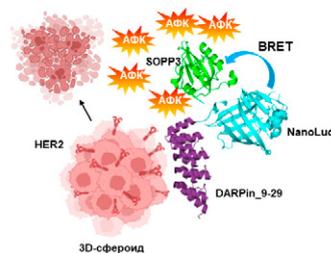
И. В. Ковязина, А. А. Хамидуллина

В обзоре рассмотрены современные представления о функциях мускариновых холинорецепторов в скелетной мышце, в частности, в нервно-мышечном синапсе, а также о сигнальных путях, связанных с активацией разных подтипов этих рецепторов в скелетных мышцах холоднокровных и теплокровных животных. Обсуждаются различные подходы к изучению функций мускариновых рецепторов в моторных синапсах, а также проблемы, возникающие при интерпретации экспериментальных данных. Заключительная часть обзора посвящена анализу внутриклеточных механизмов и сигнальных путей, опосредующих эффекты мускариновых агентов на параметры нервно-мышечной передачи.

## Система для самоактивируемой адресной фотодинамической терапии на основе мультимодального белка DARP-NanoLuc-SOPP3

Е. И. Шрамова, А. Ю. Фролова, В. П. Филимонова, С. М. Деев, Г. М. Прошкина

В работе предложена полностью биосовместимая система на основе мультимодального белка DARP-NanoLuc-SOPP3 для адресной HER2-специфичной самоактивируемой фотодинамической терапии (ФДТ). Принцип работы системы основан на биоломинесцентном резонансном переносе энергии. Данная система позволяет преодолеть проблему ограниченной глубины проникновения возбуждающего света в ткани, а также проблему индуцированных солнечным светом фотодерматозов вследствие аберрантного накопления химических фотосенсибилизаторов в коже.



Система на основе мультимодального белка DARP-NanoLuc-SOPP3 для адресной BRET-индуцированной ФДТ

# Acta Naturae

ТОМ 15, № 4 (59), ОКТЯБРЬ—ДЕКАБРЬ 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 декабря 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

О. А. Аверина, С. А. Кузнецова,

О. А. Пермяков, П. В. Сергиев

**Животные модели митохондриальных  
заболеваний, вызванных мутациями**

**в ядерных генах . . . . . 4**

М. А. Воробьева, Д. А. Скворцов,

Д. Д. Первушин

**Кооперация и конкуренция вторичной  
структуры и РНК-белковых взаимодействий  
в регуляции альтернативного сплайсинга . . . . . 23**

С. А. Голышев, Е. П. Казаков, И. И. Киреев,

Д. Г. Реунов, И. В. Малышев

**Микроскопия мягкого рентгеновского  
диапазона в клеточной биологии:**

**современное состояние, вклад и перспективы . . 32**

## СОДЕРЖАНИЕ

И. В. Ковязина, А. А. Хамидуллина  
**Мускариновые холинорецепторы  
в скелетной мышце: локализация  
и функциональная роль** ..... 44

Е. В. Лапшин, Ю. Г. Гершович, А. В. Карабельский  
**Потенциал и использование индуцированных  
плюрипотентных стволовых клеток  
в генной и клеточной терапии ретинопатий  
и оптических нейропатий** ..... 56

### ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ СТАТЬИ

И. С. Изюмов, М. С. Шитова,  
М. С. Сабиров, С. А. Шелег,  
О. Л. Черкашина, Е. П. Калабушева,  
Е. А. Воротеляк, Е. И. Моргун  
**Экспрессия RIPK3 в фибробластах  
в модели кожной раны *in vivo* и *in vitro*:  
противоречивый результат** ..... 65

А. В. Машковская, С. С. Марьясина,  
М. В. Серебрякова, М. П. Рубцова,  
О. А. Донцова, П. В. Сергиев  
**Проверка метилирования митохондриальной  
12S рРНК предполагаемой  
метилтрансферазой METTL17** ..... 75

А. Н. Наровлянский, М. В. Филимонова,  
Н. Г. Цышкова, А. В. Пронин,  
Т. В. Гребенникова, Э. В. Карамов,  
В. Ф. Ларичев, Г. В. Корнилаева,  
И. Т. Федякина, И. В. Должикова,  
М. В. Мезенцева, Е. И. Исаева,  
В. В. Полосков, Л. С. Коваль,  
В. П. Маринченко, В. И. Суринова,  
А. С. Филимонов, А. А. Шитова,  
О. В. Солдатова, А. В. Санин,  
И. К. Зубашев, А. В. Пономарев,  
В. В. Веселовский, В. В. Козлов,  
А. В. Степанов, А. В. Хомич,  
В. С. Козлов, С. А. Иванов,  
П. В. Шегай, А. Д. Каприн,  
Ф. И. Ершов, А. Л. Гинцбург  
**Противовирусная активность *in vitro*  
нового производного индол-3-карбоновой  
кислоты в отношении SARS-CoV-2** ..... 83

А. Ю. Фролова, С. В. Кутяков, В. И. Мартынов,  
С. М. Деев, А. А. Пахомов  
**Производное красителя BODIPY  
для необратимого флуоресцентного  
маркирования эукариотических  
клеток и их одновременного  
цитометрического анализа** ..... 92

Е. И. Шрамова, А. Ю. Фролова,  
В. П. Филимонова, С. М. Деев, Г. М. Прошкина  
**Система для самоактивируемой  
адресной фотодинамической терапии  
на основе мультимодального белка  
DARP-NanoLuc-SOPP3** ..... 100

О. К. Gasymov, М. J. Bakhishova,  
R. B. Aslanov, L. A. Melikova, J. A. Aliyev  
**Membrane Partitioning of TEMPO Discriminates  
Human Lung Cancer from Neighboring  
Normal Cells** ..... 111

Правила для авторов ..... 121



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

УДК 576.311.347: 575.224:577.2

# Животные модели митохондриальных заболеваний, вызванных мутациями в ядерных генах

О. А. Аверина<sup>1,2,3</sup>, С. А. Кузнецова<sup>1\*</sup>, О. А. Пермяков<sup>1,3</sup>, П. В. Сергиев<sup>1,2,3</sup><sup>1</sup>Институт функциональной геномики, Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, Москва, 119991 Россия<sup>2</sup>Научно-исследовательский институт физико-химической биологии имени А.Н. Белозерского, Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, Москва, 119991 Россия<sup>3</sup>Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, химический факультет, Москва, 119991 Россия

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

Поступила в редакцию 25.08.2023

Принята к печати 05.10.2023

DOI: 10.32607/actanaturae.25442

**РЕФЕРАТ** Митохондриальные болезни, вызываемые мутациями в ядерных генах, входят в большую группу наследственных заболеваний, при которых наблюдается угнетение энергетического обмена. Эти заболевания представляют особый интерес, поскольку ядерные гены кодируют не только большинство структурных белков системы окислительного фосфорилирования (ОХРНOS), но и все белки, участвующие в их импорте из цитоплазмы и сборке в митохондриях. Дефекты в любом из этих белков могут привести к функциональному нарушению работы дыхательной цепи, включая дисфункцию комплекса I, играющего центральную роль в процессах клеточного дыхания и окислительного фосфорилирования, что является наиболее частой причиной митопатологий. Митохондриальные болезни проявляются в раннем возрасте и характеризуются прогрессирующим течением и поражением, в первую очередь, энергоемких тканей и органов. Терапию митохондриальных болезней необходимо начинать как можно раньше, однако их диагностика затрудняется гетерогенностью заболеваний и перекрыванием спектров их клинических проявлений. Для понимания молекулярного патогенеза митохондриальных болезней создают животные модели, т.е. животных с мутациями, проявления которых напоминают симптомы митопатологий человека. Использование животных моделей открывает новые возможности в исследовании функций генов, кодирующих митохондриальные белки, молекулярных механизмов возникновения и развития митопатологий, что необходимо для усовершенствования диагностики и разработки подходов к лекарственной терапии. В представленном обзоре суммированы и сопоставлены современные сведения о митохондриальных заболеваниях, вызванных мутациями в ядерных генах, и животных моделях, созданных для их изучения.

**КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА** митохондриальные болезни, ядерные гены, мутации, животные модели.

**СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ** МБ – митохондриальные болезни; мтДНК – митохондриальная ДНК; яДНК – ядерная ДНК; ОХРНOS – окислительное фосфорилирование; FGF – факторы роста фибробластов.

## ВВЕДЕНИЕ

Митохондриальные болезни (МБ), вызванные мутациями в ядерных генах, представляют собой гетерогенную группу наследственных заболеваний, затрагивающих все процессы, связанные с митохондриями. яДНК кодирует не только большинство структурных белков системы окислительного фосфорилирования (ОХРНOS, примерно 80 белков), но и все белки, необходимые для их импорта из цитоплазмы и сборки в митохондриях. Дефекты

любого из этих белков могут привести к функциональному нарушению работы дыхательной цепи и, следовательно, к развитию МБ. Такой же негативный эффект может вызывать и дисфункция белков, влияющих на стабильность и/или целостность мтДНК. К МБ приводят также некоторые нарушения, явно вызванные дефектами белков, функционирующих в других органеллах, например, WFS1 в эндоплазматическом ретикулуме или EIF2S3 в цитоплазме [1, 2].

Мутации в яДНК, вызывающие МБ, являются ау-тосомно-доминантными или рецессивными, а также могут находиться в X-хромосоме. Они обнаружены более чем в 300 генах, что составляет 78.5% от общего количества генов, мутации в которых приводят к МБ [3, 4].

Окислительное фосфорилирование обеспечивает энергией большинство клеток и тканей млекопитающих. Система ОХРНОС включает пять мульти-субъединичных белковых комплексов, содержащих более 80 белков, кодируемых яДНК, а также 13 субъединиц, кодируемых мтДНК. Мутации индивидуальных компонентов системы ОХРНОС являются причиной гетерогенной группы врожденных нарушений метаболизма – первичных МБ.

Наиболее часто к развитию МБ приводит дис-функция комплекса I, крупнейшего ферментатив-ного комплекса системы ОХРНОС, играющего цен-тральную роль в процессах клеточного дыхания и окислительного фосфорилирования [5]. Симптомы дефицита комплекса I чаще всего проявляют-ся в детском возрасте: примерно 75% пациентов не доживают до 10 лет и почти 50% из них умира-ют в возрасте до 2 лет [6]. В 1998 г. была описана первая мутация в кодируемой яДНК субъединице комплекса I, вызывающая синдром Лея (Leigh) [7]. Синдром Лея диагностируют почти у 80% детей с дефицитом комплекса I и примерно 70% из них связаны с мутациями в яДНК. У больных с син-дромом Лея наблюдается развитие энцефалопатии, гипотонии, а также задержка развития, психомо-торные дисфункции, дистония, судороги, дисфагия, дыхательная недостаточность и ранняя смертность [8]. Комплекс I (NADH:убихинооксидоредуктаза) представляет собой L-образный многобелковый комплекс размером 1 МДа, состоящий из 45 раз-личных субъединиц, организованных в шесть мо-дулей (N, Q, ND1, ND2, ND4, ND5), локализованных на гидрофобном и гидрофильном (периферийном) плечах. С МБ, вызванными дефицитом компле-кса I, связывают мутации в 39 различных ядерных генах. Большинство приводящих к МБ мутаций в ядерных генах локализованы в генах субъединиц NADH-дегидрогеназы и Q-модуля гидрофильного плеча. Мутации найдены как в основных каталити-ческих субъединицах (NDUFV1, NDUFV2, NDUFS1, NDUFS2, NDUFS3, NDUFS7, NDUFS8), так и в субъ-единицах, отвечающих за сборку и стабильность комплекса I (NDUFS4, NDUFS6, NDUFA2, NDUFA12, NDUFA13, NDUFA1, NDUFA6, NDUFA8, NDUFA9, NDUFA10, NDUFA11, NDUFB3, NDUFB8, NDUFB9, NDUFB10, NDUFB11, NDUFC2), что в целом вы-зывает дефицит NADH:убихинооксидоредуктазы. Дестабилизация комплекса I также приводит к не-

скольким дополнительным дефектам, включая из-менение морфологии митохондриальной сети, мем-бранного потенциала, внутриклеточного гомеостаза кальция и гиперпродукцию активных форм кисло-рода. Пока не обнаружены и/или не опубликованы данные о мутациях в 13 генах, связанных с МБ: *NDUFA5, NDUFAB1, NDUFS5, NDUFB4, NDUFV3, NDUFC1, NDUFB1, NDUFB2, NDUFB5, NDUFB6, NDUFAF7, ECSIT, NDUFA3*. Однако благодаря все бо-лее часто применяемой стратегии секвенирования экзона или всего генома в ближайшее время можно ожидать обнаружения новых патологических мута-ций [3, 5].

Диагностика МБ, включающая оценку уров-ня лактата, аланина, глюкозы и FGF в сыворотке крови, электронно-микроскопический и гистохи-мический анализ ультраструктуры митохондрий и определение ферментативной активности ком-понентов ОХРНОС, представляет сложную задачу. Гетерогенность клинических проявлений МБ обу-славливает сложность как в постановке правильного диагноза, так и в выборе терапии. Многие симптомы МБ имеют общие черты с другими наследственны-ми болезнями, такими, как сахарный диабет, ин-сульт или кардиомиопатия [4]. Эти проблемы мо-гут быть решены при помощи моделирования МБ на животных. Мутантные животные модели могут пролить свет на механизмы развития МБ и функ-ции генов, кодирующие митохондриальные белки. Высокая консервативность митохондриальных бел-ков обуславливает широкий выбор модельных объ-ектов для исследования последствий мутаций у че-ловека.

### **ЖИВОТНЫЕ МОДЕЛИ МИТОХОНДРИАЛЬНЫХ ЗАБОЛЕВАНИЙ**

Выбор животной модели МБ всегда остается пред-метом многочисленных дискуссий. Ни одна модель по своей сути не является «хорошей» или «плохой»; о ценности отдельной модели можно судить толь-ко в контексте конкретного проекта. При выборе вида, пола, генетических свойств модельного объ-екта отталкиваются от направления исследования и поставленных целей для достижения максималь-но адекватного переноса результатов, полученных на животных, на человека. Также необходимо про-анализировать возможность использования организ-мов, стоящих на более низкой ступени эволюции, без ущерба для получения репрезентативных ре-зультатов. Немалую роль в выборе эксперименталь-ного организма должны играть факторы доступ-ности объекта, удобства манипуляций, стоимости проведения исследований и простоты обслужива-ния. При выборе объекта необходимо основывать-

ся на генетической и физиологической гомологии. Генетическая дивергенция между человеком и другими млекопитающими составляет порядка 90 млн лет. Например, между человеком и такими модельными объектами, как карликовые свиньи (*Porcula salvania*) и овцы (*Ovis aries*), она достигает 94 млн лет, а между человеком и кроликами (*Oryctolagus cuniculus*) и крысами (*Rattus norvegicus*) – 87 млн лет [9]. В связи с этим геномы всех млекопитающих считаются сравнительно схожими. Однако в течение многих лет именно лабораторная мышь (*Mus musculus*) остается квинтэссенцией модельных объектов для исследования генетических МБ человека. В целом, мыши и человек имеют практически одинаковый набор генов. Области генома мыши и человека, кодирующие белок, идентичны примерно на 85%. Почти каждый ген, найденный у одного вида, обнаружен в близкородственной форме у другого; при этом одни гены идентичны на 99%, а другие только на 60% [10].

Первые генетические исследования на мышах отталкивались не от изменения генотипа, моделирующего патологию, а от схожих с исследуемой патологией фенотипов, возникающих вследствие случайных, спонтанных мутаций или вызванных воздействием мутагенных факторов. С появлением методов редактирования генома мышей отпала необходимость подбора соответствующего фенотипа после случайного мутагенеза, стало возможным создавать в геноме мыши специфические мутации и изучать их последствия. Таким образом, мышинные модели чрезвычайно важны для выяснения функций генов и исследования патологических процессов, связанных с мутациями в этих генах [11].

Разработаны мыши с измененным геномом, моделирующие более 50% МБ, вызванных мутациями ядерных генов. Однако в половине случаев полная инактивация исследуемого гена приводит к эмбриональной летальности, хотя подобная патологическая мутация может быть причиной смерти в раннем возрасте [3–5, 12]. Для преодоления этого препятствия в моделировании заболеваний анализируют животных с гетерозиготными мутациями в интересующем гене. Хотя у одних гетерозиготных мутантов патологический фенотип не проявляется, другие становятся модельными объектами; например, у гетерозиготных мышей *Risp*<sup>+P224S</sup> ожидаемо снижена активность митохондриального комплекса III [13], а мыши *Tfam*<sup>+/-</sup> характеризуются синдромом истощения (резкое снижение содержания) мтДНК, характерным для людей с мутацией данного гена [14]. Другим подходом к исследованию жизненно необходимых генов стало создание условных тканеспецифичных нокаутов этих генов. Такие нокауты

разработаны почти для всех летальных мутаций в ядерных генах МБ в тканях и органах, которые более всех должны быть подвержены поражению при каждой конкретной мутации [3–5, 12]. В случае эмбриональной летальности идеальным объектом исследования становятся икринки рыб *Danio rerio* и амфибий *Xenopus laevis*, их мальки и головастики соответственно [15–17]. Эти модели хорошо зарекомендовали себя в исследованиях с редактированием генома [18]. На ранних стадиях развития *D. rerio* и *X. laevis* являются полупрозрачными, что позволяет непрерывно в реальном времени оценивать и контролировать развитие основных внутренних органов. При этом *D. rerio* и *X. laevis* развиваются независимо от родительского организма и доступны для непосредственного воздействия препаратами на разных стадиях эмбриогенеза [19]. Кроме того, разработана батарея поведенческих тестов, позволяющих анализировать нейродегенеративные нарушения на этих животных [20, 21].

К сожалению, возникают ситуации, когда манипуляции с мышинным геномом, которые должны приводить к развитию МБ, не отражают клиническую картину этой патологической мутации у человека [22]. Такие результаты, с одной стороны, связывают с более высокой устойчивостью мышей к МБ [23], а с другой, некоторые мутации у человека могут проявляться в сочетании с более сложными факторами, такими, как образ жизни и сопутствующие заболевания [24]. Выходом в подобных случаях может стать использование другой животной модели. Например, при обнаружении мутации гена, кодирующего митохондриальный белок, участвующий в сборке цитохром-с-оксидазы, у человека диагностируют синдром Лея, однако конститутивный нокаут *SURF1*<sup>-/-</sup> у мыши не воспроизводит тяжесть клинического фенотипа у человека. Поэтому в данном случае подходящими модельными объектами стали мутантные свиньи *SURF1*<sup>-/-</sup> с характерной общей задержкой развития, мышечной слабостью, «младенческой» задержкой развития центральной нервной системы и резко сниженной продолжительностью жизни [25].

Следует отметить вклад альтернативных объектов исследования в моделирование основных митохондриальных процессов и некоторых аспектов патологий человека:

Лабораторные рыбки *D. rerio* считаются оптимальной альтернативой мышам. На них можно смоделировать синдром Лея, в частности, с дисфункцией печени, а также МБ, затрагивающие нервную, иммунную и сердечно-сосудистую системы. Кроме того, как упоминалось выше, разработаны поведенческие тесты для оценки нарушений двигатель-

ной активности и сенсорных реакций, характерных для клинических проявлений МБ [26].

Нематода *Caenorhabditis elegans* и плодовая муха *Drosophila melanogaster*, несмотря на их сильную дивергенцию от человека (686 млн лет [9]), стали мощными генетическими моделями МБ с большим потенциалом в ранних высокопроизводительных скринингах терапевтических агентов [27, 28].

Микроорганизмы также используются для изучения МБ. Так, функции митохондрий у человека и *Saccharomyces cerevisiae* (дрожжи) в высокой степени сходны. В дрожжах можно воспроизвести патогенные мутации, которые приводят к дисфункции митохондрий у человека. Дрожжи показали себя хорошей альтернативной моделью для изучения МБ [29] и скрининга терапевтических соединений [30].

Таким образом, создание надежных животных моделей позволяет исследовать функции генов, кодирующих митохондриальные белки, молекулярные механизмы возникновения и развития МБ, что необходимо для усовершенствования диагностики и разработки подходов к лекарственной терапии.

### ЖИВОТНЫЕ МОДЕЛИ МИТОХОНДРИАЛЬНЫХ ЗАБОЛЕВАНИЙ ЧЕЛОВЕКА, ВЫЗВАННЫХ МУТАЦИЯМИ В ЯДЕРНЫХ ГЕНАХ (СВОДНАЯ ТАБЛИЦА)

В результате анализа публикаций, посвященных описанию различных МБ [4, 5], а также информации, представленной в регулярно обновляемых ресурсах Genomics England PanelApp [3] и Online Mendelian Inheritance in Man [12], нами создана таблица, в которой суммированы самые современные данные по МБ, вызванным мутациями в ядерных генах, и эти данные сопоставлены с соответствующими животными моделями. Таблица содержит информацию о клинических проявлениях МБ, о мутациях в конкретных ядерных генах, вызывающих определенные МБ, о типе наследования, а также

приведены подробные описания животных моделей, соответствующих данным МБ. Эта сводная таблица может быть полезна как для планирования и анализа поисковых и клинических исследований, так и для написания научных трудов и публикаций.

### ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Митохондриальные болезни считаются одними из наиболее распространенных генетических заболеваний, они могут возникать при рождении или развиваться в течение жизни. Генетические мутации, вызывающие эти заболевания, разнообразны, поэтому при описании фенотипического эффекта той или иной мутации исследователи сталкиваются с проблемой, заключающейся в том, что последствия мутации представляют собой целый спектр разнообразных клинических проявлений. В связи с этим остро стоит задача описать фенотипы митохондриальных мутаций и выявить механизмы, посредством которых те или иные мутации в генах, кодирующих митохондриальные белки, проявляются на уровне целого организма. Эта проблема может быть решена с помощью моделирования МБ на живых организмах. Манипуляции с геномом экспериментальных объектов, особенно мышей, зачастую способны точно смоделировать клиническую картину МБ человека, предоставляя возможность исследовать молекулярные механизмы патологических процессов, проводить тестирование лекарственных препаратов, прогнозировать их эффективность и подбирать новые методы лечения. ●

*Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов. Работа поддержана грантом Российского научного фонда № 17-75-30027 и частично профинансирована из бюджета Института функциональной геномики МГУ имени М.В. Ломоносова.*

#### Животные модели митохондриальных заболеваний человека, вызванные мутациями в ядерных генах

Ген	Клиническая картина	Тип наследования
<b>Дефицит митохондриального комплекса I</b>		
<i>ACAD9</i> acyl-CoA dehydrogenase family, member 9	<ul style="list-style-type: none"> <li>• гипертрофическая кардиомиопатия,</li> <li>• снижение толерантности к физической нагрузке,</li> <li>• легкий дефицит бета-окисления</li> </ul>	Аутосомно-рецессивный
<p>Мыши с нокаутом <i>Acad9</i> [31]:</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• полная инактивация <i>Acad9</i> приводит к эмбриональной летальности;</li> <li>• при кардиоспецифичном нокауте <i>Acad9</i> в сердечной ткани не экспрессируются гены <i>Acadvl</i> (кодирует длинноцепочечную ацил-СоА-дегидрогеназу) и <i>Ecsit</i> (кодирует белок, участвующий в сборке комплекса I), снижена экспрессия <i>Acadm</i>, кодирующего среднецепочечную ацил-СоА-дегидрогеназу, показана дисфункция комплекса I;</li> <li>• диагностируется развитие кардиомиопатии с утолщением предсердий и желудочков к 14-му дню жизни;</li> <li>• при тканеспецифичном для мышц нокауте <i>Acad9</i> снижена толерантность к физической нагрузке и лактоацидоз.</li> </ul>		

## ОБЗОРЫ

<i>NDUFS1</i> NADH-ubiquinone oxidoreductase Fe-S protein 1	<ul style="list-style-type: none"> <li>• синдром Лея,</li> <li>• кавитирующая лейкоэнцефалопатия</li> </ul>	Аутосомно-рецессивный
Гомозиготный нокаут гена <i>Ndufs1</i> мыши летален [32].		
<i>NDUFS4</i> NADH-ubiquinone oxidoreductase Fe-S protein 4	<ul style="list-style-type: none"> <li>• комбинированный дефицит комплексов I и III,</li> <li>• синдром Лея,</li> <li>• гипертрофическая кардиомиопатия</li> </ul>	Аутосомно-рецессивный
Мыши с полным нокаутом гена <i>Ndufs4</i> [33–35]: <ul style="list-style-type: none"> <li>• Лея-подобный синдром,</li> <li>• атаксия, неврологические нарушения,</li> <li>• задержка развития,</li> <li>• развитие слепоты к 21 дню жизни,</li> <li>• ранняя смертность.</li> </ul> Тканеспецифичный нокаут <i>Ndufs4</i> , направленный на нейроны и глию [36]: <ul style="list-style-type: none"> <li>• летальная прогрессирующая энцефалопатия,</li> <li>• реактивный фенотип глиальных клеток, потеря нейронов, атаксия;</li> <li>• нарушение дыхания.</li> </ul> Кардиоспецифичный нокаут <i>Ndufs4</i> [37, 38]: <ul style="list-style-type: none"> <li>• гипертрофическая кардиомиопатия.</li> </ul> Точечная мутация в гене <i>Ndufs4</i> [39]: <ul style="list-style-type: none"> <li>• эмбриональная летальность гомозиготных мышечей <i>Ndufs4</i><sup>-/-</sup>,</li> <li>• снижение активности комплекса I у гетерозиготных мышечей на фоне стабильной работы комплекса II.</li> </ul>		
<i>NDUFS6</i> NADH-ubiquinone oxidoreductase Fe-S protein 6	<ul style="list-style-type: none"> <li>• лактоацидоз с летальным исходом в неонатальном периоде,</li> <li>• митохондриальная энцефаломиопатия,</li> <li>• синдром Лея</li> </ul>	Аутосомно-рецессивный
Мыши с нокаутом гена <i>Ndufs6</i> [40, 41]: <ul style="list-style-type: none"> <li>• кардиомиопатия, систолическая дисфункция,</li> <li>• заболевание почек с изменением ультраструктуры.</li> </ul>		
<i>NDUFX1</i> NADH-ubiquinone oxidoreductase flavo protein 1	<ul style="list-style-type: none"> <li>• митохондриальная энцефаломиопатия,</li> <li>• церебральная атаксия,</li> <li>• синдром Лея</li> </ul>	Аутосомно-рецессивный
Трансгенная линия <i>Caenorhabditis elegans</i> (почвенная нематода) по гену <i>Nio-1</i> , гомологу <i>Ndufv1</i> [42]: <ul style="list-style-type: none"> <li>• лактоацидоз,</li> <li>• снижение NADH-зависимого митохондриального дыхания,</li> <li>• гиперчувствительность к экзогенному окислительному стрессу.</li> </ul>		
<i>NUBPL</i> nucleotide-binding protein-like protein	<ul style="list-style-type: none"> <li>• лейкоэнцефалопатия</li> </ul>	Аутосомно-рецессивный
Гомозиготный нокаут гена <i>Nubpl</i> мыши летален [32].		
<i>NDUFA7</i> NADH dehydrogenase (ubiquinone) complex I, assembly factor 7	<ul style="list-style-type: none"> <li>• патологическая миопия</li> </ul>	
Летальность мышечей с гомозиготным нокаутом гена <i>Ndufaf7</i> [15]. Морфолинопосредованный нокаут <i>Ndufaf7</i> у <i>D. rerio</i> [15]: <ul style="list-style-type: none"> <li>• задержка вылупления мальков,</li> <li>• морфологические аномалии,</li> <li>• снижение активности комплекса I.</li> </ul>		
<i>NDUFS7</i> NADH-ubiquinone oxidoreductase Fe-S protein 7	<ul style="list-style-type: none"> <li>• синдром Лея</li> </ul>	Аутосомно-рецессивный
Гомозиготный нокаут гена <i>Ndufs7</i> мыши летален [32].		
<i>NDUFA1</i> NADH-ubiquinone oxidoreductase subunit a1	<ul style="list-style-type: none"> <li>• синдром Лея</li> </ul>	X-сцепленный рецессивный
Мутантные мыши с направленным разрушением мРНК субъединицы комплекса I, <i>Ndufa1</i> [43]: <ul style="list-style-type: none"> <li>• дефицит комплекса I, увеличение уровня активных форм кислорода,</li> <li>• поражение зрительного нерва и сетчатки.</li> </ul>		

<p><i>NDUFA13</i> NADH-ubiquinone oxidoreductase subunit a13 или <i>GRIM19</i> gene associated with retinoid- &amp; interferon-induced mortality 19</p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• энцефалопатия на фоне сенсорной недостаточности,</li> <li>• синдром Лея,</li> <li>• рак щитовидной железы</li> </ul>	<p>Аутосомно-рецессивный</p>
<p>Мутантные мыши с дефицитом Grim19 [44]:</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• эмбрионы Grim19<sup>-/-</sup> погибают к 9.5 дню эмбрионального развития,</li> <li>• замедление и аномалии развития бластоцист Grim19<sup>-/-</sup> на фоне нарушений в структуре митохондрий и дефектного комплекса I (в норме Grim19 располагается в комплексе I и отвечает за его сборку),</li> <li>• гетерозиготные мыши Grim19<sup>+/-</sup> не имеют физиологических и фенотипических аномалий.</li> </ul>		
<p><i>NDUFA8</i> NADH-ubiquinone oxidoreductase subunit a8</p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• задержка развития,</li> <li>• микроцефалия,</li> <li>• эпилепсия,</li> <li>• потеря веса и отставание в физическом развитии,</li> <li>• дефекты в развитии речи</li> </ul>	<p>Аутосомно-рецессивный</p>
<p>Гомозиготный нокаут гена <i>Ndufa8</i> мыши летален [32].</p>		
<p><i>NDUFB11</i> NADH-ubiquinone oxidoreductase 1 beta subcomplex, 11</p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• множественные врожденные пороки развития,</li> <li>• микрофтальмия с линейными кожными дефектами (MLS-синдром),</li> <li>• эмбриональная мужская летальность,</li> <li>• лактоацидоз,</li> <li>• гистиоцитозная кардиомиопатия,</li> <li>• офтальмомигррия,</li> <li>• дефекты кожи</li> </ul>	<p>X-сцепленный</p>
<p>Нокаут гена <i>Ndufb11</i> у <i>Drosophila</i> [45]:</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• сокращение продолжительности жизни,</li> <li>• снижение скорости метаболизма,</li> <li>• дефекты сборки комплекса I,</li> <li>• увеличение уровня лактата и пирувата.</li> </ul>		
<p style="text-align: center;"><b>Дефекты электрон-транспортной цепи митохондрий; нарушение OXPHOS</b></p>		
<p><i>UCP2</i> uncoupling protein 2</p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• ожирение</li> </ul>	<p>Не показано</p>
<p>Мыши с нокаутом гена <i>Ucp2</i> [46, 47]:</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• отсутствие ожирения, нормальная реакция на воздействие холода или диету с высоким содержанием жиров,</li> <li>• устойчивы к инфекции <i>Toxoplasma gondii</i> (образует кисты в головном мозге) за счет увеличения уровня активных форм кислорода в макрофагах,</li> <li>• повышенная секреция инсулина, стимулированная глюкозой, что специфично для сахарного диабета II типа.</li> </ul> <p>Мутантные мыши с повышенной экспрессией <i>Ucp2</i> в гипокретиновых (орексин) нейронах [48]:</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• у этих мутантных мышей повышена температура гипоталамуса, что приводит к общему снижению температуры тела на 0.3–0.5°C,</li> <li>• данные мутанты обладают повышенной энергетической эффективностью и большей средней продолжительностью жизни.</li> </ul> <p>Мыши с нокаутом гена <i>Ucp1</i> [49]:</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• чувствительны к холоду, что указывает на нарушение терморегуляции,</li> <li>• накапливают избыточный жир в буро-жировой ткани, но не становятся тучными,</li> <li>• потерю <i>Ucp1</i> компенсирует <i>Ucp2</i>, экспрессирующийся в буром эпидидимальном жире.</li> </ul> <p>Мыши с нокаутом гена <i>Ucp3</i> [50]:</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• инактивация <i>Ucp3</i> связана с повышенной регуляцией <i>Ucp1</i> и <i>Ucp2</i> в буро-жировой ткани,</li> <li>• в скелетных мышцах увеличивается соотношение дыхания состояний 3 и 4, как следствие утечки протонов,</li> <li>• в скелетных мышцах повышение производства активных форм кислорода и снижение митохондриальной аконитазы.</li> </ul>		
<p><i>PDHA1</i> pyruvate dehydrogenase, alpha-1</p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• нарушение связи между гликолизом и циклом трикарбоновых кислот,</li> <li>• синдром Лея,</li> <li>• дефицит пируватдегидрогеназы E1-альфа,</li> <li>• неврологическая дисфункция,</li> <li>• лактоацидоз,</li> <li>• задержка роста,</li> <li>• ранняя смертность</li> </ul>	<p>X-сцепленный доминантный</p>
<p>Инактивация гена <i>Pdha1</i> пируватдегидрогеназы мыши эмбрионально летальна [51]. Мутантные <i>D. rerio</i> с дефектами зрительной функции «ноа» (no optokinetic response a) имеют дефицит дигидролипоамид-S-ацетилтрансферазы (<i>Dlat</i>), субъединицы PDH E2 [16]:</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• фенотип, сходный с синдромом дефекта комплекса пируватдегидрогеназы у человека (неврологическая дисфункция, лактоацидоз, задержка роста, ранняя смерть).</li> </ul>		

## ОБЗОРЫ

<i>PDSS2</i> renyl diphosphate syn- thase, subunit 2	<ul style="list-style-type: none"> <li>• дефект синтеза убихинона, CoQ10,</li> <li>• энцефаломиопатия,</li> <li>• тубулопатия,</li> <li>• атаксия</li> </ul>	Аутосомно- рецессивный
<p>Эмбриональная летальность мышей с нокаутом гена <i>Pdss2</i> [52].</p> <p>Тканеспецифичный нокаут <i>Pdss2</i>, нацеленный на подоциты почечных клубочков [52]:</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• нефротический синдром без изменений уровня кофермента Q в гомогенатах почек.</li> </ul> <p>Тканеспецифичный нокаут <i>Pdss2</i>, нацеленный на гепатоциты [52]:</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• истощение кофермента Q в гомогенатах печени,</li> <li>• дисфункция митохондриальной дыхательной цепи,</li> <li>• нарушение основных метаболических процессов.</li> </ul> <p>Тканеспецифичный нокаут <i>Pdss2</i>, нацеленный на почки (<i>Pdss2<sup>kd/kd</sup></i>) [53]:</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• аномалии ультраструктуры почечных митохондрий, почечная недостаточность CoQ, снижение активности дыхательной цепи, повышенный окислительный стресс,</li> <li>• развитие нефропатии с протеинурией вплоть до летальной почечной недостаточности,</li> <li>• аномалии мозжечка.</li> </ul>		
<i>COQ9</i> coenzyme Q9	Дефицит коэнзима Q10 (убихинона)	Аутосомно- рецессивный
<p>Мыши с укороченной мутацией R239X в гене <i>Coq9</i> [54]:</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• нарушение дыхания митохондрий с потерей АТФ и активности комплекса I,</li> <li>• энцефаломиопатия,</li> <li>• гибель нейронов, демиелинизация, вакуолизация, губчатая дегенерация и астроглиоз,</li> <li>• фиброз сердца,</li> <li>• нарушение двигательной функции и прогрессирующий паралич,</li> <li>• ранняя смертность.</li> </ul>		
<i>CYCS</i> cytochrome C somatic isoform	• тромбоцитопения	Аутосомно- доминантный
<p>Дефицит Cyt C у мышей вызывает эмбриональную гибель и ослабляет стресс-индуцированный апоптоз [55]. Мыши, экспрессирующие мутантный Cyt C (аллель КА), с сохранением функции переноса электронов, но с дисфункцией активации Araf-1 [56]:</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• экзенцефалия и гидроцефалия,</li> <li>• кахексия,</li> <li>• лимфопения.</li> </ul>		
<i>COQ2</i> coenzyme Q2, polyprenyltransferase	<ul style="list-style-type: none"> <li>• энцефаломиопатия,</li> <li>• тубулопатия,</li> <li>• атаксия</li> </ul>	Аутосомно- рецессивный
	• склонность к множественной системной атрофии	Аутосомно- рецессивный / доминантный
Гомозиготный нокаут гена <i>Coq2</i> у мыши летален [32].		
<b>Дефицит митохондриального комплекса II</b>		
<i>SDHD</i> succinate dehydrogenase complex, subunit D, integral membrane protein	<ul style="list-style-type: none"> <li>• параганглиома и стромальная саркома желудка,</li> <li>• феохромоцитома</li> </ul>	Аутосомно- рецессивный / доминантный
Гомозиготный нокаут гена <i>Sdhd</i> у мыши летален [57, 58].		
<i>SDHA</i> succinate dehydrogenase complex, subunit A, flavo protein	<ul style="list-style-type: none"> <li>• синдром Лея,</li> <li>• кардиомиопатия</li> </ul>	Аутосомно- рецессивный
	<ul style="list-style-type: none"> <li>• нейродегенерация с атаксией,</li> <li>• атрофия зрительного нерва,</li> <li>• параганглиома</li> </ul>	Аутосомно- доминантный
Гомозиготный нокаут гена <i>Sdha</i> у мыши летален [32].		

Дефицит митохондриального комплекса III		
<i>BCS1L</i> BCS1 homolog, ubiquinol-cytochrome c reductase complex chaperone	<ul style="list-style-type: none"> <li>энцефалопатия,</li> <li>тубулопатия,</li> <li>печеночная дисфункция,</li> <li>синдром Бьёрнстада,</li> <li>GRACILE-синдром</li> </ul>	Аутосомно-рецессивный
Мыши с гомозиготной мутацией <i>Bcs1l</i> [59]: <ul style="list-style-type: none"> <li>мышинная модель синдрома GRACILE – неонатального МБ с поражением печени и почек,</li> <li>задержка роста и короткая продолжительность жизни,</li> <li>истощение печеночного гликогена, стеатоз, фиброз, цирроз, тубулопатия,</li> <li>лактоацидоз,</li> <li>дефицит комплекса III в печени, сердце и почках.</li> </ul>		
<i>UQCRFS1</i> ubiquinol-cytochrome c reductase, rieske iron-sulfur или <i>RISP</i> Rieske iron-sulfur protein	<ul style="list-style-type: none"> <li>гипертрофическая кардиомиопатия,</li> <li>тромбоцитопения,</li> <li>гипотония,</li> <li>повышенный уровень лактата и аланина в сыворотке,</li> <li>незначительные нарушения двигательных навыков со снижением мышечной силы</li> </ul>	Аутосомно-рецессивный
Гомозиготная мутация <i>Risp</i> у мышей летальна [13]. У гетерозиготных мутантов <i>Risp<sup>+P224S</sup></i> мыши [13]: <ul style="list-style-type: none"> <li>снижена активность комплекса III на фоне падения уровня железосерного белка «RISP»,</li> <li>снижен общий метаболизм и продолжительность жизни у самцов, но не у самок.</li> </ul> Условный нокаут по гену <i>Risp</i> в нейронах мыши (сКО) с использованием системы Cre-loxP [60]: <ul style="list-style-type: none"> <li>короткая продолжительность жизни,</li> <li>внезапная смерть с минимальными поведенческими изменениями,</li> <li>потеря веса,</li> <li>циклическая гиперактивность,</li> <li>сниженная работоспособность,</li> <li>обширный окислительный стресс,</li> <li>нейродегенеративные заболевания, гибель нейронов, поражение пириформной и соматосенсорной коры головного мозга, связанное с дефектом СIII области головного мозга.</li> </ul> Мутантные мыши с инактивацией <i>Risp</i> в регуляторных Т (Treg)-клетках [61]: <ul style="list-style-type: none"> <li>Treg-специфический дефицит комплекса III,</li> <li>развитие раннего, летального воспалительного заболевания,</li> <li>потеря способности подавлять Т-клетки без изменения пролиферации и выживания клеток Treg,</li> <li>увеличение метилирования ДНК.</li> </ul>		
Дефицит митохондриального комплекса IV		
<i>COX4I2</i> или <i>COX4-2</i> cytochrome C oxidase, subunit 4i2 / IV, isoform 2	<ul style="list-style-type: none"> <li>экзокринная панкреатическая недостаточность,</li> <li>дизэритропоэтическая анемия,</li> <li>гиперостоз свода черепа,</li> <li>специфическая для легких изоформа субъединицы Cox4 CIV</li> </ul>	Аутосомно-рецессивный
Мутантные мыши с инактивацией гена <i>Cox4I2</i> [62]: <ul style="list-style-type: none"> <li>патология легких с воспалением и формированием кристаллов Шарко–Лейдена (в мокроте при бронхиальной астме)</li> </ul>		
<i>COX6A2</i> cytochrome C oxidase, subunit 6a2	<ul style="list-style-type: none"> <li>ранняя гипотония,</li> <li>слабость лицевых мышц и конечностей,</li> <li>высокий свод неба,</li> <li>дыхательная недостаточность,</li> <li>кардиомиопатия,</li> <li>нарушение умственного развития</li> </ul>	Аутосомно-рецессивный
Мутантные <i>Cox6a2<sup>-/-</sup></i> мыши [63]: <ul style="list-style-type: none"> <li>стабильный аномально низкий вес даже на фоне высокожировой диеты, связанный с неэффективным энергетическим обменом, повышенным расходом энергии и адаптивным термогенезом,</li> <li>высокие уровни экспрессии <i>Ucp1</i> и <i>2</i> в сердце и жировой ткани,</li> <li>волокна скелетных мышц функционируют в более медленном окислительном режиме,</li> <li>увеличение размера митохондрий мышц,</li> <li>повышенная толерантность к глюкозе и чувствительность к инсулину, что связано с повышенным фосфорилированием и конститутивной активацией <i>Ampk</i>.</li> </ul>		

<p>COX10 cytochrome C oxidase assembly factor</p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• дефицит митохондриального комплекса IV,</li> <li>• атаксия,</li> <li>• ацидоз,</li> <li>• гипогликемия,</li> <li>• гипотония,</li> <li>• митохондриальная энцефалопатия,</li> <li>• мышечная слабость,</li> <li>• опущение верхнего века,</li> <li>• пирамидный синдром,</li> <li>• проксимальная тубулопатия,</li> <li>• эпилептическое состояние,</li> <li>• кардиомиопатия,</li> <li>• гипотрофия,</li> <li>• лактоацидоз,</li> <li>• синдром Лея</li> </ul>	<p>Аутосомно- рецессивный</p>
<p>Мыши с тканеспецифичной для мышц инактивацией гена <i>Cox10</i> [64]:</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• регрессивная миопатия и слабость,</li> <li>• ранняя смертность,</li> <li>• прогрессирующее снижение активности COX и повышение активности SDH в мышцах,</li> <li>• нервно-мышечная патология, гистологически выявленные признаки разорванных красных волокон,</li> <li>• аномальные митохондрии.</li> </ul> <p>Мыши с тканеспецифичной для нейронов инактивацией гена <i>Cox10</i> [65]:</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• снижение активности COX в коре головного мозга и гиппокампе,</li> <li>• ранняя смертность,</li> <li>• уменьшение размера и снижение плотности клеток переднего мозга,</li> <li>• дефекты поведения.</li> </ul> <p>Мыши с тканеспецифичной для печени инактивацией гена <i>Cox10</i> [66]:</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• ранняя смертность,</li> <li>• митохондриальная гепатопатия,</li> <li>• снижение массы тела и общей активности,</li> <li>• тяжелая дисфункция печени,</li> <li>• сниженная активность COX и повышенная активность SDH,</li> <li>• увеличение пролиферации митохондрий и снижение уровня АТФ,</li> <li>• накопление липидов и исчерпание гликогена.</li> </ul> <p>Условный нокаут гена <i>Cox10</i> характеризуется дисфункцией олигодендроцитов и шванновских клеток формировать COX [67]:</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• тяжелая невропатия с демиелинизацией, аномальные пучки Ремака в периферической нервной системе,</li> <li>• мышечная атрофия, паралич,</li> <li>• нарушение митохондриального дыхания.</li> </ul>		
<p>SURF1 surfeit 1</p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• синдром Лея,</li> <li>• амиотрофия Шарко–Мари–Тута</li> </ul>	<p>Аутосомно- рецессивный</p>
<p>Мыши с инактивацией гена <i>Surf1</i>, кодирующего фактор сборки комплекса IV (COX). Мутанты <i>Surf1Neo<sup>-/-</sup></i> (замена 5–7 экзонов на кассету неомицирезистентности) [68]:</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• 90% эмбриональная летальность (предположительно вызвана не инактивацией <i>Surf1</i>, а присутствием кассеты нео или удалением регуляторных элементов),</li> <li>• сокращение продолжительности жизни,</li> <li>• снижение двигательной активности, координации, мышечной силы и выносливости без явных аномалий морфологии головного мозга или неврологических симптомов,</li> <li>• подавление фертильности у обоих полов,</li> <li>• гистохимический анализ скелетных мышц и печени показал снижение активности COX и повышение SDH,</li> <li>• падение активности COX до 23–40% от нормы в разных тканях.</li> </ul> <p>Мутанты <i>Surf1loxP<sup>-/-</sup></i> (введение последовательности loxP в экзон 7, генерирующий стоп-кодон в положении 225, с устранением 81 С-концевой аминокислоты) [69]:</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• отсутствие эмбриональной летальности,</li> <li>• увеличение продолжительности жизни,</li> <li>• гистохимический анализ скелетных мышц показал снижение активности COX и повышение SDH,</li> <li>• снижение активности COX на 50–70% в различных тканях,</li> <li>• неврологические дефекты не развиваются, а проявляется устойчивость к опосредованному Ca<sup>2+</sup> поражению изолированных нейронов и головного мозга в целом,</li> <li>• митохондрии сохраняют нормальную морфологию и мембранный потенциал.</li> </ul> <p>Мутантные свиньи <i>SURF1<sup>-/-</sup></i> [25]:</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• общая задержка развития,</li> <li>• младенческая задержка развития центральной нервной системы,</li> <li>• мышечная слабость,</li> <li>• короткая продолжительность жизни,</li> <li>• дефицит цитохром-с-оксидазы в ворсинках тощей кишки (гистохимический анализ).</li> </ul>		

SCO2 SCO cytochrome C oxidase assembly protein 2	<ul style="list-style-type: none"> <li>• синдром Лея,</li> <li>• гипертрофическая кардиомиопатия,</li> <li>• невропатия</li> </ul>	Аутосомно-рецессивный
<ul style="list-style-type: none"> <li>• миопия</li> </ul>		Аутосомно-доминантный
<p>Мышиная модель с нокаутом <i>Sco2</i><sup>-/-</sup> эмбрионально летальна [70]. Гомозиготные мыши со вставкой в гене <i>Sco2</i> или с мутацией в компаунд-гетерозиготном состоянии жизнеспособны и демонстрируют недостаточность дыхательной цепи, дефекты сборки IV комплекса, снижение содержания меди в митохондриях и общую мышечную слабость [70].</p>		
COX15 cytochrome C oxidase assembly factor	<ul style="list-style-type: none"> <li>• синдром Лея,</li> <li>• гипертрофическая кардиомиопатия</li> </ul>	Аутосомно-рецессивный
<p>Мыши с гомозиготным нокаутом <i>Cox15</i><sup>-/-</sup> эмбрионально летальны [71]. Мыши с тканеспецифичной для скелетной мышцы мутацией имеют тяжелую миопатию [71].</p>		
<p><b>Дефицит митохондриального комплекса V (АТФ-синтазы)</b></p>		
<p>Дефекты АТФ-синтазы чаще всего связаны с мутациями мтДНК. Что касается мутаций в ядерных генах, то выделено пять генов, связанных с МБ человека. Три из них, <i>АТФ5А1</i>, <i>АТФ5D</i> и <i>АТФ5Е</i>, кодируют структурные α-, δ- и ε-субъединицы фермента соответственно, а два других, <i>АТРАF2</i> и <i>ТМЕМ70</i>, кодируют специфические вспомогательные факторы, облегчающие биогенез АТФ-синтазы. Все эти дефекты имеют сходный фенотип с выраженным генерализованным снижением содержания АТФ-синтазного комплекса:</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• неонатальная гипотония,</li> <li>• лактоацидоз,</li> <li>• гипераммониемия,</li> <li>• гипертрофическая кардиомиопатия,</li> <li>• 3-метилглутаконовая ацидурия.</li> </ul> <p>Мутации в генах <i>АТФ5А1</i>, <i>АТФ5D</i>, <i>АТФ5Е</i> и <i>АТРАF2</i> встречаются очень редко, а животные модели с этими мутациями в большинстве случаев летальны. Напротив, мутации в гене <i>ТМЕМ70</i> представляют собой наиболее частую причину дефицита АТФ-синтазы.</p>		
ТМЕМ70 transmembrane protein 70	<ul style="list-style-type: none"> <li>• энцефалопатия,</li> <li>• лицевой дисморфизм,</li> <li>• гипертрофическая кардиомиопатия,</li> <li>• лактоацидоз</li> </ul>	Аутосомно-рецессивный
<p>Мыши с гомозиготным нокаутом <i>Tmem70</i><sup>-/-</sup> [72]:</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• эмбриональная летальность,</li> <li>• у эмбрионов задержка развития сердечно-сосудистой системы, нарушение ультраструктуры митохондрий сердца с кристами неправильной структуры.</li> </ul> <p>Мыши с гетерозиготным нокаутом <i>Tmem70</i><sup>+/-</sup> [72]:</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• жизнеспособны,</li> <li>• нормальный постнатальный рост и развитие митохондриальной системы OXPHOS,</li> <li>• легкое ухудшение функции сердца.</li> </ul> <p>Крысы с нокаутом гена <i>Tmem70</i>, созданным на генетическом бэкграунде линии SHR и под контролем универсального промотора EF-1α [73]:</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• жизнеспособная модель,</li> <li>• генетическая комплементация восстановила экспрессию <i>Tmem70</i> в различных тканях,</li> <li>• для полного восстановления физиологических функций митохондрий биохимической комплементации биогенеза АТФ-синтазы в печени достаточно 20% белка ТМЕМ70 и одноаллельной экспрессии <i>Tmem70</i>, а в сердце не менее 40% ТМЕМ70 и оба трансгенных аллеля.</li> </ul>		
<p><b>Истощение (снижение содержания) мтДНК</b></p>		
ТУМР thymidine phosphorylase	<ul style="list-style-type: none"> <li>• синдром истощения мтДНК,</li> <li>• митохондриальная нейрогастроинтестинальная энцефаломиопатия</li> </ul>	Аутосомно-рецессивный
<p>Мыши с двойным нокаутом <i>Upp1/ Tump</i> [74, 75]:</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• критический дефицит Тумр, повышенный уровень тимидина и дезоксиуридина в тканях, высокий уровень митохондриального дезокситимидинтрифосфата,</li> <li>• частичное истощение мтДНК, недостаточность комплексов дыхательной цепи и энцефалопатия,</li> <li>• интенсивные поражения головного мозга из-за повышения уровня пиримидина в плазме и последующего отека аксонов.</li> </ul>		

<i>ANT1</i> adenine nucleotide translocator 1	• синдром истощения мтДНК	Аутосомно-доминантный / рецессивный
	• гипертрофическая кардиомиопатия, • гипотония	Аутосомно-рецессивный
	• прогрессирующая внешняя офтальмоплегия	Аутосомно-доминантный
<p>Инактивация гена <i>Ant1</i> у мышей [76, 77]:</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• митохондриальная миопатия, гипертрофическая кардиомиопатия, метаболический ацидоз,</li> <li>• митохондриальная пролиферация в скелетных мышцах и в сердце,</li> <li>• нарушение работы комплексов I, III и IV дыхательной цепи митохондрий, развитие окислительного стресса в тканях мышц и сердца,</li> <li>• накопление множественных делеций мтДНК, дестабилизация мтДНК.</li> </ul> <p>Инактивация гена <i>Ant4</i> у мышей [78]:</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• дефект сперматогенеза, бесплодие самцов.</li> </ul> <p>Одновременная инактивация генов <i>Ant1</i> и <i>Ant2</i> в печени мыши [79]:</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• активность комплекса IV и уровень белка COI, цитохрома-с повышаются для компенсации дефицита АТФ ОХРОС,</li> <li>• для активации mtPTP требуется больше Ca<sup>2+</sup>, чем обычно, а поры не могут регулироваться Ant-лигандами, включая адениновые нуклеотиды,</li> <li>• гепатоциты способны реагировать на индукцию клеточной гибели,</li> <li>• митохондрии печени демонстрируют увеличение частоты дыхания, отсутствие реакции на добавление ADP, увеличение мембранного потенциала.</li> </ul>		
<i>TWINK</i> twinkle mtDNA helicase	• синдром истощения (резкое снижение содержания) мтДНК, • синдром Альперса / прогрессирующая детская полиодистрофия, • синдром Перро (тип женского гипогонадизма), • младенческая форма спинно-мозжечковой атаксии	Аутосомно-рецессивный
	• прогрессирующая внешняя офтальмоплегия	Аутосомно-доминантный
<p>Мутантные мыши со сверхэкспрессией Twinkle [80]:</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• аномальное увеличение количества копий мтДНК в мышцах и сердце.</li> </ul> <p>Мыши с РЕО-ассоциированной мутацией, несущие замену треонина на аланин в положении 360 белка Twinkle мыши – Twinkle<sup>AT</sup> [81]:</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• мягкий фенотип миопатии.</li> </ul> <p>Мыши «Deletor» с РЕО-ассоциированной мутацией, несущие внутрирамочную дупликацию аминокислот 353–365 – Twinkle<sup>dup</sup> [81, 82]:</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• митохондриальная миопатия; миофибриллярная структура заменяется увеличенными митохондриями с концентрическими кристами и пролиферацией,</li> <li>• митохондриальная пролиферация в клетках Пуркинье мозжечка, пирамидных нейронах гиппокампа, нейронах серого покрова (слой серого вещества, закрывающий верхнюю поверхность мозолистого тела),</li> <li>• сниженный уровень мтДНК в мозге (но не в мышцах и сердце),</li> <li>• нарушения липидного обмена,</li> <li>• профили экспрессии генов скелетных мышц с митохондриальной миопатией показали индукцию нескольких транскриптов, участвующих в ответе на аминокислотное и липидное голодание, активацию передачи сигналов Akt и связанного с голоданием гормона, фактора роста фибробластов-21.</li> </ul>		
<i>POLG</i> polymerase, DNA, gamma	• прогрессирующая внешняя офтальмоплегия, • синдром SANDO – системное заболевание, характеризующееся нарушением координации движений, равновесия, поражением нервов – сенситивная атаксия, невропатия, дизартрия и офтальмопарез, • паркинсонизм	Аутосомно-доминантный / рецессивный
	• синдром истощения (резкое снижение содержания) мтДНК, • синдром Альперса / прогрессирующая детская полиодистрофия, • митохондриальная нейрогастроинтестинальная энцефаломиопатия	Аутосомно-рецессивный
<p>Мыши D257A (proofreading-deficient PolgA) [83–88]:</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• увеличение уровней точечных мутаций и соматических мутаций мтДНК, индукция маркеров апоптоза,</li> <li>• сокращение продолжительности жизни, уменьшение содержания подкожного жира, алопеция, кифоз, остеопороз, анемия, снижение фертильности, увеличение сердца, анемия, потеря клеток кишечных крипт, веса и слуха, саркопения,</li> <li>• дефицит PolgA у эмбрионов мыши вызывает раннюю остановку развития.</li> </ul>		

## ОБЗОРЫ

<p><i>Tk2</i> thymidine kinase, mitochondrial</p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• миопатия,</li> <li>• синдром истощения (резкое снижение содержания) мтДНК,</li> <li>• прогрессирующая внешняя офтальмоплегия</li> </ul>	<p>Аутосомно-рецессивный</p>
<p>Мыши <i>Tk2</i><sup>-/-</sup> с мутацией his126-to-asn (H126N) в гене <i>Tk2</i> [89, 90]:</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• задержка роста, снижение активности, генерализованный грубый тремор и нарушение походки,</li> <li>• смертность в 2-недельном возрасте,</li> <li>• истощение мтДНК, наиболее заметное в головном мозге,</li> <li>• снижение активности ферментов дыхательной цепи митохондрий, уровня АТФ и соотношения АТФ/АДР в головном мозге,</li> <li>• дегенерация и дисфункция отдельных типов нейронов,</li> <li>• аномальные вакуолярные изменения в нейронах спинного мозга,</li> <li>• наличие активированных глиальных клеток в белом веществе спинного мозга и коре головного мозга,</li> <li>• стремительно прогрессирующая энцефаломиелопатия.</li> </ul>		
<p><i>DGUOK</i> deoxyguanosine kinase</p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• синдром истощения (резкое снижение содержания) мтДНК,</li> <li>• синдром Альперса / прогрессирующая детская полиодистрофия,</li> <li>• нецирротическая портальная гипертензия / синдром Банти,</li> <li>• прогрессирующая внешняя офтальмоплегия</li> </ul>	<p>Аутосомно-рецессивный</p>
<p>Мутантные мыши <i>Dguok</i><sup>-/-</sup> [91]:</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• потеря веса, уменьшение жировой ткани,</li> <li>• дефицит мтДНК в печени, головном мозге, сердце, скелетных мышцах,</li> <li>• накопление липофусцина в тканях печени с усилением окислительного стресса,</li> <li>• усиление катаболического метаболизма липидов,</li> <li>• увеличение относительного веса печени, почек, сердца,</li> <li>• нарушение (осветление) пигментации шерсти.</li> </ul>		
<p><i>MPV17</i> mitochondrial inner membrane protein</p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• синдром истощения (резкое снижение содержания) мтДНК,</li> <li>• синдром Альперса / прогрессирующая детская полиодистрофия,</li> <li>• перонеальная амиотрофия Шарко–Мари–Тута</li> </ul>	<p>Аутосомно-рецессивный</p>
<p>Мутантные мыши <i>Mpv17</i><sup>-/-</sup> [92]:</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• истощение мтДНК в печени на фоне увеличенной скорости транскрипции,</li> <li>• истощение мтДНК в скелетных мышцах,</li> <li>• умеренное снижение ферментативной активности дыхательной цепи митохондрий и легкие изменения цитоархитектоники в печени,</li> <li>• нарушение (осветление) пигментации шерсти,</li> <li>• дегенерации кохлеарного сенсорного эпителия,</li> <li>• фокально-сегментарный гломерулосклероз с массивной протеинурией,</li> <li>• сокращенная продолжительность жизни.</li> </ul>		

<p>TFAM mitochondrial transcription factor A</p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• синдром истощения (резкое снижение содержания) мтДНК</li> </ul>	<p>Аутосомно- рецессивный</p>
<p>Гомозиготные <i>Tfam</i><sup>-/-</sup> мыши [14]:</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• эмбрионально летальное истощение мтДНК.</li> </ul> <p>Гетерозиготные <i>Tfam</i><sup>+/-</sup> мыши [14]:</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• уменьшение числа копий мтДНК и активности дыхательной цепи митохондрий в сердце.</li> </ul> <p>Тканеспецифичный для сердца и мышц нокаут гена <i>Tfam</i> [93]:</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• ранняя смертность на фоне мозаичной кардиоспецифической прогрессирующей недостаточности дыхательной цепи, дилатационной кардиомиопатии и атриовентрикулярной блокады сердечной проводимости,</li> <li>• истощение мтДНК и белка <i>Tfam</i>, дефицит комплексов I и IV в сердце и мышцах.</li> </ul> <p>Тканеспецифичный для скелетных мышц нокаут гена <i>Tfam</i> [94, 95]:</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• прогрессирующая миопатия, уменьшение мышечной силы, связанное с повышенным уровнем митохондриального Ca<sup>2+</sup>, снижением высвобождения Ca<sup>2+</sup> из саркоплазматического ретикулума,</li> <li>• увеличенные митохондрии с деформированными кристами,</li> <li>• снижение количества мтДНК, митохондриального транскрипта, функции дыхательной цепи и выработки АТФ.</li> </ul> <p>Тканеспецифичный для дофаминергических нейронов среднего мозга нокаут гена <i>Tfam</i> (MitoPark) [96]:</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• развитие фенотипа, подобного паркинсонизму, включая особенности поведения, потерю дофаминергических нейронов, наличие телец Леви,</li> <li>• снижение экспрессии мтДНК и дефицит дыхательной цепи в дофаминергических нейронах среднего мозга.</li> </ul> <p>Специфичный для Т-клеток нокаут гена <i>Tfam</i> мыши [97]:</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• преждевременные признаки старения, включая метаболические, когнитивные, физические и сердечно-сосудистые изменения,</li> <li>• развитие цитокинового шторма стало индуктором старения,</li> <li>• ранняя смертность.</li> </ul> <p>Тканеспецифичный для β-клеток поджелудочной железы нокаут гена <i>Tfam</i> мыши [98]:</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• развитие митохондриального диабета,</li> <li>• повышенный уровень глюкозы, прогрессирующее снижение β-клеточной массы и соотношения эндо/экзокринной ткани поджелудочной железы,</li> <li>• в мутантных β-клетках снижена активность СОХ при нормальной активности SDH, митохондрии аномально большого размера.</li> </ul> <p>Тканеспецифичный для клеток неокортекса нокаут гена <i>Tfam</i> мыши [99]:</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• мышьяная модель митохондриальной нейродегенерации (MILON) с поздним началом (в районе 4–6 месяцев),</li> <li>• в нейронах снижена активность дыхательной цепи, уровень мтДНК и мтРНК,</li> <li>• повышенная уязвимость к эксайтотоксичному воздействию,</li> <li>• короткая продолжительность жизни в финале с прогрессирующей нейродегенерацией и массивной гибелью клеток в гиппокампе и неокортексе.</li> </ul> <p>Мутантные мыши с искусственной хромосомой P1 (PAC), экспрессирующие TFAM человека на фоне стабильной экспрессии TFAM мыши [100]:</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• суммарная сверхэкспрессия TFAM,</li> <li>• увеличение числа копий мтДНК при нормальной емкости дыхательной цепи и общей массы митохондрий,</li> <li>• комбинация мутантов с сверхэкспрессией TFAM и нокаутом TFAM показала, что количество копий мтДНК прямо пропорционально зависит от общего уровня белка TFAM.</li> </ul>		
<p><b>Нарушение метаболизма железа</b></p>		
<p>ABCB7 ATP-binding cassette, subfamily b, member 7</p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• сидеробластная анемия с атаксией</li> </ul>	<p>X-сцепленный рецессивный</p>
<ul style="list-style-type: none"> <li>• летальность полного нокаута гена <i>Abcb7</i> связывают с дефектом внеэмбриональной висцеральной энтодермы, которая преимущественно содержит X-хромосому в качестве активного аллеля [101],</li> <li>• X-инактивации и тканеспецифичные делеции показали, что <i>Abcb7</i> необходим для полноценного развития всех тканей, кроме гепатоцитов и эндотелиальных клеток [101],</li> <li>• в печени потеря <i>Abcb7</i> вызывала легкое повреждение митохондрий, нарушение сборки цитозольного кластера Fe-S и изменение восприятия железа, но не приводила к летальному исходу [101].</li> </ul>		

<p><i>FXN</i> frataxin или <i>FRDA</i></p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• атаксия Фридрейха</li> </ul>	<p>Аутосомно-рецессивный</p>
<p>Мутантные мыши с делецией экзона 4 гена <i>Frda</i> [102]:</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• гомозиготная модель <i>Frda</i><sup>-/-</sup> эмбрионально летальна,</li> <li>• эмбриональная смертность не связана с аномальным накоплением железа.</li> </ul> <p>Жизнеспособная линия мышей с тканеспецифичным дефицитом фратаксина создана при скрещивании гомозигот по условному аллелю <i>Frda</i> с гетерозиготами по делеции экзона 4 <i>Frda</i>, дополненной системой эксцизии <i>Cre/Lox</i> под контролем промотора мышечной креатинкиназы (далее линия мутантных мышей «МСК») или нейрон-специфической енолазы (далее линия мутантных мышей «NSE») [103, 104]:</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• мутанты NSE не имеют явных признаков патологии, а посмертные исследования показали отсутствие отложений железа,</li> <li>• в сердцах мутантных мышей «МСК» зафиксирован ранний дефицит комплексов I–III и активности аконитазы (7 день жизни),</li> <li>• постепенная митохондриальная дегенерация развивается у мутантных мышей «МСК» с 4-недельного возраста,</li> <li>• с 7 недель в сердцах мутантных мышей «МСК» падает уровень окисления липидов и белков,</li> <li>• внутримитохондриальное накопление железа у мутантных мышей «МСК» происходит на терминальной стадии (10–12 неделя жизни) после инактивации Fe/S-ферментов (4 неделя жизни) и развития дилатации сердца с гипертрофией левого желудочка (5 неделя жизни).</li> </ul> <p>Тканеспецифичный нокаут <i>Frda</i> в гепатоцитах мыши [105]:</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• высокий уровень окислительного стресса в печени,</li> <li>• нарушение дыхания митохондрий, падение уровня АТФ и активности Fe/S-ферментов,</li> <li>• сниженное OXPHOS,</li> <li>• развитие множественных опухолей печени,</li> <li>• сокращение продолжительности жизни.</li> </ul> <p>Двойные гетерозиготные мутанты, созданные путем скрещивания мышей со вставкой повторов GAA в гене <i>Frda</i> (у человека интронная экспансия триплетов GAA в гене <i>FXN</i> вызывает дефицит фратаксина и, как следствие, атаксию Фридрейха) с мышами с нокаутом гена фратаксина [106–108]:</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• длина повтора GAA определяет возраст начала соматической нестабильности, а также скорость и величину мутации,</li> <li>• мыши <i>Frda</i><sup>- /230GAA</sup> жизнеспособны и не имеют ярко выраженного патологического фенотипа:</li> <li>• на данной модели показано, что в основе повышенного липогенеза в скелетных мышцах и изменений состава волокон в сердце, согласующихся с резистентностью к инсулину и кардиомиопатией, лежит нарушение регуляции пути гамма-рецептора, активируемого пролифератором пероксисом (PPARγ).</li> </ul> <p><i>Drosophila</i> с инактивацией гена <i>Dfh</i>, гомолога фратаксина [109, 110]:</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• пролонгация личиночной стадии и сокращение жизни взрослых особей,</li> <li>• увеличение размера личинок,</li> <li>• нарушение экспрессии ферритина только у взрослых особей,</li> <li>• H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> является важным патологическим субстратом, лежащим в основе фенотипов, возникающих при дефиците фратаксина у <i>Drosophila</i>.</li> </ul>		
<p><b>Мутации в ядерных генах антиоксидантной защиты</b></p>		
<p><i>SOD1</i> superoxide dismutase 1</p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• боковой амиотрофический склероз,</li> <li>• спастическая тетраплегия,</li> <li>• аксиальная гипотония</li> </ul>	<p>Аутосомно-рецессивный / доминантный</p>
<p>Мутантные мыши с сверхэкспрессией <i>Sod1</i> – основная модель бокового амиотрофического склероза. Создано несколько линий трансгенных мышей с различными формами мутаций <i>Sod1</i>, сверхэкспрессированных на разных уровнях. Наиболее часто используемой моделью бокового амиотрофического склероза стали мыши с мутацией <i>SOD1</i><sup>G93A</sup> [111–113].</p> <p>Мыши с дефицитом Cu/ZnSOD, нокаутом гена <i>Sod1</i> [114, 115]:</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• увеличение количества митохондрий и гранул липофусцина в гепатоцитах,</li> <li>• повсеместное окислительное повреждение,</li> <li>• гепатоканцерогенез,</li> <li>• дисфункция сетчатки,</li> <li>• короткая продолжительность жизни.</li> </ul>		

## ОБЗОРЫ

<i>SOD2</i> superoxide dismutase 2	<ul style="list-style-type: none"> <li>• микроангиопатия при сахарном диабете</li> </ul>	Не установлено
<p>Мыши с дефицитом MnSOD, нокаут гена <i>Sod2</i>, созданные на генетическом бэкграунде инбредной линии C57BL6/J2 [116]:</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• тяжелая анемия, дегенерация нейронов в базальных ганглиях и стволе мозга,</li> <li>• прогрессирующие двигательные нарушения, характеризующиеся слабостью, утомляемостью и вращательным поведением,</li> <li>• обширные митохондриальные повреждения в дегенерирующих нейронах и сердечных миоцитах,</li> <li>• повышенная восприимчивость к окислительному повреждению митохондрий.</li> </ul> <p>Мыши с дефицитом MnSOD, нокаут гена <i>Sod2</i>, созданные на генетическом бэкграунде аутбредной линии CD1 [117, 118]:</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• короткая продолжительность жизни,</li> <li>• дилатационная кардиомиопатия,</li> <li>• накопление липидов в печени и скелетных мышцах,</li> <li>• метаболический ацидоз,</li> <li>• дефицит железосерного центра, аконитазы, цитратсинтазы, комплексов II и I в сердце и мозге,</li> <li>• накопление окислительных повреждений ДНК,</li> <li>• развитие органической ацидурии.</li> </ul> <p>Гетерозиготные <i>Sod2</i><sup>+/-</sup> мыши [119]:</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• модель «свободнорадикальной теории старения» – хронического окислительного повреждения тканей и клеток,</li> <li>• у мышцей среднего возраста хроническое окислительное повреждение липидов во внутренней митомембране приводит к увеличению выхода протонов,</li> <li>• мышцей среднего и пожилого возраста имеют высокосенсибилизированный mtPTE, что связано с трехкратным увеличением апоптотических гепатоцитов,</li> <li>• снижение митохондриальной функции сопровождается повышением активности ферментов дыхательной цепи.</li> </ul>		
<i>GPX1</i> glutathione peroxidase 1	<ul style="list-style-type: none"> <li>• гемолитическая анемия из-за дефицита глутатионпероксидазы</li> </ul>	Аутосомно-рецессивный
<p>Инактивация гена <i>Gpx1</i> у мышцей показала [120–122]:</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• <i>Gpx1</i> сильно экспрессируется в печени, головном мозге и почечной коре, но очень слабо в сердце и скелетных мышцах,</li> <li>• <i>Gpx1</i> играет критическую роль в защите от окислительного стресса, в механизмах антиоксидантной защиты,</li> <li>• <i>Gpx1</i><sup>-/-</sup> мышцей жизнеспособны, но у них снижена масса тела и отмечена хроническая задержка роста,</li> <li>• митохондрии <i>Gpx1</i><sup>-/-</sup> выделяют в 4 раза больше H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> в печени, но не в сердце, что, предположительно, связано с наличием каталазы в митохондриях сердца.</li> </ul> <p>Сверхэкспрессия <i>Gpx1</i> в сердце мышцей на фоне моделирования инфаркта миокарда (перевязка левой коронарной артерии) привела к лучшим показателям и выживаемости по сравнению с мышцей дикого типа [123].</p>		
<b>Мутации в ядерных генах митохондриальной динамики</b>		
<i>MFN2</i> mitofusin 2	<ul style="list-style-type: none"> <li>• аксональная амиотрофия Шарко–Мари–Тута</li> </ul>	Аутосомно-доминантный / рецессивный
	<ul style="list-style-type: none"> <li>• наследственная моторная сенсорная нейропатия</li> </ul>	Аутосомно-доминантный
<p>Тканеспецифичная для мозжечка инактивация гена <i>Mfn2</i> у мышцей [124, 125]:</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• модель нейродегенерации, вызванная потерей слияния митохондрий,</li> <li>• 50% смертность в помете; для эмбрионов показано разрушение гигантоклеточного слоя плацентарного трофобласта; фрагментированные митохондрии в эмбриональных фибробластах,</li> <li>• клетки Пуркинью <i>Mfn2</i><sup>-/-</sup> имеют аномальную морфологию, короткие, тонкие и менее разветвленные дендритные деревья со сниженным количеством шипов; изменения морфологии, ультраструктуры и распределения митохондрий со снижением активности комплексов I и IV и увеличением активности комплекса II,</li> <li>• у выживших мышцей атрофия мозжечка на 75% за счет снижения количества и качества клеток Пуркинью; нарушение координации движений.</li> </ul> <p>Тканеспецифичная инактивация гена <i>Mfn2</i> в периферических двигательных нейронах [126]:</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• у гомозиготных особей отсутствие способности сгибать задние лапы с атрофией передних икроножных мышц; укороченные, деформированные хвосты с изгибами и утолщениями;</li> <li>• в двигательных аксонах <i>Mfn2</i><sup>-/-</sup>, при общем снижении их количества, фиксируют аномалии в распределении митохондрий с образованием плотных кластеров.</li> </ul>		

<p><i>OPA1</i> OPA1 mitochondrial dynamin-like GTPase</p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• атрофия зрительного нерва</li> </ul>	Аутосомно-доминантный
	<ul style="list-style-type: none"> <li>• синдром Бера,</li> <li>• синдром истощения мтДНК</li> </ul>	Аутосомно-рецессивный
	<ul style="list-style-type: none"> <li>• склонность к развитию глаукомы</li> </ul>	Не установлено
<p>Мыши с мутацией в гене <i>Opa1</i>, кодирующем ядерную динамин-родственную GTP-азу, которая локализуется в митохондриях [127, 128]:</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• снижение уровня белка <i>Opa1</i> на 50%,</li> <li>• гомозиготная мутация эмбрионально летальна,</li> <li>• у гетерозиготных особей обнаруживают возрастную дегенерацию ганглионарных клеток сетчатки и снижение зрительной функции,</li> <li>• в зрительных нервах <i>Opa1<sup>+/-</sup></i> снижено количество аксонов, а у оставшихся аномальная форма, нерегулярная миелинизация, уменьшение количества нейрофибрилл и морфологически аномальные митохондрии с дезорганизованными кристами,</li> <li>• изменение морфологии фибробластов <i>Opa1<sup>+/-</sup></i> с увеличением митохондриального деления и фрагментации.</li> </ul>		
<p><b>Дефект деления митохондрий и пероксисом</b></p>		
<p><i>DNM1L</i> dynamin 1-like</p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• энцефалопатия,</li> <li>• микроцефалия,</li> <li>• атрофия зрительного нерва,</li> <li>• лактоацидоз</li> </ul>	Аутосомно-доминантный / рецессивный
<p>Гомозиготный нокаут гена <i>Drp1</i> у мышей летален [129].</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• у эмбрионов <i>Drp1<sup>-/-</sup></i> нарушение развития сердца и печени, истощение клеточного слоя нервной трубки, увеличенные митохондрии,</li> <li>• цитокинез в фибробластах <i>Drp1<sup>-/-</sup></i> протекает асимметрично,</li> <li>• нейрональные клетки высокочувствительны к <math>Ca^{2+}</math>-зависимому апоптозу.</li> </ul> <p>Мыши со специфичной для нервных клеток делецией <i>Drp1</i> (<i>NS-Drp1<sup>-/-</sup></i>) [129]:</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• младенческая смертность в результате гипоплазии и апоптоза головного мозга,</li> <li>• анализ первичной культуры переднего мозга <i>NS-Drp1<sup>-/-</sup></i> показал, что агрегированные митохондрии не могут должным образом распределяться в отростках нервных клеток,</li> <li>• нейрональные клетки высокочувствительны к <math>Ca^{2+}</math>-зависимому апоптозу.</li> </ul> <p>Гетерозиготный нокаунт <i>Dnm1l</i> у мышей приводит к удлинению митохондриальной сети ганглиозных клеток сетчатки, но не к дегенерации аксонов в зрительном нерве [130].</p>		
<p><b>Дефицит кофакторов митохондриальных ферментов</b></p>		
<p><i>SLC19A2</i> solute carrier family 19 (thiamine transporter), member 2</p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• тиамин (витамин B1)-чувствительная мегалобластная анемия (TRMA)</li> </ul>	Аутосомно-рецессивный
<p>Мутантные мыши с инактивацией гена <i>Slc19a2</i>, кодирующего высокоаффинный переносчик тиамин Thtr-1 [131, 132]:</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• отсутствие высокоаффинного компонента транспорта тиамин,</li> <li>• сахарный диабет со сниженной секрецией инсулина и усиленным ответом на инсулин,</li> <li>• нейросенсорная глухота, потеря внутренних волосковых клеток в улитке,</li> <li>• аномальный костный мозг с мегалобластозом.</li> </ul>		

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Dogan S.A., Trifunovic A. // *Physiol. Res.* 2011. V. 60. № SUPPL. 1.
2. Mayr J.A., Haack T.B., Freisinger P., Karall D., Makowski C., Koch J., Feichtinger R.G., Zimmermann F.A., Rolinski B., Ahting U., et al. // *J. Inherit. Metab. Dis.* 2015. V. 38. № 4. P. 629–640.
3. Martin A.R., Williams E., Foulger R.E., Leigh S., Daugherty L.C., Niblock O., Leong I.U.S., Smith K.R., Gerasimenko O., Haraldsdottir E., et al. // *Nat. Genet.* 2019. V. 51. № 11. P. 1560–1565.
4. Rambani V., Hromnikova D., Gasperikova D., Skopkova M. // *Endocr. Regul.* 2022. V. 56. № 3. P. 232–248.
5. Fernandez-Vizarra E., Zeviani M. // *FEBS Lett.* 2021. V. 595. № 8. P. 1062–1106.
6. Koene S., Rodenburg R.J., van der Knaap M.S., Willemsen M.A.A.P., Sperl W., Laugel V., Ostergaard E., Tarnopolsky M., Martin M.A., Nesbitt V., et al. // *J. Inherit. Metab. Dis.* 2012. V. 35. № 5. P. 737–747.
7. Loeffen J., Smeitink J.A.M., Triepels R., Smeets R., Schuelke M., Sengers R., Trijbels F., Hamel B., Mullaart R., van den Heuvel L. // *Am. J. Hum. Genet.* 1998. V. 63. № 6. P. 1598–1608.
8. Chang X., Wu Y., Zhou J., Meng H., Zhang W., Guo J. // *Medicine.* 2020. V. 99. № 5. P. e18634.
9. Kumar S., Suleski M., Craig J.M., Kasprovicz A.E., Sandeferford M., Li M., Stecher G., Hedges S.B. // *Mol. Biol.* 2022. V. 39. № 8. P. 1–6.
10. Law M., Shaw D.R. // *Methods Mol. Biol.* 2018. V. 1757. P. 141–161.
11. Gurumurthy C.B., Kent Lloyd K.C. // *DMM Disease Models and Mechanisms.* 2019. V. 12. № 1. P. dmm029462
12. Amberger J.S., Bocchini C.A., Scott A.F., Hamosh A. // *Nucl. Acids Res.* 2019. V. 47. № D1. P. D1038–D1043.
13. Hughes B.G., Hekimi S. // *PLoS One.* 2011. V. 6. № 10. P. e26116.
14. Larsson N.G., Wang J., Wilhelmsson H., Oldfors A., Rustin P., Lewandoski M., Barsh G.S., Clayton D.A. // *Nat. Genet.* 1998. V. 18. № 3. P. 231–236.
15. Zurita Rendón O., Silva Neiva L., Sasarman F., Shoubridge E.A. // *Hum. Mol. Genet.* 2014. V. 23. № 19. P. 5159–5170.
16. Taylor M.R., Hurler J.B., van Epps H.A., Brockerhoff S.E. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2004. V. 101. № 13. P. 4584–4589.
17. Nenni M.J., Fisher M.E., James-Zorn C., Pells T.J., Ponferada V., Chu S., Fortriede J.D., Burns K.A., Wang Y., Lotay V.S., et al. // *Front. Physiol.* 2019. V. 10. № 26. P. 154.
18. Naert T., Vleminckx K. // *Drug. Discov. Today Technol. England.* 2018. V. 28. P. 41–52.
19. Menegola E., Battistoni M., Metruccio F., Di Renzo F. // *Curr. Opin. Toxicol.* 2023. V. 34. P. 100387.
20. Zeng S.L., Sudlow L.C., Berezin M.Y. // *Expert. Opin. Drug Discov.* 2020. V. 15. № 1. P. 39–52.
21. Langova V., Vales K., Horka P., Horacek J. // *Front. Psychiatry.* 2020. V. 11. P. 1–22.
22. Ruzzenente B., Rötig A., Metodiev M.D. // *Hum. Mol. Genet.* 2016. V. 25. № R2. P. R115–R122.
23. Wallace D.C. // *Am. J. Med. Genet.* 2001. V. 106. № 1. P. 71–93.
24. Ishikawa K., Nakada K. // *Biochim. Biophys. Acta Gen. Subj.* 2021. V. 1865. № 3. P. 129835.
25. Quadalti C., Brunetti D., Lagutina I., Duchi R., Perota A., Lazzari G., Cerutti R., Di Meo I., Johnson M., Bottani E., et al. // *Biochim. Biophys. Acta Mol. Basis Dis.* 2018. V. 1864. № 6 Pt A. P. 2131–2142.
26. Steele S.L., Prykhozhiy S.V., Berman J.N. // *Transl. Res.* 2014. V. 163. № 2. P. 79–98.
27. Maglioni S., Ventura N. // *Mitochondrion.* 2016. V. 30. P. 117–125.
28. Sen A., Cox R.T. // *Curr. Top. Dev. Biol.* 2017. V. 121. P. 1–27.
29. Baile M.G., Claypool S.M. // *Front. Biosci.* 2013. V. 18. № 1. P. 241–278.
30. Garrido-Maraver J., Cordero M.D., Moñino I.D., Pereira-Arenas S., Lechuga-Vieco A.V., Cotán D., De la Mata M., Oropesa-Ávila M., De Miguel M., Bautista Lorite J., et al. // *Br. J. Pharmacol.* 2012. V. 167. № 6. P. 1311–1328.
31. Sinsheimer A., Mohsen A.-W., Bloom K., Karunanidhi A., Bharathi S., Wu Y.L., Schiff M., Wang Y., Goetzman E.S., Ghaloul-Gonzalez L., et al. // *Mol. Genet. Metab.* 2021. V. 134. № 1–2. P. 156–163.
32. Dickinson M.E., Flenniken A.M., Ji X., Teboul L., Wong M.D., White J.K., Meehan T.F., Weninger W.J., Westerberg H., Adissu H., et al. // *Nature.* 2016. V. 537. № 7621. P. 508–514.
33. Kruse S.E., Watt W.C., Marcinek D.J., Kapur R.P., Schenkman K.A., Palmiter R.D. // *Cell Metab.* 2008. V. 7. № 4. P. 312–320.
34. Leong D.W., Komen J.C., Hewitt C.A., Arnaud E., McKenzie M., Phipson B., Bahlo M., Laskowski A., Kinkel S.A., Davey G.M., et al. // *J. Biol. Chem.* 2012. V. 287. № 24. P. 20652–20663.
35. van de Wal M.A.E., Adjobo-Hermans M.J.W., Keijer J., Schirris T.J.J., Homberg J.R., Wieckowski M.R., Grefte S., van Schothorst E.M., van Karnebeek C., Quintana A., et al. // *Brain.* 2022. V. 145. № 1. P. 45–63.
36. Quintana A., Zanella S., Koch H., Kruse S.E., Lee D., Ramirez J.M., Palmiter R.D. // *J. Clin. Invest.* 2012. V. 122. № 7. P. 2359–2368.
37. Sterky F.H., Hoffman A.F., Milenkovic D., Bao B., Paganelli A., Edgar D., Wibom R., Lupica C.R., Olson L., Larsson N.-G. // *Hum. Mol. Genet.* 2012. V. 21. № 5. P. 1078–1089.
38. Karamanlidis G., Lee C.F., Garcia-Menendez L., Kolwicz S.C., Suthammarak W., Gong G., Sedensky M.M., Morgan P.G., Wang W., Tian R. // *Cell Metab.* 2013. V. 18. № 2. P. 239–250.
39. Ingraham C.A., Burwell L.S., Skalska J., Brookes P.S., Howell R.L., Sheu S.S., Pinkert C.A. // *Mitochondrion.* 2009. V. 9. № 3. P. 204–210.
40. Ke B.X., Pepe S., Grubb D.R., Komen J.C., Laskowski A., Rodda F.A., Hardman B.M., Pitt J.J., Ryan M.T., Lazarou M., et al. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2012. V. 109. № 16. P. 6165–6170.
41. Forbes J.M., Ke B.X., Nguyen T.V., Henstridge D.C., Penfold S.A., Laskowski A., Sourris K.C., Groschner L.N., Cooper M.E., Thorburn D.R., et al. // *Antioxid. Redox Signal.* 2013. V. 19. № 4. P. 331–343.
42. Grad L.I., Lemire B.D. // *Hum. Mol. Genet.* 2004. V. 13. № 3. P. 303–314.
43. Qi X., Lewin A.S., Sun L., Hauswirth W.W., Guy J. // *Ann. Neurol. United States.* 2004. V. 56. № 2. P. 182–191.
44. Huang G., Lu H., Hao A., Ng D.C.H., Ponniah S., Guo K., Lufei C., Zeng Q., Cao X. // *Mol. Cell. Biol.* 2004. V. 24. № 19. P. 8447–8456.
45. Kohda M., Tokuzawa Y., Kishita Y., Nyuzuki H., Moriyama Y., Mizuno Y., Hirata T., Yatsuka Y., Yamashita-Sugahara Y., Nakachi Y., et al. // *PLoS Genet.* 2016. V. 12. № 1. P. e1005679.
46. Arsenijevic D., Onuma H., Pecqueur C., Raimbault S., Manning B.S., Miroux B., Couplan E., Alves-Guerra M.C., Goubern M., Surwit R., et al. // *Nat. Genet.* 2000. V. 26. № 4. P. 435–439.
47. Zhang C.Y., Baffy G., Perret P., Krauss S., Peroni O., Grujic

- D., Hagen T., Vidal-Puig A.J., Boss O., Kim Y.B., et al. // *Cell*. 2001. V. 105. № 6. P. 745–755.
48. Conti B., Sanchez-Alavez M., Winsky-Sommerer R., Morale M.C., Lucero J., Brownell S., Fabre V., Huitron-Resendiz S., Henriksen S., Zorrilla E.P., et al. // *Science*. 2006. V. 314. № 5800. P. 825–828.
49. Enerbäck S., Jacobsson A., Simpson E.M., Guerra C., Yamashita H., Harper M.E., Kozak L.P. // *Nature*. 1997. V. 387. № 6628. P. 90–94.
50. Vidal-Puig A.J., Grujic D., Zhang C.Y., Hagen T., Boss O., Ido Y., Szczepanik A., Wade J., Mootha V., Cortright R., et al. // *J. Biol. Chem*. 2000. V. 275. № 21. P. 16258–16266.
51. Johnson M.T., Mahmood S., Hyatt S.L., Yang H.S., Soloway P.D., Hanson R.W., Patel M.S. // *Mol. Genet. Metab*. 2001. V. 74. № 3. P. 293–302.
52. Peng M., Falk M.J., Haase V.H., King R., Polyak E., Selak M., Yudkoff M., Hancock W.W., Meade R., Saiki R., et al. // *PLoS Genet*. 2008. V. 4. № 4. P. e1000061.
53. Quinzii C.M., Garone C., Emmanuele V., Tadesse S., Krishna S., Dorado B., Hirano M. // *FASEB J*. 2013. V. 27. № 2. P. 612–621.
54. García-Corzo L., Luna-Sánchez M., Doerrier C., García J.A., Guarás A., Acín-Pérez R., Bulles-Peregrín J., López A., Escames G., Enríquez J.A., et al. // *Hum. Mol. Genet*. 2013. V. 22. № 6. P. 1233–1248.
55. Li K., Li Y., Shelton J.M., Richardson J.A., Spencer E., Chen Z.J., Wang X., Williams R.S. // *Cell*. 2000. V. 101. № 4. P. 389–399.
56. Hao Z., Duncan G.S., Chang C.C., Elia A., Fang M., Wakeham A., Okada H., Calzascia T., Jang Y., You-Ten A., et al. // *Cell*. 2005. V. 121. № 4. P. 579–591.
57. Piruat J.I., Pintado C.O., Ortega-Sáenz P., Roche M., López-Barneo J. // *Mol. Cell Biol*. 2004. V. 24. № 24. P. 10933–10940.
58. Bayley J.P., van Minderhout I., Hogendoorn P.C.W., Cornelisse C.J., van der Wal A., Prins F.A., Teppema L., Dahan A., Devilee P., Taschner P.E.M. // *PLoS One*. 2009. V. 4. № 11. P. 1–7.
59. Levéen P., Kotarsky H., Mörgelin M., Karikoski R., Elmér E., Fellman V. // *Hepatology*. 2011. V. 53. № 2. P. 437–447.
60. Diaz F., Garcia S., Padgett K.R., Moraes C.T. // *Hum. Mol. Genet*. 2012. V. 21. № 23. P. 5066–5077.
61. Weinberg S.E., Singer B.D., Steinert E.M., Martinez C.A., Mehta M.M., Martínez-Reyes I., Gao P., Helmin K.A., Abdala-Valencia H., Sena L.A., et al. // *Nature*. 2019. V. 565. № 7740. P. 495–499.
62. Hüttemann M., Lee I., Gao X., Pecina P., Pecinova A., Liu J., Aras S., Sommer N., Sanderson T.H., Tost M., et al. // *FASEB J*. 2012. V. 26. № 9. P. 3916–3930.
63. Quintens R., Singh S., Lemaire K., De Bock K., Granvik M., Schraenen A., Vroegrijk I.O.C.M., Costa V., van Noten P., Lambrechts D., et al. // *PLoS One*. 2013. V. 8. № 2. P. e56719.
64. Diaz F., Thomas C.K., Garcia S., Hernandez D., Moraes C.T. // *Hum. Mol. Genet*. 2005. V. 14. № 18. P. 2737–2748.
65. Fukui H., Diaz F., Garcia S., Moraes C.T. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2007. V. 104. № 35. P. 14163–14168.
66. Diaz F., Garcia S., Hernandez D., Regev A., Rebelo A., Oca-Cossio J., Moraes C.T. // *Gut*. 2008. V. 57. № 2. P. 232–242.
67. Fünfschilling U., Supplie L.M., Mahad D., Boretius S., Saab A.S., Edgar J., Brinkmann B.G., Kassmann C.M., Tzvetanova I.D., Möbius W., et al. // *Nature*. 2012. V. 485. № 7399. P. 517–521.
68. Agostino A., Invernizzi F., Tiveron C., Fagiolari G., Prella A., Lamantea E., Giavazzi A., Battaglia G., Tatangelo L., Tiranti V., et al. // *Hum. Mol. Genet*. 2003. V. 12. № 4. P. 399–413.
69. Dell'Agnello C., Leo S., Agostino A., Szabadkai G., Tiveron C.C., Zulian A.A., Prella A., Roubertoux P., Rizzuto R., Zeviani M. // *Hum. Mol. Genet*. 2007. V. 16. № 4. P. 431–444.
70. Yang H., Brosel S., Acin-Perez R., Slavkovich V., Nishino I., Khan R., Goldberg I.J., Graziano J., Manfredi G., Schon E.A. // *Hum. Mol. Genet*. 2009. V. 19. № 1. P. 170–180.
71. Viscomi C., Bottani E., Civileto G., Cerutti R., Moggio M., Fagiolari G., Schon E.A., Lamperti C., Zeviani M. // *Cell. Metab*. 2011. V. 14. № 1. P. 80–90.
72. Vrbacký M., Kovalčíková J., Chawengsaksophak K., Beck I.M., Mráček T., Nůsková H., Sedmera D., Papoušek F., Kolář F., Sobol M., et al. // *Hum. Mol. Genet*. 2016. V. 25. № 21. P. 4674–4685.
73. Marković A., Tauchmannová K., Šimáková M., Mlejnek P., Kaplanová V., Pecina P., Pecinová A., Papoušek F., Liška F., Šilhavý J., et al. // *Biomedicines*. 2022. V. 10. № 2. P. 276.
74. Haraguchi M., Tsujimoto H., Fukushima M., Higuchi I., Kuribayashi H., Utsumi H., Nakayama A., Hashizume Y., Hirato J., Yoshida H., et al. // *Mol. Cell. Biol*. 2002. V. 22. № 14. P. 5212–5221.
75. López L.C., Akman H.O., García-Cazorla Á., Dorado B., Martí R., Nishino I., Tadesse S., Pizzorno G., Shungu D., Bonilla E., et al. // *Hum. Mol. Genet*. 2009. V. 18. № 4. P. 714–722.
76. Graham B.H., Waymire K.G., Cottrell B., Trounce I.A., MacGregor G.R., Wallace D.C. // *Nat. Genet*. 1997. V. 16. № 3. P. 226–234.
77. Esposito L.A., Melov S., Panov A., Cottrell B.A., Wallace D.C. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 1999. V. 96. № 9. P. 4820–4825.
78. Brower J.V., Rodic N., Seki T., Jorgensen M., Fliess N., Yachnis A.T., McCarrey J.R., Oh S.P., Terada N. // *J. Biol. Chem*. 2007. V. 282. № 40. P. 29658–29666.
79. Kokoszka J.E., Waymire K.G., Levy S.E., Sligh J.E., Cai J., Jones D.P., MacGregor G.R., Wallace D.C. // *Nature*. 2004. V. 427. № 6973. P. 461–465.
80. Tynismaa H., Sembongi H., Bokori-Brown M., Granycome C., Ashley N., Poulton J., Jalanko A., Spelbrink J.N., Holt I.J., Suomalainen A. // *Hum. Mol. Genet*. 2004. V. 13. № 24. P. 3219–3227.
81. Tynismaa H., Mjosund K.P., Wanrooij S., Lappalainen I., Ylikallio E., Jalanko A., Spelbrink J.N., Paetau A., Suomalainen A. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2005. V. 102. № 49. P. 17687–17692.
82. Tynismaa H., Carroll C.J., Raimundo N., Ahola-Erkkilä S., Wenz T., Ruhanen H., Guse K., Hemminki A., Peltola-Mjosund K.E., Tulkki V., et al. // *Hum. Mol. Genet*. 2010. V. 19. № 20. P. 3948–3958.
83. Trifunovic A., Wredenberg A., Falkenberg M., Spelbrink J.N., Rovio A.T., Bruder C.E., Bohlooly-Y M., Gidlöf S., Oldfors A., Wibom R., et al. // *Nature*. 2004. V. 429. № 6990. P. 417–423.
84. Kujoth C.C., Hiona A., Pugh T.D., Someya S., Panzer K., Wohlgemuth S.E., Hofer T., Seo A.Y., Sullivan R., Jobling W.A., et al. // *Science*. 2005. V. 309. № 5733. P. 481–484.
85. Miller R.A. // *Science*. 2005. V. 310. № 5747. P. 441–443.
86. Hance N., Ekstrand M.L., Trifunovic A. // *Hum. Mol. Genet*. 2005. V. 14. № 13. P. 1775–1783.
87. Vermulst M., Wanagat J., Kujoth G.C., Bielas J.H., Rabino-vitch P.S., Prolla T.A., Loeb L.A. // *Nat. Genet*. 2008. V. 40. № 4. P. 392–394.
88. Ross J.M., Stewart J.B., Hagström E., Brené S., Mourier A., Coppotelli G., Freyer C., Lagouge M., Hoffer B.J., Olson L., et al. // *Nature*. 2013. V. 501. № 7467. P. 412–415.
89. Akman H.O., Dorado B., López L.C., García-Cazorla Á., Vilà

- M.R., Tanabe L.M., Dauer W.T., Bonilla E., Tanji K., Hirano M. // *Hum. Mol. Genet.* 2008. V. 17. № 16. P. 2433–2440.
90. Bartesaghi S., Betts-Henderson J., Cain K., Dinsdale D., Zhou X., Karlsson A., Salomoni P., Nicotera P. // *Hum. Mol. Genet.* 2010. V. 19. № 9. P. 1669–1677.
91. Zhou X., Curbo S., Zhao Q., Krishnan S., Kuiper R., Karlsson A. // *Hum. Mol. Genet.* 2019. V. 28. № 17. P. 2874–2884.
92. Viscomi C., Spinazzola A., Maggioni M., Fernandez-Vizarra E., Massa V., Pagano C., Vettor R., Mora M., Zeviani M. // *Hum. Mol. Genet.* 2009. V. 18. № 1. P. 12–26.
93. Wang J., Wilhelmsson H., Graff C., Li H., Oldfors A., Rustin P., Brüning J.C., Kahn C.R., Clayton D.A., Barsh G.S., et al. // *Nat. Genet.* 1999. V. 21. № 1. P. 133–137.
94. Wredenberg A., Wibom R., Wilhelmsson H., Graff C., Wiener H.H., Burden S.J., Oldfors A., Westerblad H., Larsson N.G. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2002. V. 99. № 23. P. 15066–15071.
95. Aydin J., Andersson D.C., Hänninen S.L., Wredenberg A., Tavi P., Park C.B., Nils-Göran L., Bruton J.D., Westerblad H. // *Hum. Mol. Genet.* 2009. V. 18. № 2. P. 278–288.
96. Ekstrand M.I., Terzioglu M., Galter D., Zhu S., Hofstetter C., Lindqvist E., Thams S., Bergstrand A., Hansson F.S., Trifunovic A., et al. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2007. V. 104. № 4. P. 1325–1330.
97. Desdín-Micó G., Soto-Herederó G., Aranda J.F., Oller J., Carrasco E., Gabandé-Rodríguez E., Blanco E.M., Alfranca A., Cussó L., Desco M., et al. // *Science.* 2020. V. 368. № 6497. P. 1371–1376.
98. Silva J.P., Köhler M., Graff C., Oldfors A., Magnuson M.A., Berggren P.O., Larsson N.G. // *Nat. Genet.* 2000. V. 26. № 3. P. 336–340.
99. Sörensen L., Ekstrand M., Silva J.P., Lindqvist E., Xu B., Rustin P., Olson L., Larsson N.G. // *J. Neurosci.* 2001. V. 21. № 20. P. 8082–8090.
100. Ekstrand M.I., Falkenberg M., Rantanen A., Park C.B., Gaspari M., Hulténby K., Rustin P., Gustafsson C.M., Larsson N.G. // *Hum. Mol. Genet.* 2004. V. 13. № 9. P. 935–944.
101. Pondarré C., Antiochos B.B., Campagna D.R., Clarke S.L., Greer E.L., Deck K.M., McDonald A., Han A.-P., Medlock A., Kutok J.L., et al. // *Hum. Mol. Genet.* 2006. V. 15. № 6. P. 953–964.
102. Cossée M., Puccio H., Gansmuller A., Koutnikova H., Dierich A., LeMeur M., Fischbeck K., Dollé P., Koenig M. // *Hum. Mol. Genet.* 2000. V. 9. № 8. P. 1219–1226.
103. Puccio H., Simon D., Cossée M., Criqui-Filipe P., Tiziano F., Melki J., Hindelang C., Matyas R., Rustin P., Koenig M. // *Nat. Genet.* 2001. V. 27. № 2. P. 181–186.
104. Seznec H., Simon D., Monassier L., Criqui-Filipe P., Gansmuller A., Rustin P., Koenig M., Puccio H. // *Hum. Mol. Genet.* 2004. V. 13. № 10. P. 1017–1024.
105. Thierbach R., Schulz T.J., Isken F., Voigt A., Mietzner B., Drewes G., von Kleist-Retzow J.-C., Wiesner R.J., Magnuson M.A., Puccio H., et al. // *Hum. Mol. Genet.* 2005. V. 14. № 24. P. 3857–3864.
106. Miranda C.J., Santos M.M., Ohshima K., Smith J., Li L., Bunting M., Cossée M., Koenig M., Sequeiros J., Kaplan J., et al. // *FEBS Lett.* 2002. V. 512. № 1–3. P. 291–297.
107. Clark R.M., De Biase I., Malykhina A.P., Al-Mahdawi S., Pook M., Bidichandani S.I. // *Hum. Genet.* 2007. V. 120. № 5. P. 633–640.
108. Coppola G., Marmolino D., Lu D., Wang Q., Cnop M., Rai M., Acquaviva F., Coccozza S., Pandolfo M., Geschwind D.H. // *Hum. Mol. Genet.* 2009. V. 18. № 13. P. 2452–2461.
109. Anderson P.R., Kirby K., Hilliker A.J., Phillips J.P. // *Hum. Mol. Genet.* 2005. V. 14. № 22. P. 3397–3405.
110. Anderson P.R., Kirby K., Orr W.C., Hilliker A.J., Phillips J.P. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2008. V. 105. № 2. P. 611–616.
111. Swarup V., Julien J.-P. // *Prog. Neuropsychopharmacol Biol. Psychiatry.* 2011. V. 35. № 2. P. 363–369.
112. Kreilau F., Guerra S., Masanetz R., Menne V., Yerbury J., Karl T. // *Genes Brain Behav.* 2020. V. 19. № 2. P. 1–14.
113. Riboldi G., Nizzardo M., Simone C., Falcone M., Bresolin N., Comi G.P., Corti S. // *Prog. Neurobiol.* 2011. V. 95. № 2. P. 133–148.
114. Elchuri S., Oberley T.D., Qi W., Eisenstein R.S., Roberts L.J., van Remmen H., Epstein C.J., Huang T.T. // *Oncogene.* 2005. V. 24. № 3. P. 367–380.
115. Hashizume K., Hirasawa M., Imamura Y., Noda S., Shimizu T., Shinoda K., Kurihara T., Noda K., Ozawa Y., Ishida S., et al. // *Am. J. Pathol.* 2008. V. 172. № 5. P. 1325–1331.
116. Lebovitz R.M., Zhang H., Vogel H., Cartwright J., Dionne L., Lu N., Huang S., Matzuk M.M. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1996. V. 93. № 18. P. 9782–9787.
117. Li Y., Huang T.T., Carlson E.J., Melov S., Ursell P.C., Olson J.L., Noble L.J., Yoshimura M.P., Berger C., Chan P.H., et al. // *Nat. Genet.* 1995. V. 11. № 4. P. 376–381.
118. Melov S., Coskun P., Patel M., Tuinstra R., Cottrell B., Jun A.S., Zastawny T.H., Dizdaroglu M., Goodman S.I., Huang T.T., et al. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1999. V. 96. № 3. P. 846–851.
119. Kokoszka J.E., Coskun P., Esposito L.A., Wallace D.C. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2001. V. 98. № 5. P. 2278–2283.
120. Esposito L.A., Kokoszka J.E., Waymire K.G., Cottrell B., MacGregor G.R., Wallace D.C. // *Free Radic. Biol. Med.* 2000. V. 28. № 5. P. 754–766.
121. Reddy V.N., Giblin F.J., Lin L.R., Dang L., Unakar N.J., Musch D.C., Boyle D.L., Takemoto L.J., Ho Y.S., Knoernschild T., et al. // *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 2001. V. 42. № 13. P. 3247–3255.
122. De Haan J.B., Bladier C., Griffiths P., Kelner M., O’Shea R.D., Cheung N.S., Bronson R.T., Silvestro M.J., Wild S., Zheng S.S., et al. // *J. Biol. Chem.* 1998. V. 273. № 35. P. 22528–22536.
123. Shiomi T., Tsutsui H., Matsusaka H., Murakami K., Hayashidani S., Ikeuchi M., Wen J., Kubota T., Utsumi H., Takeshita A. // *Circulation.* 2004. V. 109. № 4. P. 544–549.
124. Chen H., Detmer S.A., Ewald A.J., Griffin E.E., Fraser S.E., Chan D.C. // *J. Cell Biol.* 2003. V. 160. № 2. P. 189–200.
125. Chen H., McCaffery J.M., Chan D.C. // *Cell.* 2007. V. 130. № 3. P. 548–562.
126. Detmer S.A., Velde C. Vande, Cleveland D.W., Chan D.C. // *Hum. Mol. Genet.* 2008. V. 17. № 3. P. 367–375.
127. Alavi M.V., Bette S., Schimpf S., Schuettauf F., Schraermeyer U., Wehrl H.F., Ruttiger L., Beck S.C., Tonagel F., Pichler B.J., et al. // *Brain.* 2007. V. 130. № 4. P. 1029–1042.
128. Davies V.J., Hollins A.J., Piechota M.J., Yip W., Davies J.R., White K.E., Nicols P.P., Boulton M.E., Votruba M. // *Hum. Mol. Genet.* 2007. V. 16. № 11. P. 1307–1318.
129. Ishihara N., Nomura M., Jofuku A., Kato H., Suzuki S.O., Masuda K., Otera H., Nakanishi Y., Nonaka I., Goto Y.I., et al. // *Nat. Cell Biol.* 2009. V. 11. № 8. P. 958–966.
130. Gerber S., Charif M., Chevrollier A., Chaumette T., Angebault C., Kane M.S., Paris A., Alban J., Quiles M., Delettre C., et al. // *Brain.* 2017. V. 140. № 10. P. 2586–2596.
131. Oishi K., Hofmann S., Diaz G.A., Brown T., Manwani D., Ng L., Young R., Vlassara H., Ioannou Y.A., Forrester D., et al. // *Hum. Mol. Genet.* 2002. V. 11. № 23. P. 2951–2960.
132. Liberman M.C., Tartaglino E., Fleming J.C., Neufeld E.J. // *J. Assoc. Res. Otolaryngol.* 2006. V. 7. № 3. P. 211–217.

УДК 577.21

# Кооперация и конкуренция вторичной структуры и РНК-белковых взаимодействий в регуляции альтернативного сплайсинга

М. А. Воробьева<sup>1</sup>, Д. А. Скворцов<sup>1</sup>, Д. Д. Первушин<sup>2\*</sup><sup>1</sup>Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, Москва, 119192 Россия<sup>2</sup>Сколковский институт науки и технологий, Москва, 121205 Россия

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

Поступила в редакцию 16.10.2023

Принята к печати 31.10.2023

DOI: 10.32607/actanaturae.26826

**РЕФЕРАТ** Регуляция альтернативного сплайсинга в клетках эукариот осуществляется за счет скоординированного действия большого числа факторов, включающих в РНК-связывающие белки и структуру РНК. Структура РНК оказывает влияние на альтернативный сплайсинг, блокируя цис-регуляторные элементы, а также приближая или отдаляя их друг от друга. В сочетании с РНК-связывающими белками вторичная структура способствует образованию конформаций транскриптов, необходимых для получения нужных сплайс-изоформ. Однако связывание регуляторных белков зависит от структуры РНК, и, наоборот, формирование структуры РНК зависит от взаимодействия с регуляторами. Таким образом, структура РНК и РНК-связывающие белки являются неотделимыми компонентами общих регуляторных механизмов. В данном обзоре рассмотрены примеры регуляции альтернативного сплайсинга РНК-связывающими белками, примеры регуляции локальными и дальними взаимодействиями в структуре РНК, а также их совместные действия, кооперация и конкуренция.

**КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА** структура РНК, дальние взаимодействия, сплайсинг, РНК-связывающие белки.

**СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ** АС – альтернативный сплайсинг; RBP – РНК-связывающие белки; мяРНК – малые ядерные РНК; мяРПП – малые ядерные рибонуклеопротеины; 5'ss – 5'-сайт сплайсинга; 3'ss – 3'-сайт сплайсинга; PPT – полипиримидиновый тракт; BPS – сайт ветвления.

## ВВЕДЕНИЕ

Большинство эукариотических транскриптов в процессе созревания подвергаются сплайсингу – процессу, при котором участки, называемые интронами, удаляются, а оставшиеся экзоны соединяются, образуя зрелые мРНК [1]. В подавляющем числе случаев сплайсинг катализируется сложным макромолекулярным комплексом, называемым сплайсосомой, который состоит из малых ядерных рибонуклеопротеинов (мяРПП), состоящих, в свою очередь, из малых ядерных РНК (мяРНК) и связанных с ними белков [2–4].

Сплайсосома распознает цис-регуляторные элементы в пре-мРНК, среди которых следует выделить четыре основных: 5'-сайт сплайсинга (5'ss), 3'-сайт сплайсинга (3'ss), полипиримидиновый тракт (polypyrimidine tract, PPT) и сайт ветвления (branch point sequence, BPS) [5]. Однако сплайсинг одинаковых транскриптов может происходить по-разному из-за распознавания на них различных сплайс-

сайтов, а также в результате их комбинирования в различных сочетаниях. Таким образом, вследствие альтернативного сплайсинга (АС) транскриптов одного и того же гена в клетке образуется множество различных изоформ зрелой мРНК.

Из многообразия событий АС можно выделить несколько основных: пропуск кассетного экзона, использование альтернативного 5'- или 3'-сайта сплайсинга, удержание интрона, а также выбор одного из нескольких взаимоисключающих экзонов [6, 7]. По современным оценкам не менее 95% генов человека, состоящих из более чем одного экзона, подвергаются альтернативному сплайсингу [8, 9], а скоординированные изменения сплайсинга множества пре-мРНК являются неотъемлемой частью регуляции ряда клеточных процессов [10–12].

АС регулируется комбинацией РНК-белковых, РНК-РНК- и белок-белковых взаимодействий, которые возникают между цис-регуляторными элементами и транс-действующими факторами [13,

14]. Помимо описанных ключевых элементов (5'ss, 3'ss, PPT, BPS) на АС оказывают влияние дополнительные цис-регуляторные элементы, которые могут располагаться как в экзонах, так и в интронах. Они называются экзонными и интронными энхансерами и сайленсерами сплайсинга. Их взаимодействие с транс-действующими факторами стимулирует или подавляет выбор сайта сплайсинга соответственно [15]. Результат сплайсинга зависит от согласованного действия множества энхансеров и сайленсеров [16].

В представленном обзоре мы приведем сведения о наиболее изученной регуляции АС РНК-связывающими белками, далее рассмотрим регуляцию АС вторичной структурой РНК, а затем опишем известные данные о совместном действии белков и РНК-структур в регуляции АС.

### РЕГУЛЯЦИЯ АС РНК-СВЯЗЫВАЮЩИМИ БЕЛКАМИ

В регуляции АС принимают участие более полутысячи РНК-связывающих белков (RNA-binding proteins, RBP) [17]. Их можно разделить на несколько классов: гетерогенные ядерные рибонуклеопротеиды (heterogeneous nuclear ribonucleoproteins, hnRNP), серин/аргинин-богатые белки (serine/arginine-rich proteins, SR) и остальные, например, тканеспецифические РНК-связывающие белки, такие, как NOVA, нейрональные РТВ/hnRNP I, семейство RBFOX и др. [6]. Здесь мы коротко остановимся на примерах, имеющих отношение к структуре РНК, а более подробные сведения о регуляции АС различными классами RBP можно найти в других обзорах [6, 18–20].

Повсеместно экспрессируемые белки из семейств SR и hnRNP являются наиболее изученными медиаторами распознавания сайтов сплайсинга [21–25]. SR-белки участвуют как в конститутивном, так и в альтернативном сплайсинге, что делает это семейство РНК-связывающих белков уникальным по сравнению с другими РНК-связывающими белками [22]. SR-белки обычно рассматриваются как положительные регуляторы сплайсинга. Они способствуют включению экзона, помогая рекрутировать U1 мРНК в 5'-сайт сплайсинга и вспомогательный фактор U2 (U2AF) в 3'-сайт сплайсинга посредством белок-белковых взаимодействий на ранних стадиях сборки сплайсосомы [21, 26].

Белки семейства hnRNP и SR-белки считаются антагонистами. Природа этого антагонизма не совсем ясна, так как высокоаффинные сайты связывания hnRNP нечасто перекрываются с сайтами связывания SR-белков в экзонах. Потенциальный механизм предполагает совместное связывание олигомеров hnRNP, которое распространяется вдоль транскрипта,

чтобы предотвратить связывание SR-белков с РНК [24]. Наиболее охарактеризованными среди hnRNP, участвующих в регуляции сплайсинга, являются негативные регуляторы hnRNP A/B и белок РТВ, связывающий РРТ, также известный как hnRNP I. Фактор hnRNP A2/B1 в основном является ингибитором сплайсинга, который препятствует распознаванию 5'ss и 3'ss, что чаще приводит к исключению альтернативного экзона (подробно функции hnRNP A/B изложены в [27]). РТВ связывается с полипиримидиновыми участками, как и U2AF65, который способствует связыванию U2 мРНК с 3'ss. Это подразумевает, что РТВ может мешать функциональному распознаванию 3'ss [28]. Механизм и направление действия белков семейства hnRNP зависят от расположения их сайтов связывания: при связывании перед или внутри кассетного экзона они, как правило, действуют как репрессоры, при связывании после – как активаторы АС [19, 29, 30].

Помимо SR и hnRNP белков охарактеризовано несколько тканеспецифических РНК-связывающих регуляторов сплайсинга. К ним относятся специфические для нейронов факторы NOVA [31], РТВР2 (nРТВ, brРТВ) [32] и SRRM4 (nSR100) [33], а также такие тканеспецифические факторы, как белки семейства RBFOX [34], MBNL [35, 36], CELF [37], QKI [38] и TIA [39, 40]. Их действие может быть обусловлено как тканеспецифической экспрессией, так и связыванием с мотивами пре-мРНК, которыми обогащены гены, экспрессирующиеся в определенном типе клеток или ткани. Тканеспецифические регуляторы АС чаще всего изучают при различных патологиях, например, при нейродегенеративных заболеваниях или мышечной дистрофии [41–43].

Для привлечения и правильного распределения факторов сплайсинга на их сайты связывания необходимо присутствие РНК-полимеразы II. Соответственно, транскрипция и сплайсинг взаимно влияют друг на друга за счет пространственных и кинетических механизмов [44]. РНК-полимераза II имеет С-концевой домен гептадных повторов (CTD), который используется в качестве «посадочной площадки» для доступных факторов, что позволяет увеличить их концентрацию рядом с сайтами сплайсинга [45–48]. Скорость элонгации транскрипции влияет на протекание АС, определяя, насколько быстро сайты сплайсинга становятся доступными для конкуренции за связывание с трансдействующими факторами, в том числе за счет образования вторичной структуры пре-мРНК [49–53].

### РЕГУЛЯЦИЯ АС ВТОРИЧНОЙ СТРУКТУРОЙ ПРЕ-МРНК

Несмотря на то, что большая часть молекул РНК в клетке является одноцепочечными, их отдельные

участки могут принимать конформации, содержащие двойные спирали, из которых формируется вторичная структура. Вторичная структура РНК может быть высокостабильной как *in vitro*, так и *in vivo*, а изменения в ее элементах представляют собой хорошо известный механизм регуляции многих клеточных процессов с участием РНК, включая сплайсинг [54–58].

Комплементарные спаривания оснований, из которых состоит вторичная структура РНК, можно отнести к локальным и дальним взаимодействиям [59]. Простейшим типом локальной вторичной структуры РНК является шпилька (hairpin, stem-loop). Поскольку сворачивание пре-мРНК происходит ко-транскрипционно, большая часть структуры *in vivo* образуется за счет локальных РНК-взаимодействий [60, 61]. В отличие от локальных, дальние взаимодействия образуются между комплементарными сайтами, разделенными протяженными участками (более 100 нуклеотидов) последовательности [62]. Дальние взаимодействия обладают некоторыми чертами третичной структуры, но, как и локальные, относятся ко вторичному уровню организации, т.е. определяют укладку полинуклеотидной цепи вследствие спаривания между основаниями [59].

### ЛОКАЛЬНЫЕ СТРУКТУРЫ В ПРЕ-мРНК

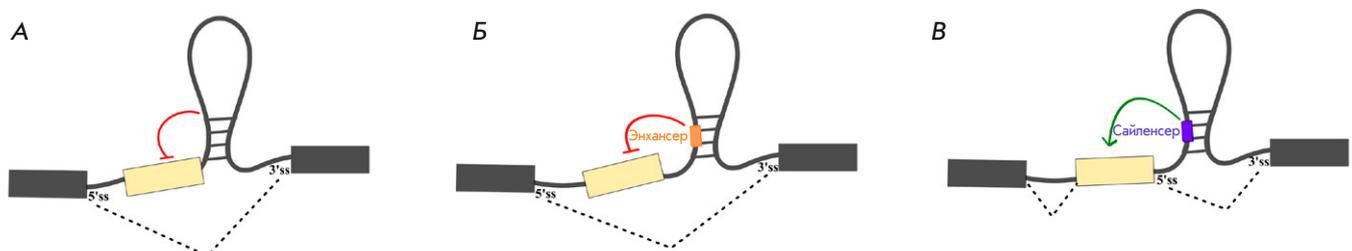
Существует множество экспериментально подтвержденных данных о регуляции АС локальной структурой пре-мРНК, например, путем предотвращения распознавания сплайсосомой 5'ss, 3'ss или элементов последовательности BPS [63]. Простейшим механизмом регуляции АС локальной вторичной структурой является блокирование сайтов сплайсинга (*рис. 1А*) [64]. Например, в пре-мРНК гена *MART* человека локальная вторичная структура маскирует 5'ss экзона 10, что не позволяет ему включаться в зрелый транскрипт [65]. Образование шпильки вблизи 5'ss может мешать взаимодействию пре-мРНК со сплайсосомой, как в случае экзона 7 гена *SMN2*, где такая шпилька мешает связыванию

5'ss с U1 мяРНК, что приводит к снижению уровня включения экзона [66].

Пре-мРНК гена фибронектина (*FN1*) является самым ярким примером влияния структуры шпильки на функцию энхансера сплайсинга (*рис. 1Б*). Один из экзонов гена *FN1*, называемый экзонем EDA, сильно структурирован и образует семь шпилек. Энхансер локализован в терминальной петле шпильки V и распознается транс-действующими факторами, например SRSF1. Изменение локализации энхансера с петли на стебель приводит к снижению его регулирующей способности [67]. Сходный механизм регуляции АС с участием интронного сайленсера сплайсинга наблюдается в пре-мРНК вируса иммунодефицита человека (*рис. 1В*) [68].

Неканоническим типом локальной вторичной структуры, влияющей на протекание АС, является G-квадруплекс (GQ). В G-квадруплексе четыре гуанозина взаимодействуют друг с другом через имидазольные связи, а их стэки образуют четырехцепочечную спираль [69]. GQ действуют как цис-элементы в регуляции АС, обычно располагаются в интронных областях и способствуют включению экзонов. Так, например, нарушение способности образовывать GQ существенно уменьшает включение экзона 8 в гене *CD44* [70]. Некоторые регуляторы сплайсинга, например, hnRNP H, hnRNP F, SRSF1, SRSF9, hnRNP U и U2AF65, могут взаимодействовать с GQ [71–73]. Формирование GQ в пре-мРНК гена *TP53* в интроне 3 регулирует сплайсинг интрона 2, что приводит к изменению соотношения активных и неактивных изоформ [74], причем удержание интрона приводит к появлению неактивной формы белка,  $\Delta 40p53$  [75].

Локальные вторичные структуры в пре-мРНК также могут быть мишенями малых молекул. Например, в результате АС транскрипта гена обратной транскриптазы теломеразы человека (*hTERT*) образуются 22 изоформы, из которых только полноразмерная мРНК транслируется в активный белок с обратной транскриптазной активностью



**Рис. 1.** Блокировка цис-регуляторных элементов сплайсинга структурой РНК. Блокировка сайта сплайсинга (А). Блокировка интронного энхансера (Б). Блокировка интронного сайленсера сплайсинга (В). Красными и зелеными линиями обозначено активирующее и ингибирующее действие на сплайсинг соответственно

[71]. Использование стабилизатора GQ приводит к снижению уровня активной теломеразы за счет исключения экзона 7 и 8. Это приводит к синтезу укороченного неактивного белка, называемого hTERT-β. Важным классом локальных структур РНК, служащих мишенями малых молекул у эукариот и влияют на АС, являются рибопереключатели (riboswitches) [76].

### ДАЛЬНИЕ ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ В ПРЕ-мРНК, РНК-МОСТЫ И ВЫПЕТЛИВАНИЯ

Наиболее хорошо дальние взаимодействия изучены в пре-мРНК у таких вирусов, как вирус табачной мозаики [77], вирус иммунодефицита человека [78] и др. [79, 80]. Наиболее известный пример дальних взаимодействий в пре-мРНК у эукариот – ген *Dscam* дрозофилы, рассмотрен далее, но следует сразу отметить, что в настоящее время появляется все больше и больше данных о наличии дальних взаимодействий в пре-мРНК человека и их влиянии на АС [81–86].

Дальние взаимодействия могут регулировать АС с помощью различных механизмов. Во-первых, как и локальные РНК-структуры, они могут блокировать цис-регуляторные элементы [87]. Во-вторых, дальние взаимодействия могут действовать как «РНК-мосты», сближающие цис-регуляторные элементы [34]. В-третьих, дальние взаимодействия могут также отдалять цис-регуляторные элементы друг от друга. Так, дальние взаимодействия между соседними интронами могут приводить к «выпетливанию» промежуточного экзона или группы экзона и способствовать их пропуску. Пример дальних взаимодействий в генах *CG33298* и *Gug* дрозофилы, которые функционируют как РНК-мосты и одновременно блокируют сайты сплайсинга [87], показывает, что эти три механизма не исключают друг друга.

РНК-мосты могут сближать в пространстве цис-регуляторные элементы без участия вспомогательных белков (рис. 2А). Например, дальние взаимодействия в пре-мРНК гена *SF1* млекопитающих сближают сильный 5'ss экзона 9 и слабый 3'ss экзона 10, а разрушение образуемой ими вторичной структуры приводит к активации более сильного 3'ss, расположенного на расстоянии 21 нуклеотида в направлении 3'-конца гена [62]. РНК-мосты могут также приближать интронные цис-регуляторные элементы к сайтам сплайсинга (рис. 2Б). Для успешной сборки сплайсосомы и протекания сплайсинга пре-мРНК гена *ENAH* необходимо, чтобы сайт связывания фактора RBFOX2 был сближен в пространстве с альтернативным экзоном, что достигается путем взаимодействия удаленных участков пре-мРНК, образующих РНК-мост [34]. В настоя-

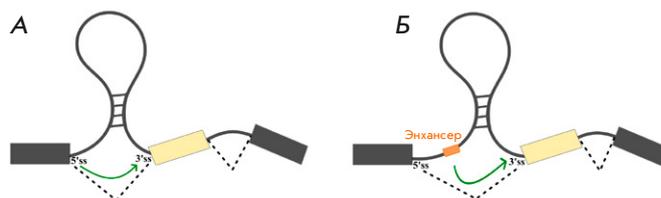


Рис. 2. Сближение цис-регуляторных элементов сплайсинга структурой РНК (РНК-«мосты»). Сближение сайтов сплайсинга (А). Приближение эхансера сплайсинга к сайту сплайсинга (Б)

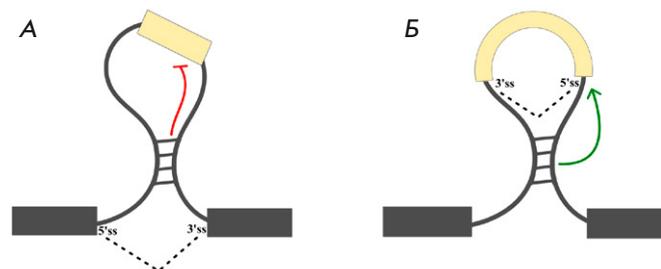


Рис. 3. Отдаление цис-регуляторных элементов сплайсинга структурой РНК (выпетливания). Выпетливание участка, содержащего один или несколько экзона и интронов (А). Обратный сплайсинг в интроне, приводящий к образованию кольцевой РНК (Б). Красными и зелеными линиями обозначено активирующее и ингибирующее действие на сплайсинг соответственно

щее время описано множество случаев, когда цис-регуляторные элементы находятся на значительном расстоянии от регулируемого экзона, как, например, у гена *14-3-3ζ* дрозофилы [88], а также генов *ENAH* и *KIF21A* человека [34]. Полногеномные карты РНК-белковых взаимодействий также показывают, что большая часть сайтов связывания удалена от потенциальных экзона-мишеней намного дальше, чем 1000 нуклеотидов [89].

Выпетливание части пре-мРНК вторичной структурой, с одной стороны, сближает окружающие цис-регуляторные элементы, а с другой, помещает ее внутреннюю часть в петлю, что, как считается, способствует исключению выпетливаемого участка (рис. 3А) [90]. Например, при взаимодействиях между комплементарными основаниями в интронах, фланкирующих альтернативный экзон, увеличивается частота пропуска такого экзона [91]. Вторичная структура в гене *Nmnat* дрозофилы выпетливает примерно 350 нуклеотидов и приводит к исключению экзона 5 и сигнала поли(А) из пре-мРНК. В этом случае структура приближает дистальный акцепторный сайт сплайсинга к донорному сайту и тем самым способствует вырезанию внутреннего терминального экзона [87]. Выпетливания

экзонов характерны и для дальних взаимодействий в других генах млекопитающих, например, в *CASK* и *PHF20L1* [92], гене дистонина (*DST*), в котором комплементарные участки предположительно выпетливают кластер из шести экзонов [93], а также в гене теломеразы человека (*hTERT*), в котором дальние взаимодействия между тандемными повторами приводят к исключению двух экзонов [94]. Пример вторичной структуры в пре-мРНК протеолипидного белка 1 (*PLP1*), две изоформы альтернативного сплайсинга которого различаются выбором альтернативного 5'ss в интроне между экзонами 3 и 4, показывает, что выпетливания не только экзонов, но и отдельных сайтов сплайсинга оказывают значительное влияние на сплайсинг [95].

Однако самый известный пример влияния дальних взаимодействий на АС – ген *Dscam* дрозофилы, в транскриптах которого комплементарные спаривания могут происходить на расстоянии до 12000 нуклеотидов. Особенностью механизма сплайсинга *Dscam* является то, что комплементарные участки образуют комплекс конкурирующих структур РНК, которые управляют взаимоисключающим выбором экзонов [96, 97]. Расположенный перед кластером экзонов 6 докерный сайт может спариваться только с одним из нескольких селекторных сайтов, находящихся перед каждым из альтернативных экзонов, тем самым не только сближая удаленные друг от друга 5'ss и 3'ss, но и выпетливая промежуточные экзоны. Взаимоисключающий механизм АС дополнительно контролируется фактором *Hrp36*, который подавляет эктопическое включение альтернативных экзонов под действием SR-белков [98]. Аналогичный механизм обнаружен во многих других генах, содержащих кластеры взаимоисключающих экзонов (см. обзор [99]), например, *14-3-3ζ* [100], *Mhc* [88], *srp*, *RIC-3*, *MRP1* [101], *DNM1* [102], *TCF3*, *CD55* [103] и *ATE1* [52]. Высказано также предположение о том, что тандемные дубликации, в результате которых образуются кластеры взаимоисключающих экзонов, неизбежно приводят к образованию конкурирующих структур РНК и вследствие этого к взаимоисключающему типу АС [104].

Однако выпетливание части пре-мРНК само по себе не предотвращает ее связывания с компонентами сплайсосомы, а наоборот, может способствовать протеканию сплайсинга. Как показывает пример кольцевых РНК, комплементарные взаимодействия в интронах, в частности с участием *Alu*-повторов, могут способствовать протеканию так называемого обратного сплайсинга (*back-splicing*), ковалентно связывающего 5'- и 3'-концы РНК с образованием кольцевых транскриптов (*рис. 3B*) [105, 106]. Из сказанного можно заключить, что блокиров-

ка, сближение и отдаление цис-регуляторных элементов являются частными случаями более общего молекулярного механизма, в котором направление сплайсинга регулируется конформацией транскрипта, зависящей, в свою очередь, от дальних взаимодействий в его вторичной структуре.

### КООПЕРАЦИЯ И КОНКУРЕНЦИЯ ВТОРИЧНОЙ СТРУКТУРЫ РНК И РНК-БЕЛКОВЫХ ВЗАИМОДЕЙСТВИЙ

Пре-мРНК образует локальную вторичную структуру котранскрипционно, одновременно со сворачиванием вступая во взаимодействие с RBP [107]. RBP содержат четко определенные РНК-связывающие домены (RBD), такие, как РНК-распознающий домен (RRM), hnRNP К-гомологичный домен (KH), цинковые пальцы (ZF) и др., которые взаимодействуют с определенными последовательностями и/или структурами в РНК [108]. Большинство RBD распознают очень короткие (3–7 нуклеотидов) и вырожденные мотивы, которые часто организованы в кластеры, что позволяет увеличить специфичность связывания RBP, имеющих несколько RBD, а также позволяет нескольким RBP кооперировать между собой [17]. Например, высокоаффинное связывание нейрон-специфического фактора сплайсинга NOVA определяется мотивом YCAU (Y = C/U), который обычно находится в кластерах из нескольких тетрамеров [109]. Некоторые RBP распознают разнесенные в пространстве двудольные мотивы, имеющие определенный структурный контекст [110]. Тем не менее, RBP, узнающие схожие мотивы, могут иметь различные профили связывания и даже высокоаффинные взаимодействия могут оказаться нефункциональными [111].

Множество данных указывает на то, что важнейшим фактором, влияющим на связывание RBP, является структура РНК [112]. Сайты связывания RBP могут входить в состав различных структурных элементов пре-мРНК [113]. Естественно предположить, что ZF RBD связываются с РНК-дуплексами, поскольку более 20 ZF-доменсодержащих белков избирательно связывают высокоструктурированные двуцепочечные прекурсоры микроРНК [108]. RBP с доменами KH предпочитают, как правило, большие петли шпильки. Учитывая, что большинство таких RBP содержат несколько RBD, большие петли РНК-шпильки позволяют связывать сразу несколько доменов KH, как это происходит в случае с NOVA1 и PCBP2 [109, 114–116]. Можно предположить, что результат АС должен зависеть от равновесия между РНК-РНК- и РНК-белковыми взаимодействиями, причем конкуренция между ними зависит от репертуара RBP, которые экспрессиру-

ются в клетках данного типа [111]. Кроме того, сами RBP часто функционируют комбинаторно, связываясь с сайтами и структурными элементами на общих мишенях мРНК [117].

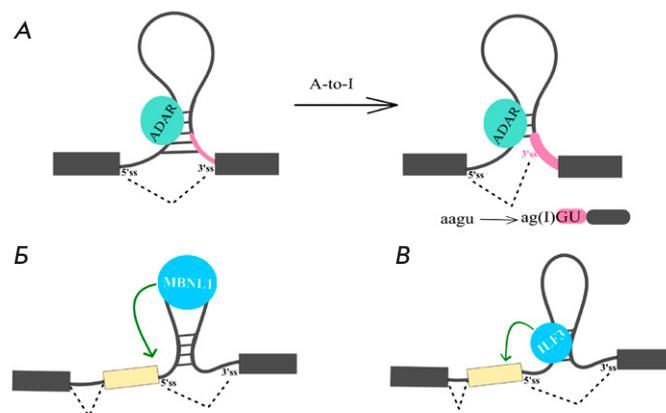
Изменения в структуре РНК и вызванные ими изменения АС могут возникать за счет взаимодействия с другими нуклеиновыми кислотами, например с микроРНК [118], а также в результате посттранскрипционных модификаций последовательности пре-мРНК [119]. Так, например, A-to-I-редактирование с помощью белков ADAR регулирует протекание АС за счет изменения последовательности основных дис-элементов (рис. 4А) [120–122]. Кроме того, ADAR2 может связываться с двухцепочечной РНК, образованной GA-богатой последовательностью и полипиримидиновым трактом, тем самым предотвращая рекрутирование U2AF65 [123]. Метилированный N6-аденозин (m<sup>6</sup>A) и связанные с ним белки также могут регулировать АС [119, 124]. Например, модификация m<sup>6</sup>A может способствовать связыванию hnRNP C за счет изменения структуры РНК-мишени и обнажения одноцепочечного сайта сплайсинга. Такой механизм характерен и для hnRNP G [125].

Структура РНК может затруднять распознавание дис-регуляторных элементов сплайсинга и сайтов связывания RBP, однако, это не единственный способ, которым она может влиять на АС. Так, для сплайсинга экзона 5 гена сердечного тропонина Т (сТNT) человека требуется связывание белка MBNL1 на 3'-конце предшествующего интрона. MBNL1 связывает часть интрона в форме шпильки (рис. 4Б), тогда как фактор сплайсинга U2AF65 связывает ту же область в одноцепочечном состоянии. Стабилизация локальной структуры в форме шпильки блокирует связывание U2AF65, что не позволяет рекрутировать U2 мяРПП, и экзон пропускается [126]. Еще одним ярким примером является связывание hnRNP F с пре-мРНК, содержащей G-квадруплексы, которое стимулирует включение кассетного экзона в гене *CD44*. Интересно отметить, что другой регулятор АС, ESRP1, также стимулирует включение альтернативного экзона *CD44* независимо от hnRNP F, связываясь с GU-богатым мотивом, частично перекрывающимся с GQ. Это позволяет предположить, что пре-мРНК *CD44* находится в равновесии линейной формы и формы GQ, что помогает поддерживать правильное соотношение изоформ АС [70].

Регуляция АС может происходить за счет RBP-зависимой стабилизации или ослабления вторичной структуры РНК. Например, белки ZFR (zinc-finger RNA-binding protein) и ILF3 образуют гетеродимерные дуплексы с ILF2. Получившиеся комплексы

неспецифически связываются с двухцепочечными участками в пре-мРНК, влияя на доступность сайтов сплайсинга и связывание транс-действующих факторов (рис. 4В). Взаимодействие ILF3 и ZFR со структурой РНК влияет на взаимоисключающий выбор экзонов гена *ATE1*. Было высказано предположение о том, что ZFR и ILF3 участвуют в стабилизации дуплексов РНК во время взаимоисключающего сплайсинга, хотя точный механизм их действия остается неизвестным [127].

Некоторые RBP регулируют АС, изменяя третичную структуру пре-мРНК. В отличие от РНК-мостов, в этом случае именно белок-белковые, а не комплементарные взаимодействия обеспечивают необходимую для АС конформацию пре-мРНК. Например, гомодимеры белка hnRNPA1, взаимодействуя с расположенными в соседних интронах сайтами, сближают их и вышетливают экзон, приводя к его пропуску [90]. Подобный механизм также характерен для белков hnRNP F/H [128]. Показано также, что hnRNPA1 и hnRNP H могут взаимодействовать друг с другом и с другими белками семейства hnRNP [129]. Сближением далеких участков пре-мРНК объясняют и влияние белка NOVA на сплайсинг, поскольку его сайты связывания часто располагаются в начале интрона и вблизи BPS. Это позволяет предположить, что NOVA связывается с двумя сайтами на концах интрона и образует петлю, сближая 5'ss и BPS [130]. Гомотипические и гетеротипические взаимодействия между RBP, которые сближают удаленные друг от друга участки пре-мРНК, могут быть широко распространенным механизмом регуляции АС.



**Рис. 4.** Совместное действие вторичной структуры РНК и РНК-белковых взаимодействий. Создание сайта сплайсинга за счет редактирования РНК (A-to-I RNA editing) (А). Связывание РНК-связывающего белка с петлей РНК-структуры (Б). Связывание РНК-связывающего белка с двухцепочечным участком (В)

**ЗАКЛЮЧЕНИЕ**

Механизмы регуляции АС структурой РНК и РНК-связывающими белками ранее были описаны независимо друг от друга. Тем не менее, поскольку связывание регуляторов АС может зависеть от структуры РНК и наоборот, образование структуры может зависеть от взаимодействия с регуляторами, мы видим множественные взаимные эффекты. В настоящее время ясно, что структура пре-мРНК участвует в регуляции доступности сайтов связывания факторов сплайсинга, а также способствует образованию конформаций, необходимых для протекания сплайсинга, за счет РНК-мостов и выпетливаний. При этом белковые факторы могут участвовать в модификации последовательности

пре-мРНК, организации ее вторичной и третичной структуры, тем самым влияя на протекание сплайсинга. Таким образом, локальные и дальние взаимодействия в структуре пре-мРНК, а также белковые факторы следует рассматривать как неотъемлемые составные части общих регуляторных каскадов. ●

*Авторы выражают благодарности М.А. Власенок, М.В. Петровой и О.А. Донцовой за критические замечания.*

*Данная работа выполнена при поддержке гранта Министерства науки и образования Российской Федерации (№ 075-10-2021-116).*

**СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ**

- Gilbert W. // Nature. 1978. V. 271. № 5645. P. 501.
- Will C.L., Lührmann R. // Cold Spring Harb. Perspect. Biol. 2011. V. 3. № 7. P. a003707.
- Matera A.G., Wang Z. // Nat. Rev. Mol. Cell. Biol. 2014. V. 15. № 2. P. 108–121.
- Yan C., Wan R., Shi Y. // Cold Spring Harb. Perspect. Biol. 2019. V. 11. № 1. P. a032409.
- Shapiro M.B., Senapathy P. // Nucl. Acids Res. 1987. V. 15. № 17. P. 7155–7174.
- Wang Y., Liu J., Huang B.O., Xu Y.M., Li J., Huang L.F., Lin J., Zhang J., Min Q.H., Yang W.M., Wang X.Z. // Biomed. Rep. 2015. V. 3. № 2. P. 152–158.
- Nilsen T.W., Graveley B.R. // Nature. 2010. V. 463. № 7280. P. 457–463.
- Wang E.T., Sandberg R., Luo S., Khrebtkova I., Zhang L., Mayr C., Kingsmore S.F., Schroth G.P., Burge C.B. // Nature. 2008. V. 456. № 7221. P. 470–476.
- Pan Q., Shai O., Lee L.J., Frey B.J., Blencowe B.J. // Nat. Genet. 2008. V. 40. № 12. P. 1413–1415.
- Grabowski P.J. // Cell. 1998. V. 92. № 6. P. 709–712.
- Schwerk C., Schulze-Osthoff K. // Mol. Cell. 2005. V. 19. № 1. P. 1–13.
- Baralle F.E., Giudice J. // Nat. Rev. Mol. Cell Biol. 2017. V. 18. № 7. P. 437–451.
- Ule J., Blencowe B. // Mol. Cell. 2019. V. 76. № 2. P. 329–345.
- Wahl M.C., Will C.L., Lührmann R. // Cell. 2009. V. 136. № 4. P. 701–718.
- Wang Z., Burge C.B. // RNA. 2008. V. 14. № 5. P. 802–813.
- Barash Y., Calarco J.A., Gao W., Pan Q., Wang X., Shai O., Blencowe B.J., Frey B.J. // Nature. 2010. V. 465. № 7294. P. 53–59.
- Gerstberger S., Hafner M., Tuschl T. // Nat. Rev. Genet. 2014. V. 15. № 12. P. 829–845.
- Li Q., Lee J.A., Black D.L. // Nat. Rev. Neurosci. 2007. V. 8. № 11. P. 819–831.
- Fu X.D., Ares M. // Nat. Rev. Genet. 2014. V. 15. № 10. P. 689–701.
- Dvinge H. // FEBS Lett. 2018. V. 592. № 17. P. 2987–3006.
- Zhou Z., Fu X.D. // Chromosoma. 2013. V. 122. № 3. P. 191–207.
- Long J.C., Caceres J.F. // Biochem. J. 2009. V. 417. № 1. P. 15–27.
- Pandit S., Zhou Y., Shiue L., Coutinho-Mansfield G., Li H., Qiu J., Huang J., Yeo G.W., Ares M., Fu X.D. // Mol. Cell. 2013. V. 50. № 2. P. 223–235.
- Martinez-Contreras R., Cloutier P., Shkreta L., Fiset J.F., Revil T., Chabot B. // Adv. Exp. Med. Biol. 2007. V. 623. P. 123–147.
- Dreyfuss G., Matunis M.J., Piñol-Roma S., Burd C.G. // Annu. Rev. Biochem. 1993. V. 62. P. 289–321.
- Sahebi M., Hanafi M.M., van Wijnen A.J., Azizi P., Abiri R., Ashkani S., Taheri S. // Gene. 2016. V. 587. № 2. P. 107–119.
- Liu Y., Shi S.L. // Wiley Interdiscip. Rev. RNA. 2021. V. 12. № 2. P. e1612.
- Xue Y., Zhou Y., Wu T., Zhu T., Ji X., Kwon Y.S., Zhang C., Yeo G., Black D.L., Sun H., et al. // Mol. Cell. 2009. V. 36. № 6. P. 996–1006.
- Schaub M.C., Lopez S.R., Caputi M. // J. Biol. Chem. 2007. V. 282. № 18. P. 13617–13626.
- Caputi M., Zahler A.M. // J. Biol. Chem. 2001. V. 276. № 47. P. 43850–43859.
- Zhang C., Frias M.A., Mele A., Ruggiu M., Eom T., Marney C.B., Wang H., Licatalosi D.D., Fak J.J., Darnell R.B. // Science. 2010. V. 329. № 5990. P. 439–443.
- Markovtsov V., Nikolic J.M., Goldman J.A., Turck C.W., Chou M.Y., Black D.L. // Mol. Cell. Biol. 2000. V. 20. № 20. P. 7463–7479.
- Quesnel-Vallières M., Irimia M., Cordes S.P., Blencowe B.J. // Genes Dev. 2015. V. 29. № 7. P. 746–759.
- Lovci M.T., Ghanem D., Marr H., Arnold J., Gee S., Parra M., Liang T.Y., Stark T.J., Gehman L.T., Hoon S., et al. // Nat. Struct. Mol. Biol. 2013. V. 20. № 12. P. 1434–1442.
- Warf M.B., Berglund J.A. // RNA. 2007. V. 13. № 12. P. 2238–2251.
- Wang E.T., Cody N.A., Jog S., Biancolella M., Wang T.T., Treacy D.J., Luo S., Schroth G.P., Housman D.E., Reddy S., et al. // Cell. 2012. V. 150. № 4. P. 710–724.
- Ladd A.N., Charlet N., Cooper T.A. // Mol. Cell Biol. 2001. V. 21. № 4. P. 1285–1296.
- Hall M.P., Nagel R.J., Fagg W.S., Shiue L., Cline M.S., Perriman R.J., Donohue J.P., Ares M. // RNA. 2013. V. 19. № 5. P. 627–638.
- Wang Z., Kayikci M., Briese M., Zarnack K., Luscombe N.M., Rot G., Zupan B., Curk T., Ule J. // PLoS Biol. 2010. V. 8. № 10. P. e1000530.
- Gal-Mark N., Schwartz S., Ram O., Eyraş E., Ast G. //

- PLoS Genet. 2009. V. 5. № 11. P. e1000717.
41. Berto S., Usui N., Konopka G., Fogel B.L. // *Hum. Mol. Genet.* 2016. V. 25. № 12. P. 2451–2464.
  42. Zhou H., Mangelsdorf M., Liu J., Zhu L., Wu J.Y. // *Sci. China Life Sci.* 2014. V. 57. № 4. P. 432–444.
  43. Prashad S., Gopal P.P. // *RNA Biol.* 2021. V. 18. № 7. P. 972–987.
  44. Das R., Dufu K., Romney B., Feldt M., Elenko M., Reed R. // *Genes Dev.* 2006. V. 20. № 9. P. 1100–1109.
  45. Bird G., Zorio D.A., Bentley D.L. // *Mol. Cell. Biol.* 2004. V. 24. № 20. P. 8963–8969.
  46. Saldi T., Cortazar M.A., Sheridan R.M., Bentley D.L. // *J. Mol. Biol.* 2016. V. 428. № 12. P. 2623–2635.
  47. Yuryev A., Patturajan M., Litingtung Y., Joshi R.V., Gentile C., Gebara M., Corden J.L. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1996. V. 93. № 14. P. 6975–6980.
  48. Misteli T., Spector D.L. // *Mol. Cell.* 1999. V. 3. № 6. P. 697–705.
  49. Aslanzadeh V., Huang Y., Sanguinetti G., Beggs J.D. // *Genome Res.* 2018. V. 28. № 2. P. 203–213.
  50. Dujardin G., Lafaille C., de la Mata M., Marasco L.E., Muñoz M.J., Le Jossic-Corcós C., Corcos L., Kornblihtt A.R. // *Mol. Cell.* 2014. V. 54. № 4. P. 683–690.
  51. Aitken S., Alexander R.D., Beggs J.D. // *PLoS Comput. Biol.* 2011. V. 7. № 10. P. e1002215.
  52. Kalinina M., Skvortsov D., Kalmykova S., Ivanov T., Dontsova O., Pervouchine D.D. // *Nucl. Acids Res.* 2021. V. 49. № 1. P. 479–490.
  53. Saldi T., Riemyndy K., Erickson B., Bentley D.L. // *Mol. Cell.* 2021. V. 81. № 8. P. 1789–1801.
  54. Baralle F.E., Singh R.N., Stamm S. // *Biochim. Biophys. Acta Gene Regul. Mech.* 2019. V. 1862. № 11–12. P. 194448.
  55. Rieder L.E., Reenan R.A. // *Semin. Cell Dev. Biol.* 2012. V. 23. № 3. P. 281–288.
  56. Xu B., Meng Y., Jin Y. // *Wiley Interdiscip. Rev. RNA.* 2021. V. 12. № 1. P. e1626.
  57. Rubtsov P.M. // *Mol. Biol. (Moscow).* 2016. V. 50. № 6. P. 935–943.
  58. Herbert A., Hatfield A., Lackey L. // *Biosci. Rep.* 2023. V. 43. № 3. P. BSR20220149.
  59. Pervouchine D.D. // *Genes (Basel).* 2018. V. 9. № 6. P. 302.
  60. Lai D., Proctor J.R., Meyer I.M. // *RNA.* 2013. V. 19. № 11. P. 1461–1473.
  61. Fong N., Kim H., Zhou Y., Ji X., Qiu J., Saldi T., Diener K., Jones K., Fu X.D., Bentley D.L. // *Genes Dev.* 2014. V. 28. № 23. P. 2663–2676.
  62. Pervouchine D.D., Khrameeva E.E., Pichugina M.Y., Nikolaienko O.V., Gelfand M.S., Rubtsov P.M., Mironov A.A. // *RNA.* 2012. V. 18. № 1. P. 1–15.
  63. Buratti E., Baralle F.E. // *Mol. Cell. Biol.* 2004. V. 24. № 24. P. 10505–10514.
  64. Hiller M., Zhang Z., Backofen R., Stamm S. // *PLoS Genet.* 2007. V. 3. № 11. P. e204.
  65. Hutton M., Lendon C.L., Rizzu P., Baker M., Froelich S., Houlden H., Pickering-Brown S., Chakraverty S., Isaacs A., Grover A., et al. // *Nature.* 1998. V. 393. № 6686. P. 702–705.
  66. Singh N.N., Singh R.N. // *Biochim. Biophys. Acta Gene Regul. Mech.* 2019. V. 1862. № 11–12. P. 194403.
  67. Muro A.F., Caputi M., Pariyarath R., Pagani F., Buratti E., Baralle F.E. // *Mol. Cell. Biol.* 1999. V. 19. № 4. P. 2657–2671.
  68. Damgaard C.K., Tange T.O., Kjems J. // *RNA.* 2002. V. 8. № 11. P. 1401–1415.
  69. Rhodes D., Lipps H.J. // *Nucl. Acids Res.* 2015. V. 43. № 18. P. 8627–8637.
  70. Huang H., Zhang J., Harvey S.E., Hu X., Cheng C. // *Genes Dev.* 2017. V. 31. № 22. P. 2296–2309.
  71. Gomez D., Lemarteleur T., Lacroix L., Mailliet P., Mergny J.L., Riou J.F. // *Nucl. Acids Res.* 2004. V. 32. № 1. P. 371–379.
  72. Didiot M.C., Tian Z., Schaeffer C., Subramanian M., Mandel J.L., Moine H. // *Nucl. Acids Res.* 2008. V. 36. № 15. P. 4902–4912.
  73. Millevoi S., Moine H., Vagner S. // *Wiley Interdiscip. Rev. RNA.* 2012. V. 3. № 4. P. 495–507.
  74. Marcel V., Tran P.L., Sagne C., Martel-Planche G., Vaslin L., Teulade-Fichou M.P., Hall J., Mergny J.L., Hainaut P., van Dyck E. // *Carcinogenesis.* 2011. V. 32. № 3. P. 271–278.
  75. Courtois S., Verhaegh G., North S., Luciani M.G., Lassus P., Hibner U., Oren M., Hainaut P. // *Oncogene.* 2002. V. 21. № 44. P. 6722–6728.
  76. Wachter A. // *RNA Biol.* 2010. V. 7. № 1. P. 67–76.
  77. Archer E.J., Simpson M.A., Watts N.J., O’Kane R., Wang B., Erie D.A., McPherson A., Weeks K.M. // *Biochemistry.* 2013. V. 52. № 18. P. 3182–3190.
  78. Jacquenet S., Ropers D., Bilodeau P.S., Damier L., Mouglin A., Stoltzfus C.M., Branlant C. // *Nucl. Acids Res.* 2001. V. 29. № 2. P. 464–478.
  79. Nicholson B.L., White K.A. // *Nat. Rev. Microbiol.* 2014. V. 12. № 7. P. 493–504.
  80. Miller W.A., White K.A. // *Annu. Rev. Phytopathol.* 2006. V. 44. P. 447–467.
  81. Kalmykova S., Kalinina M., Denisov S., Mironov A., Skvortsov D., Guigó R., Pervouchine D. // *Nat. Commun.* 2021. V. 12. № 1. P. 2300.
  82. Cai Z., Cao C., Ji L., Ye R., Wang D., Xia C., Wang S., Du Z., Hu N., Yu X., et al. // *Nature.* 2020. V. 582. № 7812. P. 432–437.
  83. Lu Z., Zhang Q.C., Lee B., Flynn R.A., Smith M.A., Robinson J.T., Davidovich C., Gooding A.R., Goodrich K.J., Mattick J.S., et al. // *Cell.* 2016. V. 165. № 5. P. 1267–1279.
  84. Aw J.G., Shen Y., Wilm A., Sun M., Lim X.N., Boon K.L., Tapsin S., Chan Y.S., Tan C.P., Sim A.Y., et al. // *Mol. Cell.* 2016. V. 62. № 4. P. 603–617.
  85. Sharma E., Sterne-Weiler T., O’Hanlon D., Blencowe B.J. // *Mol. Cell.* 2016. V. 62. № 4. P. 618–626.
  86. Ziv O., Gabryelska M.M., Lun A.T.L., Gebert L.F.R., Sheu-Gruttadauria J., Meredith L.W., Liu Z.Y., Kwok C.K., Qin C.F., MacRae I.J., et al. // *Nat. Methods.* 2018. V. 15. № 10. P. 785–788.
  87. Raker V.A., Mironov A.A., Gelfand M.S., Pervouchine D.D. // *Nucl. Acids Res.* 2009. V. 37. № 14. P. 4533–4544.
  88. Yang Y., Zhan L., Zhang W., Sun F., Wang W., Tian N., Bi J., Wang H., Shi D., Jiang Y., et al. // *Nat. Struct. Mol. Biol.* 2011. V. 18. № 2. P. 159–168.
  89. van Nostrand E.L., Freese P., Pratt G.A., Wang X., Wei X., Xiao R., Blue S.M., Chen J.Y., Cody N.A.L., Dominguez D., et al. // *Nature.* 2020. V. 583. № 7818. P. 711–719.
  90. Nasim F.U., Hutchison S., Cordeau M., Chabot B. // *RNA.* 2002. V. 8. № 8. P. 1078–1089.
  91. Miriami E., Margalit H., Sperling R. // *Nucl. Acids Res.* 2003. V. 31. № 7. P. 1974–1983.
  92. Margasyuk S., Kalinina M., Petrova M., Skvortsov D., Cao C., Pervouchine D.D. // *RNA.* 2023. V. 29. № 9. P. 1423–1436.
  93. Pervouchine D.D. // *RNA.* 2014. V. 20. № 10. P. 1519–1531.
  94. Wong M.S., Shay J.W., Wright W.E. // *Nat. Commun.* 2014. V. 5. P. 3306.
  95. Taube J.R., Sperle K., Banser L., Seeman P., Cavan B.C., Garbern J.Y., Hobson G.M. // *Hum. Mol. Genet.* 2014. V. 23. № 20. P. 5464–5478.
  96. Graveley B.R. // *Cell.* 2005. V. 123. № 1. P. 65–73.
  97. Wang X., Li G., Yang Y., Wang W., Zhang W., Pan H.,

- Zhang P., Yue Y., Lin H., Liu B., et al. // *Nat. Commun.* 2012. V. 3. P. 1255.
98. Olson S., Blanchette M., Park J., Savva Y., Yeo G.W., Yeakley J.M., Rio D.C., Graveley B.R. // *Nat. Struct. Mol. Biol.* 2007. V. 14. № 12. P. 1134–1140.
99. Jin Y., Dong H., Shi Y., Bian L. // *Wiley Interdiscip. Rev. RNA.* 2018. V. 9. № 3. P. e1468.
100. Yang Y., Sun F., Wang X., Yue Y., Wang W., Zhang W., Zhan L., Tian N., Shi F., Jin Y. // *RNA Biol.* 2012. V. 9. № 5. P. 691–700.
101. Yue Y., Yang Y., Dai L., Cao G., Chen R., Hong W., Liu B., Shi Y., Meng Y., Shi F., et al. // *RNA.* 2016. V. 22. № 1. P. 96–110.
102. Suyama M. // *Bioinformatics.* 2013. V. 29. № 17. P. 2084–2087.
103. Hatje K., Rahman R.U., Vidal R.O., Simm D., Hammesfahr B., Bansal V., Rajput A., Mickael M.E., Sun T., Bonn S., Kollmar M. // *Mol. Syst. Biol.* 2017. V. 13. № 12. P. 959.
104. Ivanov T.M., Pervouchine D.D. // *Genes (Basel).* 2018. V. 9. № 7. P. 356.
105. Welden J.R., Stamm S. // *Biochim. Biophys. Acta Gene Regul. Mech.* 2019. V. 1862. № 11–12. P. 194410.
106. Pervouchine D.D. // *Biochim. Biophys. Acta Gene Regul. Mech.* 2019. V. 1862. № 11–12. P. 194384.
107. Eperon L.P., Graham I.R., Griffiths A.D., Eperon I.C. // *Cell.* 1988. V. 54. № 3. P. 393–401.
108. Lunde B.M., Moore C., Varani G. // *Nat. Rev. Mol. Cell. Biol.* 2007. V. 8. № 6. P. 479–490.
109. Jensen K.B., Musunuru K., Lewis H.A., Burley S.K., Darnell R.B. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2000. V. 97. № 11. P. 5740–5745.
110. Dominguez D., Freese P., Alexis M.S., Su A., Hochman M., Palden T., Bazile C., Lambert N.J., van Nostrand E.L., Pratt G.A., et al. // *Mol. Cell.* 2018. V. 70. № 5. P. 854–867.
111. Witten J.T., Ule J. // *Trends Genet.* 2011. V. 27. № 3. P. 89–97.
112. Taliaferro J.M., Lambert N.J., Sudmant P.H., Dominguez D., Merkin J.J., Alexis M.S., Bazile C., Burge C.B. // *Mol. Cell.* 2016. V. 64. № 2. P. 294–306.
113. Cusack S. // *Curr. Opin. Struct. Biol.* 1999. V. 9. № 1. P. 66–73.
114. Lewis H.A., Musunuru K., Jensen K.B., Edo C., Chen H., Darnell R.B., Burley S.K. // *Cell.* 2000. V. 100. № 3. P. 323–332.
115. Teplova M., Malinina L., Darnell J.C., Song J., Lu M., Abagyan R., Musunuru K., Teplov A., Burley S.K., Darnell R.B., Patel D.J. // *Structure.* 2011. V. 19. № 7. P. 930–944.
116. Du Z., Fenn S., Tjhen R., James T.L. // *J. Biol. Chem.* 2008. V. 283. № 42. P. 28757–28766.
117. Nag S., Goswami B., Das Mandal S., Ray P.S. // *Semin Cancer Biol.* 2022. V. 86. Pt 3. P. 286–297.
118. Schorr A.L., Mangone M. // *Int. J. Mol. Sci.* 2021. V. 22. № 21. P. 11618.
119. Hsiao Y.E., Bahn J.H., Yang Y., Lin X., Tran S., Yang E.W., Quinones-Valdez G., Xiao X. // *Genome Res.* 2018. V. 28. № 6. P. 812–823.
120. Rueter S.M., Dawson T.R., Emeson R.B. // *Nature.* 1999. V. 399. № 6731. P. 75–80.
121. Lev-Maor G., Sorek R., Levanon E.Y., Paz N., Eisenberg E., Ast G. // *Genome Biol.* 2007. V. 8. № 2. P. R29.
122. Solomon O., Oren S., Safran M., Deshet-Unger N., Akiva P., Jacob-Hirsch J., Cesarkas K., Kabesa R., Amariglio N., Unger R., et al. // *RNA.* 2013. V. 19. № 5. P. 591–604.
123. Mazloomian A., Meyer I.M. // *RNA Biol.* 2015. V. 12. № 12. P. 1391–1401.
124. Xiao W., Adhikari S., Dahal U., Chen Y.S., Hao Y.J., Sun B.F., Sun H.Y., Li A., Ping X.L., Lai W.Y., et al. // *Mol. Cell.* 2016. V. 61. № 4. P. 507–519.
125. Liu N., Dai Q., Zheng G., He C., Parisien M., Pan T. // *Nature.* 2015. V. 518. № 7540. P. 560–564.
126. Warf M.B., Diegel J.V., von Hippel P.H., Berglund J.A. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2009. V. 106. № 23. P. 9203–9208.
127. Haque N., Will A., Cook A.G., Hogg J.R. // *Nucl. Acids Res.* 2023. V. 51. № 12. P. 6411–6429.
128. Martinez-Contreras R., Fiset J.F., Nasim F.U., Madden R., Cordeau M., Chabot B. // *PLoS Biol.* 2006. V. 4. № 2. P. e21.
129. Fiset J.F., Toutant J., Brisson S., Desgroseillers L., Chabot B. // *RNA.* 2010. V. 16. № 1. P. 228–238.
130. Ule J., Stefani G., Mele A., Ruggiu M., Wang X., Taneri B., Gaasterland T., Blencowe B.J., Darnell R.B. // *Nature.* 2006. V. 444. № 7119. P. 580–586.

УДК 576.08:53.086

# Микроскопия мягкого рентгеновского диапазона в клеточной биологии: современное состояние, вклад и перспективы

С. А. Голышев<sup>1</sup>, Е. П. Казаков<sup>1</sup>, И. И. Киреев<sup>1</sup>, Д. Г. Реунов<sup>2</sup>, И. В. Малышев<sup>2</sup><sup>1</sup>Научно-исследовательский институт физико-химической биологии имени А.Н. Белозерского, Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, Москва, 119992 Россия<sup>2</sup>Институт физики микроструктур РАН, Нижний Новгород, 603950 Россия

\*E-mail: sergei.golyshev@belozersky.msu.ru

Поступила в редакцию 30.09.2023

Принята к печати 27.11.2023

DOI: 10.32607/actanaturae.26551

**РЕФЕРАТ** Развитие микроскопии обеспечило серьезный прорыв в биологических исследованиях на рубеже 20–21 вв. Световая флуоресцентная микроскопия с суперразрешением позволила визуализировать субклеточные структуры вплоть до локализации в них отдельных молекул и их взаимного расположения на масштабах десятков нанометров, а современная электронная микроскопия дала возможность изучать строение белковых комплексов с разрешением, приближающимся к атомному, в их нативном внутриклеточном окружении. Однако и флуоресцентная, и электронная микроскопия не преодолели своих естественных ограничений – зависимости от меток и жестких требований к объему образца соответственно. На роль метода, компенсирующего эти ограничения, претендует микроскопия в мягком рентгеновском диапазоне. Этот метод позволяет наблюдать всю совокупность субклеточных структур в состоянии, близком к нативному, без химической фиксации и применения меток, с изотропным разрешением порядка 40–70 нм, перекрывая пусть и сокращающийся, но все еще существующий зазор в разрешающей способности между световой и электронной микроскопией, при этом сочетаясь с первой и, потенциально, со второй. Настоящий обзор ставит своей целью рассмотреть вклад и вычлнить принципиально новые возможности, которые уже дала биологическая микроскопия в мягком рентгеновском диапазоне, проанализировать особенности этого метода и оценить потенциальные направления его дальнейшего развития применительно к клеточно-биологическим исследованиям.

**КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА** рентгеновская микроскопия, клеточная биология, мягкое рентгеновское излучение, окно прозрачности воды, криотомография.

**СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ** ктМРД – криотомография в мягком рентгеновском диапазоне; МРМ – мягкая рентгеновская микроскопия; ЭМ – электронная микроскопия (микроскоп); SMLM (Single Molecule Localization Microscopy) – локализационная микроскопия; STED (STimulated Emission Depletion) – микроскопия с гашением за счет вынужденного излучения; SIM/3D-SIM (Structured Illumination Microscopy) – микроскопия структурированного освещения; ЭПР – эндоплазматический ретикулум.

## ПРИНЦИПЫ МРМ И ЕЕ СРАВНЕНИЕ С ДРУГИМИ ВИДАМИ МИКРОСКОПИИ

Совокупность современных методов микроскопического исследования в биологии позволяет решать самые разнообразные задачи: от наблюдения за развитием эмбрионов через локализацию единичных молекул в клетке до прямой визуализации структуры макромолекул в их нативном состоянии [1–3]. Развитие как световой, так и электронной микроскопии постоянно расширяет спектр возможностей

для исследователей, однако при всех достигнутых успехах и тот, и другой подходы сохраняют свои принципиальные ограничения.

Световая микроскопия развивается в направлении совершенствования флуоресцентных методов, главным достоинством которых является высокий контраст получаемого изображения в сочетании с высочайшей избирательностью и чувствительностью методов флуоресцентного мечения [4]. Эксплуатация этих особенностей дала возможность

обойти дифракционное ограничение разрешающей способности световых микроскопов. В вошедших в широкое употребление методах световой микроскопии с суперразрешением рутинно реализуется разрешение порядка 30 нм [1]. Но достоинства флуоресцентной микроскопии являются одновременно и ее ограничениями. Позволяя наблюдать меченые молекулы и структуры, ими формируемые, флуоресцентный микроскоп не показывает компоненты, не несущие метки (рис. 1А,Г). Использование более трех-четырех флуоресцентных меток в одном эксперименте затруднительно, а методы «оптического» контрастирования – фазовый и дифференциально-интерференционный контраст – существенно проигрывают флуоресценции по разрешающей силе (рис. 1А,Г). Немаловажным ограничением большинства флуоресцентных методов, направленных на максимальное увеличение разрешающей силы, является анизотропия разрешения – в аксиальном направлении предельное разрешение улучшается обратно пропорционально удвоенному квадрату числовой апертуры, в то время как латеральное разрешение обратно пропорционально ее первой степени.

Фундаментальным ограничением для просвечивающей электронной микроскопии является длина свободного пробега электрона в веществе, в максимуме не превышающая 300–500 нм, поэтому исследование с помощью ПЭМ требует приготовления ультратонких срезов исследуемого объекта, толщина которых сопоставима с длиной свободного пробега электронов [5]. Выполнение этого требования требует химической фиксации, изменяющей структуру и состав образца [5, 6]. Необходимость исследования серии срезов, иногда до сотен штук, затрудняет изучение трехмерной организации клетки, размеры которой на два порядка превосходят допустимую толщину срезов. Для преодоления этого ограничения используют разнообразные подходы, каждый из которых является компромиссом между величиной исследуемого объема, разрешающей силой и трудозатратами [7].

Методы криоэлектронной томографии, главным преимуществом которых является сохранение нативного строения и состава клетки, ограничены еще сильнее. Особенности пробоподготовки заставляют исследователей фокусироваться на той части клетки, где ее толщина мала, или необходимо изготовить из клетки методами травления ионным лучом единичную пластинку-ламелю толщиной 100–500 нм. Поэтому главное применение крио-ЭМ-томографии – именно анализ макромолекулярных комплексов в их нативном окружении [8].

На роль метода, который в какой-то мере позволяет преодолеть описанные ограничения, пре-

тендует наиболее развитое на сегодняшний день направление биологической мягкой рентгеновской микроскопии (МРМ) – криотомография в мягком рентгеновском диапазоне (кТМРД, cryo-SXT) [9]. Этот метод обладает следующим набором характеристик: 1) обеспечивает разрешение порядка 50 нм и 2) возможность исследовать объекты толщиной около 10 мкм без приготовления срезов 3) в близком к нативному витрифицированном состоянии и 4) без применения дополнительного контрастирования и селективных меток для выявления многих субклеточных структур.

В данном обзоре рассмотрены принципы метода, инструментальная база и вклад микроскопии мягкого рентгеновского диапазона в клеточную биологию. Выделены направления исследований, в которых особенности МРМ являются наиболее выигрышными, оценены перспективы дальнейшего развития и внедрения МРМ в клеточной биологии.

В методе МРМ используется рентгеновское излучение с энергией квантов порядка 500 эВ (длины волн от 2.3 до 4.4 нм), соответствующей так называемому «окну прозрачности воды». В этом диапазоне энергий атомы кислорода, а стало быть, и молекулы воды слабо поглощают рентгеновские фотоны (в зависимости от длины волны поглощение составляет от 10 до 40% в слое воды толщиной 1 мкм). Таким образом, для исследования оказывается доступным образец толщиной до 15 мкм [10–12]. Атомы углерода и других легких элементов становятся в этих условиях эффективными генераторами абсорбционного контраста. Современные синхротроны в большинстве своем имеют возможность генерировать излучение с такой энергией и с высокой интенсивностью светового потока [13].

Станция, предназначенная для проведения исследований с применением МРМ, состоит из синхротронного источника рентгеновских фотонов, монохроматора, фокусирующей системы, освещающей выходную апертуру (осветитель для микроскопа), и самого микроскопа, где в качестве конденсора используется или зонная пластинка или так называемый «капиллярный конденсор». Конденсор проецирует на образец уменьшенное изображение выходной апертуры синхротрона. Образец размещен на охлаждаемом поворотном столике с механизмом точного позиционирования. В качестве объектива используется зонная пластинка, формирующая увеличенное изображение образца на светочувствительной матрице цифрового детектора. Оптические пути таких станций позволяют формировать изображения с глубиной фокуса 1.5–10 мкм, а разрешение подобных установок составляет от 30 до 70 нм [10, 13, 14]. Сменные зонные пластинки-объективы

позволяют выбирать между глубиной фокуса и разрешающей силой [15].

При таком сочетании параметров оптического пути и толщины объекта изображение неизбежно будет представлять собой почти недоступную для визуальной расшифровки сумму проекций всех внутриклеточных структур, поэтому угловая томография становится наиболее продуктивным способом извлечения морфологических данных из такого изображения [16]. Высокая яркость синхротронного источника излучения позволяет получать необходимый объем данных для томографической реконструкции за разумное время.

В то же время МРД-фотоны не распространяются в воздухе, что требует помещения всех оптических элементов установки и исследуемого образца в глубокий вакуум [17]. Преодолению этого технического затруднения способствовало развитие инструментальной базы криоэлектронной микроскопии – появление автоматизированных устройств для криофиксации биологических объектов сверхбыстрым замораживанием путем погружения в жидкий этан, при котором вода не кристаллизуется, а становится аморфным твердым телом – витрифицируется (*vitrum* – лат. стекло) [18]. Такой образец, при поддержании его температуры на уровне  $-180$ – $100^{\circ}\text{C}$ , стабилен в вакууме и устойчив к облучению за счет постоянного отведения тепла.

Вторым вкладом ЭМ в развитие ктМРД стало создание гониометрических держателей образцов с охлаждением для оснащения ими крио-ЭМ-инструментов. Эти устройства были адаптированы к применению на некоторых МРМ-станциях, предназначенных для проведения биологических исследований, что унифицировало пробоподготовку вплоть до использования стандартных «сеток» для ЭМ в МРМ-инструментах, но и внесло ограничения, свойственные ЭМ-томографии, – увеличение эффективной толщины образца и его затенение конструкциями держателя при высоких углах поворота [10–13]. Особенностью МРМ-станции на синхротроне ALS (США) является полноповоротный капиллярный держатель образца, изготовленный специально для этой установки и позволяющий получать изотропное разрешение без искажений, вызванных ограничениями угла наклона [10, 19]. Витрификация образца погружением с использованием автоматического устройства – быстрый, хотя и требующий определенных навыков, процесс; подготовка образца к ктМРД-исследованию занимает порядка 4 ч, даже если конструкция держателя образца отличается особой сложностью [19].

Изображение клетки, получаемое с помощью ктМРД, весьма сходно с электронной микрофото-

графией малого увеличения [9, 16, 20] (рис. 1), поэтому для реконструкции объема по сериям угловых проекций, сегментации и последующего анализа пригодны программные пакеты для работы с ЭМ-данными [12, 13, 20]. Разрабатываются и специализированные средства для работы с данными ктМРД, осуществляющие восстановление изображений и повышение их информативности [21], облегчающие самый оператор-зависимый этап – сегментацию трехмерных данных, вычленение из массива «вокселей» контуров и поверхностей органоидов [22, 23].

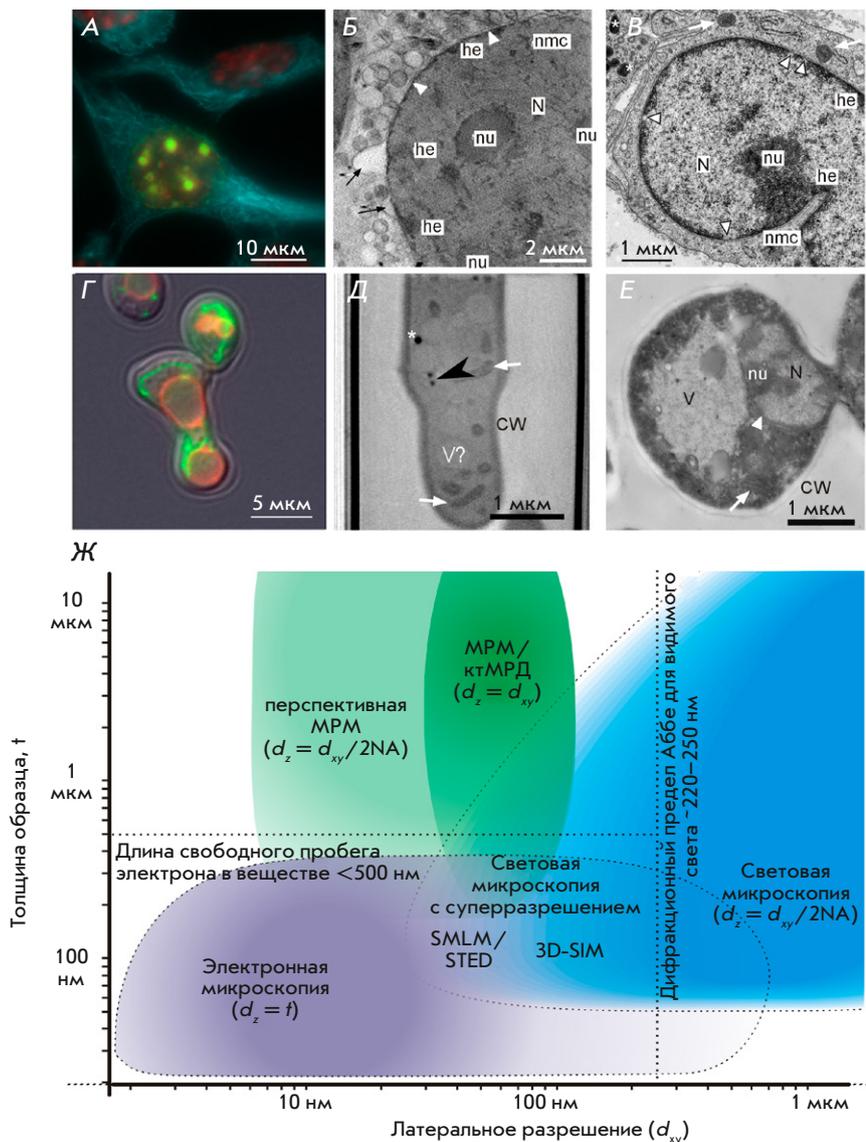
Несколько менее приняты биологами просвечивающие сканирующие рентгеновские микроскопы (STXM, Scanning Transmission X-ray Microscope), работающие в МРД. В этих приборах образец размещен на сканирующей столике, который смещает его относительно тонко сфокусированного луча, а изображение строится на основе измеряемого точечным однопиксельным детектором изменения яркости проходящего луча от точки к точке [24, 25].

Можно заключить, что МРМ, особенно в реализации ктМРД, – это зрелый, в смысле развития технической базы, метод, ориентированный на биологические задачи, работающий на клеточных масштабах и занимающий особое место на стыке возможностей световой и электронной микроскопии (рис. 1).

## ПРИМЕНЕНИЕ МИКРОСКОПИИ МРД В КЛЕТОЧНОЙ БИОЛОГИИ

В работе [9] представлен каталог изображений внутриклеточных структур, полученных с помощью ктМРД, таких, как ядерная оболочка, ядрышко, митохондрии, лизосомы, ЭПР и другие эндомембраны. Объектом служили криофиксированные трансформированные клетки мыши толщиной 6–12 мкм. Контролем служили электронно-микроскопические изображения тех же структур. Авторы указывали, что мембранные структуры хорошо различимы и узнаваемы, поскольку визуально воспринимаются так же, как и с применением ЭМ, однако такие белковые компоненты, как субдомены хроматина и ядерные тельца, различимы гораздо хуже (что может быть связано с выбором длины волны для регистрации изображения), не говоря уже о рибосомах и элементах цитоскелета, находящихся вблизи границы разрешающей способности инструмента. Какой прогресс был достигнут в применении МРМ в клеточной биологии со времени публикации этой работы и какие результаты были получены?

Значительная часть работ посвящена применению метода к различным типам клеток: клеткам человека и животных, нормальным, опухолевым, зараженным вирусом, контактирующим с нано-



**Рис. 1.** Микроскопия мягкого рентгеновского диапазона в сравнении со световой флуоресцентной и электронной микроскопией. А–В – клетки млекопитающих (фибробласты мышцы). А – широкопольная флуоресцентная микроскопия, фиксированные клетки *in vitro*: голубой – микротрубочки, флуоресцентно меченные антитела против альфа-тубулина; зеленый – новореплицированная ДНК, click-реакция с этинилдезоксигуанидином; красный – ядра, ДНК-связывающий флуорохром DAPI. Б – виртуальный срез криофиксированной клетки, кТМРД: N – ядро, nu – ядрышки; he – гетерохроматин, nmc – впячивание ядерной оболочки внутрь ядра (nuclear membrane channel), указатель – ядерная оболочка, черные стрелки – выпячивания внешней мембраны ядерной оболочки (адаптировано с модификациями из [11] CC 4.0 BY). В – электронная микрофотография ультратонкого среза клетки, фиксированной альдегидами и контрастированной тяжелыми металлами: стрелка – митохондрия; \* – липидные капли. Г–Е – дрожжи *S. cerevisiae*. Г – живая клетка (зигота), целиком широкопольная флуоресцентная микроскопия: зеленый – митохондрии, химерный митохондриальный белок Ldh1-GFP; красный – мембрана вакуоли, флуорохром FM4-64; контуры клетки – дифференциальный интерференционный контраст (фотография любезно предоставлена Кнорре Д.А.). Д – виртуальный срез криофиксированной клетки, полученный методом кТМРД: V – вакуоль; CW – клеточная стенка; черный указатель – структура, использованная для корреляции, возможно, мелкая липидная капля (адаптировано с модификациями из [15], CC0 1.0). Е – электронная микрофотография ультратонкого среза клетки, фиксированной альдегидами и контрастированной тяжелыми металлами. Расположение МРМ, световой и электронной микроскопии в «пространстве разрешающей способности» (Ж). Интенсивность цвета соответствует тем масштабам, на которых метод наиболее востребован в исследовании структур и функционирования клетки. NA – числовая апертура, геометрическое описание светособирающей способности объектива в сочетании с длиной волны излучения ( $\lambda$ ) является главным фактором, определяющим предельное разрешение объектива:  $d_{xy} = 0.61 \times \lambda / NA$  [4]. Фотографии А, В, Е сделаны авторами обзора

частицами и др. [22, 26–31], дрожжей [16, 26, 32] и бактерий [12] для проверки пригодности метода или конкретного МРМ-инструмента для решения задач визуализации субклеточных структур и сравнения МРМ со световой и электронной микроскопией. В этих работах вместе с «проверкой концепции» предлагаются различные усовершенствования или комбинации методов, например, корреляция флуоресцентной метки с МРМ-изображением [20, 28] или сочетание ктМРД с маркированием белков плазмалеммы антителами, меченными коллоидным золотом [29].

Параллельно с разработкой методики корреляционного флуоресцентного и МРМ-анализа изучали также систему эндосом (везикул, вовлеченных во внутриклеточное переваривание вещества, поглощенного извне) и аутофагосом, инкапсулирующих компоненты клетки, подлежащие рециркуляции [20]. Для идентификации аутофагосом применили две флуоресцентные генетически кодируемые метки, а весь эндоцитозный компартмент был *in vivo* помечен антителами с меткой коллоидного золота, захватываемыми клеткой путем эндоцитоза. На МРМ-изображении эндосомы идентифицируются по золотым частицам внутри и имеют прозрачное содержимое. Везикулы, попадающие в зоны колокализации флуоресцентных меток, отличаются плотным содержимым и прозрачным гало, соотношены с аутофагосомами. С помощью корреляции флуоресцентных и МРМ-изображений впервые визуализированы специализированные зоны генерации многочисленных предшественников аутофагосом (омегасом) в ЭПР. Параллельно подтверждено, что при голодании, используемом для инициации аутофагии, в системе митохондрий появляются тонкие и длинные трубчатые связи между отдельными митохондриями. Этот пример анализа системных изменений в клетке не только демонстрирует возможности ктМРД в сочетании со световой микроскопией, но и представляет новые данные и прямо подтверждает результаты, ранее полученные другими методами.

Возможность ктМРД визуализировать весь объем клетки, выявлять многие субклеточные системы и измерять размеры органелл без применения контрастирования/мечения использовали для исследования динамики перераспределения секреторных гранул тучных клеток при стимуляции антигеном [33], опустошения инсулиновых везикул в секреторных клетках поджелудочной железы в ответ на стимуляцию глюкозой [34], для визуализации и количественной оценки предапоптотических изменений под действием противоопухолевого агента цисплатина в сочетании с адьювантами для сни-

жения его эффективной концентрации [35], оценки среднего объема фрагментов митохондрий в раковых клетках после воздействия свободных радикалов, генерируемых фотосенсибилизатором на основе ионов иридия [36]; для измерения объема митохондрий, радиуса липидных капель и цитоплазматических везикул при заражении клеток вирусом SARS-CoV-2 [37], при анализе перераспределения цитоплазматических везикул и изменения морфологии митохондрий под воздействием вируса простого герпеса [22], для извлечения количественных параметров ответа эндотелиоцитов на стимуляцию глюкозой (*in vitro* модель процессов повреждения сосудов при диабете) [38].

Помимо возможности проводить морфометрию на уровне целой клетки, применение ктМРД позволяет обнаруживать новые и, зачастую, неожиданные структурные аспекты изучаемых явлений, например, формирование тонких, на пределе разрешающей силы ктМРД, нитевидных выростов цистерн ЭПР, формирующихся в зонах контактов ЭПР с митохондриями [39], маркируемых скоплением белков-участников деления митохондрий, выявляемых с помощью флуоресцентных химерных конструкций.

С применением ктМРД визуализировали фрагментацию митохондрий, увеличение числа липидных капель и вакуолизацию цитоплазмы в клетках млекопитающих и дрожжей при воздействии золотых наночастиц и ионов золота [40, 41]. Также показано, что небольшая доля золотых наночастиц, поглощенных клеткой, оказывается в цитоплазме, а не в эндосомно-лизосомном компартменте. Их количество слишком мало для обнаружения по флуоресцентному сигналу и на ультратонких срезах методами ЭМ. Кроме того, некоторое количество частиц выявлено в липидных каплях, что необычно [40].

Биогенные наночастицы золота, формируемые клетками дрожжей для последующего их выведения в периплазматическое пространство, обнаружены и идентифицированы также при помощи ктМРД. Идентификация этих частиц потребовала привлечения дополнительных физических методов измерения, а локализация частиц, в том числе (и впервые) в митохондриях, дополнительно подтверждена с помощью ЭМ [41].

Предполагать существование подобных структур и явлений *a priori* невозможно, в световой микроскоп они не разрешаются, а случайное их обнаружение методами электронной микроскопии крайне маловероятно, а если и произошло, то может быть проигнорировано.

Иногда изменения физиологии клетки, например, развитие патологии на клеточном уровне, приводят

к формированию новых структур, размеры которых сопоставимы с самой клеткой, что затрудняет их детальный анализ и установление топологии методами ЭМ, а их тонкая организация находится за пределами разрешающей способности светового микроскопа. Пример – трансформация ЭПР при заражении вирусом гепатита С, когда эндоплазматическая сеть преобразуется в губчатый лабиринт мембранных каналов, занимающий почти всю цитоплазму [42, 43]. Детальный анализ геометрии мембранных каналов при этой трансформации в масштабе всей клетки проведен с помощью ктМРД [30]. Параллельно были исследованы изменения контактов ЭПР с митохондриями, источниками энергии клетки и важными участниками метаболизма липидов, которые также изменяются при вирусной инфекции. Производительность ктМРД позволила проанализировать динамику процесса преобразования ЭПР и показать, что преобразование начинается локально, но сразу вовлекает в себя и ЭПР, и митохондрии [30].

В работе [44] с применением ктМРД показано, что клетки дрожжей дикого типа и мутанты, продуцирующие только триацилглицериды, формируют гомогенные, эффективно поглощающие МРД-фотоны, липидные капли, а в клетках, производящих только стериды, липидные капли имеют прозрачное ядро, окруженное поглощающей оболочкой. Комбинируя данные ктМРД с другими неинвазивными методиками, авторы подтвердили предположение о слоистой структуре липидных капель с ядром из триацилглицеридов и оболочкой из стеридов. Эта двухслойная модель предложена на основе изучения выделенных липидных капель, но процедура выделения может вызвать перераспределение липидов, что не делало результат абсолютно убедительным.

Показателем состава органелл может быть не только плотность органического вещества в них. Варьируя длину волны МРД-фотонов, можно идентифицировать элементы, которые имеют пики поглощения в диапазоне прозрачности воды, оценивать их концентрацию, определять их состояние в кристаллических частицах и зоны их специфической концентрации. Это позволяет использовать МРМ для изучения таких процессов, как минерализация тканей, формирование скелетов беспозвоночных, поглощение и выведение из клетки наночастиц и других наноконструкций, используя особенности их состава в качестве дополнительного критерия для их идентификации.

Например, используя излучение с энергией больше и меньше скачка поглощения азота (410 эВ), визуализировали распределение азота и отношение

концентраций азота и углерода в клетках *Anabena* sp. [45]. Эти синезеленые водоросли в условиях голодания по азоту формируют специализированные клетки (гетероцисты), фиксирующие атмосферный азот. Используя разрешающую силу МРМ, смогли идентифицировать вегетативные клетки и гетероцисты и проанализировать исследуемый параметр в привязке к клеточному типу, чего ранее не делали. В клетках обоих типов элементы распределены неравномерно, отношение концентраций углерода к азоту растёт от периферии к центру клетки, но периферическая зона гетероцист маркирована слоем, обогащенным азотом, чего нет в вегетативных клетках.

Исследование путей концентрации кальция (края поглощения 352.6 и 338.3 эВ) в клетках одноклеточных водорослей, накапливающих кальциевые включения, и в мезенхимальных клетках личинки морского ежа, формирующих спиккулы из карбоната кальция, показало, что и у водорослей, и у личинок иглокожих есть специализированные везикулы, концентрирующие ионы кальция из морской воды и служащие промежуточным депо для этого иона [46, 47]. У водоросли это одна крупная «вакулоподобная» цистерна [46], а клетки личинок морского ежа содержат популяцию везикул диаметром около 100 нм с концентрацией иона кальция от 1 М (нижний предел обнаружения) до концентрации, соответствующей безводному аморфному карбонату кальция, из которого состоит спиккула. Использование МРМ позволило точно посчитать количество кальцийсодержащих везикул [47].

При поглощении клетками млекопитающих наночастиц гидроксиапатита, стимулирующих регенерацию костной ткани, флуоресцентные сенсоры кальция показывают появление популяции кальцийсодержащих везикул, однако применение электронной микроскопии не позволяет идентифицировать их на фоне общей совокупности везикул в клетках [48]. Применение ктМРД и анализ линейных коэффициентов поглощения органелл позволили вычленивать интернализированные наночастицы, идентифицировать жировые капли и отдельную популяцию везикул с промежуточной эффективностью поглощения, которую соотнесли с мультивезикулярными тельцами, а их коэффициент поглощения увязали с возможностью депонирования в них ионов кальция, высвободившихся при растворении наночастиц [48].

Большая плотность и, как следствие, повышенный контраст на ктМРД-изображениях, является отличительной чертой некоторых внутриклеточных патогенов и симбионтов, чем эффективно пользуются исследователи, изучающие жизненные циклы

этих организмов и их взаимодействие с клетками. При изучении формирования вирионов коровьей оспы (*Vaccinia*) и структур, появляющихся в инфицированных клетках, удалось различить зрелую и незрелую форму вирионов и обнаружить «вирусные фабрики», в которых происходит репликация вирусных геномов [49].

В работе [50] изучен перенос вещества от клетки-хозяина к вирусу в ходе развития неидентифицированного гигантского ДНК-вируса (предположительное *Cedratvirus*), заражающего амебу *Acanthamoeba castellanii*. Изучена динамика развития инфекции, уточнены данные по количеству вирионов, формирующихся в ходе размножения вируса. На основе измерения коэффициентов поглощения скорректированы ранние оценки переноса материала, полученные более грубыми методами. Показано, что в вирионы преобразуется 6–12% вещества клетки-хозяина. Обнаружена структура, возможно, являющаяся фабрикой репликации вируса. Показано, что изменения затрагивают сократимую вакуоль и фагосомы, но не ядро, что позволяет клетке функционировать вплоть до лизиса, увеличивая эффективность продукции вируса [50]. Линейная зависимость коэффициентов поглощения от концентрации органического вещества, визуализируемая на ктМРД-изображениях, плюс возможность обработки всего объема клетки делают ктМРД предпочтительным инструментом для проведения такого рода исследований по сравнению с ЭМ, которая позволяет обнаруживать вирионы куда меньшего размера, но ставит ограничения на объемы выборки. Тем не менее, в такого рода работах ЭМ является необходимым дополнительным методом, что прямо отмечают авторы цитируемых работ.

Полуавтоматическая сегментация изображений с последующим измерением объемов бактериальных клеток показали, что каждая внутриклеточная «инклюзия» – вакуоль, в которой размножаются патогенные бактерии *Chlamydia trachomatis*, содержит гораздо более широкий спектр форм клеток, чем считалось ранее [51], когда основным инструментом анализа была реконструкция по серийным ЭМ-изображениям (диаметр инклюзии 10–15 мкм). Подсчет количества хламидий в инклюзиях показал, что объем индивидуальных бактериальных клеток, являющийся главным критерием для разделения инфекционной и пролиферирующей форм хламидий, зависит не от абсолютного их количества в инклюзии, а от их концентрации. Чем плотнее заселена вакуоль, тем реже в ней встречаются крупные и аномально крупные клетки, а значит, концентрация клеток может быть сигналом для перехода от крупной размножающейся формы к малой ин-

фекционной, что сопровождается лизисом клетки-хозяина и следующим раундом распространения инфекции.

Используя ингибиторный анализ и останавливая выход зрелых бесполок клеток (мерозоитов) малярийного плазмодия из эритроцитов на различных стадиях этого процесса, ктМРД применили вспомогательно, для комплементации и свето-, и электронно-микроскопических данных [52]. Показано, что выход мерозоитов в кровяное русло с разрушением эритроцитов, вызывающий приступ лихорадки при малярии, строго координирован во времени. Перед разрушением эритроцита происходит распад мембраны вакуоли, в которой продуцируются мерозоиты и выход зрелых мерозоитов в цитоплазму эритроцита, затем наблюдается коллапс цитоскелета эритроцитов, ведущий к утрате ими их характерной формы и формированию тесных контактов между плазмолеммами эритроцита и мерозоитов, только после этого происходит выход нового поколения мерозоитов в кровь. ктМРД здесь является своеобразной контрольной процедурой, подкрепляющей свето-микроскопические данные структурными с лучшим разрешением и позволяющей избежать ошибок интерпретации, связанных с особенностями подготовки образцов для ЭМ.

Изучение изменений на уровне отдельных органелл, происходящих в клетках при инфекции *Shigella flexneri*, с использованием комбинации флуоресцентной микроскопии и ктМРД показало, что при инфекции в клетках происходит фрагментация митохондрий [53]. Корреляция данных световой микроскопии и ктМРД позволила визуализировать «ловушку» из септинов (белков, участвующих в ремоделировании мембран, цитоскелета и в инкапсуляции внутриклеточных патогенов [54]) вокруг клеток шигеллы, а также ее тесную связь с аутофагосомой.

Крайне любопытным выглядит исследование механизмов координации деления хозяина и симбионта у *Braarudosphaera bigelowii*, одноклеточной водоросли, в клетках которой облигатно присутствует эндосимбионт – цианобактерия с сильно редуцированным геномом, не способная к самостоятельному существованию, но имеющая механизм фиксации азота. Этот симбиоз может быть промежуточной эволюционной фазой симбиогенетического формирования новой органеллы («нитропласта»), как это когда-то произошло с митохондриями. Применение ктМРД в качестве основного инструмента в этом исследовании представляется вполне оправданным, принимая во внимание размеры организма и симбионта – порядка 10х5 мкм и 4х2 мкм соответственно, и высокий контраст между симбионтом и хлоропластами и митохондриями клетки-хозяина [55].

Обращает на себя внимание то, что в большинстве работ, рассмотренных выше, внимание фокусируется на органеллах, обогащенных липидами, – липидных каплях, митохондриях, цистернах ЭПР и т.п. При этом почти не представлено одно важное направление – исследование ультраструктуры и функционирования клеточного ядра и генетического аппарата. Это связано с тем, что эффективность поглощения МРД-фотонов липидами высокая, что выделяет их на фоне цитоплазмы [9, 11], а вариации коэффициента поглощения внутри клеточного ядра слабые, что позволяет различать только такие крупные и плотные образования, как ядрышко и гетерохроматиновые блоки на фоне эухроматина [28, 56]. При этом разрешающая сила метода пока недостаточна для визуализации хроматиновых субструктур размером 100 нм и меньше [57]. Попытки спектрального разделения ДНК, РНК и белков на МРМ-изображениях ядер и хромосом [25] позволяют надеяться на существенное улучшение контраста нуклеиновых кислот, что откроет новые возможности в изучении ядерных структур методами МРМ. На текущий момент наиболее подходящими для исследования с применением ктМРД видятся поздние стадии компактизации индивидуальных хромосом в ходе подготовки эукариотической клетки к делению, сегрегация хроматид перед их распределением по дочерним клеткам и начальные этапы деконденсации хромосом при формировании дочерних ядер.

### **МРМ и флуоресцентная микроскопия с суперразрешением**

Корреляционная световая и электронная микроскопия, в том числе в криоформате, являются уже хорошо зарекомендовавшим себя сочетанием методов [58–60]. Поскольку ктМРД заимствует многие аспекты пробоподготовки из криоэлектронной микроскопии, понятно, что интеграция обычных флуоресцентных методов и ктМРД реализована и используется для решения рутинных задач, в первую очередь, для локализации объекта перед реализацией ктМРД, в том числе за счет интегрированного в МРМ-инструмент флуоресцентного микроскопа [11, 61]. В то же время современный уровень развития флуоресцентной микроскопии в ее вариантах с суперразрешением позволяет достигать разрешения 100–150 нм для микроскопии структурированного освещения и ~30 нм для SMLM и STED [1, 62], уже сопоставимых с разрешением МРМ.

Сочетание световой микроскопии с суперразрешением в вариантах STED и SMLM с МРМ выглядит весьма перспективным. Эта комбинация методов потенциально позволяет не только локализовать

молекулярные источники флуоресцентного сигнала с точностью до 20 нм, но и средствами МРМ соотнести их с внутриклеточными структурами, не несущими флуоресцентной метки.

Сочетание SMLM и ктМРД применено для локализации, изучения тонкой структуры и динамики кристаллов холестерина в клеточной модели атеросклероза [63, 64]. Липиды имеют высокий линейный коэффициент поглощения в МРД [9], так что липидные структуры являются самыми контрастными на МРМ-изображениях, но вычленив холестерин в общем липидном контексте невозможно. SMLM позволяет маркировать холестерин флуоресцентной меткой и изучить его распределение с высокой разрешающей силой, но без привязки к конкретным субклеточным структурам. При таком подходе разрешение световой составляющей превосходит рентгеновское – авторы заявляют о 35 нм против 70 нм [63].

Сочетание методов позволило соотнести флуоресцентную метку с резко очерченными на МРМ-изображении структурами на плазмалемме, а также с поверхностью липидных капель в цитоплазме [63], и отследить перемещение кристаллических структур, формируемых холестерином, внутрь клетки, идентифицировав их на фоне других липидных образований [64]. Эта интеграция методов, однако, не безупречна. SMLM требует множества, иногда десятков тысяч, пусть и коротких экспозиций, поэтому регистрация изображения занимает значительное время. Также для реализации механизмов обратимого гашения и возврата молекул флуорофора в «светлое» состояние необходимы условия, создаваемые искусственно [62]. Поэтому авторы проводили SMLM на фиксированных альдегидами клетках с применением стандартного микроскопа и лишь после препарата подвергали витрификации и осуществляли ктМРД. К ограничениям в данном случае относится не только необходимость фиксации клетки для реализации SMLM-регистрации, но и то, что носителями флуоресценции являются антитела, медленно и неэффективно проникающие сквозь мембраны, что заставило авторов сосредоточиться на плазмалемме, где мишень доступна для антител, и мириться с невысокой интенсивностью сигнала в цитоплазме. Сочетание SMLM и ктМРД привлекает сопоставимой разрешающей силой в обеих модальностях, но совокупность ограничений может оказаться критической для дальнейшего развития этого подхода.

Второе направление – использование системы с ограниченным суперразрешением SIM в сочетании в ктМРД, причем обе процедуры регистрации изображений реализуются в криоформате. SIM

позволяет работать с флуоресцентными белками, как следствие, дает возможность прямого совмещения световых и МРМ-изображений.

Криоформат делает применение высокоапертурных иммерсионных объективов крайне затруднительным, хотя и не невозможным [65, 66]. Для решения этой проблемы в МРМ-станцию был интегрирован специализированный крио-SIM-микроскоп, в котором технология 3D-SIM с использованием «сухого» объектива с числовой апертурой 0.9 и большим рабочим отрезком позволяет получать изображения с разрешением 210 нм (дифракционный предел ~340 нм) без передачи тепла образцу, находящемуся в криогенных условиях [67].

Сочетание крио-3D-SIM и ктМРД было применено для изучения динамики эндосом, содержащих частицы реовируса, в ходе развития инфекции [66]. Крио-3D-SIM позволил визуализировать везикулы нескольких размеров и различить везикулы, несущие частицы вируса, и везикулы, из которых произошел выход вирусного комплекса. Эффективное отсечение внефокусного свечения и лучшее, по сравнению с дифракционно ограниченной микроскопией, аксиальное разрешение 3D-SIM [62] позволили точно соотнести флуоресцентный сигнал от меченых везикул со структурами, наблюдаемыми на ктМРД-изображении. Ключевым наблюдением стало то, что эндосомы, из которых произошел выход вируса, остаются сферическими, без разрывов мембран. Предположили, что вирионы могут покидать эндосомы за счет образования пор в мембранах.

Метод 3D-SIM был применен для локализации на МРМ-изображении пучков актиновых филаментов, которые плохо поглощают рентгеновские фотоны и поэтому практически незаметны, но флуоресцентные данные с высокой детализацией позволяют точно определить зону, где находятся актиновые структуры, и идентифицировать их внутриклеточное окружение с помощью МРМ [68].

Для решения аналогичных задач корреляции флуоресцентного и рентгеновского изображения был построен уникальный «лазерный сканирующий конфокальный криотомограф» с иммерсионным объективом, использующий полноповоротный криодержатель образца от комплементарного ктМРД-инструмента [28]. Микроскоп испытан на модели локализации и визуализации тельца Барра (инактивированной X-хромосомы) в клетках самки мыши и стал частью МРМ-станции на синхротроне ALS (США).

Сочетание этих методов применяется для идентификации на рентгеновских изображениях слабо или совсем не охарактеризованных внутриклеточных структур, для которых известны белковые

маркеры, особенно в связи с работой по созданию «рентгеновских атласов» ультраморфологии клетки [9, 11]. Несмотря на общую схожесть ЭМ- и МРМ-изображений, не все структуры отображаются на них одинаково в связи с различиями в пробоподготовке. Остается дождаться появления крио-3D-SIM-установки с иммерсионным объективом, интегрированной в МРМ-станцию.

## ПЕРСПЕКТИВЫ МРМ

### Перспективный МРМ-инструмент

Альтернативой оптической схеме с зонными пластинками, ставшей отраслевым стандартом в ктМРД, может стать применение зеркальных объективов нормального падения, оптимизированных под длины волн окна прозрачности воды [69]. Расчет показывает, что такой микроскоп при вполне достижимой числовой апертуре 0.3 [70] (против ~0.05–0.06 у зонных пластинок) и при использовании длины волны 3.37 нм позволит реализовать латеральное разрешение около 5 нм, что на порядок лучше, чем стандартно достижимые 40–70 нм в ктМРД, и входит в диапазон, ранее доступный только ЭМ. Этот инструмент находится на стадии лабораторного прототипа и пока не вышел на проектные показатели, однако демонстрирует работоспособность всех элементов системы.

К определенным ограничениям этого инструмента относится анизотропия разрешения, связанная с растяжением функции рассеяния вдоль главной оптической оси прибора, как и в световом микроскопе [71]. Тот же простой расчет показывает, что аксиальное разрешение такого инструмента будет составлять около 40 нм, что несколько лучше, чем при работе на ЭМ в обычном режиме, где аксиальное разрешение определяется толщиной физического среза, очень редко достигающей 50 нм (обычно толще). Малая глубина фокуса этого МРМ существенно усложняет реализацию угловой томографии, так что для трехмерной реконструкции оптимальными становятся более простые алгоритмы восстановления объема по сериям оптических срезов (z-томография) с применением деконволюции [72–74], как в широкопольных и конфокальных световых микроскопах. Правильный подбор алгоритма и параметров деконволюции может частично компенсировать и анизотропию разрешения, но устранить ее полностью не удастся в силу ее фундаментальной природы.

На основе этой оптической схемы предложен проект МРМ-станции [71] для строящегося синхротронного источника СКИФ («Сибирский кольцевой источник фотонов»). Проект предполагает два ре-

жима работы: сканирующий, с использованием объектива с числовой апертурой 0.3 для освещения образца сфокусированным в пятно дифракционных размеров лучом, с регистрацией вариаций яркости проходящего пучка однопиксельным детектором при сканировании смещением образца относительно луча, и широкопольный режим, в котором второй объектив строит изображение образца на матричном детекторе. Для биологических применений предусматривается оснащение инструмента криостолом.

Потенциально, за счет короткого фокуса, малой толщины оптического среза и высокой светособирающей способности, уменьшающей необходимую для получения изображения дозу облучения, этот МРМ в широкопольном режиме позволит наблюдать динамические процессы в живых клетках, изолированных от вакуума в жидкостной микрокамере. Вопрос о практической реализуемости таких наблюдений остается открытым.

### Селективные метки для МРМ

В отличие от световой микроскопии с ее богатым арсеналом методов высокоселективного мечения субклеточных структур и биомолекул (флуоресцентно меченные антитела, конструкции с флуоресцентными белками, флуоресцентные красители высокой специфичности и др.) (рис. 1А,Г), электронная микроскопия для идентификации наблюдаемого в значительной степени полагается на накопленный за десятилетия массив данных о морфологии клетки. Методы селективного мечения в ЭМ менее разнообразны и не так надежны, как в световой микроскопии. МРМ в своем развитии может оказаться в такой же ситуации.

Для совместимости с криофиксацией методы селективной визуализации не должны влиять на жизнеспособность клетки, функционируя *in vivo*. Если для визуализации меченой структуры требуется какое-либо вспомогательное действие, например фиксация, сразу же возникает вопрос: сохраняется ли «нативное состояние» клетки? Такая метка должна также эффективно генерировать контраст при использовании излучений, в которых биологическая материя прозрачна, а следовательно, должна радикально отличаться от «живого вещества» по строению или по составу. В работе Kong и соавт. для МРМ адаптирована разработанная для ЭМ система локализации белков на основе химерных конструкций с пероксидазами и фотоактивируемыми белками-генераторами активных форм кислорода [75]. В обоих случаях проявление метки – это инициируемое меченым белком окисление диаминобензидина (DAB), проникающего сквозь плазмалемму

как фиксированной, так и живой клетки [76]. Его нерастворимая окисленная форма локально осаждается и эффективно поглощает МРД-фотоны за счет высокой плотности осадка [75]. Методика предусматривает альдегидную фиксацию перед «проявлением» метки раствором DAB и пероксида водорода, но, в отличие от ЭМ-версии этого метода, не требует «проявки» с OsO<sub>4</sub> [76]. Применение белка-генератора свободных радикалов miniSOG вместо пероксидазы не требует инкубации с пероксидом водорода – он активируется при облучении видимым светом [75]. Очевидно, что протокол можно комбинировать с другими системами мечения [20, 63].

### ЗАКЛЮЧЕНИЕ

При всех своих особенностях и относительной «молодости» микроскопия мягкого рентгеновского диапазона, в первую очередь, в реализации криотомографии, продуктивно вошла в инструментарий клеточной биологии. Наиболее многообещающим направлением ее дальнейшего развития видится более тесная интеграция ктМРД и световой микроскопии с суперразрешением. Разработка генетически кодируемых меток, особенно «мультимодалых», способных генерировать и флуоресцентный сигнал, и абсорбционный контраст в МРД, добавит этому перспективному сочетанию методов совершенно новые возможности, позволяя перейти от корреляции и чисто морфологических критериев в анализе ультраструктуры к непосредственному рассмотрению молекулярных аспектов строения и динамики субклеточных систем. Остается надеяться, что имеющиеся на настоящий момент и рассмотренные выше технические трудности будут преодолены и такой комбинированный подход станет практически доступным.

Можно предполагать, что в дальнейшем произойдет и более тесное сближение МРМ с крио-ЭМ. Например, интеграция источника сфокусированного ионного луча в крио-МРМ-инструмент даст возможность навигации при помощи ктМРД для изготовления ламелей для крио-ЭМ-томографии, включающей интересные объекты. В идеале эта интеграция приведет к появлению «бесшовного конвейера», позволяющего всесторонне исследовать строение и функционирование клетки во всем диапазоне масштабов и разрешающей силы, используя сильные стороны всех доступных микроскопических методов.

Основными «организационными» проблемами ктМРД остается все еще не преодоленная привязка пробоподготовки к достаточно дорогому оборудованию для криофиксации и к считанному числу МРМ-установок на больших синхротронных источниках,

каждая из которых по-своему уникальна, что ограничивает доступность метода. Строительство новых источников, в том числе установок СКИФ с уже запланированной станцией рентгеновской микроскопии и РИФ («Российский источник фотонов») в РФ, приведет к существенно более глубокой интеграции МРМ в исследовательскую практику.

Появление достаточно ярких лазерно-плазменных источников МРД-фотонов подстегнуло попытки создания приборов «лабораторного уровня» [31, 32, 77], отделяющих МРМ-инструменты от mega-science-установок. Пока эти работы носят конструкторско-поисковый характер, но создание коммерчески распространяемого МРМ, сопоставимого по стоимости и эксплуатационным расходам с биологическим ЭМ, должно сделать методы МРМ столь же популярными, как световая и электронная микроскопия.

Создание же лабораторного крио-МРМ с высоко-апертурной оптикой и разрешением 5–7 нм может сместить ЭМ с положения главного метода ультраструктурной визуализации, оставив ей только сегмент разрешения, близкого к атомному. ●

*Авторы выражают благодарности Кнорре Д.А. за предоставленные изображения и авторам, разрешающим использование своих работ на основе лицензии Creative Commons.*

*Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда (грант № 22-62-00068).*

### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Schermelleh L., Ferrand A., Huser T., Eggeling C., Sauer M., Biehlmaier O., Drummen G.P.C. // Nat. Cell Biol. 2019. V. 21. № 1. P. 72–84.
- Wu Y., Shroff H. // Histochem. Cell. Biol. 2022. V. 158. № 4. P. 301–323.
- Saibil H.R. // Mol. Cell. 2022. V. 82. № 2. P. 274–284.
- Murphy D., Davidson M. Fundamentals of Light Microscopy and Electronic Imaging. Wiley-Blackwell, 2013. 538 p.
- Knott G., Genoud C. // J. Cell Sci. 2013. V. 15. № 126(Pt 20). P. 4545–4552.
- Osumi M. // J. Electron. Microsc. (Tokyo). 2012. V. 61. № 6. P. 343–365.
- Peddle C.J., Genoud C., Kreshuk A., Meechan K., Micheva K.D., Narayan K., Pape C., Parton R.G., Schieber N.L., Schwab Y., et al. // Nat. Rev. Meth. Primers. 2022. V. 2. P. 51.
- Wagner J., Schaffer M., Fernández-Busnadiego R. // FEBS Lett. 2017. V. 591. № 17. P. 2520–2533.
- Müller W.G., Heymann J.B., Nagashima K., Guttman P., Werner S., Rehbein S., Schneider G., McNally J.G. // J. Struct. Biol. 2012. V. 177. № 2. P. 179–192.
- Le Gros M.A., McDermott G., Cinquin B.P., Smith E.A., Do M., Chao W.L., Naulleau P.P., Larabell C.A. // J. Synchrotron Radiat. 2014. V. 21. № 6. P. 1370–1377.
- Groen J., Conesa J.J., Valcárcel R., Pereira E. // Biophys. Rev. 2019. V. 11. № 4. P. 611–619.
- Cossa A., Wien F., Turbant F., Kaczorowski T., Węgrzyn G., Arluison V., Pérez-Berná A.J., Trépout S., Pereira E. // Methods Mol. Biol. 2022. V. 2538. P. 319–333.
- Carzaniga R., Domart M.C., Collinson L.M., Duke E. // Protoplasma. 2014. V. 251. № 2. P. 449–458.
- Loconte V., Chen J.H., Vanslebrouck B., Ekman A.A., McDermott G., Le Gros M.A., Larabell C.A. // FASEB J. 2023. V. 37. № 1. P. e22681.
- Weinhardt V., Chen J.H., Ekman A.A., Guo J., Remesh S.G., Hammel M., McDermott G., Chao W., Oh S., Le Gros M.A., Larabell C.A. // PLoS One. 2020. V. 15. № 1. P. e0227601.
- Liu J., Li F., Chen L., Guan Y., Tian L., Xiong Y., Liu G., Tian Y. // J. Microsc. 2018. V. 270. № 1. P. 64–70.
- Reinhard J., Kaleta S., Abell J.J., Wiesner F., Wünsche M., Seemann E., Westermann M., Weber T., Nathanael J., Iliou A., et al. // arXiv. 2304. 14413v1
- Studer D., Humbel B.M., Chiquet M. // Histochem. Cell. Biol. 2008. V. 130. № 5. P. 877–889.
- Chen J.H., Vanslebrouck B., Loconte V., Ekman A., Cortese M., Bartenschlager R., McDermott G., Larabell C.A., Le Gros M.A., Weinhardt V. // STAR Protoc. 2022. V. 3. № 1. P. 101176.
- Duke E.M., Razi M., Weston A., Guttman P., Werner S., Henzler K., Schneider G., Tooze S.A., Collinson L.M. // Ultramicroscopy. 2014. V. 143. № 100. P. 77–87.
- Guzzi F., Gianoncelli A., Billè F., Carrato S., Kourousias G. // Life (Basel). 2023. V. 13. № 3. P. 629.
- Nahas K.L., Fernandes J.F., Vyas N., Crump C., Graham S., Harkiolaki M. // Biol. Imaging. 2022. V. 2. P. e3.
- Dyhr M.C.A., Sadeghi M., Moynova R., Knappe C., Kepsutlu Çakmak B., Werner S., Schneider G., McNally J., Noé F., Ewers H. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 2023. V. 120. № 24. P. e2209938120.
- Lühl L., Andrianov K., Dierks H., Haidl A., Dehlinger A., Heine M., Heeren J., Nisius T., Wilhein T., Kanngießner B. // J. Synchrotron Radiat. 2019. V. 26. № 2. P. 430–438.
- Shinohara K., Toné S., Ejima T., Ohigashi T., Ito A. // Cells. 2019. V. 8. № 2. P. 164.
- Larabell C.A., Nugent K.A. // Curr. Opin. Struct. Biol. 2010. V. 20. № 5. P. 623–631.
- Chiappi M., Conesa J.J., Pereira E., Sorzano C.O., Rodríguez M.J., Henzler K., Schneider G., Chichón F.J., Carrascosa J.L. // J. Nanobiotechnol. 2016. V. 14. P. 15.
- Smith E.A., McDermott G., Do M., Leung K., Panning B., Le Gros M.A., Larabell C.A. // Biophys. J. 2014. V. 107. № 8. P. 1988–1996.
- Niclis J.C., Murphy S.V., Parkinson D.Y., Zedan A., Sathananthan A.H., Cram D.S., Heraud P. // J. R. Soc. Interface. 2015. V. 12. № 108. P. 20150252.
- Pérez-Berná A.J., Rodríguez M.J., Chichón F.J., Friesland M.F., Sorrentino A., Carrascosa J.L., Pereira E., Gastaminza P. // ACS Nano. 2016. V. 10. № 7. P. 6597–6611.
- Fahy K., Weinhardt V., Vihinen-Ranta M., Fletcher N., Skoko D., Pereira E., Gastaminza P., Bartenschlager R., Scholz D., Ekman A., et al. // J. Phys. Photonics. 2021. V. 3. P. 031002.
- Carlson D.B., Gelb J., Palshin V., Evans J.E. // Microsc. Microanal. 2013. V. 19. № 1. P. 22–29.
- Chen H.Y., Chiang D.M., Lin Z.J., Hsieh C.C., Yin G.C., Weng I.C., Guttman P., Werner S., Henzler K., Schneider G., et al. // Sci. Rep. 2016. V. 6. P. 34879.
- White K.L., Singla J., Loconte V., Chen J.H., Ekman A.,

- Sun L., Zhang X., Francis J.P., Li A., Lin W., et al. // *Sci. Adv.* 2020. V. 6. № 50. P. eabc8262.
35. Gil S., Solano E., Martínez-Trucharte F., Martínez-Esaín J., Pérez-Berná A.J., Conesa J.J., Kamma-Lorger C., Alsina M., Sabés M. // *PLoS One.* 2020. V. 15. № 3. P. e0230022.
36. Bolitho E.M., Sanchez-Cano C., Huang H., Hands-Portman I., Spink M., Quinn P.D., Harkiolaki M., Sadler P.J. // *J. Biol. Inorg. Chem.* 2020. V. 25. № 2. P. 295–303.
37. Loconte V., Chen J.H., Cortese M., Ekman A., Le Gros M.A., Larabell C., Bartenschlager R., Weinhardt V. // *Cell. Rep. Methods.* 2021. V. 1. № 7. P. 100117.
38. Scrimieri R., Locatelli L., Cazzaniga A., Cazzola R., Malucelli E., Sorrentino A., Iotti S., Maier J.A. // *Sci. Rep.* 2023. V. 13. № 1. P. 15133.
39. Elgass K.D., Smith E.A., LeGros M.A., Larabell C.A., Ryan M.T. // *J. Cell Sci.* 2015. V. 128. № 15. P. 2795–2804.
40. Kepsutlu B., Wycisk V., Achazi K., Kapishnikov S., Pérez-Berná A.J., Guttmann P., Cossmer A., Pereiro E., Ewers H., Ballauff M., et al. // *ACS Nano.* 2020. V. 14. № 2. P. 2248–2264.
41. Dang Z., Tao X.Y., Guan Y., Wu Z., Xiong Y., Liu G., Tian Y., Tian L.J. // *ACS Nano.* 2023. V. 17. № 10. P. 9069–9081.
42. Egger D., Wölk B., Gosert R., Bianchi L., Blum H.E., Moradpour D., Bienz K. // *J. Virol.* 2002. V. 76. № 12. P. 5974–5984.
43. Asselah T., Bièche I., Mansouri A., Laurendeau I., Cazals-Hatem D., Feldmann G., Bedossa P., Paradis V., Martinot-Peignoux M., Lebrech D., et al. // *J. Pathol.* 2010. V. 221. № 3. P. 264–274.
44. Jamme F., Cinquin B., Gohon Y., Pereiro E., Réfrégiers M., Froissard M. // *J. Synchrotron Radiat.* 2020. V. 27. № 3. P. 772–778.
45. Teramoto T., Azai C., Terauchi K., Yoshimura M., Ohta T. // *Plant Physiol.* 2018. V. 177. № 1. P. 52–61.
46. Sviben S., Gal A., Hood M.A., Bertinetti L., Politi Y., Bennet M., Krishnamoorthy P., Schertel A., Wirth R., Sorrentino A., Pereiro E., Faivre D., Scheffel A. // *Nat. Commun.* 2016. V. 7. P. 11228.
47. Kahil K., Varsano N., Sorrentino A., Pereiro E., Rez P., Weiner S., Addadi L. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2020. V. 117. № 9. P. 30957–30965.
48. Bonany M., Pérez-Berná A.J., Dučić T., Pereiro E., Martín-Gómez H., Mas-Moruno C., van Rijjt S., Zhao Z., Espanol M., Ginebra M.P. // *Biomater. Adv.* 2022. V. 142. P. 213148.
49. Chichón F.J., Rodríguez M.J., Pereiro E., Chiappi M., Perdiguero B., Guttmann P., Werner S., Rehbein S., Schneider G., Esteban M., et al. // *J. Struct. Biol.* 2012. V. 177. № 2. P. 202–211.
50. Kördel M., Svenda M., Reddy H.K.N., Fogelqvist E., Arsana K.G.Y., Hamawandi B., Toprak M.S., Hertz H.M., Sellberg J.A. // *Sci. Rep.* 2021. V. 11. № 1. P. 5025.
51. Phillips P., Parkhurst J.M., Kounatidis I., Okolo C., Fish T.M., Naismith J.H., Walsh M.A., Harkiolaki M., Dumoux M. // *Life (Basel).* 2021. V. 11. № 8. P. 842.
52. Hale V.L., Watermeyer J.M., Hackett F., Vizcay-Barrena G., van Ooij C., Thomas J.A., Spink M.C., Harkiolaki M., Duke E., Fleck R.A., et al. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2017. V. 114. № 13. P. 3439–3444.
53. Lobato-Márquez D., Conesa J.J., López-Jiménez A.T., Divine M.E., Pruneda J.N., Mostowy S. // *J. Cell Sci.* 2023. V. 136. № 7. P. jcs261139.
54. Weirich C.S., Erzberger J.P., Barral Y. // *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 2008. V. 9. № 6. P. 478–489.
55. Turk-Kubo K.A., Loconte V., Vanslebrouck B., Mak W.K.E., Ekman A., Chen J.H., Takano Y., Horiguchi T., Nishimura T., Adachi M., et al. // *Microsc. Microanal.* 2023. V. 29. № 29 Suppl. 1. P. 1165.
56. Le Gros M.A., Clowney E.J., Magklara A., Yen A., Markenscoff-Papadimitriou E., Colquitt B., Myllys M., Kellis M., Lomvardas S., Larabell C.A. // *Cell Rep.* 2016. V. 17. № 8. P. 2125–2136.
57. Bian Q., Belmont A.S. // *Curr. Opin. Cell Biol.* 2012. V. 24. № 3. P. 359–366.
58. Polishchuk E.V., Polishchuk R.S., Luini A. // *Methods Mol. Biol.* 2013. V. 931. P. 413–422.
59. Hampton C.M., Strauss J.D., Ke Z., Dillard R.S., Hammonds J.E., Alonas E., Desai T.M., Marin M., Storms R.E., Leon F., et al. // *Nat. Protoc.* 2017. V. 12. № 1. P. 150–167.
60. Berger C., Premaraj N., Ravelli R.B.G., Knoops K., López-Iglesias C., Peters P.J. // *Nat. Methods.* 2023. V. 20. № 4. P. 499–511.
61. Schneider G., Guttmann P., Rehbein S., Werner S., Follath R. // *J. Struct. Biol.* 2012. V. 177. № 2. P. 212–223.
62. Schermelleh L., Heintzmann R., Leonhardt H. // *J. Cell Biol.* 2010. V. 190. № 2. P. 165–175.
63. Varsano N., Dadosh T., Kapishnikov S., Pereiro E., Shimoni E., Jin X., Kruth H.S., Leiserowitz L., Addadi L. // *J. Am. Chem. Soc.* 2016. V. 138. № 45. P. 14931–14940.
64. Varsano N., Beghi F., Elad N., Pereiro E., Dadosh T., Pinkas I., Perez-Berna A.J., Jin X., Kruth H.S., Leiserowitz L., Addadi L. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2018. V. 115. № 30. P. 7662–7669.
65. Faoro R., Bassu M., Mejia Y.X., Stephan T., Dudani N., Boeker C., Jakobs S., Burg T.P. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2018. V. 115. № 6. P. 1204–1209.
66. Kounatidis I., Stanifer M.L., Phillips M.A., Paul-Gilloteaux P., Heiligenstein X., Wang H., Okolo C.A., Fish T.M., Spink M.C., Stuart D.I., et al. // *Cell.* 2020. V. 182. № 2. P. 515–530. e17.
67. Phillips M.A., Harkiolaki M., Susano Pinto D.M., Parton R.M., Palanca A., Garcia-Moreno M., Kounatidis I., Sedat J.W., Stuart D.I., Castello A., et al. // *Optica.* 2020. V. 7. № 7. P. 802–812.
68. Koronfel M., Kounatidis I., Mwangangi D.M., Vyas N., Okolo C., Jadhav A., Fish T., Chotchuang P., Schulte A., Robinson R.C., et al. // *Acta Crystallogr. D Struct. Biol.* 2021. V. 77. № 12. P. 1479–1485.
69. Malyshev I.V., Reunov D.G., Chkhhalo N.I., Toropov M.N., Pestov A.E., Polkovnikov V.N., Tsybin N.N., Lopatin A.Y., Chernyshev A.K., Mikhailenko M.S., et al. // *Opt. Express.* 2022. V. 30. № 26. P. 47567–47586.
70. Чхало Н.И., Малышев И.В., Пестов А.Е., Полковников В.Н., Салащенко Н.Н., Топоров М.Н. // *Успехи физ. наук.* 2020. Т. 190. № 1. С. 74–91.
71. Малышев И.В., Пестов А.Е., Полковников В.Н., Реунов Д.Г., Торопов М.Н., Чхало Н.И., Ракшун Я.В., Хомяков Ю.В., Чернов В.А., Щелоков И.А. // *Поверхность. Рентг. синхр. и нейтр. исследования.* 2023. Т. 5. С. 3–15.
72. Shaw P. // *Histochem. J.* 1994. V. 26. № 9. P. 687–694.
73. Malyshev I.V., Chkhhalo N.I. // *Ultramicroscopy.* 2019. V. 202. P. 76–86.
74. Gureyev T.E., Quiney H.M., Allen L.J. // *J. Opt. Soc. Am. A Opt. Image Sci. Vis.* 2022. V. 39. № 5. P. 936–947.
75. Kong H., Zhang J., Li J., Wang J., Shin H.J., Tai R., Yan Q., Xia K., Hu J., Wang L., et al. // *Natl. Sci. Rev.* 2020. V. 7. № 7. P. 1218–1227.
76. Ou H.D., Phan S., Deerinck T.J., Thor A., Ellisman M.H., O’Shea C.C. // *Science.* 2017. V. 357. № 6349. P. eaag0025.
77. Fogelqvist E., Kördel M., Carannante V., Önfelt B., Hertz H.M. // *Sci. Rep.* 2017. V. 7. № 1. P. 13433.

УДК 612.816: 612.822.2

# Мускариновые холинорецепторы в скелетной мышце: локализация и функциональная роль

И. В. Ковязина<sup>1,2\*</sup>, А. А. Хамидуллина<sup>1</sup><sup>1</sup> Казанский государственный медицинский университет, Казань, 420012 Россия<sup>2</sup> Казанский институт биохимии и биофизики – обособленное структурное подразделение Федерального исследовательского центра «Казанский научный центр Российской академии наук», Казань, 420111 Россия

\*E-mail: irina.kovyazina@list.ru; i.kovyazina@kazangmu.ru

Поступила в редакцию 20.07.2023

Принята к печати 24.09.2023

DOI: 10.32607/actanaturae.25259

**РЕФЕРАТ** В представленном обзоре рассмотрены современные представления о функциях мускариновых холинорецепторов в скелетной мышце, в частности, в нервно-мышечном синапсе, а также о сигнальных путях, связанных с активацией разных подтипов этих рецепторов в скелетных мышцах холодно-кровных и теплокровных животных. Несмотря на достаточно давнюю историю исследований участия мускариновых холинорецепторов в модуляции процесса передачи возбуждения в нервно-мышечных синапсах, многие аспекты такой регуляции и сопряженные внутриклеточные механизмы остаются недостаточно изученными. Очевидно, что функции мускариновых рецепторов в скелетной мышце не ограничиваются ауторегуляцией секреции медиатора из двигательных нервных окончаний, а затрагивают также развитие и морфологические перестройки синаптического аппарата, координируя их с уровнем активности. Обсуждаются различные подходы к изучению функций мускариновых рецепторов в моторных синапсах, а также проблемы, возникающие при интерпретации экспериментальных данных. Заключительная часть обзора посвящена анализу некоторых внутриклеточных механизмов и сигнальных путей, опосредующих эффекты мускариновых агентов на параметры нервно-мышечной передачи.

**КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА** скелетная мышца, нервно-мышечный синапс, ацетилхолин, мускариновый холинорецептор, ауторегуляция.

**СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ** АХ – ацетилхолин; мХР – мускариновый холинорецептор; НМС – нервно-мышечный синапс; ПКП – потенциал концевой пластинки.

## ВВЕДЕНИЕ

Ацетилхолин (АХ) – это один из основных нейромедиаторов и модуляторов нервной системы. Никотиновые (ионотропные) и мускариновые (метаботропные) холинорецепторы (ХР) экспрессируются в различных тканях: от нервно-мышечных синапсов (НМС) и парасимпатической нервной системы до областей коры, участвующих в когнитивных функциях, таких, как обучение и память, а холинергические агенты, в том числе аллостерические модуляторы, активно используются в лечении разного рода патологий [1–3].

Первые исследования, которые показали возможность регуляции нервно-мышечной передачи, опосредованную активацией мускариновых холинорецепторов (мХР), датируются 60-ми годами XX века

[4, 5]. В настоящее время известно, что в области нервно-мышечных контактов позвоночных присутствуют все пять известных на данный момент подтипов мХР (M1–M5), а сигнальные пути, запускаемые активацией этих рецепторов, многочисленны и нередко взаимосвязаны.

Сведения о локализации мХР разных подтипов в скелетной мышце пока неоднозначны: часть этих рецепторов, по-видимому, может располагаться не только на нервных окончаниях, но и на саркомере и шванновских клетках [6–8]. С активацией разных подтипов мХР в скелетных мышцах позвоночных связаны и разнообразные сигнальные пути – многие из них приводят к изменению концентрации внутриклеточного  $Ca^{2+}$  путем регуляции его высвобождения из внутриклеточных депо либо

модификации работы  $\text{Ca}^{2+}$ -каналов, прямо или косвенно модулируя процесс нейросекреции (например, путем повышения уровня свободных радикалов) в области НМС. Другие механизмы предполагают непосредственное воздействие на аппарат экзоцитоза, например, через регуляцию активности протеинкиназы А, фосфорилирование белка SNAP-25 и т.д.

На сегодняшний день известно, что функции мХР в регуляции нервно-мышечной передачи не ограничиваются контролем уровня нейросекреции – в ряде работ выявлено участие этих рецепторов в регуляции временного хода выделения АХ [9–11]. мХР, в частности нечетных подтипов, могут располагаться на сарколемме и регулировать сократительную активность мышечных волокон, как это показано для М5 мХР [12], либо участвовать в поддержании мембранного потенциала покоя [13]. Сравнительно недавно была выявлена роль различных подтипов мХР в обеспечении синаптической стабильности, роста и развития моторных синапсов [7]. Эти рецепторы обеспечивают функциональность трехчастного синапса (нервное окончание–мышечное волокно–шванновская клетка) и координируют развитие и морфологические особенности синаптического аппарата с уровнем его активности.

В этом обзоре предпринята попытка обобщить данные о локализации мХР в скелетных мышцах, о влиянии мускариновых агентов на параметры синаптической передачи и о сигнальных путях, связанных с активацией мХР разных подтипов в НМС позвоночных.

### ФАРМАКОЛОГИЧЕСКИЕ И ГЕНЕТИЧЕСКИЕ ПОДХОДЫ К ИЗУЧЕНИЮ ФУНКЦИЙ мХР

По особенностям локализации, молекулярному строению, последовательностям их мРНК и выполняемым функциям выделяют пять подтипов мХР (М1–М5). Консервативность структуры пяти подтипов мХР является причиной низкой избирательности большинства мускариновых агонистов и антагонистов, используемых для фармакологического анализа [2, 14] и сложностей при интерпретации экспериментальных данных. К настоящему времени единственными высокоселективными антагонистами мХР являются «мускариновые токсины», изолированные из яда мамбы [15].

Другой фармакологический подход к изучению функций мХР – использование аллостерических модуляторов [16]. Подтипы мХР обладают высокой структурной гомологией трансмембранных доменов, где расположен ортостерический сайт связывания, при этом домены вне мембраны менее консервативны. Направленный синтез реагентов, специфически связывающихся с аллостерическими доменами, по-

зволяет обеспечить селективность их связывания с определенными подтипами рецепторов в такой степени, которая невозможна с ортостерическими лигандами [17–19].

В последнее время для изучения функциональной роли мХР как в целом организме, так и в отдельных клетках, помимо фармакологического анализа, широко используют животных с мутациями в генах, кодирующих различные подтипы этих рецепторов. Установлено, например, что у крыс *Rattus norvegicus* гены, кодирующие различные подтипы мХР, расположены на хромосомах 1 (М1-подтип), 3 (М4- и М5-подтипы), 4 (М2-подтип) и 17 (М3-подтип) [20]. Разработаны конгенные и консомические линии животных, которые можно использовать для изучения функций каждого из подтипов мХР [20, 21]. Исследования особенностей синаптической передачи на животных с мутациями в генах этих рецепторов пролили свет на физиологическую роль различных подтипов мХР, в том числе и в периферических синапсах. У животных с мутациями в генах мХР, жизнеспособных и фертильных, наблюдались различные когнитивные, поведенческие отклонения, изменения в морфологии синаптических контактов и в фармакологических эффектах холинергических агентов [1, 21–23].

### ЛОКАЛИЗАЦИЯ мХР В СКЕЛЕТНОЙ МЫШЦЕ

Установлено, что мХР могут находиться как на мембране нервных окончаний, так и на шванновских клетках и сарколемме [6–8]. Активироваться эти холинорецепторы могут везикулярным АХ, выделяемым из нервных окончаний спонтанно (асинхронно) либо синхронно при нервной активности, а также некантовым АХ, который составляет весьма существенную часть нейромедиатора в области синаптического контакта [13, 24, 25]. О наличии мускариновых рецепторов, в частности М1, на сарколемме диафрагмальной мышцы крысы сообщалось в работе [8]. Меган Райт и соавт. [7] показали, что в длинном поднимателе уха (*m. levator auris longus*) мышцы рецепторы М2 находятся исключительно в моторных нейронах, тогда как М1, М3 и М5 мХР могут быть связаны со шванновскими клетками и/или мышечными волокнами. С другой стороны, функциональные подтипы М1–М4 мХР обнаружены с помощью РТ-ПЦР-анализа в культуре шванновских клеток, полученных из диафрагмального нерва новорожденных крыс, причем в этих клетках преобладал именно подтип М2 [26]. При этом мХР подтипа М4 экспрессировались в культуре шванновских клеток на очень низком уровне, а рецепторы М5 вообще не обнаружены. Позднее аналогичные результаты получили и для шванновских клеток человека [27].

Известно, что М1–М4 мХР присутствуют и функционируют в области нервно-мышечных контактов крысы на всех стадиях постнатального онтогенеза [28, 29].

В НМС холоднокровных животных также присутствуют все известные подтипы мХР. Так, использование иммуногистохимических методов и микроэлектродного отведения потенциалов концевой пластинки (ПКП) позволило выявить функционально активные М1–М5 мХР в области моторных синапсов кожно-грудинной мышцы лягушки [11]. Различные эффекты мускарина в этих синапсах могут быть связаны именно с гетерогенной локализацией мХР, в частности М3: часть этих рецепторов может быть локализована на нервном окончании и активироваться даже небольшим количеством агониста, в то время как другая часть удалена от мест секреции (например, на шванновских клетках или сарколемме) и активируется только при высоком уровне секреции (или экзогенным негидролизуемым агонистом, таким, как мускарин или карбахолин). О наличии мХР в перисинаптических шванновских клетках в НМС лягушки косвенно свидетельствует и индуцированное мускарином повышение внутриклеточного уровня  $Ca^{2+}$  в этой части нервно-мышечного контакта [30]. Предложена схема регуляции секреции АХ в моторных синапсах ящерицы с участием мХР подтипа М3, локализованных на сарколемме, активация которых запускает синтез эндоканнабиноидов, в частности 2-АГ, из липидов мышечной мембраны [6].

Неоднородная локализация мХР в НМС может отчасти объяснять множественные и нередко неоднозначные эффекты мускариновых агентов на нервно-мышечную передачу.

### **ФУНКЦИОНАЛЬНАЯ РОЛЬ мХР В СКЕЛЕТНОЙ МЫШЦЕ**

Возможность ауторегуляции секреции АХ из моторных нервных окончаний никотиновыми холинорецепторами по принципу обратной связи была впервые показана еще в 60-х годах прошлого века. «Мускариновая» регуляция была открыта позднее [4, 5, 31].

В большинстве ранних работ с активацией никотиновых рецепторов на двигательных нервных окончаниях связывали облегчение нейросекреции, в то время как мХР отводилась роль угнетения квантового освобождения АХ [31–33]. Позднее данные о том, что иннервированные области скелетных мышц содержат мХР разных подтипов, в том числе и способствующих облегчению нейросекреции, а также неоднозначные результаты исследований, выполненных в разных экспериментальных усло-

виях, заставили переосмыслить этот постулат [7, 34–36]. Так, показано [36], что в НМС крысы блокатор мХР М2/М4-подтипов метоктрамин увеличивает квантовый состав ПКП в условиях «физиологического» уровня  $Ca^{2+}$ , но угнетает секрецию АХ в условиях сниженного  $Ca^{2+}$  (либо при уменьшении количества АХ в синаптической щели путем добавления холинэстеразы). Именно с повышенной активацией мХР, в частности подтипов М1 и М2, может быть связано изменение квантового состава ПКП при ингибировании синаптической ацетилхолинэстеразы [35]. Несмотря на то, что эксперименты, проведенные в условиях сниженного  $Ca^{2+}$ , не позволяют делать однозначные выводы о физиологической роли мХР в синапсе, они демонстрируют возможность переключения с одного сигнального пути на другой и позволяют выявить эффекты активации некоторых подтипов мХР, связанных с изменением концентрации внутриклеточного кальция, и проявляются более ярко при исходно низком его уровне.

Отмечены различия в выраженности эффектов мускарина на интенсивность спонтанной и вызванной секреции в НМС лягушки при сниженном и близком к «физиологическому» уровнях  $Ca^{2+}$  [37]. Аналогичные результаты получены в работе [11] – в условиях сниженного уровня  $Ca^{2+}$  блокаторы подтипов М1, М2/М4 и М3 мХР снижали квантовый выброс АХ. В случае «физиологического» уровня  $Ca^{2+}$  эффекты ряда мускариновых агентов проявлялись лишь в условиях высокочастотной стимуляции двигательного нерва. Это может быть связано отчасти с отставленными во времени процессами, развивающимися в двигательных нервных окончаниях при активации мХР. Это предположение косвенно подтверждают эксперименты по измерению  $Ca^{2+}$  транзientа, т.е. интегрального кальциевого сигнала, отражающего метаболизм  $Ca^{2+}$  в клетке в течение довольно длительного периода (несколько десятков мс) после потенциала действия. В этих экспериментах активация М2 мХР в двигательных нервных окончаниях лягушки приводила к небольшому, но достоверному снижению амплитуды интегрального кальциевого сигнала [38].

Помимо регуляции количества высвобождаемого из нервных окончаний медиатора, активация мХР приводит и к изменению кинетики процесса секреции. Наряду с квантовым составом ПКП, синхронность выделения медиатора является фактором, обеспечивающим синаптическую пластичность в НМС [39, 40]. Степень синхронности нейросекреции в НМС обусловлена целым рядом факторов, таких, как температура, частота стимуляции двигательного нерва, присутствие физиологически ак-

тивных агентов [40–42]. Оказалось, что в моторных синапсах лягушки инактивация М2 мХР не только модулирует квантовый состав ПКП, но и десинхронизирует секреторный процесс [11, 43]. Исследования «мускариновой» регуляции кинетики секреции АХ получили свое продолжение при появлении животных с мутацией в гене, кодирующем мХР разных подтипов [44]. Оказалось, что у мышей с нокаутом М2 мХР, в отличие от мышей дикого типа, экспериментальные манипуляции, приводящие к изменению  $[Ca^{2+}]$  в цитоплазме (варьирование  $[Ca^{2+}]$  в омывающем растворе, добавление кальциевых буферов), приводили к изменению не только квантового состава ПКП, но и временного хода секреции АХ.

Рецепторы М1 также могут быть вовлечены в контроль временного хода секреции АХ [10, 45]. Причем в НМС лягушки участие этих рецепторов в регуляции синхронности секреции было очевидным только в условиях высокочастотной стимуляции двигательного нерва – блокада этих рецепторов предотвращала увеличение длительности переднего фронта постсинаптических ответов, что при неизменности характеристик спонтанных одноквантовых сигналов можно расценивать как косвенное свидетельство изменения синхронности секреторного процесса [10].

Создание положительных и негативных аллостерических модуляторов М5 мХР – соединений VU-023842 и ML-375 [17, 46], позволило приблизиться к пониманию физиологической роли М5 мХР в НМС. Так, при положительной модуляции М5 мХР увеличивались квантовый состав и длительность переднего фронта ПКП, а также усиливалась синаптическая депрессия при высокочастотной стимуляции нерва [12].

Эффекты активации либо инактивации мХР в моторных синапсах не ограничиваются регуляцией квантовой секреции АХ. В присутствии положительного модулятора М5 мХР, соединения VU-0238429, сила мышечных сокращений снижалась как при непрямой, так и при прямой стимуляции препарата. Этот факт говорит в пользу локализации М5 мХР на сарколемме и возможности прямой регуляции сократительной способности мышц АХ [12]. Механизмы такой регуляции пока неясны. На культуре фибробластов мышцы (клеток NIH 3T3) показано, что активация всех экспрессируемых мХР может угнетать функционирование  $Ca^{2+}$ -каналов L-типа путем активации протеинкиназы С [47]. Вопрос колокализации рецепторов М5 с  $Ca^{2+}$ -каналами в скелетных мышцах и возможность их функциональной регуляции пока остается открытым.

Высказано предположение, что активация М1 мХР на мышечной мембране АХ (предположительно не квантового происхождения) защищает волокна скелетной мышцы от ранней постденервационной деполяризации [13]. То есть холинорецепторы М1 могут опосредовать трофическую, не импульсную, регуляцию потенциала покоя в скелетных мышцах. В отсутствие стимуляции нерва наблюдалась эндогенная активация мХР подтипа М1, модулирующая не квантовое выделение АХ из нервного окончания, причем эти рецепторы были локализованы, по всей видимости, на мембране мышечного волокна, т.е. контроль не квантовой секреции был ретроградным [48].

В ряде работ показано участие мХР в реализации структурных изменений синапса. Так, мХР, локализованные на перисинаптической шванновской клетке, регулируют активность глияльного фибриллярного кислого белка (GFAP), который поддерживает форму клетки и участвует в регуляции процессов, связанных с пролиферацией клеток и синаптической пластичностью. Эта регуляция осуществляется, по-видимому, путем изменения концентрации внутриклеточного  $Ca^{2+}$  в перисинаптических шванновских клетках. Предполагается, что М2 мХР в шванновских клетках теплокровных участвует в контроле пролиферации, дифференцировки и миелинизации этих клеток [30, 49, 50]. В исследовании, выполненном на нервно-мышечных препаратах новорожденных крыс, было показано, что мускариновые ауторецепторы М1, М2 и М4 могут участвовать в дифференцировке «сильных» и «слабых» синапсов в случае полииннервации мышечных волокон на ранних стадиях синаптогенеза [51, 52].

С использованием методов фармакологического и генетического анализа детально исследована роль различных подтипов мХР в обеспечении синаптической стабильности, роста и развития моторных синапсов мышцы [7]. Блокада всех пяти подтипов мХР атропином (подкожные инъекции в течение 7 дней) оказывала выраженный эффект, включающий исчезновение одних нервных окончаний и спонтанное прорастание других, а также мышечную атрофию. Блокада только подтипов М2/М4 мХР метоктрамином вызывала изменения на уровне нервных окончаний, но не затрагивала состояние мышечных волокон. Инъекции блокатора М3 рецепторов 4-DAMP вызывали полное отмирание нервных окончаний, однако не затрагивали состояние шванновских клеток. Аналогичные морфологические изменения наблюдались и у ген-модифицированных мышей – мышцы М2-/- характеризовались нестабильностью нервных терминалей (исчезновение терминалей, сопровождающееся спонтанным спраутингом),

в то время как мышцы с нокаутом гена M5 отличались малым размером моторных синапсов и атрофией мышечных волокон.

Таким образом, разные подтипы мХР обеспечивают функциональность трехчастного синапса (нервное окончание–мышечное волокно–шванновская клетка) и координируют развитие и морфологические особенности синаптического аппарата с его активностью.

### СИГНАЛЬНЫЕ ПУТИ, СВЯЗАННЫЕ С АКТИВАЦИЕЙ мХР В НМС

Мускариновые рецепторы могут активировать многочисленные сигнальные пути в НМС. Классическое представление о нейромодуляции, опосредуемой через нечетные (M1, M3, M5) и четные (M2, M4) мХР, разделяет сигнальные пути, связанные с этими подтипами, на активацию белков  $G_q$  и  $G_{i/o}$ . Традиционно облегчение нейросекреции АХ, опосредуемое через активацию «нечетных» мХР, связывали с активацией фосфолипазы С, ведущей к синтезу инозитол-4,5-трифосфата (ИФ3) и диацилглицерина (ДАГ) [53]. ИФ3 повышает интенсивность секреции путем освобождения  $Ca^{2+}$  из внутриклеточных депо, а ДАГ может прямо влиять на белки аппарата экзоцитоза. Регуляция активности протеинкиназы А за счет изменения уровня сАМР при активации белков  $G_{i/o}$  приводит к модуляции работы  $Ca^{2+}$ -каналов, белков аппарата экзоцитоза, а также контролирует процесс загрузки АХ в везикулы [54–57]. Однако недавние исследования показали, что в НМС мышцы подтипы M1 и M2 мХР могут использовать одни и те же мишени, следующие после активации G-белков [58]. Таким образом, между M1 и M2 мХР существуют реципрокные отношения, которые, как выяснилось, реализуются через белок, заякоривающий протеинкиназу А. Некоторые эффекты, связанные с активацией M2 мХР, наблюдаются лишь при активном рецепторе M1 (например, уменьшение каталитических субъединиц протеинкиназы А и увеличение регуляторных), в то время как некоторые изменения могут быть вызваны дополнительной активацией рецептора M1 (например, повышение уровня регуляторного белка RII $\beta$  и его высвобождение в цитозоль). Более того, мХР могут разделять общие сигнальные пути с рецепторами к другим медиаторам. Так, в НМС крыс пресинаптические аденозиновые A2 и мускариновые M1-рецепторы облегчают нейросекрецию, и у этих рецепторов есть общий внутриклеточный сигнальный путь [59, 60]. Конкуренция между рецепторами может происходить путем конвергенции сигнала к общему звену через активацию протеинкиназы А и вход  $Ca^{2+}$  через  $Ca^{2+}$ -каналы L-типа. Позднее было показано, что эндогенный аденозин,

высвобождаемый во время ритмической активности нерва, участвует в тонкой регуляции пресинаптической активности M1 и M2 мХР [61]. Превалирование облегчения нейросекреции, связанного с M1 мХР, при ритмической стимуляции нерва происходит благодаря аккумуляции в области синапса эндогенного аденозина, который действует на рецепторы A1 и не дает проявиться в полной мере эффектам, связанным с активацией M2 мХР. Похожий феномен – отсутствие эффекта активации M2 мХР на спонтанную секрецию АХ в синапсах лягушки на фоне действия аденозина наблюдался в синапсах лягушки [62].

В НМС ящерицы активация мХР приводила к двухфазной модуляции нейросекреции: кратковременная (<12 мин) активация M3-рецепторов мускарином снижала квантовый выброс АХ, а более длительная активация M1-рецепторов, наоборот, повышала, причем обе эти стадии зависели от уровня оксида азота в области синаптического контакта [63]. Выраженность эффектов, связанных со стимуляцией M1-рецепторов, определялась уровнем сАМР и активностью протеинкиназы А. Снижение квантового состава ПКП при активации M3-рецепторов, локализованных на мышечной клетке, было опосредовано увеличением синтеза эндоканнабиноидов, вероятно, 2-AG [6]. Попадая в синаптическую щель, эндоканнабиноиды связываются с рецепторами типа CB1 на пресинаптических нервных окончаниях, что приводит к уменьшению входа  $Ca^{2+}$  и снижению количества секретиремого АХ. При этом для реализации как минимум одного звена в этой регуляторной цепочке требуется продукция оксида азота (либо в мышцах, либо в шванновских клетках).

Интересно отметить, что в исследовании, выполненном на нервно-мышечном препарате лягушки [64], активация M3 мХР также приводила к снижению квантового состава ПКП, однако это угнетение секреции было связано исключительно с активацией NO-синтазы и увеличением продукции оксида азота и не задействовало выработку эндоканнабиноидов (что, однако, не исключает наличия и определенной функциональной роли каннабиноидных рецепторов типа CB1 в моторных синапсах лягушки). Активность NO-синтазы может усиливаться из-за роста концентрации внутриклеточного  $Ca^{2+}$  при активации  $G_q$ -белка, сопряженного с M3-подтипом мХР. Интересно отметить, что в этих экспериментах ингибирование фосфоинозитид-3-киназы (PI3K) вортманнином препятствовало восстановлению исходного уровня секреции после удаления мускарина из раствора. Таким образом, аппликация мускарина приводила к нарушению баланса между синтезом

мембранных фосфолипидов и их распадом, что может, по-видимому, влиять на свойства ряда сигнальных молекул, связанных с мембранами и участвующих в регуляции экзоцитоза.

Другой механизм мускариновой регуляции секреции АХ в НМС связан с активностью  $K^+$ -каналов, управляемых G-белком (GIRK-каналов). Активация GIRK-каналов  $G_i$ -белками обычно приводит к гиперполяризации клетки и снижению ее возбудимости. Одним из метаболитных рецепторов, сопряженных с  $G_i$ -белками, является мХР подтипа М2. Использование флуоресцентной метки FluxOR™ позволило визуализировать открывание  $K^+$ -каналов при активации М2 мХР в скелетной мышце лягушки [65]. Эти опыты напрямую показали, что в моторных синапсах лягушки GIRK-каналы функционально активны и сопряжены с М2 мХР. Анализ ПКП и миниатюрных ПКП, зарегистрированных в присутствии активатора (ML-297) и блокатора (тертиапин-Q) GIRK-каналов, позволил сделать вывод о двойственном «поведении» этих  $K^+$ -каналов в НМС лягушки. В зависимости от уровня внеклеточного кальция, М2 мХР могут как угнетать, так и увеличивать уровень вызванной секреции АХ [11]. Можно предположить, что внеклеточный  $Ca^{2+}$  может служить переключателем между стимулирующей и ингибирующей функциями М2 мХР, т.е. эти рецепторы могут как активировать, так и ингибировать GIRK-каналы, дифференцированно модулируя процесс вызванного освобождения нейромедиатора. Следующим за GIRK-каналом звеном в этой сигнальной схеме является  $Ca^{2+}$ -канал L-типа – предполагается, что подавление (за счет гиперполяризации) несинхронной, спонтанной активности этих каналов в периоды покоя аксона может обеспечить их успешное срабатывание в ответ на потенциал действия.

Еще один сигнальный путь, связанный с М2-подтипом мХР в моторных синапсах холоднокровных и теплокровных животных, связан с возможностью тонического блока аппарата экзоцитоза при активации этих рецепторов и его устранения при деполяризации двигательного нервного окончания [66]. Предполагается, что в покое М2 мХР обладают повышенным сродством к АХ и при активации переводят секреторный аппарат в состояние тонического блока. При деполяризации пресинаптической мембраны аффинность М2 мХР к АХ снижается, молекулы нейромедиатора диссоциируют и аппарат экзоцитоза теперь может взаимодействовать с  $Ca^{2+}$ , что в конечном итоге приводит к выделению АХ. Зависимость константы диссоциации от мембранного потенциала для М2-подтипа мХР позже прямо показали на ооцитах в экспериментах с регистра-

цией  $K^+$ -токов через GIRK-каналы и при оценке степени связывания и диссоциации с рецепторами меченого АХ [67]. С помощью метода высвобождения связанного карбахолина показано, что в случае быстрой (в течение нескольких мс) активации холиномиметика в области моторного синапса у мышей дикого типа блокада М2 мХР приводит к существенному дозозависимому снижению квантового выброса АХ, в то время как у мутантов без рецепторов этого подтипа карбахолин не влиял на амплитуду ПКП, что можно трактовать как вовлеченность М2 мХР в самую раннюю фазу секреции, в пределах нескольких мс после деполяризации нервного окончания [68].

В шванновских клетках крысы рецепторы М2 в дополнение к каноническому пути, связанному с  $G_i$ -белком, активируют и неканонические пути, включая PI3K/АКТ/mTOR-сигнальный путь, что может модулировать процессы пролиферации и миграции этих глиальных клеток [50].

#### **СРАВНЕНИЕ СИГНАЛЬНЫХ ПУТЕЙ, СВЯЗАННЫХ С АКТИВАЦИЕЙ мХР В ЦЕНТРАЛЬНЫХ И МОТОРНЫХ СИНАПСАХ**

В рамках данного обзора было интересно сопоставить некоторые сигнальные пути, сопряженные с мХР, в моторных и центральных синапсах.

В ЦНС мХР расположены в различных областях головного мозга, которые иннервируются холинергическими нейронами как на постсинаптических, так и на пресинаптических мембранах, а также в глиальных клетках. Считается, что мХР вовлечены в такие процессы, как обучение, концентрация внимания, регуляция циклов сна и бодрствования, моторный контроль и некоторые другие; с их активацией связаны такие эффекты, как постсинаптическое возбуждение, постсинаптическое торможение и пресинаптическое аутоингибирование [69, 70].

Одним из механизмов, ответственным за постсинаптическое возбуждение, является ингибирование потенциалзависимых  $K^+$ -каналов (М-каналов), сопряженных с подтипами М1/М3/М5 мХР, в результате активации фосфолипазы С. К М-каналам относятся представители подсемейства  $Kv7$  – в основном  $Kv7.2$  и  $Kv7.3$  [71, 72]. Для стабилизации этих каналов в открытом состоянии необходима определенная плотность фосфатидилинозитол-4,5-бисфосфата (PIP2) в клеточной мембране [73, 74]. Быстрый гидролиз PIP2 фосфолипазой С приводит к закрытию  $K^+$ -канала, что вызывает деполяризацию и повышение возбудимости клетки. Впервые этот механизм был исследован в симпатических нейронах, но он характерен и для центральных нейронов (например, пирамидных нейронов гиппокампа, корковых

пирамидных нейронов). Обычно М-каналы сосредоточены в начальном сегменте аксона, где контролируют порог потенциала действия. Дополнительным механизмом возбуждения, связанным с активацией мХР нечетных подтипов и истощением мембранных липидов, является ингибирование некоторых других калиевых каналов, например,  $\text{Ca}^{2+}$ -зависимых  $\text{K}^+$ -каналов или  $\text{K}^+$ -каналов утечки [75–78].

Известно, что М-каналы (Kv7.2, Kv7.3 и Kv7.4) экспрессируются и в поперечно-полосатых мышцах [79, 80]; им отводят роль регулятора процесса дифференциации скелетных мышц и поддержания мышечного тонуса [81–83]. Учитывая наличие нечетных подтипов мХР на саркомере, гипотеза о возможной их колокализации с Kv7-каналами и модуляции калиевой проводимости представляется весьма перспективной и могла бы объяснить некоторые эффекты мускариновых агентов на «мышечном» уровне.

Постсинаптическое торможение возникает в ЦНС в результате активации калиевых каналов внутреннего выпрямления (GIRK-каналов), сопряженных с М2-подтипом мХР. Впервые этот механизм был обнаружен в симпатических и парасимпатических нейронах [84], а позднее сходные М2-опосредованные эффекты АХ обнаружили в некоторых центральных нейронах [70, 85–87]. Медленный тормозной постсинаптический потенциал представляет собой отсроченную гиперполяризацию, начинающуюся примерно через 50 мс после «никотинового» ПКП. Эта гиперполяризация имеет близкое сходство с ответом миокарда на стимуляцию блуждающего нерва и также возникает в результате активации  $G_i$ -белка  $\text{K}^+$ -канала внутреннего выпрямления (в основном Kir3.1 и Kir3.2) после активации М2 мХР. Сопряжение М2 мХР с GIRK-каналами показано и для НМС [65]. В моторных синапсах GIRK-каналы локализованы на пресинаптической мембране и, как оказалось, могут не только снижать возбудимость клетки, но при некоторых условиях облегчать секрецию АХ за счет подавления «кальциевого шума» в периоды покоя. В моторных синапсах позвоночных этот сигнальный путь участвует в ауторегуляции нейросекреции.

Что касается ауторегуляции в ЦНС, то здесь пресинаптическое торможение (аутоингибирование) связывают, как правило, с прямой инактивацией потенциалзависимых  $\text{Ca}^{2+}$ -каналов, сопряженных с рецепторами М2/М4. В симпатических нейронах эти два подтипа мХР и родственные им белки  $G_i$  и  $G_o$  и эффекторные каналы, по-видимому, отделены друг от друга в отдельные функциональные микродомены или сигналосомы [88], возможно, с помощью вспомогательных белков [89].

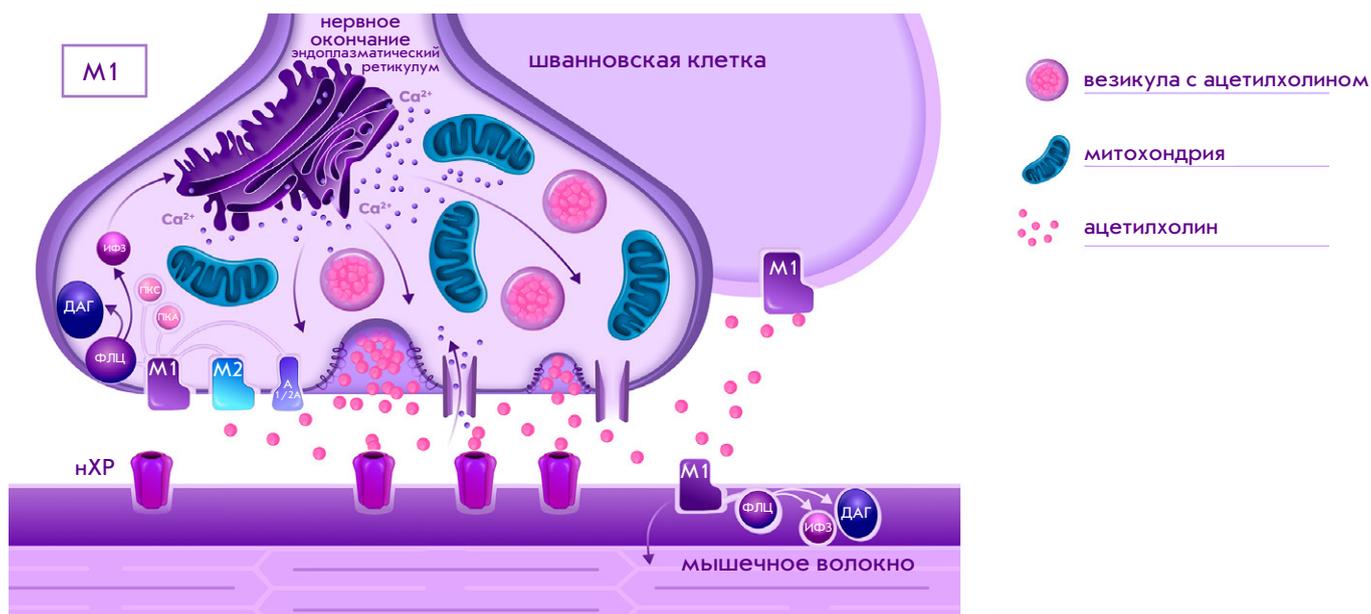
С каждым годом находят новые механизмы, ответственные за передачу сигнала с помощью метаболитных рецепторов, а уже известные усложняются благодаря идентификации дополнительных изоформ молекул, участвующих в передаче сигнала, распознаванию новых точек пересечения сигнальных путей и выявлению специфических для разных типов клеток различий в передаче сигналов. Традиционно считается, что нечетные подтипы рецепторов (М1, М3 и М5) активируют фосфолипазу С через нечувствительные к коклюшному токсину G-белки семейства  $G_q$ , а рецепторы подтипов М2 и М4 регулируют активность аденилатциклазы (с помощью чувствительных к коклюшному токсину G-белков семейства  $G_i$ ) без стимуляции фосфолипазы С. Однако эта специфичность не является абсолютной, и «четные» мХР также могут активировать  $\alpha$ -субъединицы  $G_s$  и  $G_{q/11}$  G-белков, запуская таким образом многочисленные сигнальные пути в зависимости от природы и концентраций агониста [90–92].

#### **НЕРВНО-МЫШЕЧНЫЕ ПАТОЛОГИИ, СВЯЗАННЫЕ С НАРУШЕНИЕМ МУСКАРИНОВОЙ РЕГУЛЯЦИИ**

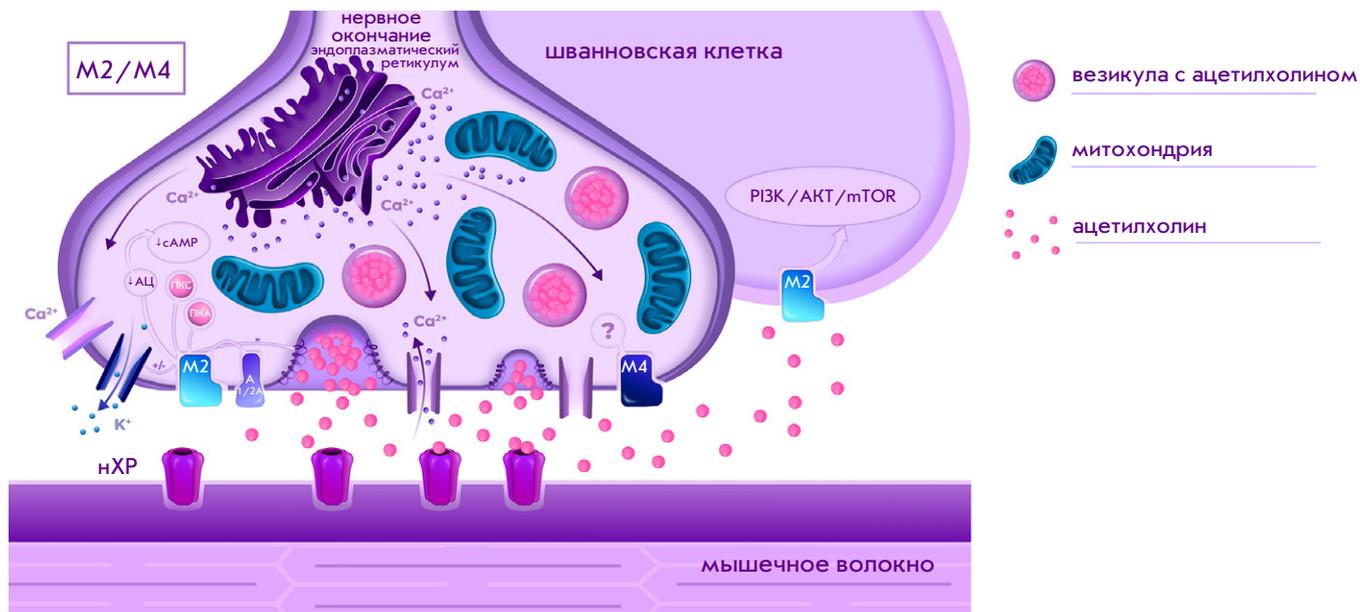
Дисбаланс холинергической системы является основной причиной симптомов многих неврологических заболеваний, включая болезни Альцгеймера, Паркинсона, шизофрению, депрессию и биполярное расстройство [16, 53]. Однако данных о прямой связи каких-либо заболеваний с дефектами мускариновой регуляции скелетных мышц и, в частности, нервно-мышечной передачи на данный момент не так уж и много.

Нарушение мускариновой адаптации может быть одним из патогенетических факторов бокового амиотрофического склероза. Известно, что перисинаптические шванновские клетки участвуют в поддержании стабильности и нормального функционирования моторных синапсов, причем мХР играют важную роль в реализации этих процессов. Одна из функций шванновских клеток состоит в быстром удалении остатков аксонов после повреждений периферических нервных волокон [93]. Повышение фагоцитарной активности шванновских клеток связано с экспрессией галектина-3, а уровень активации мХР является фактором, определяющим переключение шванновской клетки с поддерживающего режима на репарационный [94]. У мышей, моделирующих боковой амиотрофический склероз (линия SOD1), наблюдается повышенная активация мХР в шванновских клетках во время предстартовой стадии заболевания [95] и неспособность активировать галектин-3 при повреждениях нервов [96, 97].

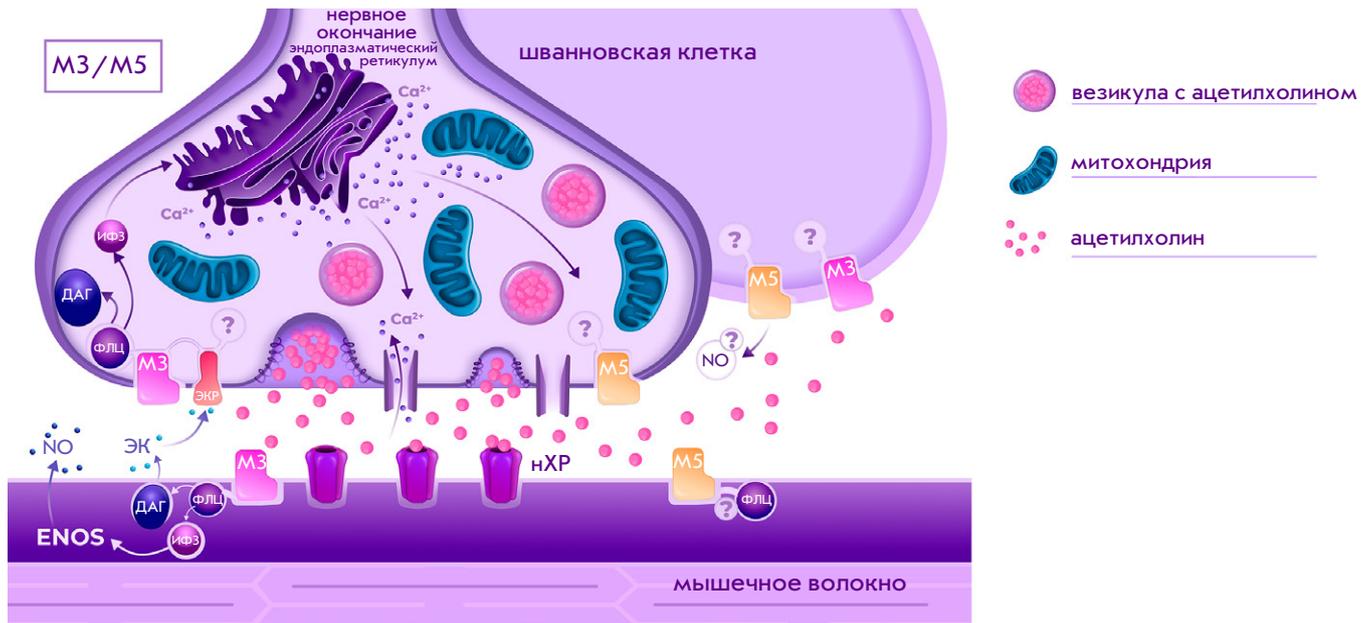
У пациентов с синдромом хронической усталости (миалгическим энцефаломиелитом) и миасте-



**Рис. 1.** Схематическое изображение локализации мускариновых холинорецепторов подтипа М1 и сопряженных с ним сигнальных путей в нервно-мышечном синапсе позвоночных [7, 8, 29, 48, 52, 58]; нХР – никотиновый холинорецептор, ФЛЦ – фосфолипаза С, ДАГ – диацилглицерин, ИФЗ – инозитолтрифосфат, ПКС – протеинкиназа С, ПКА – протеинкиназа А, А1/2А – аденозиновый рецептор



**Рис. 2.** Схематическое изображение локализации мускариновых холинорецепторов (мХР) подтипов М2 и М4 и сопряженных с ними сигнальных путей в нервно-мышечном синапсе позвоночных [7, 29, 50, 58, 65, 66]; нХР – никотиновый холинорецептор, АЦ – аденилатциклаза, сАМР – циклический аденозинмонофосфат, ПКС – протеинкиназа С, ПКА – протеинкиназа А, А1/2А – аденозиновый рецептор, PI3K/AKT/mTOR – сигнальный путь, центральными компонентами которого являются фосфоинозитид-3-киназа (PI3K), киназы АКТ и mTOR



**Рис. 3.** Схематическое изображение локализации мускариновых холинорецепторов (мХР) подтипов М3 и М5 и сопряженных с ними сигнальных путей в нервно-мышечном синапсе позвоночных [6, 7, 12, 29, 63, 64]; нХР – никотиновый холинорецептор, ФЛЦ – фосфолипаза С, ДАГ – диацилглицерин, ИФЗ – инозитолтрифосфат, NO – оксид азота, ENOS – эндотелиальная форма NO-синтазы, ЭК – эндоканнабиноид (предположительно, 2-AG), ЭКР – эндоканнабиноидный рецептор

**Таблица 1.** Локализация и функции мХР в скелетных мышцах позвоночных животных

Подтип	Локализация	Эффекты, связанные с активацией	Предполагаемые сигнальные пути
М1	Нервное окончание [7, 11, 29]; сарколемма [8]; шванновская клетка [29]	Увеличение квантового состава ПКП [10, 11, 29, 31, 63]; регуляция неквантовой секреции АХ и мембранного потенциала мышечного волокна [8, 13, 48]; дифференцировка «сильных» и «слабых» синапсов на ранних стадиях синаптогенеза [51, 52]	Активация фосфолипазы С, увеличение $[Ca^{2+}]_i$ , регулирование активности протеинкиназ А и С [52, 58, 63]
М2	Нервное окончание, шванновская клетка [7, 29, 30, 49, 50]	$Ca^{2+}$ -зависимая регуляция нейросекреции, квантового состава ПКП и временного хода секреции [11, 29, 34, 43, 44, 65, 66]; регуляция процессов пролиферации и дифференциации шванновских клеток [30, 49, 50]; контроль развития двигательных нервных окончаний в процессе онтогенеза [7], дифференцировка «сильных» и «слабых» синапсов на ранних стадиях синаптогенеза [51, 52]	Регулирование уровня сАМР и активности протеинкиназ А и С [52, 58]; тонический блок аппарата экзоцитоза [66]; $Ca^{2+}$ -зависимая регуляция $K^+$ -канала (GIRK) и $Ca^{2+}$ -канала L-типа [65]; PI3K/АКТ/mTOR-сигнальный путь [50]
М3	Нервное окончание [29]; сарколемма [63]; шванновская клетка [29]	$Ca^{2+}$ -зависимая регуляция квантового состава ПКП [6, 11, 63, 64]; контроль развития двигательных нервных окончаний в процессе онтогенеза [7]	Активация фосфолипазы С, увеличение продукции эндоканнабиноидов и оксида азота [6, 63, 64]
М4	Нервное окончание [7, 29]; шванновская клетка [29]	Регуляция квантового состава ПКП [6]; дифференцировка «сильных» и «слабых» синапсов на ранних стадиях синаптогенеза [51, 52]	Нет данных
М5	Сарколемма [7]; нервное окончание? шванновская клетка?	Контроль роста мышц и синаптических контактов в процессе онтогенеза [7], регуляция сократительной способности мышечных волокон [12]; увеличение квантового состава ПКП [12]	Нет данных

ническим синдромом Ламберта–Итона наблюдается выработка аутоантител к некоторым подтипам мХР (М1, М3, М4), что, вероятно, может усугублять выраженность некоторых симптомов этих заболеваний, проявляющихся как нарушения двигательной активности [98, 99].

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В данном обзоре предпринята попытка обобщить известные на сегодняшний день факты и гипотезы о функциях мускариновых рецепторов в скелетных мышцах холонокровных и теплокровных животных. Основные сведения и предположения о локализации, последствиях фармакологических и генетических воздействий и связанных с мХР сигнальных каскадах в НМС и скелетных мышцах позвоночных представлены в *табл. 1* и на *рис. 1–3*.

Сегодня не вызывает сомнений наличие в скелетных мышцах позвоночных всех пяти (М1–М5) известных на данный момент подтипов мХР. Сигнальные пути, связанные с активацией различных подтипов мХР в скелетных мышцах позвоночных, многообразны, а эффекты от активации этих рецепторов отличаются по продолжительности (от нескольких мс до десятков минут) и, по-видимому, предполагают возможность «переключения» с одного сигнального пути на другой в зависимости от факторов внутренней либо внешней природы. Часть этих внутриклеточных механизмов так или иначе связана с изменением уровня внутриклеточного  $Ca^{2+}$  (путем регуляции его высвобождения из внутриклеточных депо либо модификацией работы  $Ca^{2+}$ -каналов) и его влиянием на процесс секреции АХ. Другие возможные сигнальные пути предполагают непосредственное воздействие на аппарат экзоцитоза, например, через регуляцию активности протеинкиназы А, фосфорилирование белка SNAP-25 и т.д.

Функции мХР в скелетной мышце не ограничиваются ауторегуляцией секреции АХ. Рецепторы

М1- и М2-подтипов могут участвовать в регуляции кинетики секреции АХ. мХР нечетных подтипов могут располагаться на сарколемме и регулировать сократительную активность мышечных волокон либо участвовать в поддержании мембранного потенциала покоя.

Интересно отметить, что мХР сами служат мишенью для различных эндогенных факторов, например, свободных радикалов [100, 101], а также являются потенциалчувствительными, причем в диапазоне физиологических изменений потенциала клеток [102–104]. Поэтому можно предположить возможность динамической регуляции свойств этих рецепторов при разных режимах работы синапса, например, снижение вероятности активации в период генерации потенциала действия или при функционировании НМС в высокочастотном режиме.

Лиганды мХР, в том числе и аллостерические модуляторы, активно используются при лечении разного рода патологий, и в настоящее время активно ведется направленный поиск новых, высокоселективных мускариновых агентов в качестве потенциальных терапевтических средств [1, 2, 16]. Присутствие всех известных на данный момент подтипов мХР в скелетных мышцах и многообразие связанных с их активацией сигнальных каскадов следует учитывать при использовании мускариновых агентов в качестве лекарственных препаратов. ●

## Источники финансирования

*Работа выполнена в рамках государственного задания Казанского института биохимии и биофизики – обособленного структурного подразделения Федерального исследовательского центра «Казанский научный центр Российской академии наук».*

*Авторы выражают благодарность А.Р. Юнусовой за техническую помощь при выполнении иллюстраций.*

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Eglen R.M. // *Handb. Exp. Pharmacol.* 2012. № 208. P. 3–28.
- Leach K., Simms J., Sexton P.M., Christopoulos A. // *Handb. Exp. Pharmacol.* 2012. № 208. P. 29–48.
- Matta J.A., Gu S., Davini W.B., Bredt D.S. // *Science.* 2021. V. 373. № 6556. P. eabg6539.
- Hubbard J.I., Wilson D.F. // *Experientia.* 1970. V. 26. № 11. P. 1234–1235.
- Adler M., Albuquerque E.X. // *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 1976. V. 196. № 2. P. 360–372.
- Newman Z., Malik P., Wu T.-Y., Ochoa C., Watsa N., Lindgren C. // *Eur. J. Neurosci.* 2007. V. 25. № 6. P. 1619–1630.
- Wright M.C., Potluri S., Wang X., Dentcheva E., Gautam D., Tessler A., Wess J., Rich M.M., Son Y.-J. // *J. Neurosci.* 2009. V. 29. № 47. P. 14942–14955.
- Malomouzh A.I., Arkhipova S.S., Nikolsky E.E., Vyskočil F. // *Physiol. Res.* 2011. V. 60. № 1. P. 185–188.
- Slutsky I., Rashkovan G., Parnas H., Parnas I. // *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 2002. V. 22. № 9. P. 3426–3433.
- Kovyazina I.V., Tsentssevitsky A.N., Nikolsky E.E. // *Dokl. Biol. Sci.* 2015. V. 460. P. 5–7.
- Tsentssevitsky A.N., Kovyazina I.V., Nurullin L.F., Nikolsky E.E. // *Neurosci. Lett.* 2017. V. 649. P. 62–69.
- Kovyazina I.V., Khamidullina A.A., Fedorov N.S., Malomouzh A.I. // *J. Evol. Biochem. Phys.* 2022. V. 108. № 1. P. 98–108.

13. Urazaev A., Naumenko N., Malomough A., Nikolsky E., Vyskocil F. // *Neurosci. Res.* 2000. V. 37. № 4. P. 255–263.
14. Birdsall N.J., Curtis C.A., Eveleigh P., Hulme E.C., Pedder E.K., Poyner D., Wheatley M. // *Pharmacology.* 1988. V. 37. Suppl 1. P. 22–31.
15. Servent D., Blanchet G., Mourier G., Marquer C., Marcon E., Fruchart-Gaillard C. // *Toxicol. Off. J. Int. Soc. Toxicology.* 2011. V. 58. № 6–7. P. 455–463.
16. van der Westhuizen E.T., Choy K.H.C., Valant C., McKenzie-Nickson S., Bradley S.J., Tobin A.B., Sexton P.M., Christopoulos A. // *Front. Pharmacol.* 2021. V. 11. P. 606656.
17. Bridges T.M., Kennedy J.P., Hopkins C.R., Conn P.J., Lindsley C.W. // *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 2010. V. 20. № 19. P. 5617–5622.
18. Korczynska M., Clark M.J., Valant C., Xu J., Moo E.V., Albold S., Weiss D.R., Torosyan H., Huang W., Kruse A.C., et al. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2018. V. 115. № 10. P. E2419–E2428.
19. Zhu L., Rossi M., Cohen A., Pham J., Zheng H., Dattaroy D., Mukaibo T., Melvin J.E., Langel J.L., Hattar S., et al. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2019. V. 116. № 37. P. 18684–18690.
20. Tseng J., Erbe C.B., Kwitek A.E., Jacob H.J., Popper P., Wackym P.A. // *Hear. Res.* 2002. V. 174. № 1–2. P. 86–92.
21. Wess J. // *Handb. Exp. Pharmacol.* 2012. № 208. P. 95–117.
22. Tanahashi Y., Komori S., Matsuyama H., Kitazawa T., Unno T. // *Int. J. Mol. Sci.* 2021. V. 22. № 2. P. 926.
23. Svoboda J., Popelikova A., Stuchlik A. // *Front. Psychiatry.* 2017. V. 8. P. 215.
24. Grinnell A.D., Gundersen C.B., Meriney S.D., Young S.H. // *J. Physiol.* 1989. V. 419. P. 225–251.
25. Vyskocil F., Malomouzh A.I., Nikolsky E.E. // *Physiol. Res.* 2009. V. 58. № 6. P. 763–784.
26. Loreti S., Vilaró M.T., Visentin S., Rees H., Levey A.I., Tata A.M. // *J. Neurosci. Res.* 2006. V. 84. № 1. P. 97–105.
27. Piovesana R., Faroni A., Tata A.M., Reid A.J. // *Int. J. Mol. Sci.* 2020. V. 21. № 18. P. 6666.
28. Santafé M.M., Salon I., Garcia N., Lanuza M.A., Uchitel O.D., Tomàs J. // *Eur. J. Neurosci.* 2003. V. 17. № 1. P. 119–127.
29. Garcia N., Santafé M.M., Salon I., Lanuza M.A., Tomàs J. // *Histol. Histopathol.* 2005. V. 20. № 3. P. 733–743.
30. Ko C.-P., Robitaille R. // *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* 2015. V. 7. № 10. P. a020503.
31. Re L. // *Acta Physiol. Pharmacol. Ther. Latinoam. Organo Asoc. Latinoam. Cienc. Fisiol. Asoc. Latinoam. Farmacol.* 1999. V. 49. № 4. P. 215–223.
32. Wessler I., Halank M., Rasbach J., Kilbinger H. // *Naunyn-Schmiedeberg Arch. Pharmacol.* 1986. V. 334. № 4. P. 365–372.
33. Vizi E.S., Somogyi G.T. // *Br. J. Pharmacol.* 1989. V. 97. № 1. P. 65–70.
34. Slutsky I., Parnas H., Parnas I. // *J. Physiol.* 1999. V. 514 (Pt 3). P. 769–782.
35. Minic J., Molgó J., Karlsson E., Krejci E. // *Eur. J. Neurosci.* 2002. V. 15. № 3. P. 439–448.
36. Santafé M.M., Lanuza M.A., Garcia N., Tomàs M., Tomàs J. // *Neuroscience.* 2007. V. 148. № 2. P. 432–440.
37. Arenson M.S. // *Naunyn-Schmiedeberg Arch. Pharmacol.* 1991. V. 343. № 2. P. 128–133.
38. Samigullin D.V., Khaziev E.F., Kovyazina I.V., Bukharaeva E.A., Nikolsky E.E. // *Genes Cells.* 2014. V. 9. № 3. P. 242–247.
39. Nikolsky E.E., Vyskocil F., Bukharaeva E.A., Samigullin D., Magazanik L.G. // *J. Physiol.* 2004. V. 560 (Pt 1). P. 77–88.
40. Bukharaeva E.A., Skorinkin A.I., Samigullin D.V., Petrov A.M. // *Biomedicines.* 2022. V. 10. № 8. P. 1771.
41. Katz B., Miledi R. // *J. Physiol.* 1965. V. 181. № 3. P. 656–670.
42. Kovyazina I.V., Tsentsevitsky A.N., Nikolsky E.E., Bukharaeva E.A. // *Eur. J. Neurosci.* 2010. V. 32. № 9. P. 1480–1489.
43. Slutsky I., Silman I., Parnas I., Parnas H. // *J. Physiol.* 2001. V. 536 (Pt 3). P. 717–725.
44. Slutsky I., Wess J., Gomez J., Dudel J., Parnas I., Parnas H. // *J. Neurophysiol.* 2003. V. 89. № 4. P. 1954–1967.
45. Dudel J. // *Eur. J. Neurosci.* 2007. V. 26. № 8. P. 2160–2168.
46. Berizzi A.E., Gentry P.R., Rueda P., Den Hoedt S., Sexton P.M., Langmead C.J., Christopoulos A. // *Mol. Pharmacol.* 2016. V. 90. № 4. P. 427–436.
47. Pemberton K.E., Jones S.V. // *Pflugers Arch.* 1997. V. 433. № 4. P. 505–514.
48. Malomouzh A.I., Mukhtarov M.R., Nikolsky E.E., Vyskocil F. // *J. Neurochem.* 2007. V. 102. № 6. P. 2110–2117.
49. Bélair E.-L., Vallée J., Robitaille R. // *J. Physiol.* 2010. V. 588 (Pt 7). P. 1039–1056.
50. Botticelli E., Salazar Intriago M.S., Piovesana R., Tata A.M. // *Life Basel Switz.* 2022. V. 12. № 2. P. 211.
51. Santafé M.M., Salon I., Garcia N., Lanuza M.A., Uchitel O.D., Tomàs J. // *Neuroscience.* 2004. V. 123. № 1. P. 61–73.
52. Tomàs J., Lanuza M.A., Santafé M.M., Cilleros-Mañé V., Just-Borràs L., Balanyà-Segura M., Polishchuk A., Nadal L., Tomàs M., Garcia N. // *Mol. Neurobiol.* 2023. V. 60. № 3. P. 1580–1593.
53. Dencker D., Thomsen M., Wörtwein G., Weikop P., Cui Y., Jeon J., Wess J., Fink-Jensen A. // *ACS Chem. Neurosci.* 2012. V. 3. № 2. P. 80–89.
54. Machado J.D., Morales A., Gomez J.F., Borges R. // *Mol. Pharmacol.* 2001. V. 60. № 3. P. 514–520.
55. Catterall W.A. // *Curr. Mol. Pharmacol.* 2015. V. 8. № 1. P. 12–21.
56. Gaydukov A., Bogacheva P., Tarasova E., Molchanova A., Miteva A., Pravdivceva E., Balezina O. // *Cells.* 2019. V. 8. № 7. P. 762.
57. Pallien T., Klussmann E. // *Biochem. Soc. Trans.* 2020. V. 48. № 1. P. 39–49.
58. Cilleros-Mañé V., Just-Borràs L., Tomàs M., Garcia N., Tomàs J.M., Lanuza M.A. // *FASEB J.* 2020. V. 34. № 4. P. 4934–4955.
59. Oliveira L., Correia-de-Sá P. // *Neurosignals.* 2005. V. 14. № 5. P. 262–272.
60. Oliveira L., Timóteo M.A., Correia-de-Sá P. // *Eur. J. Neurosci.* 2002. V. 15. № 11. P. 1728–1736.
61. Oliveira L., Timóteo M.A., Correia-de-Sá P. // *Neurosci. Lett.* 2009. V. 459. № 3. P. 127–131.
62. Shakirzyanova A.V., Bukharaeva E.A., Nikolsky E.E., Giniatullin R.A. // *Eur. J. Neurosci.* 2006. V. 24. № 1. P. 105–115.
63. Graves A.R., Lewin K.A., Lindgren C.A. // *J. Physiol.* 2004. V. 559 (Pt 2). P. 423–432.
64. Tsentsevitsky A.N., Zakyrjanova G.F., Petrov A.M., Kovyazina I.V. // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2020. V. 524. № 3. P. 589–594.
65. Tsentsevitsky A.N., Khaziev E.F., Kovyazina I.V., Petrov A.M. // *Neuropharmacology.* 2022. V. 209. P. 109021.
66. Parnas H., Slutsky I., Rashkovan G., Silman I., Wess J., Parnas I. // *J. Neurophysiol.* 2005. V. 93. № 6. P. 3257–3269.
67. Ben Chaim Y., Bochnik S., Parnas I., Parnas H. // *PLoS One.* 2013. V. 8. № 9. P. e74354.
68. Kupchik Y.M., Barchad-Avitur O., Wess J., Ben-Chaim Y., Parnas I., Parnas H. // *J. Cell Biol.* 2011. V. 192. № 1. P. 137–151.
69. Brown D.A. // *J. Mol. Neurosci.* 2010. V. 41. № 3. P. 340–346.

70. Brown D.A. // *Neuropharmacology*. 2018. V. 136 (Pt C). P. 383–400.
71. Petrovic M.M., Nowacki J., Olivo V., Tsaneva-Atanasova K., Randall A.D., Mellor J.R. // *PLoS One*. 2012. V. 7. № 2. P. e30402.
72. Gigout S., Jones G.A., Wierschke S., Davies C.H., Watson J.M., Deisz R.A. // *BMC Neurosci*. 2012. V. 13. P. 42.
73. Fürst O., Mondou B., D'Avanzo N. // *Front. Physiol*. 2014. V. 4. P. 404.
74. Hille B., Dickson E., Kruse M., Falkenburger B. // *Prog. Mol. Biol. Transl. Sci*. 2014. V. 123. P. 219–247.
75. Vaithianathan T., Schneider E.H., Bukiya A.N., Dopico A.M. // *Adv. Exp. Med. Biol*. 2023. V. 1422. P. 217–243.
76. Bista P., Meuth S.G., Kanyshkova T., Cerina M., Pawlowski M., Ehling P., Landgraf P., Borsotto M., Heurteaux C., Pape H.-C., et al. // *Pflugers Arch*. 2012. V. 463. № 1. P. 89–102.
77. Bista P., Pawlowski M., Cerina M., Ehling P., Leist M., Meuth P., Aissaoui A., Borsotto M., Heurteaux C., Decher N., et al. // *J. Physiol*. 2015. V. 593. № 1. P. 127–144.
78. Leist M., Rinné S., Datunashvili M., Aissaoui A., Pape H.-C., Decher N., Meuth S.G., Budde T. // *J. Physiol*. 2017. V. 595. № 17. P. 5875–5893.
79. Iannotti F.A., Panza E., Barrese V., Viggiano D., Soldovieri M.V., Tagliatela M. // *J. Pharmacol. Exp. Ther*. 2010. V. 332. № 3. P. 811–820.
80. Iannotti F.A., Barrese V., Formisano L., Miceli F., Tagliatela M. // *Mol. Biol. Cell*. 2013. V. 24. № 3. P. 274–284.
81. Iannotti F.A., Silvestri C., Mazzarella E., Martella A., Calvigioni D., Piscitelli F., Ambrosino P., Petrosino S., Czifra G., Biró T., et al. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2014. V. 111. № 24. P. E2472–2481.
82. Zagorchev P., Apostolova E., Kokova V., Peychev L. // *Naunyn. Schmiedebergs Arch. Pharmacol*. 2016. V. 389. № 4. P. 439–446.
83. Dupont C., Denman K.S., Hawash A.A., Voss A.A., Rich M.M. // *Exp. Neurol*. 2019. V. 315. P. 52–59.
84. Kuba K., Koketsu K. // *Prog. Neurobiol*. 1978. V. 11. № 2. P. 77–169.
85. McCormick D.A., Prince D.A. // *J. Physiol*. 1986. V. 375. P. 169–194.
86. Egan T.M., North R.A. // *Nature*. 1986. V. 319. № 6052. P. 405–407.
87. Sugawara S., Nakaya Y., Matsumura S., Hirose K., Saito Y., Kaneko R., Kobayashi M. // *Neuroscience*. 2022. V. 506. P. 1–13.
88. Fernández-Fernández J.M., Abogadie F.C., Milligan G., Delmas P., Brown D.A. // *Eur. J. Neurosci*. 2001. V. 14. № 2. P. 283–292.
89. Borroto-Escuela D.O., Romero-Fernandez W., García-Negredo G., Correia P.A., Garriga P., Fuxe K., Ciruela F. // *Cell. Physiol. Biochem. Int. J. Exp. Cell. Physiol. Biochem. Pharmacol*. 2011. V. 28. № 5. P. 1009–1022.
90. Ashkenazi A., Winslow J.W., Peralta E.G., Peterson G.L., Schimerlik M.I., Capon D.J., Ramachandran J. // *Science*. 1987. V. 238. № 4827. P. 672–675.
91. Santiago L., Abrol R. // *Int. J. Mol. Sci*. 2019. V. 20. № 21. P. 5290.
92. Michal P., El-Fakahany E.E., Dolezal V. // *J. Pharmacol. Exp. Ther*. 2007. V. 320. № 2. P. 607–614.
93. Kang H., Tian L., Mikesh M., Lichtman J.W., Thompson W.J. // *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci*. 2014. V. 34. № 18. P. 6323–6333.
94. Perez-Gonzalez A.P., Provost F., Rousse I., Piovesana R., Benzina O., Darabid H., Lamoureux B., Wang Y.S., Arbour D., Robitaille R. // *Glia*. 2022. V. 70. № 9. P. 1605–1629.
95. Arbour D., Tremblay E., Martineau É., Julien J.-P., Robitaille R. // *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci*. 2015. V. 35. № 2. P. 688–706.
96. Martineau É., Di Polo A., Vande Velde C., Robitaille R. // *eLife*. 2018. V. 7. P. e41973.
97. Martineau É., Arbour D., Vallée J., Robitaille R. // *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci*. 2020. V. 40. № 40. P. 7759–7777.
98. Loebel M., Grabowski P., Heidecke H., Bauer S., Hanitsch L.G., Wittke K., Meisel C., Reinke P., Volk H.-D., Fluge Ø, et al. // *Brain. Behav. Immun*. 2016. V. 52. P. 32–39.
99. Suzuki S. // *Brain Nerve Shinkei Kenkyu No Shinpo*. 2010. V. 62. № 4. P. 419–426.
100. Moyano P., de Frias M., Lobo M., Anadon M.J., Sola E., Pelayo A., Díaz M.J., Frejo M.T., Del Pino J. // *Toxicology*. 2018. V. 394. P. 54–62.
101. de Jongh R., Haenen G.R.M.M., van Koeveeringe G.A., Dambros M., De Mey J.G.R., van Kerrebroeck P.E.V. // *Neurorol. Urodyn*. 2007. V. 26. № 2. P. 302–308.
102. Rinne A., Mobarec J.C., Mahaut-Smith M., Kolb P., Bünemann M. // *Sci. Signal*. 2015. V. 8. № 401. P. ra110.
103. Ben-Chaim Y., Broide C., Parnas H. // *PLoS One*. 2019. V. 14. № 10. P. e0224367.
104. David D., Bentulila Z., Tauber M., Ben-Chaim Y. // *Int. J. Mol. Sci*. 2022. V. 23. № 22. P. 13988.

УДК 577.21:576.364:615-085:576.367

# Потенциал и использование индуцированных плюрипотентных стволовых клеток в генной и клеточной терапии ретинопатий и оптических нейропатий

Е. В. Лапшин\*, Ю. Г. Гершович, А. В. Карабельский

Научный центр трансляционной медицины, Научно-технологический университет «Сириус», Краснодарский край, пгт Сириус, 354340 Россия

\*E-mail: lapshin.ev@talantiuspeh.ru

Поступила в редакцию 08.09.2023

Принята к печати 05.10.2023

DOI: 10.32607/actanaturae.25454

**РЕФЕРАТ** В представленном обзоре на примере двух наиболее распространенных типов патологии зрительной системы – наследственной оптической нейропатии и ретинопатии – рассмотрены *in vitro* моделирование этих заболеваний с использованием индуцированных плюрипотентных стволовых клеток (ИПСК), а также подходы к разработке терапевтических стратегий. При нейропатиях наблюдаются дегенерация ганглиозных клеток сетчатки и атрофия зрительного нерва, а при ретинопатиях поражаются фоторецепторы или клетки пигментного эпителия сетчатки. ИПСК человека могут служить моделью для изучения патологических основ этих заболеваний и механизмов восстановления зрительных функций. В последние годы достигнут значительный прогресс в создании ганглиозных и ретинальных органоидов из ИПСК, опубликованы данные о потенциале ИПСК для моделирования оптических нейропатий, таких, как глаукома, нейропатия Лебера и др., в том числе и при разработке терапевтических подходов с использованием инструментов генетического редактирования.

**КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА** индуцированные плюрипотентные стволовые клетки, ретинопатии, оптические нейропатии, ганглиозные клетки сетчатки, органоиды, генная терапия, клеточная терапия.

**СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ** CRISPR – короткие палиндромные повторы, регулярно расположенные группами; ГКС – ганглиозные клетки сетчатки; LHON – наследственная оптическая нейропатия Лебера; DOA – аутосомно-доминантная атрофия зрительного нерва; ПР – пигментный ретинит; ЭСК – эмбриональные стволовые клетки; ИПСК – индуцированные плюрипотентные стволовые клетки; ЭРГ – электроретинограмма; ЭТЦ – электрон-транспортная цепь; АФК – активные формы кислорода; HDR – гомологически направленная репарация; NHEJ – негомологичное соединение концов; OCR – скорость потребления кислорода; LCA – врожденный амавроз Лебера.

## ВВЕДЕНИЕ

В 2007 году показали, что зрелые соматические фибробласты можно перепрограммировать в состояние стволовых клеток за счет сверхэкспрессии четырех плюрипотентных транскрипционных факторов (так называемых факторов Яманака) – OCT3/4, SOX2, C-MYC и KLF4 [1]. Индуцированные плюрипотентные стволовые клетки (ИПСК) имеют морфологию эмбриональных стволовых клеток (ЭСК) человека и экспрессируют их генетические маркеры.

Сверхэкспрессия коктейля транскрипционных факторов позволяет репрограммировать соматические клетки пациента в ИПСК [1–3], которые обладают такими важными характеристиками, как:

- способность дифференцироваться в клетки всех зародышевых листков (эктодерма, мезодерма и энтодерма);
- способность неограниченно размножаться при сохранении нормального кариотипа, что позволяет постоянно получать клеточный материал [4–6].

Развитие методологии работы с ИПСК человека привело к созданию концепции «болезни в чашке» («disease-in-a-dish»). В настоящее время комбинация ИПСК с технологией редактирования генома, анализом регуляции метаболических путей и оценка фенотипа до редактирования и после являются мощным инструментом изучения развития глазных болезней, включая редкие формы наследственных заболеваний

сетчатки глаза, и позволяют разрабатывать способы тестирования эффективности лекарственных препаратов и новых терапевтических подходов.

Генная терапия зачастую является единственным вариантом коррекции наследственных заболеваний. Чаще всего используют заместительную терапию, при которой генетический дефект исправляют путем введения функциональной копии гена в клетки пациента. ИПСК, полученные из первичных клеток пациентов, являются релевантной и удобной моделью как для *in vitro* скрининга и оценки эффективности генотерапевтических препаратов, так и для предсказания потенциальных побочных эффектов терапии и увеличения профиля безопасности продукта.

Для доставки генетического материала используют катионные полимеры, липидные наночастицы и векторные системы на основе различных вирусов. Катионные полимеры способны проникать внутрь клеточного ядра, при этом они могут разрушать клеточные мембраны и оказывать таким образом токсическое действие на клетку [7]. Липидные наночастицы, заключающие ДНК в липосомы, сливаются с клеточной мембраной, высвобождая генетический материал в клетку [8]. К недостаткам доставки с использованием липидных наночастиц ДНК относится низкая эффективность, обусловленная деградацией комплексов липосом с ДНК лизосомами клетки. В качестве векторов чаще всего используют вирусы, обеспечивающие при однократном введении эффективную доставку и экспрессию терапевтического гена, приводящую к длительному ответу на терапию пациентов с тяжелыми генетическими заболеваниями. Разнообразие вирусных векторов дает возможность варьировать специфичность доставки к клеткам [9]. Однако при выборе вирусного вектора следует обязательно учитывать его потенциальную иммуногенность, а также риски инсерционного мутагенеза при использовании интегративных вирусов.

Достижения в области редактирования генома и получения ИПСК открыли новую ветвь генной терапии в сочетании с клеточной терапией. Методика редактирования патогенных генотипов пациента *in vitro* и введения скорректированных ИПСК для коррекции фенотипа лишены минусов классической генной терапии, поскольку обеспечивают иммуносовместимость с реципиентом и позволяют контролировать качество ИПСК до трансплантации [10].

Следует отметить, что основным трендом в использовании ИПСК в генной терапии является разработка способов редактирования с помощью системы CRISPR/Cas9 и ее аналогов, тогда как работы по заместительной генной терапии практически

полностью отсутствуют. Далее будут представлены данные об использовании ИПСК в качестве моделей в основном для оценки эффективности редактирования аутосомно-доминантных мутаций.

В обзоре рассмотрены *in vitro* моделирование двух наиболее распространенных типов патологий зрительной системы – наследственных нейропатий и ретинопатий, и разработка терапевтических стратегий с использованием ИПСК. Обсуждаются также трансляционные достижения клеточной и генной терапии.

## ГЕННАЯ И КЛЕТочНАЯ ТЕРАПИЯ НЕЙРОПАТИЙ С ПРИМЕНЕНИЕМ ИПСК

Оптические нейропатии, обусловленные гибелью ганглиозных клеток сетчатки и дегенерацией аксонов зрительного нерва, являются основной причиной потери зрения и слепоты во всем мире [11, 12]. Ганглиозные клетки сетчатки (ГКС) – это специализированные нейроны, аксоны которых образуют зрительный нерв, проводящий информацию от глаза к мозгу [13]. Глаукома – прогрессирующая оптическая нейропатия, характеризующаяся структурными изменениями диска (головки) зрительного нерва и необратимой потерей зрения, – наиболее распространенная патология, диагностированная более чем у 60 млн человек [14–19]. Другие оптические нейропатии, такие, как наследственная нейропатия Лебера (LHON) и аутосомно-доминантная атрофия зрительного нерва (DOA), проявляются в более раннем возрасте и вызываются мутациями в митохондриальных генах.

### Генная терапия нейропатий

LHON – характеризуется потерей центрального зрения и встречается преимущественно у мужчин. Большая часть мутаций при этом заболевании найдена в митохондриальных генах, кодирующих белки первого комплекса электрон-транспортной цепи (ЭТЦ), *MT-ND4* (m.11778G>A), *MT-ND1* (m.3460G>A), *MT-ND6* (m.14484T>C). Патогенез LHON связан со сниженной генерацией АТФ и накоплением активных форм кислорода (АФК), что приводит к гибели ГКС, атрофии зрительного нерва и, соответственно, к потере центрального зрения сначала в одном глазу, а далее во втором.

Исследователями из Австралии были получены ИПСК от пациента с гомоплазматическими двойными мутациями мтДНК (m.4160T>C и m.14484T>C), приходящиеся на гены *MT-ND1* и *MT-ND6* соответственно. Такой генотип приводит к так называемой «LHON plus», при которой дополнительно развиваются неврологические симптомы, отличные от оптической нейропатии, например, двигательные

расстройства. С помощью гибридной технологии митохондрии в этих ИПСК заменили на митохондрии без мутаций. Уровни апоптоза и АФК в ГКС, полученных из отредактированных ИПСК, были ниже, чем в контрольных ГКС, содержащих мутации [20].

DOA – заболевание, вызываемое митохондриальной дисфункцией, проявляется снижением остроты зрения в раннем возрасте и далее слепотой. При DOA наблюдается повреждение ГКС и их аксонов, образующих зрительный нерв. В основном мутации, приводящие к DOA, локализованы в гене *OPA1*, кодирующем белок внутренней мембраны митохондрий, дисфункция которого влияет на слияние митохондрий, продукцию АТФ, сигналинг апоптотических факторов, метаболизм кальция и поддержание целостности митохондриального генома [21].

В ИПСК, полученных от пациента с мутацией 1334G>A (R445H) в *OPA1*, проведена коррекция мутации с помощью комбинации технологии CRISPR/Cas9 и механизма гомологичной рекомбинации (HDR), где в качестве матрицы использовали ssDNA. Скорость потребления кислорода (OCR) в отредактированных ИПСК была выше, чем в клетках с мутациями, которые характеризовались снижением митохондриальной фрагментации, а также более низкой продукцией апоптотических сигналов [21].

### Клеточная терапия нейропатий

Заместительная клеточная терапия с использованием ИПСК является привлекательным подходом к лечению нейропатий и ретинопатий, особенно на более поздних стадиях патологического процесса, когда произошла значительная потеря клеток. Также считается, что в некоторых случаях трофические факторы, высвобождаемые стволовыми клетками, могут способствовать процессу регенерации при трансплантации. На животных моделях оптической нейропатии была доказана эффективность клеточной терапии на основе ИПСК [22, 23]. Ганглиозные клетки, происходящие из ИПСК, могут интегрироваться и выживать после трансплантации в сетчатку мышей, служащих моделью заболевания [22]. Более того, трансплантация клеток-предшественников, полученных из ИПСК, способствовала заживлению повреждения зрительного нерва у крыс со значительным восстановлением вызванных потенциалов [23].

Следует отметить, что клеточная терапия нейропатий зрительного нерва может использоваться для получения клеток, отличных от ганглиозных. Так, Abu-Hassan D.W. и соавт. показали, что трансплантация клеток трабекулярной сети, полученных из ИПСК, может восстанавливать гомеостатическую

функцию в *ex vivo* перфузированной модели органной культуры переднего сегмента глаза человека [24], открывая тем самым новый интересный подход к лечению глаукомы.

В настоящее время отсутствуют сообщения о проведении клинических испытаний клеточной терапии при нейропатии зрительного нерва, однако проводятся клинические испытания по замещению клеток пигментного эпителия сетчатки, полученных из ИПСК [25, 26]. Недавно компания Advanced Cell Technology, специализирующаяся на стволовых клетках, сообщила об успешном завершении фазы I/IIa клинических испытаний суспензии клеток пигментного эпителия сетчатки, полученных из ЭСК, трансплантированных при связанной с возрастом макулярной дегенерации и болезни Штаргардта [25, 26]. Сообщалось об улучшении зрения без серьезных побочных эффектов или иммунных реакций после трансплантации низкой дозы дифференцированных из ЭСК клеток в один глаз у 18 пациентов. Не получено данных об отторжении трансплантированных клеток, неконтролируемой пролиферации или серьезных глазных или системных проблемах. Отмечено улучшение зрительных функций у большей части пациентов, а испытания достигли целевых конечных точек по безопасности. Кроме того, команда под руководством профессора Масайо Такахаша из Японии готовится к проведению клинических испытаний с использованием ретинального эпителия, полученного из ИПСК, для лечения связанной с возрастом макулярной дегенерации [26]. Эти клинические испытания подтвердят концептуальную возможность использования плюрипотентных стволовых клеток для восстановления функциональности пораженных тканей, предоставив новый альтернативный вариант эффективного и безопасного лечения слепоты, вызванной различными патологическими процессами.

### ГЕННАЯ И КЛЕТочНАЯ ТЕРАПИЯ РЕТИНОПАТИЙ С ПРИМЕНЕНИЕМ ИПСК

Наследственной ретинопатией считается любое генетическое заболевание, приводящее к поражению сетчатки глаза и, как следствие, к ухудшению зрения. Распространенность этой группы заболеваний составляет около 3 человек из 100. Наиболее частыми симптомами ретинопатий являются изменение полей зрения, неспособность адаптироваться к плохому освещению, искажение форм, размеров объектов и изменение цветовосприятия. Данные о молекулярных процессах заболеваний получены в основном на моделях фибробластов, так как получить образцы сетчатки не представляется возможным. Использование с этой целью ИПСК может

позволить получить более релевантную модель заболевания.

По своему типу различают ретинопатии макулярные и периферические. При макулярных ретинопатиях (например, болезнь Штаргардта и Беста) поражается центральная часть сетчатки – макула. При периферических ретинопатиях нарушается периферическое зрение. К наиболее распространенным заболеваниям этой группы относятся пигментный ретинит и хороидеремия [27].

Самыми тяжелыми и ранними формами наследственных заболеваний сетчатки считаются различные типы врожденного амавроза Лебера (LCA), приводящего к потере зрения при рождении или вскоре после него. При этом заболевании возможно также развитие повышенной светочувствительности, непроизвольное движение глаз (нистагм) и дальность зрения. В редких случаях наблюдается задержка умственного развития.

### Применение генотерапевтических подходов к лечению наследственных ретинопатий

Существует не менее 20 типов LCA, обусловленных разными мутациями в разных генах, а также фенотипическими проявлениями. К наиболее распространенным патологическим мутациям при LCA относятся мутации в генах *CEP290*, *CRB1*, *GUCY2D*, *RPE65*. При этом примерно в 30% случаев молекулярно-генетические причины LCA не найдены [28]. Так белок, кодируемый геном *CEP290*, участвует в клеточном делении, сборке микротрубочек, формировании centrosом и ресничек. Мутации в этом гене приводят к наиболее тяжелой форме LCA – LCA типа 10 [29]. До 15% всех мутаций *CEP290* представлены мутацией IVS26 – 2991+1655 A>G в интроне 26, приводящей к включению экзона со стоп-кодоном (C998X). Получаемый в случае этой мутации укороченный пептид обеспечивает лишь частичную активность CEP290. Модель ИПСК, полученная от пациента с таким генотипом, была отредактирована с помощью CRISPR/Cas9. По сравнению с мутациями в кодирующей части гена, где требуется использование матрицы для рекомбинации, мутации сайта сплайсинга можно скорректировать специфической делецией. Так, редактирование ИПСК с удалением сайта сплайсинга в области IVS26 привело к повышенной продукции функционального CEP290 [29].

Генная терапия с использованием некодирующей РНК, нацеленной на IVS26, оказалась эффективной в модели 3D-органоида сетчатки, полученной из ИПСК пациента. Полностью фосфорилированный и 2'-О-метил-модифицированный РНК-олигонуклеотид (QR-110) корректировал де-

фект сплайсинга CEP290 и восстанавливал дикий тип мРНК. Показано дозозависимое восстановление ресничек фоторецепторов [30].

LCA типа 4, обусловленный мутациями в гене *AIPL1*, характеризуется тяжелым нарушением зрения в младенчестве и прогрессирующей атрофией фоторецепторных клеток. С помощью CRISPR/Cas9 и HDR с эффективностью 30% был отредактирован органоид сетчатки, полученный от ИПСК пациента с мутацией 834 G>A (Trp278X) гена *AIPL1*. Показано восстановление экспрессии *AIPL1*, повышение количества cGMP и PDE6 в клетках после редактирования [31].

LCA типа 7, составляющий около 2% всех LCA, характеризуется ранней дисфункцией фоторецепторов, вызванной мутациями в гене *CRX* (кодирует гомеобоксо-содержащий белок колбочек-палочек). Опосредованное NHEJ (негомологичное соединение концов) CRISPR/Cas9-редактирование мутации 263A>C (K88Q) в гене *CRX* в модели органоидов сетчатки способствовало развитию и созреванию фоторецепторных клеток. Интересно, что стратегия редактирования предполагала внесение двух двухцепочечных разрывов. Один был нацелен на мутацию, а другой – на аллель-специфические SNP между экзонами 2 и 4 гена *CRX* [32].

Пигментный ретинит (ПР) – затрагивающее сетчатку глаза наследственное заболевание с прогрессирующей потерей фоторецепторных клеток. Пациенты ощущают проблемы с ночным и периферическим зрением, хотя полная слепота достаточно редка. Манифестация начинается, как правило, в детском возрасте. Одной из возможных причин ПР является мутация в гене родопсина (*RHO*) [33]. Родопсин – зрительный пигмент, содержащийся в палочках сетчатки, является трансмембранным рецептором, связанным с G-белками, конформация которого изменяется при поглощении квантов света. Родопсин активирует G-белок трансдуцин, активирующий cGMP-зависимую фосфодиэстеразу, что в дальнейшем приводит к изменению проницаемости cGMP-зависимых ионных каналов, гиперполяризации мембраны и возникновению нервного импульса [34]. Используя зависимый от вируса-помощника аденовирусный вектор (HAdV), осуществляли редактирование мутации в ИПСК пациента с мутацией, ведущей к замене E181K в молекуле родопсина. Дифференцированные в фоторецепторные клетки ИПСК после редактирования характеризовались сниженным уровнем аутофагии за счет подавления апоптоза, вызванного стрессом ЭПР. Перенос генов HAdV осуществляли путем гомологичной рекомбинации без внесения разрывов в ДНК [34].

Удалось также отредактировать с помощью CRISPR/Cas9 мутацию 68C>A (P23H) в этом же гене на модели ИПСК. В клетках дикого типа (контрольных) не наблюдали неспецифического редактирования, в то время как в мутантных клетках в результате редактирования происходили сдвиг рамки считывания и терминация (трансляции), что приводило к инактивации мутантного аллеля [29].

Пигментный ретинит, сцепленный с X-хромосомой, встречается у мужчин с частотой 1 на 15 000 человек и проявляется потерей ночного зрения, а затем периферического зрения и полной слепотой к 40 годам. Мутации в этом случае локализуются в гене *RPGR*, кодирующем регулятор GTP-азы пигментного ретинита, влияющим на развитие фоторецепторных клеток, так как является компонентом взаимодействия centrosомы и ресничек. Около 16% случаев ПР связаны с мутациями в *RPGR*. С помощью CRISPR/Cas9 и HDR проведено редактирование ИПСК пациента с мутацией 3070 G>T в гене *RPGR*, где одноцепочечная матрица не имела мутации. Несмотря на то, что этот ген является GC-богатым и содержит нуклеотидные повторы, эффективность редактирования составила 13% [35]. Известны случаи делеции в экзоне 14 гена *RPGR*, приводящие к сдвигу рамки считывания и потере последовательностей, кодируемых экзонами 15–19. Такие мутации приводят к нарушению цилиогенеза, поэтому реснички фоторецепторных клеток у пациентов с таким дефектом укорочены. ИПСК, полученные от пациентов с вариантами мутаций *RPGR* (1685\_1686delAT, 2234\_2235delGA и 2403\_2404delAG), были отредактированы с помощью CRISPR/Cas9 с использованием HDR. Полученные 3D-органоиды сетчатки имели нормальную морфологию, экспрессировали рековерин, содержали большее количество палочек и колбочек по сравнению с контролем [36].

Другим X-сцепленным заболеванием является X-сцепленный ювенильный ретиношизис, который характеризуется дегенеративной нейропатией и отслоением сетчатки. Ювенильный ретиношизис развивается преимущественно у мужчин, а его частота составляет примерно 1:10000. Это заболевание обусловлено мутациями в гене *RS1*, вовлеченном в клеточную организацию сетчатки и межклеточную адгезию. Получены модели ИПСК от пациентов с мутациями 625C>T (R209C) и 488G>A (W163X). Отредактированные с помощью CRISPR/Cas9 и HDR ИПСК показали 50% эффективность редактирования, но также и наличие инсерций. Эффективность опосредованного Cas9-ABE7.10 редактирования оснований в случае

625C>T оказалась сравнимой с подходом, использующим принцип HDR [37].

Мутации в генах *PRPF*, приводящие к ПР типа 13, являются аутосомно-доминантными и объединяют около 15% случаев пигментного ретинита. Белок, кодируемый *PRPF8*, играет важную роль в сплайсинге пре-мРНК, он является основным компонентом сплайсосомы типа U2 и U12 и отвечает за размещение сплайсосомы на пре-мРНК. С помощью CRISPR/Cas9-Gem (эндонуклеаза Cas9 и белок геминин) проведено редактирование ИПСК с мутацией 6901 C>T (P2301S) в гене *PRPF8* за счет HDR. В отредактированных ИПСК, дифференцированных в эпителиальные клетки сетчатки, восстановились морфология и апикально-базальная полярность, способность фагоцитировать внешние сегменты фоторецепторов. Cas9-Gem использовали для деградации системы в фазе G0/G1 для снижения вероятности инсерций, вызванных NHEJ [38].

С помощью системы CRISPR/Cas9 и HDR проведено редактирование ИПСК пациента с мутацией 1115\_1125del11 в гене *PRPF31*, кодирующем компонент сплайсосомного комплекса пре-мРНК (11-й тип пигментного ретинита). Такое редактирование привело к восстановлению молекулярных и клеточных фенотипов индуцированных органоидов сетчатки [39].

Ген *MERTK*, мутации в котором приводят к аутосомно-рецессивному пигментному ретиниту, кодирует рецепторную тирозинкиназу, передающую сигналы из внеклеточного матрикса в цитоплазму. Этот фермент участвует в процессах дифференцировки, выживания клеток и фагоцитозе апоптотических клеток. Мутация 992\_993delCA в гене *MERTK* была скорректирована в ИПСК, полученных от пациента, системой CRISPR/Cas9 и HDR. Дифференцированные в пигментные клетки сетчатки отредактированные ИПСК восстановили экспрессию *MERTK* и функции фагоцитов по сравнению с мутантными вариантами [40, 41].

Основной причиной рецессивного пигментного ретинита у этнических евреев является инсерция Alu длиной 354 п.н. в гене *MAK*, кодирующем серин/треониновую протеинкиназу, участвующую в регуляции клеточного цикла и важную для регуляции длины ресничек и выживания фоторецепторных клеток. Опосредованное CRISPR/Cas9 редактирование с HDR ИПСК с инсерцией Alu привело к восстановлению транскрипта *MAK* [29].

Синдром усиленного ответа S-колбочек опосредован мутацией гена *NR2E3*, кодирующего транскрипционный фактор, активатор развития палочек и репрессор развития колбочек. Для этого синдрома характерна атрофия сетчатки с последующей поте-

рей зрения. S-колбочки – один из трех типов колбочек сетчатки, наименее распространенный в нормальной сетчатке человека. Мутации в гене *NR2E3* приводят к дефектам дифференцировки с образованием большого количества S-колбочек и отсутствию палочек. Нокаут мутантного аллеля в ИПСК пациента с мутацией 166G>A (G56R) в гене *NR2E3*, проведенный с помощью CRISPR/Cas9 и NHEJ, привел к нормальному функционированию и развитию фоторецепторов палочек в дифференцированных органоидах сетчатки [42].

Синдром Ашера – заболевание, на поздних стадиях которого наблюдается потеря зрения (в результате пигментного ретинита), а ранее – потеря слуха, возможны также нарушения вестибулярного аппарата. Одной из причин заболевания является мутация гена *MYO7A*, который кодирует миозин – моторный белок сетчатки, участвующий в обновлении наружных дисков фоторецепторов, способствующий распределению и миграции меланосом и фагосом пигментного эпителия сетчатки, а также связанный с регуляцией транспорта опсина в фоторецепторах сетчатки. Полученные от пациента с мутациями *MYO7A* (с.1184 G>A и с.4118C>T) ИПСК были отредактированы с помощью CRISPR/Cas9 и HDR. После чего наблюдали морфологическое (в виде слипания стереоцилии) и функциональное (в виде восстановления мембранного потенциала) восстановление дифференцированных отредактированных волосковых клеток [43]. Также синдром Ашера ассоциирован с мутациями в гене *USH2A*, кодирующим белок ушерин, который участвует в процессах звуко- и световосприятия в комплексе USH2. В фоторецепторах сетчатки комплекс USH2 поддерживает комплекс перилимбальной мембраны, который играет роль в регуляции внутриклеточного транспорта белков. В ИПСК пациентов использовали CRISPR-eSpCas9 и HDR для исправления мутаций 2276G>T (C759F) и 2299delG (E767Serfs\*21), расположенных на расстоянии 22 п.н. друг от друга в экзоне 13 гена *USH2A*. Достигнута 15% эффективность редактирования и восстановление экспрессии *USH2A*, кроме того, ИПСК сохранили геномную стабильность и плюрипотентность [44, 45].

### Клеточная терапия ретинопатий

На животных моделях ретинопатий доказана эффективность клеточной терапии на основе ИПСК. Так, сетчатку, полученную из ИПСК человека, трансплантировали в субретинальное пространство обезьян с лазер-индуцированным повреждением сетчатки и иммунодефицитным крысам с пигментным ретинитом. Трансплантированные клетки интегрировались в сетчатку крысы и образовыва-

ли синаптические связи с биполярными клетками хозяина. В модели обезьян трансплантированные клетки интегрировались в сетчатку хозяина; зафиксировано и улучшение электроретинограммы (ЭРГ) [46]. Аналогично, в модели пигментного ретинита у мышей субретинальная трансплантация ретинальных сфероидов, полученных из ИПСК, задерживала истончение сетчатки, увеличивала уровень фактора, производного пигментного эпителия (PEDF), уменьшала количество апоптотических клеток, а также уменьшала инфильтрацию микроглии в сетчатку [47]. У крыс с наследственной мутацией гена протоонкогенной тирозинкиназы *MER* (*MERTK*) как модели дегенерации сетчатки субретинальная трансплантация клеток РПЭ, полученных из ИПСК, значительно восстанавливала зрительную функцию, измеренную порогами оптокинетического отслеживания. Ни у одного животного не было выявлено аномальной пролиферации или образования тератом [48]. Интересно, что совместная трансплантация различных типов ретинальных клеток, полученных из ИПСК, показывала лучшие результаты по сравнению с трансплантацией отдельных типов клеток, это приводило к лучшему зрительному ответу и сохранению внешнего нуклеарного слоя в модели дегенерации сетчатки у крыс [49]. В животной модели пигментного ретинита субретинально трансплантированные предшественники фоторецепторов, экспрессирующие *CRX*, происходящие из ИПСК, встраивались во внутренний ядерный слой клеток. Пересаженные клетки экспрессировали маркер аррестин 3, что указывало на их дальнейшее созревание [50].

В доклиническом исследовании на крысах и свиньях ИПСК, полученные из клеток CD34+ пациентов с макулярной дистрофией сетчатки, при дифференцировке в клетки ретины интегрировались и восстанавливали сетчатку. В этом исследовании обнаружено, что для достижения терапевтического эффекта при пересадке монослоя требовалось в 10 раз меньше клеток, чем при использовании суспензии клеток. При этом клетки ретины, трансплантированные в виде суспензии, не смогли интегрироваться в слой ретинальных клеток крысы, каркас на основе поли(молочно-когличевой кислоты) (PLGA) способствовал интеграции трансплантированного слоя клеток в мембрану Бруха крысы [51].

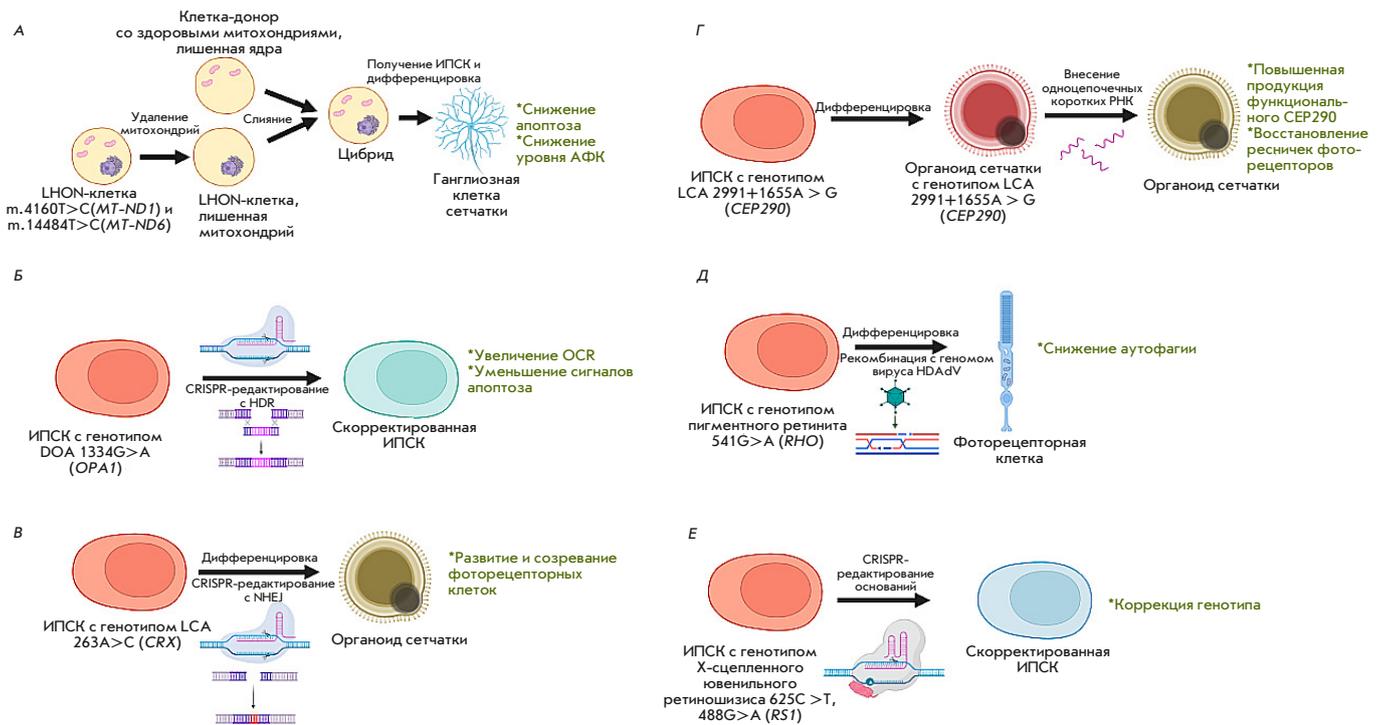
### ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Хотя использование ИПСК в исследованиях оптических нейропатий и ретинопатий является относительно новым подходом, нет сомнений в том, что эта технология обладает высоким потенциалом как с точки зрения изучения патогенеза заболева-

**Таблица 1.** Изучение потенциала генотерапевтических подходов и генетического редактирования наследственных ретинопатий и оптических нейропатий на моделях ИПСК

Заболевание	Мутация	Тип наследования	Подход к лечению	Основные эффекты/результат
LHON* <sup>1</sup>	m.4160T>C( <i>MT-ND1</i> ) и m.14484T>C( <i>MT-ND6</i> )	Материнское, митохондриальное	Замена митохондрий, создание цибридов	Снижение апоптотических эффектов и уровня АФК* <sup>2</sup> в дифференцированных ГКС* <sup>3</sup> [20]
DOA* <sup>4</sup>	1334G>A ( <i>OPA1</i> )	Аутосомно-доминантный	CRISPR-редактирование с HDR* <sup>5</sup>	Увеличение OCR* <sup>6</sup> в отредактированных ИПСК* <sup>7</sup> и уменьшение сигналов апоптоза [21]
LCA* <sup>8</sup>	2991+1655A > G ( <i>CEP290</i> )	Аутосомно-рецессивный	CRISPR-редактирование с NHEJ* <sup>9</sup> , РНК-интерференция	Повышенная продукция функционального CEP290. Восстановление ресничек фоторецепторов [29, 30]
	834G>A ( <i>AIPL1</i> )	Аутосомно-рецессивный	CRISPR-редактирование с HDR	Восстановление экспрессии <i>AIPL1</i> , повышение количества cGMP* <sup>10</sup> и PDE6 в клетках органоида сетчатки [31]
	263A>C ( <i>CRX</i> )	Аутосомно-рецессивный	CRISPR-редактирование с NHEJ	В модели органоидов сетчатки, полученных от ИПСК пациентов, способствовало развитию и созреванию фоторецепторных клеток [32]
Пигментный ретинит	541 G>A ( <i>RHO</i> )	Аутосомно-доминантный	Рекомбинация с геномом HDAdV	Дифференцированные в фоторецепторные клетки ИПСК после редактирования проявили сниженную аутофагию [34]
	68C>A ( <i>RHO</i> )	Аутосомно-доминантный	CRISPR-редактирование с NHEJ	Инактивация мутантного аллеля [29]
	3070G>T ( <i>RPGR</i> )	X-сцепленный	CRISPR-редактирование с HDR	Восстановление нуклеотидной последовательности [35]
	1685_1686delAT, 2234_2235delGA и 2403_2404delAG ( <i>RPGR</i> )	X-сцепленный	CRISPR-редактирование с HDR	Органоиды сетчатки демонстрировали нормальную морфологию [36]
	6901C>T ( <i>PRFP8</i> )	Аутосомно-доминантный	CRISPR-редактирование с HDR	Морфология, способность фагоцитировать были восстановлены в дифференцированных, отредактированных ИПСК в эпителиальные клетки сетчатки [38]
	1115_1125del11 ( <i>PRPF31</i> )	Аутосомно-доминантный	CRISPR-редактирование с HDR	Восстановление молекулярных и клеточных фенотипов в индуцированных органоидах сетчатки [39]
	992_993delCA ( <i>MERTK</i> )	Аутосомно-рецессивный	CRISPR-редактирование с HDR	Восстановление экспрессии <i>MERTK</i> и функции фагоцитов [40, 41]
	Инсерция Alu длиной 354 п.н. ( <i>MAK</i> )	Аутосомно-рецессивный	CRISPR-редактирование с HDR	Восстановление транскрипта <i>MAK</i> [29]
X-сцепленный ювенильный ретиношизис	625C >T, 488G>A ( <i>RS1</i> )	X-сцепленный	CRISPR-редактирование оснований при помощи ABE7.10	Восстановление нуклеотидной последовательности [37]
Синдром усиленного ответа S-колбочек	166G>A ( <i>NR2E3</i> )	Аутосомно-рецессивный	CRISPR-редактирование с NHEJ	Нормальное функционирование и развитие фоторецепторов палочек в дифференцированных органоидах сетчатки [42]
Синдром Ашера	c.1184G>A и c.4118C>T ( <i>MYO7A</i> )	Аутосомно-рецессивный	CRISPR-редактирование с HDR	Морфологическое (в виде слияния стереоцилии) и функциональное восстановление (в виде восстановления мембранного потенциала) [43]
	2276G>T ( <i>USH2A</i> )	Аутосомно-рецессивный	CRISPR-редактирование с HDR	Восстановление нуклеотидной последовательности [44, 45]

\*<sup>1</sup> – наследственная оптическая нейропатия Лебера; \*<sup>2</sup> – активные формы кислорода; \*<sup>3</sup> – ганглиозные клетки сетчатки; \*<sup>4</sup> – аутосомно-доминантная атрофия зрительного нерва; \*<sup>5</sup> – гомологически направленная репарация; \*<sup>6</sup> – скорость потребления кислорода; \*<sup>7</sup> – индуцированные плюрипотентные стволовые клетки; \*<sup>8</sup> – врожденный амавроз Лебера; \*<sup>9</sup> – негомологичное соединение концов; \*<sup>10</sup> – циклический гуанозинмонофосфат.



**Рис. 1.** Подходы к генной терапии наследственных ретинопатий/нейропатий на моделях ИПСК. А – замена митохондрий, создание цибридов на модели LHON. Б – CRISPR-редактирование с HDR на модели DOA. В – CRISPR-редактирование NHEJ на модели LCA. Г – РНК-интерференция на модели LCA. Д – рекомбинация с геномом вируса HDAdV на модели пигментного ретинита. Е – CRISPR-редактирование оснований при помощи ABE7.10 на модели X-сцепленного ювенильного ретиношиза

ний, так и с точки зрения апробации и оптимизации методов генной терапии и генетического редактирования (рис. 1, табл. 1). Моделирование заболеваний с использованием ИПСК позволяет изучать основные механизмы, ведущие к потере ганглиозных или ретинальных клеток, а заместительная клеточная терапия с использованием ИПСК, полученных из собственных соматических клеток пациента, имеет минимальный риск иммунного отторжения после трансплантации и уже демонстрирует высокую эффективность на различных моделях. Генная терапия в сочетании с заместительной клеточной терапией может быть использована для коррекции генетических дефектов в клетках, полученных из ИПСК, перед трансплантацией.

ИПСК обладают огромным трансляционным потенциалом в широком спектре терапевтических областей, а отработка и совершенствование протоколов для повышения эффективности и чистоты полученных из ИПСК ганглиозных и ретинальных клеток будут иметь решающее значение для создания стандартизированной методологии использования ИПСК в моделировании заболеваний, скрининге лекарств, токсикологических исследованиях, клеточной и генной терапии, регенеративной медицине. ●

*Финансирование проекта осуществлялось Министерством науки и высшего образования Российской Федерации (Соглашение № 075-10-2021-093; Проект GTH-RND-2112).*

**СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ**

1. Takahashi K., Tanabe K., Ohnuki M., Narita M., Ichisaka T., Tomoda K., Yamanaka S. // Cell. 2007. V. 131. № 5. P. 861–872.
2. Piao Y., Hung S.S., Lim S.Y., Wong R.C., Ko M.S. // Stem Cells Transl. Med. 2014. V. 3. № 7. P. 787–791.
3. Hung S.S., Pebay A., Wong R.C. // J. Vis. Exp. 2015. V. 102. P. e53174.
4. Evans M.J., Kaufman M.H. // Nature. 1981. V. 292. № 5819. P. 154–156.
5. Martin G.R. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1981. V. 78. № 12. P. 7634–7638.
6. Thomson J.A., Itskovitz-Eldor J., Shapiro S.S., Waknitz M.A., Swiergiel J.J., Marshall V.S., Jones J.M. // Science. 1998. V. 282. № 5391. P. 1145–1147.
7. Giacca M., Zacchigna S. // J. Control. Release. 2012. V. 161. № 2. P. 377–388.
8. Junquera E., Aicart E. // Curr. Top. Med. Chem. 2014. V. 14. № 5. P. 649–663.

9. Eggermann K., Gess B., Häusler M., Weis J., Hahn A., Kurth I. // *Dtsch. Arztebl. Int.* 2018. V. 115. № 6. P. 91–97.
10. Paolini Sguazzi G., Muto V., Tartaglia M., Bertini E., Compagnucci C. // *Int. J. Mol. Sci.* 2021. V. 22. № 24. P. 13674.
11. Ghaffarieh A., Levin L.A. // *Int. Rev. Neurobiol.* 2012. V. 105. P. 1–17.
12. Moore D.L., Goldberg J.L. // *J. Neuroophthalmol.* 2010. V. 30. № 4. P. 347–360.
13. Yu D.Y., Cringle S.J., Balaratnasingam C., Morgan W.H., Yu P.K., Su E.N. // *Progr. Retinal Eye Res.* 2013. V. 36. P. 217–246.
14. Cook C., Foster P. // *Can. J. Ophthalmol.* 2012. V. 47. № 3. P. 223–226.
15. Quigley H.A., Broman A.T. // *Br. J. Ophthalmol.* 2006. V. 90. № 3. P. 262–267.
16. Tham Y.C., Li X., Wong T.Y., Quigley H.A., Aung T., Cheng C.Y. // *Ophthalmology.* 2014. V. 121. № 11. P. 2081–2090.
17. Garcia-Valenzuela E., Gorczyca W., Darzynkiewicz Z., Sharma S.C. // *J. Neurobiol.* 1994. V. 25. № 4. P. 431–438.
18. Kerrigan L.A., Zack D.J., Quigley H.A., Smith S.D., Pease M.E. // *Arch. Ophthalmol.* 1997. V. 115. № 8. P. 1031–1035.
19. Quigley H.A., Addicks E.M., Green W.R., Maumenee A.E. // *Arch. Ophthalmol.* 1981. V. 99. № 4. P. 635–649.
20. Wong R.C.B., Lim S.Y., Hung S.S.C., Jackson S., Khan S., van Bergen N.J., De Smit E., Liang H.H., Kearns L.S., Clarke L., et al // *AGING-US.* 2017. V. 9. № 4. P. 1341–1350.
21. Sladen P.E., Perdigo P.R.L., Salisbury G., Novoselova T., van der Spuy J., Chapple J.P., Yu-Wai-Man P., Cheetham M.E. // *Mol. Ther. Nucl. Acids.* 2021. V. 26. P. 432–443.
22. Hambright D., Park K.Y., Brooks M., McKay R., Swaroop A., Nasonkin I.O. // *Mol. Vis.* 2012. V. 18. P. 920–936.
23. Satarian L., Javan M., Kiani S., Hajikaram M., Mirnajafi-Zadeh J., Baharvand H. // *PLoS One.* 2013. V. 8. № 8. P. e71855.
24. Abu-Hassan D.W., Li X., Ryan E.I., Acott T.S., Kelley M.J. // *Stem Cells.* 2015. V. 33. № 3. P. 751–761.
25. Schwartz S.D., Hubschman J.P., Heilwell G., Franco-Cardenas V., Pan C.K., Ostrick R.M., Mickunas E., Gay R., Klimanskaya I., Lanza R. // *Lancet.* 2012. V. 379. № 9817. P. 713–720.
26. Schwartz S.D., Regillo C.D., Lam B.L., Elliott D., Rosenfeld P.J., Gregori N.Z., Hubschman J.P., Davis J.L., Heilwell G., Spirn M., et al. // *Lancet.* 2015. V. 385. № 9967. P. 509–516.
27. Hereditary retinal dystrophy. URL: <https://www.barraquer.com/en/pathology/hereditary-retinal-dystrophy>.
28. Leber congenital amaurosis. URL: <https://medlineplus.gov/genetics/condition/leber-congenital-amaurosis>.
29. Burnight E.R., Giacalone J.C., Cooke J.A., Thompson J.R., Bohrer L.R., Chirco K.R., Drack A.V., Fingert J.H., Worthington K.S., Wiley L.A., et al. // *Mol. Ther.* 2017. V. 25. № 9. P. 1999–2013.
30. Dulla K., Aguila M., Lane A., Jovanovic K., Parfitt D.A., Schulkens I., Chan H.L., Schmidt I., Beumer W., Vorthoren L., et al. // *Mol. Ther. Nucl. Acids.* 2018. V. 12. P. 730–740.
31. Leung A., Sacristan-Reviriego A., Perdigo P.R.L., Sai H., Georgiou M., Kalitzeos A., Carr A.F., Coffey P.J., Michaelides M., Bainbridge J., et al. // *Stem Cell Repts.* 2022. V. 17. № 10. P. 2187–2202.
32. Chirco K.R., Chew S., Moore A.T., Duncan J.L., Lamba D.A. // *Stem Cell Repts.* 2021. V. 16. № 11. P. 2690–2702.
33. Rezaie T., Child A., Hitchings R., Brice G., Miller L., Coca-Prados M., Héon E., Krupin T., Ritch R., Kreutzer D., et al. // *Science.* 2002. V. 295. № 5557. P. 1077–1079.
34. Yoshida T., Ozawa Y., Suzuki K., Yuki K., Ohyama M., Akamatsu W., Matsuzaki Y., Shimmura S., Mitani K., Tsubota K., et al. // *Mol. Brain.* 2014. V. 7. P. 45.
35. Bassuk A.G., Zheng A., Li Y., Tsang S.H., Mahajan V.B. // *Sci. Rep.* 2016. V. 6. P. 19969.
36. Deng W.L., Gao M.L., Lei X.L., Lv J.N., Zhao H., He K.W., Xia X.X., Li L.Y., Chen Y.C., Li Y.P., et al. // *Stem Cell Repts.* 2018. V. 10. № 4. P. 1267–1281.
37. Huang K.C., Wang M.L., Chen S.J., Kuo J.C., Wang W.J., Nhi Nguyen P.N., Wahlin K.J., Lu J.F., Tran A.A., Shi M., et al. // *Stem Cell Repts.* 2019. V. 13. № 5. P. 906–923.
38. Foltz L.P., Howden S.E., Thomson J.A., Clegg D.O. // *Int. J. Mol. Sci.* 2018. V. 19. № 12. P. 4127.
39. Buskin A., Zhu L., Chichagova V., Basu B., Mozaffari-Jovin S., Dolan D., Droop A., Collin J., Bronstein R., Mehrotra S., et al. // *Nat. Commun.* 2018. V. 9. № 1. P. 4234.
40. Artero-Castro A., Long K., Bassett A., Machuca C., León M., Ávila-Fernandez A., Cortón M., Vidal-Puig T., Ayuso C., Lukovic D., et al. // *Stem Cell Res.* 2019. V. 34. P. 101341.
41. Artero-Castro A., Long K., Bassett A., Ávila-Fernandez A., Cortón M., Vidal-Puig A., Jendelova P., Rodriguez-Jimenez F.J., Clemente E., Ayuso C., et al. // *Int. J. Mol. Sci.* 2021. V. 22. № 4. P. 2092.
42. Diakatou M., Dubois G., Erkilic N., Sanjurjo-Soriano C., Meunier I., Kalatzis V. // *Int. J. Mol. Sci.* 2021. V. 22. № 5. P. 2607.
43. Tang Z.H., Chen J.R., Zheng J., Shi H.S., Ding J., Qian X.D., Zhang C., Chen J.L., Wang C.C., Li L., et al. // *Stem Cells Transl. Med.* 2016. V. 5. № 5. P. 561–571.
44. Sanjurjo-Soriano C., Erkilic N., Baux D., Mamaeva D., Hamel C.P., Meunier I., Roux A.F., Kalatzis V. // *Mol. Ther. Methods Clin. Dev.* 2019. V. 17. P. 156–173.
45. Liu X., Lillywhite J., Zhu W., Huang Z., Clark A.M., Gosstola N., Maguire C.T., Dykxhoorn D., Chen Z.Y., Yang J. // *Genes (Basel).* 2021. V. 12. № 6. P. 805.
46. Tu H.Y., Watanabe T., Shirai H., Yamasaki S., Kinoshita M., Matsushita K., Hashiguchi T., Onoe H., Matsuyama T., Kuwahara A., et al. // *EBioMedicine.* 2019. V. 39. P. 562–574.
47. Zhu D., Xie M., Gademann F., Cao J., Wang P., Guo Y., Zhang L., Su T., Zhang J., Chen J. // *Stem Cell Res. Ther.* 2020. V. 11. № 1. P. 98.
48. Surendran H., Nandakumar S., Reddy K.V.B., Stoddard J., Mohan K.V., Upadhyay P.K., McGill T.J., Pal R. // *Stem Cell Res. Ther.* 2021. V. 12. № 1. P. 70.
49. Salas A., Duarri A., Fontrodona L., Ramírez D.M., Badia A., Isla-Magrané H., Ferreira-de-Souza B., Zapata M.Á., Raya Á., Veiga A., et al. // *Mol. Ther. Methods Clin. Develop.* 2021. V. 20. P. 688–702.
50. Collin J., Zerti D., Queen R., Santos-Ferreira T., Bauer R., Coxhead J., Hussain R., Steel D., Mellough C., Ader M., et al. // *Stem Cells (Dayton, Ohio).* 2019. V. 37. № 5. P. 609–622.
51. Sharma R., Khristov V., Rising A., Jha B.S., Dejene R., Hotaling N., Li Y., Stoddard J., Stankewicz C., Wan Q., et al. // *Sci. Transl. Med.* 2019. V. 11. № 475. P. eaat5580.

УДК 576.53

# Экспрессия RIPK3 в фибробластах в модели кожной раны *in vivo* и *in vitro*: противоречивый результат

И. С. Изюмов<sup>1</sup>, М. С. Шитова<sup>1</sup>, М. С. Сабилов<sup>1</sup>, С. А. Шелег<sup>1</sup>, О. Л. Черкашина<sup>1</sup>,  
Е. П. Калабушева<sup>1</sup>, Е. А. Воротеяк<sup>1,2</sup>, Е. И. Моргун<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>Институт биологии развития имени Н.К. Кольцова РАН, Москва, 119334 Россия

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

\*E-mail: lady.morgun2016@yandex.ru

Поступила в редакцию 06.09.2023

Принята к печати 25.10.2023

DOI: 10.32607/actanaturae.25452

**РЕФЕРАТ** Одной из проблем регенеративной медицины является образование гипертрофических и келоидных рубцов. Известно, что протеинкиназа RIPK3 участвует в некроптозе, при этом появляются данные в пользу ее неканонических функций, в том числе в развитии фиброза почек. В представленной работе изучена экспрессия RIPK3 в модели фибротических процессов в коже мыши и человека. Показано, что в келоидном рубце человека, а также в ране мыши присутствует субпопуляция RIPK3+Vim+-клеток, причем в раневом ложе мыши таких клеток достоверно больше, чем в нормальной коже. С помощью полимеразной цепной реакции в реальном времени (ПЦР-РВ) экспрессия *Ripk3*, а также биомаркеров фибробластов *Acta2*, *Fap*, *Colla1* и *Fn1* выявлена в клетках, выделенных из раневого ложа, что свидетельствует о возможном синтезе RIPK3 фибробластами раневого ложа. Показано увеличение интенсивности флуоресценции фибробластов человека, окрашенных антителами к RIPK3, под воздействием липополисахарида (ЛПС, 5, 10, 25, 50, 100 нг/мл) и TGF- $\beta$  (0.1, 1, 2, 5 нг/мл) по сравнению с контролем. В то же время уровень экспрессии *RIPK3* и маркеров активации фибробластов на уровне генов под воздействием TGF- $\beta$  и ЛПС не отличался достоверно от контроля. Возможно, экспрессия RIPK3 в раневых фибробластах не связана напрямую с фибротическими процессами, и RIPK3 играет другую, пока неизвестную, роль в заживлении ран.

**КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА** рубцевание, келоид, кожа, фибробласты, культура клеток, RIPK3.

**СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ** ПЦР-РВ – полимеразная цепная реакция в реальном времени; ВКМ – внеклеточный матрикс; RIPK3 – Receptor-interacting serine/threonine protein kinase 3, взаимодействующая с рецептором серин/треониновая протеинкиназа 3; ПФА – параформальдегид; ДЭГ – дифференциально экспрессируемый ген; Vim – Vimentin, виментин; ЛПС – липополисахарид; Fn – Fibronectin, фибронектин; FAP – Fibroblast activation protein- $\alpha$ , белок активации фибробластов альфа; Colla1 – Collagen type I alpha 1, коллаген I типа альфа-1; UMAP – Uniform Manifold Approximation and Projection, алгоритм аппроксимации и проекции равномерного многообразия.

## ВВЕДЕНИЕ

Нарушения заживления ран кожи представляют значительную медицинскую проблему. К таким нарушениям относятся патологии, связанные с фибротическими процессами, в основе которых лежат чрезмерная пролиферация фибробластов и избыточный синтез внеклеточного матрикса (ВКМ) – гипертрофические и келоидные рубцы. На сегодняшний день разработаны подходы к лечению ран кожи [1], но проблема аномалий регенерации, таких, как фиброз, все еще не решена.

Протеинкиназа RIPK3 (Receptor-interacting serine/threonine protein kinase 3) – важный участник моле-

кулярного пути некроптоза – запрограммированной клеточной гибели с морфологическими признаками некроза. Известно, что RIPK3 вместе с протеинкиназой RIPK1 передает сигнал от таких рецепторов, как TNFR, FasR, TRAILR, TLR3, TLR4 и INFAR1, на белок MLKL, что приводит к гибели клетки [2, 3].

RIPK3 не только участвует в некроптозе, но и выполняет неканонические функции, например, в апоптозе и воспалении. Так, в дендритных клетках RIPK3 участвует в продукции цитокинов [4]. За последнее время опубликованы данные о возможном участии RIPK3 в развитии фибротических процессов, например, в почках или легких [5, 6],

в то же время в предварительных экспериментах нашей лаборатории экспрессия RIPK3 была обнаружена в коже мыши и человека [7]. Поэтому целью нашей работы стало изучение экспрессии RIPK3 в модели фибротических процессов в коже мыши и человека.

## ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

### Биологический материал

В работе использовали 30 половозрелых самцов мышей линии C57Bl/6. Мышей содержали при температуре +23°C с неограниченным доступом к питьевой воде и корму (соответствуют ГОСТ 33215-2014). Все манипуляции с животными проводили под общим наркозом в соответствии с «Правилами для проведения работ с использованием экспериментальных животных» (Россия, 2010) и «Международными рекомендациями (этический кодекс) по проведению медико-биологических исследований с использованием животных» (CIOMS и ICLAS, 2012) с одобрения Комиссии по биоэтике ИБР РАН (протоколы № 51 от 09.09.2021 и № 62 от 01.09.2022) при неукоснительном соблюдении этических принципов, установленных Европейской конвенцией по защите позвоночных животных, используемых в экспериментальных и других научных целях (Страсбург, 2006).

Помимо биологического материала мышей использовали по одному образцу келоидной ткани и нормальной кожи груди человека. Фрагменты кожи человека были получены после оперативного вмешательства с добровольного информированного согласия пациента, работа с культурами клеток проводилась с одобрения Комиссии по биоэтике ИБР РАН.

### Выделение клеток из ран и неповрежденной дермы мышей

Биоматериал промывали в растворе Хэнкса с добавлением раствора амфотерицина В (ОАО «Синтез», Россия) и раствора сульфата гентамицина (компания «БиоФармГарант», Россия). Затем ткани измельчали и помещали в 0.2% раствор диспазы (Gibco, каталожный номер 17105-041). Образцы инкубировали в термостате в течение 30 мин при +37°C. Далее с фрагментов ткани стерильно снимали эпидермис. Затем биоматериал ран помещали в 0.2% раствор коллагеназы I (Worthington Biochemical, каталожный номер LS004197) и IV (Gibco, каталожный номер 1704-019), а кожи в 0.2% раствор коллагеназы IV (Gibco, каталожный номер 1704-019). Далее полученный раствор центрифугировали при +4°C и трижды промывали стерильным ледяным раствором DPBS, после чего пипетировали осадок.

### Культивирование клеток мыши

Суспензию клеток, выделенных из нормальной дермы мыши, фильтровали через сито с диаметром пор 100 мкм. Далее клетки, выделенные из раневого ложа и из нормальной дермы, ресуспендировали в среде DMEM и DMEM Advanced соответственно, содержащей 10% эмбриональной телячьей сыворотки, 1% глутамина и 1% пенициллина–стрептомицина, после чего высевали в 96-луночное плато. Из клеток, достигших монослоя, выделяли РНК.

### Культивирование клеток человека

Фибробласты человека были предоставлены УНУ «Коллекция клеточных культур для биотехнологических и биомедицинских исследований (общебиологического и биомедицинского направления)» Института биологии развития имени Н.К. Кольцова РАН.

Фибробласты человека от трех различных доноров культивировали в 6-луночных планшетах по  $3 \times 10^5$  клеток на лунку, с использованием среды DMEM («ПанЭко») с 10% эмбриональной телячьей сыворотки, 1% глутамина и 1% пенициллина-стрептомицина. Через 24 ч после введения в культуру клетки переводили на среду Opti-MEM с 1% эмбриональной телячьей сыворотки [5]. Затем через 60 мин клетки переводили в среду, содержащую TGF- $\beta$  в концентрации 0.1, 1, 2, 5, 10 нг/мл [5], липополисахарид (ЛПС) – 1, 5, 10, 25, 50, 100 нг/мл [8], а также смесь TGF- $\beta$  (10 нг/мл) и ЛПС (100 нг/мл). Через 24 ч клетки фиксировали и окрашивали антителами к RIPK3 по стандартному протоколу лаборатории. Далее эксперимент повторяли, но TGF- $\beta$  добавляли в концентрации 1 и 10 нг/мл, а ЛПС – 10 и 100 нг/мл. Через 24 ч выделяли тотальную РНК, используя колонки.

### Модель раны кожи мыши

Методологически мы опирались на работу [9], в которой использовали модели большой (квадратная рана площадью 1 см<sup>2</sup>) и малой раны мыши (круглая рана диаметром 4 мм). Нам требовалось смоделировать малую рану, однако выделить фибробласты на стадии пролиферации из раны диаметром 4 мм не представляется возможным, из-за ее малых размеров, поэтому мы использовали рану диаметром 8 мм.

Мышь наркотизировали путем внутрибрюшинного введения препарата Авертин. Для удаления шерсти в области операционного поля использовали крем для депиляции Veet (Франция). Далее при помощи трафарета на кожу спины мыши наносили по пять окружностей диаметром 8 мм, после чего иссекали ткань в границах нанесенных окружностей. Получившиеся раны накрывали пластырем (Tegaderm<sup>tm</sup>). Мышей выводили из эксперимента на 10-й день после операции. В качестве биологи-

ческого контроля использовали нормальную кожу спины мышей.

**Иммунофлуоресцентное окрашивание**

Препараты раны кожи на предметных стеклах и культуру клеток на пластике фиксировали с помощью 4% раствора ПФА в течение 10 мин, после чего промывали в фосфатно-солевом буфере (PBS, 3 раза по 5 мин). Затем на образцы наносили блокирующий раствор (5% сыворотки крови осла, 1% Triton на PBS) и инкубировали в течение 30 мин во влажной камере при комнатной температуре. Далее блокирующий раствор удаляли и наносили раствор первичных антител, после чего инкубировали во влажной камере при температуре +4°C в течение минимум 12 ч.

Затем образцы промывали в PBS, после чего на них наносили раствор вторичных антител и инкубировали во влажной камере при комнатной температуре в течение 1 ч, после чего ядра докрасивали DAPI и заключали в среду BrightMount/Plus (Abcam, Британия).

В работе использовали первичные антитела к RIPK3 (Sigma, каталожный номер HPA055087, разведение 1 : 500) и Vimentin (Abcam, каталожный номер ab24525, разведение 1 : 500), а также вторичные антитела AlexaFluor 488 (Abcam, Ab150173, разведение 1 : 500), AlexaFluor 594 (A21207, Invitrogen, разведение 1 : 500) и AlexaFluor 660 (A21074, Invitrogen, разведение 1 : 500). В качестве положительного контроля для антител к RIPK3 был выбран лимфоузел, для антител к Vimentin выбраны фибробласты. В качестве отрицательного контроля использован биоматериал без окрашивания первичными антителами.

**Флуоресцентная микроскопия**

Для флуоресцентной микроскопии и получения фотографий препаратов, окрашенных антителами, ис-

пользовали микроскоп Leica DMI6000. Фотографии обрабатывали и анализировали при помощи программного обеспечения BZ-II Analyzer (Keyence), LAS X (Leica), ImageJ (FiJi) и STATISTICA (StatSoft).

**Выделение РНК, обратная транскрипция, ПЦР с геле-электрофорезом и ПЦР-РВ**

РНК из клеток выделяли на колонках (Biolabmix и Zymo Research) согласно рекомендациям производителя (США, Россия). Далее проводили обработку ДНКазой (ThermoFisher и Zymo Research), затем синтезировали кДНК с помощью набора для обратной транскрипции MMLV RT kit («Евроген») с олиго(dT)праймером согласно протоколу, предоставленному производителем. ПЦР-анализ с детекцией в реальном времени проводили с применением смеси для ПЦР qPCRmix-HS SYBR («Евроген») по инструкциям производителя на приборе LightCycler 96 (Roche, Швейцария). Обычную ПЦР проводили с применением смеси для ПЦР ScreenMix («Евроген») согласно инструкции производителя на приборе T100 Thermal Cycler (Bio-Rad, США). Горизонтальный электрофорез проводили в 2% агарозном геле, после чего визуализировали результаты на ChemiDoc XRS+ System (Bio-Rad).

Праймеры подбирали в программах PrimerBlast и PrimerSelect (табл. 1). Уровни экспрессии генов нормировали по экспрессии генов домашнего хозяйства – бета-актина (*Actb*) у мышей и глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназы (*GAPDH*) у человека.

**Измерение интенсивности флуоресценции окрашенных культур фибробластов человека**

Среднюю интенсивность флуоресценции измеряли с помощью программы ImageJ (FiJi). Для сравнительного анализа интенсивности флуоресценции применяли съемку на одинаковой экспозиции различных образцов фибробластов, окрашенных флуо-

Таблица 1. Нуклеотидные последовательности праймеров для ПЦР

Праймер	Последовательность прямого праймера	Последовательность обратного праймера
<i>hu FN1</i>	GCACCACCCAGACATTACT	CGGGACTCAGGTTATCAAAAAGTG
<i>hu FAP</i>	ATGGGCTGGTGGATTCTTTGT	ATGTTTGTAGCCATCCTTGTCAC
<i>hu COL1A1</i>	CCCCTGGAAAGAATGGAGATGA	CAAACCACTGAAACCTCTGTGTC
<i>hu GAPDH</i>	GAAGGTCGGAGTCAACGGATTT	TTCTCAGCCTTGACGGTGC
<i>hu RIPK3</i>	ATGCTGCTGTCTCCACGGTAA	AAAGCCATCCATTTCTGTCCCTC
<i>mo Actb</i>	ACCCGCCACCAGTTTCG	AGCATCGTCGCCCCG
<i>mo Acta2</i>	CATTTGGGATGGAGTCAGCGG	GACAGGACGTTGTAGCATAGAGA
<i>mo Acta2</i>	CCCTGAAGAGCATCCGACAC	CAGAGTCCAGCACAAATACCAGT
<i>mo Fn1</i>	GAGGAAGAAGACAGGACAGGAA	GTCAGAGTCGCACTGGTAGAA
<i>mo Fap</i>	AAGAAGCTCAAAGACGGGGG	TGCAAGGACCACCATACACTT
<i>mo Ripk3</i>	ACACGGCACTCCTTGGTATC	CCTTGAGGCAGTAGTTCTTGGTG
<i>mo Col1a1</i>	TGACTGGAAGAGCGGAGAGTA	GGCTGAGTAGGGAACACACA

ресцентными антителами, после чего проводили измерения в 30 точках 3–5 полей зрения контрольной и экспериментальной групп. Результаты анализировали в программе GraphPad Prism 8 (США).

### Анализ экспрессии гена *RIPK3* в данных RNA-seq

**Сбор данных.** Три набора данных были извлечены из базы данных NCBI GEO (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/>). Набор GSE113619 содержит данные массового секвенирования РНК из 27 образцов нормальной кожи человека (контроль) и 37 образцов кожи людей, имеющих наследственную склонность к образованию келоидных рубцов, с учетом биологических повторностей [10]. Набор GSE130973 включает данные секвенирования РНК индивидуальных клеток пяти образцов нормальной кожи человека [11]. Набор GSE163973 содержит данные секвенирования РНК индивидуальных клеток из трех образцов келоидного рубца человека [12].

**Анализ дифференциальной экспрессии генов.** Дифференциальную экспрессию генов в данных массового секвенирования РНК анализировали с использованием R-пакета Edger [13].

**Обработка и анализ данных секвенирования РНК индивидуальных клеток.** Для обработки и анализа данных использовали R-пакет Seurat v4.1.1 [14]. Фибробласты из наборов данных GSE113619 и GSE163973 были интегрированы методом канонического корреляционного анализа (CCA). Снижение размерности данных выполняли методом главных компонент (PCA) на 3000 высоковариабельных генах (HGV). Поиск ближайших соседей выполнен с помощью функции *FindNeighbors* на первых 30 PC's. Кластеризация выполнена с помощью функции *FindClusters* с параметром  $resolution = 0.1$ .

### Статистический анализ

Полученные данные анализировали с использованием программного обеспечения Excel, GraphPad Prism 8 (США). Для сравнения нескольких групп применяли однофакторный дисперсионный анализ Краскела–Уоллиса. Для сравнения двух групп использовали U-критерий Манна–Уитни. Статистически значимым данные считали при  $P < 0.05$ .

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

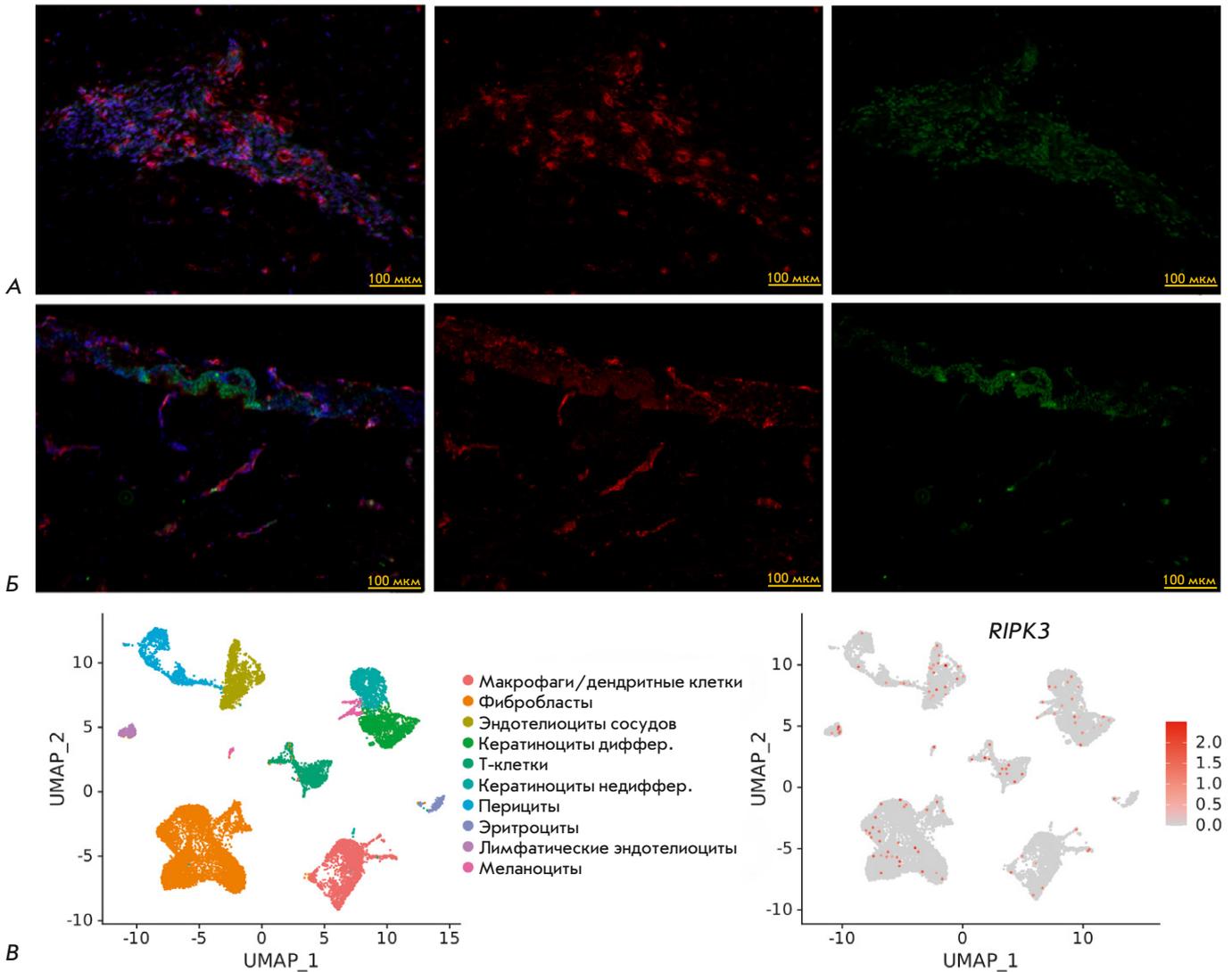
### Экспрессия *RIPK3* в рубцовой ткани и в нормальной коже человека

Иммунофлуоресцентное окрашивание келоида человека выявило экспрессию *RIPK3* во множествен-

ных Vimentin+-клетках (рис. 1А). При этом в дерме нормальной кожи обнаружены единичные *RIPK3*+клетки (рис. 1Б).

Чтобы оценить изменения уровня экспрессии гена *RIPK3* в фибробластах келоидного рубца *in vivo*, мы проанализировали данные секвенирования РНК образцов кожи человека. Для начала использовали данные массового секвенирования РНК, полученные Onoufriadis и соавт. (GSE113619), чтобы выяснить, относится ли *RIPK3* к дифференциально экспрессируемым генам (ДЭГ) при сравнении нормальной кожи и кожи индивидов с наследственной склонностью к образованию келоидов [10]. Набор данных содержал 27 образцов нормальной кожи и 37 образцов кожи лиц с наследственной склонностью к образованию келоидов. Сравнение экспрессии генов в нормальной коже и в коже лиц с наследственной склонностью к образованию келоидов показало, что *RIPK3* не является ДЭГ ( $logFC = -0.07619307$ ,  $P_{adjusted} = 1$ ). Из рис. 1Ж видно, что распределение счетов этого гена в нормальной коже (светло-фиолетовая диаграмма размаха) не отличается от распределения в коже людей с наследственной склонностью к формированию келоидов (светло-золотистая диаграмма размаха). В обоих случаях медиана распределения счетов равна 1.

Низкий уровень экспрессии *RIPK3* в данных массового секвенирования РНК потенциально можно объяснить немногочисленной специфической популяцией клеток, где этот ген активен. Поэтому мы проанализировали результаты секвенирования РНК индивидуальных клеток нормальной кожи и келоидного рубца. Образцы нормальной кожи взяли из работы Solé-Boldo и соавт. (GSE130973) и визуально оценили экспрессию *RIPK3* среди клеток различных типов [11]. В нормальной коже экспрессию гена *RIPK3*, т.е. *RIPK3*+клетки, удалось детектировать в крайне незначительном количестве (рис. 1В). Данные секвенирования РНК индивидуальных клеток в келоидном рубце были взяты из работы Deng и соавт. (GSE163973) [12]. Если визуально оценивать представленность *RIPK3*+клеток, то можно заметить, что таких клеток достаточно много среди эндотелиальных клеток и фибробластов келоидного рубца (рис. 1Г). Чтобы провести сравнительный анализ фибробластов из здоровой кожи и келоидного рубца, анализируемые данные были объединены и интегрированы. Всего объект содержал 11710 клеток, 5948 из которых соответствовали фибробластам нормальной кожи, а 5762 – фибробластам келоидного рубца. Мы получили четыре кластера клеток фибробластов, как и в работе Solé-Boldo и соавт., и оценили распределение *RIPK3*+клеток по кластерам. Как уже показано на наборо-



**Рис. 1.** Паттерны экспрессии RIPK3 в коже человека. Препараты келоидного рубца человека (А) и нормальной дермы (Б), иммунофлуоресцентное окрашивание антителами к Vim (красный) и RIPK3 (зеленый), ядра докрашены DAPI, увеличение  $\times 20$ , масштабные отрезки 100 мкм. В – График UMAP-кластеров клеток с аннотацией из образцов нормальной кожи (слева) и распределение RIPK3+–клеток в этих данных (справа). Г – График UMAP-кластеров клеток с аннотацией из образцов нормального шрама и келоидного рубца (слева), распределение RIPK3+–клеток в этих данных (справа). Д – График UMAP-кластеров клеток в фибробластах из образцов нормальной кожи и келоидного рубца (слева) и распределение RIPK3+–клеток в этих данных (справа). Е – Процент RIPK3+–клеток в фибробластах нормальной кожи и келоидного рубца среди четырех кластеров клеток (справа) и сравнение долей RIPK3+–клеток во всех фибробластах из нормальной кожи и келоидного рубца (слева), \*\*\**P*-значение < 0.001 (точный тест Фишера). Ж – Распределение счетов гена RIPK3 в данных массового секвенирования РНК в образцах нормальной кожи и кожи лиц с наследственной склонностью к образованию келоидных рубцов

рах данных, содержащих все типы клеток кожи (рис. 1В,Г), среди фибробластов келоидного рубца увеличивается количество RIPK3+–клеток (рис. 1Д). При этом RIPK3+–фибробласты не формируют отдельный кластер, а возникают произвольным образом. Далее мы сравнили гены с дифференциальной экспрессией в клетках нормальной кожи и келоидного рубца. Как и в случае с данными массового секвенирования РНК (рис. 1Ж), RIPK3 нельзя от-

нести к генам ДЭГ, экспрессия которых различается в фибробластах нормальной кожи и келоидного рубца. Более того, из-за небольшого количества клеток, экспрессирующих этот ген, он не учитывается в анализе.

Тем не менее, мы видим, что процент RIPK3+–клеток в фибробластах келоидного рубца значительно больше, чем в фибробластах нормальной кожи среди всех полученных кластеров клеток

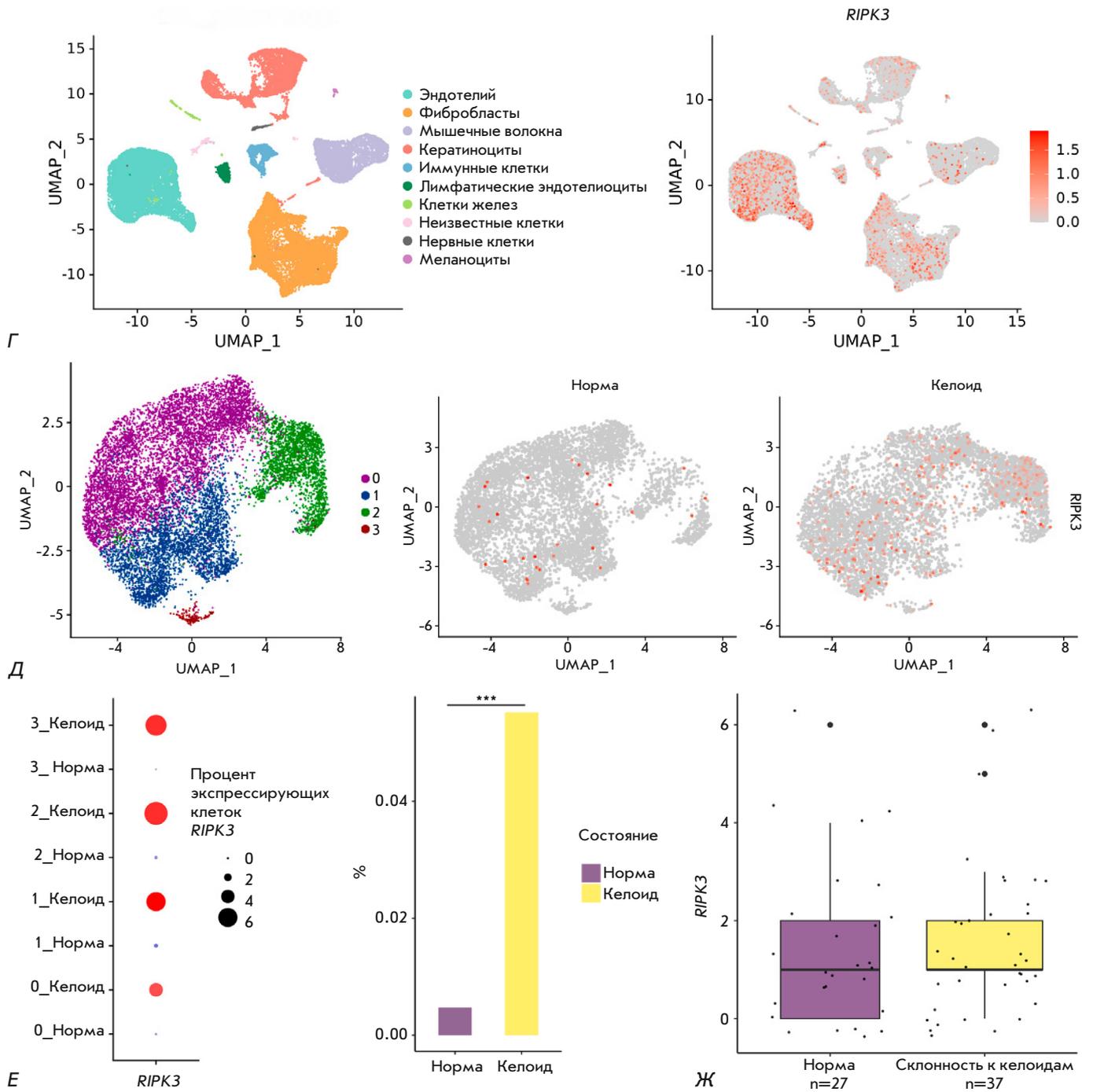


Рис. 1 (продолжение).

(рис. 1Е, слева). Разница в количестве *RIPK3*+фибробластов (28 из 5948 для клеток нормальной кожи, 318 из 5762 для клеток келоида) является статистически значимой (точный тест Фишера,  $P$ -значение  $< 0.001$ ) (рис. 1Е, справа). Таким образом, экспрессия гена *RIPK3* в фибробластах келоидного рубца не увеличивается в *RIPK3*+клетках и соответствует определенному физиологическому уровню, как и в фибробластах нормальной кожи.

При этом значительное (более чем в 10 раз) увеличение числа клеток, которые экспрессируют ген *RIPK3*, может быть связано с переходом фибробластов в активированное состояние.

### Экспрессия *RIPK3* в ране и в нормальной коже мыши

Моделирование фибротических процессов кожи на лабораторных мышах не предполагает полного

переноса процессов, происходящих в организме человека, на мышь, учитывая существенные морфофункциональные различия в ее строении у мыши и человека [15]. Например, для мышей характерно наличие мышцы *panniculus carnosus*, обуславливающей быструю регенерацию раны путем сокращения, а также индуцированный ранением неогенез волос, что не характерно для кожи человека. Тем не менее, имеются работы по изучению фибротических процессов на мышах. Так, согласно данным Lim и соавт. и Ito и соавт., процессы, происходящие в малых и больших ранах, сопровождаются активацией различных сигнальных путей, и поэтому имеют разный результат [9, 16]. В работе Lim и соавт. регенерация больших ран – от 1 см<sup>2</sup> и больше – сопровождалась повышением экспрессии *Shh* и, как следствие, рано-индуцированным неогенезом волос в раневом ложе, после чего заканчивалась полным структурно-функциональным восстановлением кожи. При заживлении малых ран повышения экспрессии *Shh* не происходило и, как следствие, не наблюдалось рано-индуцированного неогенеза волоса, вместо этого имел место фиброз. Поэтому мы использовали модель малой раны мыши. Исходя из того, что избыточное рубцевание может возникать вследствие усиленной фазы пролиферации [17], а сам рубец морфофункционально напоминает рану в стадии пролиферации, мы определили временную точку в регенерации раны мыши, когда она находится в стадии пролиферации – 10 сутки после нанесения раны. На препаратах раны мыши в данной временной точке мы наблюдали закрытие раны гиперпролиферирующим эпидермисом, грануляционную ткань с преобладанием клеточного компонента над волокнами и отсутствие волосяных фолликулов, что можно рассматривать как незрелый рубец.

Иммунофлуоресцентное исследование выявили RIPK3+Vim+, RIPK3-Vim+, RIPK3+Vim-, RIPK3-Vim--клетки в раневом ложе мыши на 10 сутки регенерации и в нормальной коже (рис. 2А). В ране преобладала субпопуляция клеток RIPK3+Vim+, RIPK3+Vim+-клеток в раневом ложе было достоверно больше, чем в нормальной коже (рис. 2А,В). В свою очередь, в нормальной дерме доминировала RIPK3-Vim+-субпопуляция клеток, их было достоверно больше, чем в ране (рис. 2Б,В). Этот результат свидетельствует о том, что RIPK3+ мезенхимных клеток в ране было достоверно больше, чем в нормальной дерме. Вместе с тем, виментин экспрессируют не только фибробласты, но и эндотелиоциты и некоторые клетки воспаления. ПЦР с гель-электрофорезом первичной культуры клеток, выделенных из раневого ложа мыши, выявила экспрессию маркеров синтеза внеклеточного матрикса

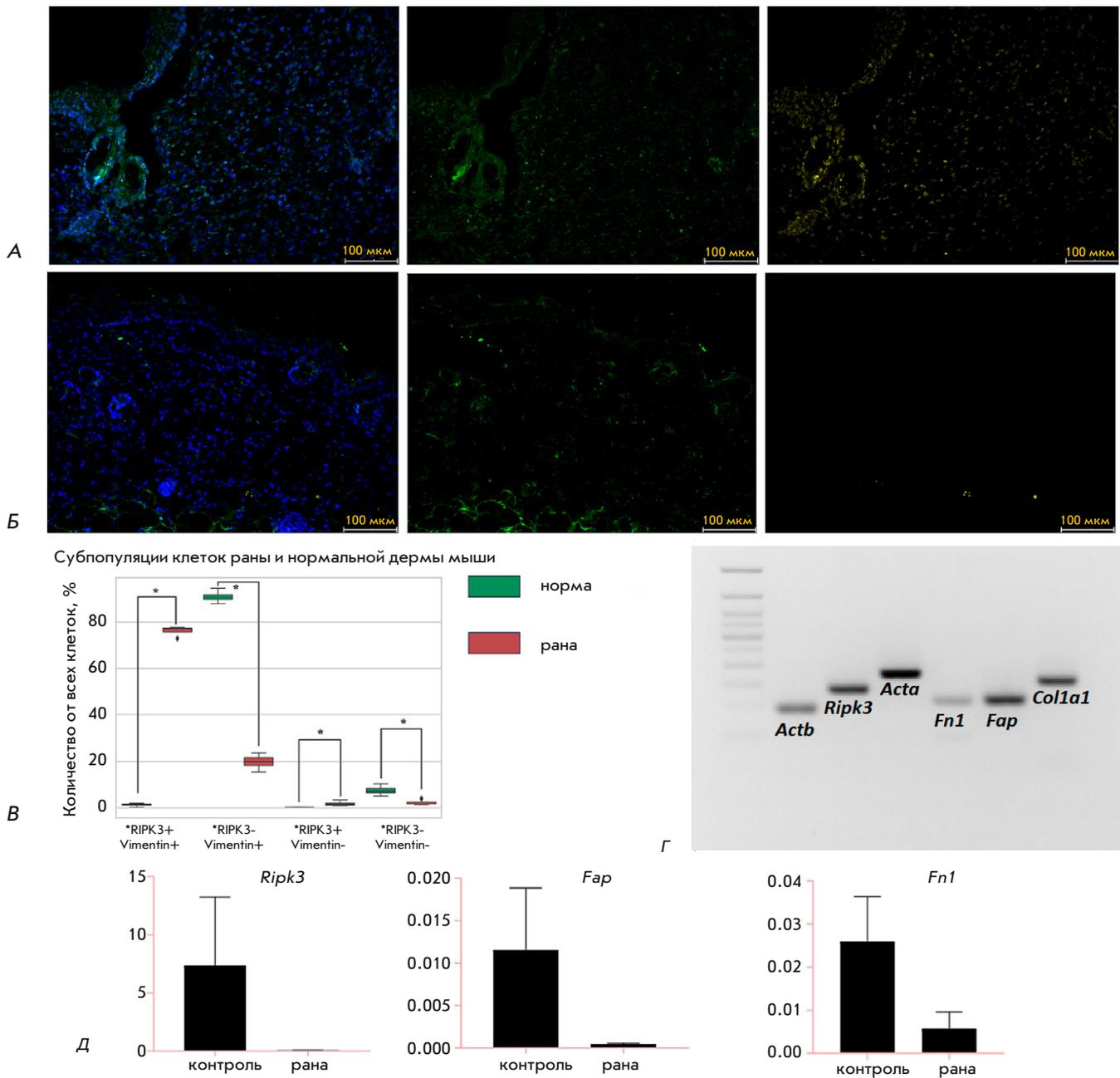
(ВКМ) и формирования миофибробластов – процессов, имеющих место при фиброзе: *Acta2*, *Fap*, *Colla1* и *Fn1*, а также на *Ripk3* (рис. 2Г). Кроме того, эти клетки имели морфологию фибробластов. На основании полученных результатов мы сделали вывод о том, что RIPK3+-клетки раневого ложа мыши являются фибробластами. В то же время методом ПЦР-РВ не были показаны достоверные различия в экспрессии генов *Ripk3*, *Fap* и *Fn1* в культуре клеток раневого ложа и культуре клеток, выделенных из нормальной дермы, что могло быть вызвано сменой фенотипа фибробластов при культивировании на пластике (рис. 2Д). Возможно, введение фибробластов нормальной дермы в культуру и их прикрепление к пластику приводит к их активации *de novo*, тогда как фибробласты грануляционной ткани уже активированы и продолжают активно пролиферировать в культуре, после чего профиль экспрессии соответствующих генов снижается.

#### Экспрессия RIPK3 в дермальных фибробластах человека под воздействием TGF-β1 и ЛПС в модели *in vitro*

Согласно данным Imamura, в фибробластах эмбриона мыши линии NIH 3T3 TGF-β вызывал дозозависимое увеличение экспрессии RIPK3 [5]. Показано также, что после воздействия TGF-β1 на фибробласты RIPK3 может активировать серин/треониновую протеинкиназу АКТ, которая в свою очередь может фосфорилировать АТФ-цитратлиазу (ACL), участвующую в активации фибробластов [18–20].

В то же время возможен и другой путь регуляции RIPK3 в фибротических процессах. В работе Guo и соавт. предполагается роль передачи сигналов TLR4/NF-κB в активации фибробластов, что приводит к развитию миомы матки. ЛПС индуцировал в фибробластах CD90+ экспрессию коллагена 1, TGF-β и FAP [8]. При этом известно, что ЛПС активирует экспрессию RIPK3. Таким образом, можно предположить, что RIPK3 участвует в ЛПС-индуцированной активации сигнального пути TLR4/NF-κB в фибробластах [21].

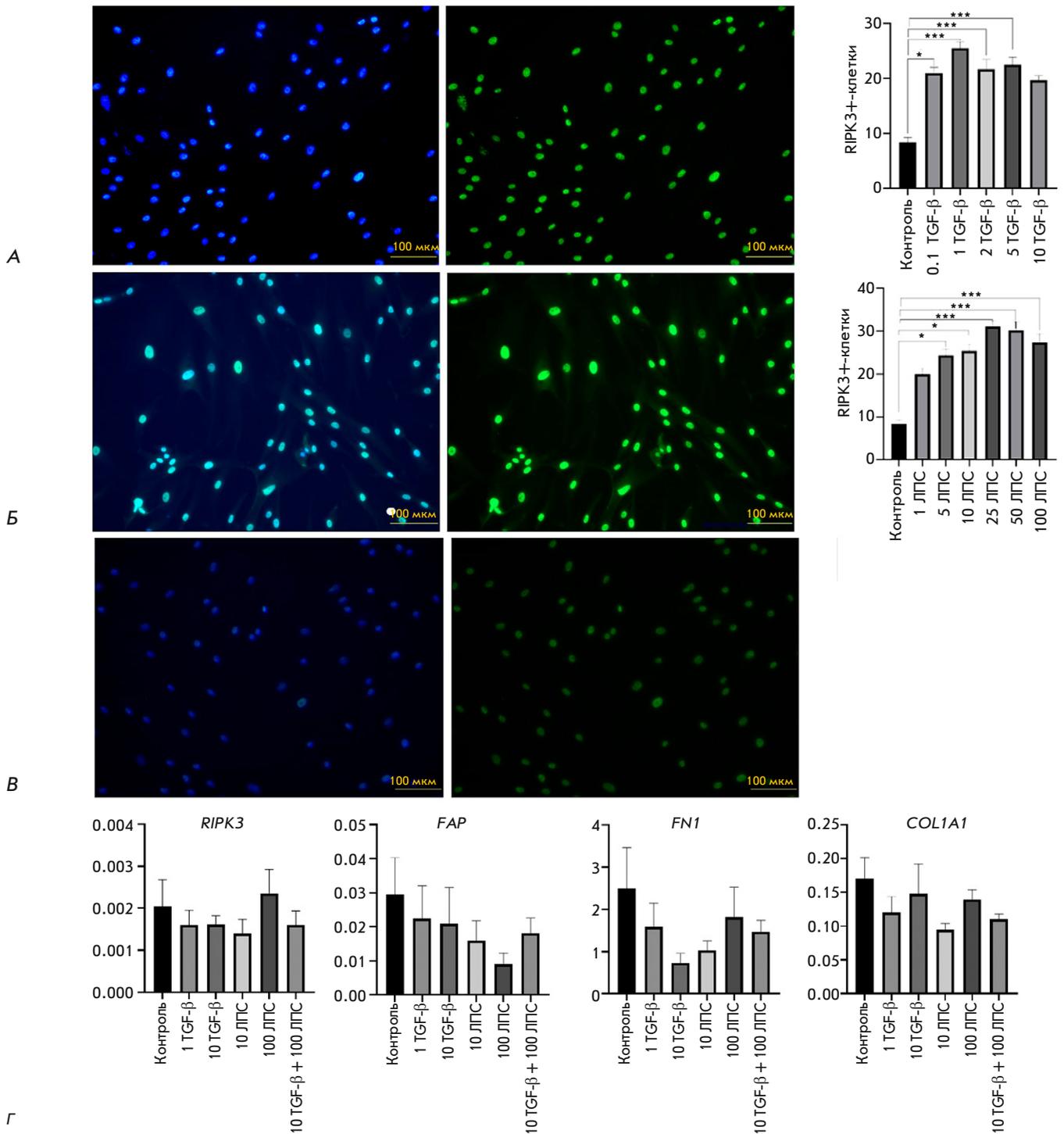
Анализ дермальных фибробластов человека, окрашенных антителами к RIPK3, показал, что воздействие TGF-β в концентрации 0,1, 1, 2, 5 нг/мл (рис. 3А) и ЛПС – 5, 10, 25, 50, 100 нг/мл (рис. 3Б) приводит к достоверному увеличению интенсивности флуоресценции, что говорит о том, что экспрессия RIPK3 может регулироваться TGF-β1 и/или сигналами TLR4/NF-κB. Однако сравнение результатов ПЦР-РВ на *RIPK3* не выявило достоверных различий между контрольными и опытными клетками (рис. 3Г). Вместе с тем, ПЦР-РВ-анализ маркеров активированных фибробластов *FAP*, *FN1* и *COL1A1*



**Рис. 2.** Паттерны экспрессии RIPK3 в коже мыши. Препараты раны в стадии пролиферации (А) и нормальной кожи мыши (Б), иммунофлуоресцентное окрашивание антителами против Vim (зеленый) и RIPK3 (желтый), ядра докрашены DAPI, увеличение  $\times 20$ , масштабные отрезки 100 мкм. В – Статистический анализ субпопуляций клеток в нормальной дерме и раневом ложе мыши,  $*P < 0.05$  (U-критерий Манна–Уитни). Экспрессия маркеров синтеза ВКМ и *Ripk3*: Г – в культуре клеток раневого ложа мыши, ПЦР с гель-электрофорезом; Д – в культуре клеток раневого ложа и нормальной дермы, ПЦР-РВ,  $P > 0.05$  (U-критерий Манна–Уитни, данные экспрессии генов представлены в виде средних значений с разбросом в виде ошибки среднего)

не показал значимых различий между экспериментальными группами и контролем. Такой результат также может быть связан с изменением фенотипа клеток в условиях 2D. Известно, что фенотип фибробластов изменяется в зависимости от субстрата. Так показано, что при культивировании на гидроге-

лях с различной жесткостью фибробласты легких мыши могут приобретать различные фенотипы – с высоким уровнем экспрессии  $\alpha$ -SMA ( $\alpha$ -SMA Hi) и FAP (FAP Hi). В случае  $\alpha$ -SMA Hi наблюдается прямая корреляция экспрессии генов с жесткостью субстрата, в случае FAP Hi – обратная [22]. Кроме



**Рис. 3.** Паттерны экспрессии RIPK3 и маркеров синтеза ВКМ в дермальных фибробластах человека. Фибробласты дермы человека, культивированные в среде, содержащей TGF-β (А), ЛПС (Б) и без воздействия (В), окрашенные антителами к RIPK3; ядра докрасены DAPI, увеличение ×20 (слева), масштабные отрезки 100 мкм. Статистический анализ интенсивности флуоресценции выполнен с использованием критерия Краскела–Уоллиса, \* $P < 0.05$ , \*\*\* $P < 0.001$ , данные интенсивности флуоресценции представлены в виде средних значений с разбросом в виде ошибки среднего (справа). Экспрессия маркеров синтеза ВКМ и RIPK3 под воздействием TGF-β и ЛПС в культуре фибробластов дермы человека, ПЦР–РВ  $P > 0.05$  (U-критерий Манна–Уитни), данные экспрессии генов представлены в виде средних значений с разбросом в виде ошибки среднего (Г)

того, наше исследование проведено на первичных дермальных фибробластах человека и мыши, которые по своим свойствам отличаются от клеток, использованных в работах, на которые мы опирались методологически и концептуально. Так, исследование Imamura было выполнено на эмбриональных фибробластах мыши линии NIH 3T3 и фибробластах почки человека, в работе Guo и соавт. использованы фибробласты миомы матки человека [5, 8]. Таким образом, модель фиброза *in vitro* могла оказаться не самой подходящей для исследования активации фибробластов дермы человека и роли RIPK3 в ней. Для дальнейшего понимания функций RIPK3 в заживлении ран необходимо разработать другую модель *in vitro*. Возможно, перспективным для решения данной проблемы может быть, например, культивирование фибробластов в коллагеновом геле или в органоидах, учитывающих эпителиально-мезенхимальные взаимодействия.

### ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Биоинформатический анализ данных показал, что ткань келоидного рубца человека содержит значительно больше RIPK3+ фибробластов, чем нормальная кожа. RIPK3+Vim+ клетки обнаружены в раневом ложе мыши, а также в келоиде человека. Во время регенерации кожи мыши количество Vimentin+RIPK3+ клеток было достоверно выше, чем в нормальной дерме. Экспрессия *Ripk3* и маркеров синтеза ВКМ *Acta2*, *Fap*, *Colla1* и *Fn1* в клетках,

выделенных из раневого ложа мыши, свидетельствует о том, что эти клетки являются фибробластами. Интенсивность флуоресценции при окрашивании антителами к RIPK3-фибробластам человека, обработанным ЛПС в концентрации 5, 10, 25, 50, 100 нг/мл и TGF- $\beta$  в концентрации 0.1, 1, 2, 5 нг/мл была достоверно выше, чем в контроле. Не обнаружено достоверных различий в определенном методом ПЦР-РВ уровне экспрессии генов маркеров синтеза ВКМ – *FAP*, *FN1* и *COL1A1* и *RIPK3* – в дермальных фибробластах человека, обработанных этими веществами, и в контроле. Этот результат является противоречивым и требует дальнейших исследований. Возможно, экспрессия RIPK3 в раневых фибробластах не связана напрямую с фибротическими процессами, а RIPK3 играет другую, пока неизвестную, роль в заживлении ран. ●

*Авторы выражают благодарность Центру высокоточного редактирования и генетических технологий для биомедицины ИБГ РАН за возможность выполнения биоинформатического анализа, а также Л.Ш. Измайловой и О.И. Сутягиной за консультацию.*

*Работа выполнена в рамках проекта № 21-74-30015 Российского научного фонда. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.*

### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Meleshina A.V., Bystrova A.S., Rogovaya O.S., Vorotelyak E.A., Vasiliev A.V., Zagaynova E.V. // *Sovremennye tehnologii v medicine*. 2017. V. 9. № 1. P. 198–220.
- Pasparakis M., Vandenabeele P. // *Nature*. 2015. V. 517. № 7534. P. 311–320.
- Varfolomeev E., Vucic D. // *Cytokine*. 2018. V. 101. P. 26–32.
- Moriwaki K., Balaji S., McQuade T., Malhotra N., Kang J., Chan F.K.M. // *Immunity*. 2014. V. 41. № 4. P. 567–578.
- Imamura M., Moon J.S., Chung K.P., Nakahira K., Muthukumar T., Shingarev R., Ryter S.W., Choi A.M., Choi M.E. // *JCI insight*. 2018. V. 3. № 3. e94979.
- Mou F., Mou C. // *Med. Sci. Monitor: Int. Med. J. Exp. Clin. Res.* 2020. V. 26. e919739-1–e919739-9.
- Morgun E.L., Pozdniakova E.D., Vorotelyak E.A. // *Dokl. Biochem. Biophys.* 2020. V. 494. № 1. P. 252–255.
- Guo J., Zheng L., Chen L., Luo N., Yang W., Qu X., Liu M., Cheng Z. // *Internat. J. Clin. Exp. Pathol.* 2015. V. 8. № 9. P. 10014.
- Lim C.H., Sun Q., Ratti K., Lee S.H., Zheng Y., Takeo M., Lee W., Rabbani P., Plikus M.V., Cain J.E., et al. // *Nat. Commun.* 2018. V. 9. № 1. P. 4903.
- Onoufriadis A., Hsu C.K., Ainali C., Ung C.Y., Rashidghamat E., Yang H.S., Huang H.Y., Niazi U., Tziotzios C., Yang J.C., et al. // *J. Investig. Dermatol.* 2018. V. 138. № 12. P. 2690–2693.
- Solé-Boldo L., Raddatz G., Schütz S., Mallm J.P., Rippe K., Lonsdorf A.S., Rodríguez-Paredes M., Lyko F. // *Commun. Biol.* 2020. V. 3. № 1. P. 188.
- Deng C.C., Hu Y.F., Zhu D.H., Cheng Q., Gu J.J., Feng Q.L., Zhang L.X., Xu Y.P., Wang D., Rong Z., et al. // *Nat. Commun.* 2021. V. 12. № 1. P. 3709.
- Robinson M.D., McCarthy D.J., Smyth G.K. // *Bioinformatics*. 2010. V. 26. № 1. P. 139–140.
- Hao Y., Hao S., Andersen-Nissen E., Mauck W.M. 3rd., Zheng S., Butler A., Lee M.J., Wilk A.J., Darby C., Zager M., et al. // *Cell*. 2021. V. 184. № 13. P. 3573–3587. e29.
- Rippa A.L., Kalabusheva E.P., Vorotelyak E.A. // *Cells*. 2019. V. 8. № 6. P. 607.
- Ito M., Yang Z., Andl T., Cui C., Kim N., Millar S.E., Cotsarelis G. // *Nature*. 2007. V. 447. № 7142. P. 316–320.
- Gantwerker E.A., Hom D.B. // *Clinics in plastic surgery*. 2012. V. 39. № 1. P. 85–97.
- Horowitz J.C., Lee D.Y., Waghray M., Keshamouni V.G., Thomas P.E., Zhang H., Cui Z., Thannickal V.J. // *J. Biol. Chem.* 2004. V. 279. № 2. P. 1359–1367.
- Berwick D.C., Hers I., Heesom K.J., Moule S.K., Tavare J.M. // *J. Biol. Chem.* 2002. V. 277. № 37. P. 33895–33900.
- Zaidi N., Swinnen J.V., Smans K. // *Cancer Res.* 2012. V. 72. № 15. P. 3709–3714.
- Yun M., Park S.H., Kang D.H., Kim J.W., Kim J.D., Ryu S., Lee J., Jeong H.M., Hwang H.R., Song K.S. // *J. Cell. Mol. Med.* 2022. V. 26. № 21. P. 5506–5516.
- Avery D., Govindaraju P., Jacob M., Todd L., Monslow J., Puré E. // *Matrix Biology*. 2018. V. 67. P. 90–106.

УДК 577.113.4 : 577.21

# Проверка метилирования митохондриальной 12S рРНК предполагаемой метилтрансферазой METTL17

А. В. Машковская<sup>1\*</sup>, С. С. Марьясина<sup>2,3,4</sup>, М. В. Серебрякова<sup>5</sup>, М. П. Рубцова<sup>3</sup>,  
О. А. Донцова<sup>3,5,6,7</sup>, П. В. Сергиев<sup>2,3,5,6</sup>

<sup>1</sup>Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, факультет биоинженерии и биоинформатики, Москва, 119192 Россия

<sup>2</sup>Институт функциональной геномики, Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, Москва, 119192 Россия

<sup>3</sup>Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, химический факультет, Москва, 119192 Россия

<sup>4</sup>Российский университет дружбы народов «НОРЦ Фармация», Москва, 117198 Россия

<sup>5</sup>Научно-исследовательский институт физико-химической биологии имени А.Н. Белозерского, Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, Москва, 119192 Россия

<sup>6</sup>Центр молекулярной и клеточной биологии, Сколтех, Москва, 121205 Россия

<sup>7</sup>Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, Москва, 117997 Россия

\*E-mail: mashkovskayaav@my.msu.ru

Поступила в редакцию 28.08.2023

Принята к печати 26.10.2023

DOI: 10.32607/actanaturae.25441

**РЕФЕРАТ** Сборка митохондриальной рибосомы является сложным и многоступенчатым процессом, в который вовлечено множество дополнительных факторов. Процесс создания рибосом отличается в разных группах организмов, однако существуют универсальные стадии и консервативные факторы, которые сохраняются в эволюционно далеких таксонах. Одним из таких факторов сборки является белок METTL17, ставший предметом изучения данной работы. Это консервативный фактор, вовлеченный в сборку рибосомы как в бактериях, так и в митохондриях эукариотических организмов, включая мышь и человека. В рамках настоящей работы проверена гипотеза о предполагаемой метилтрансферазной активности METTL17. Для оценки метилирования предполагаемой мишени METTL17 – области 12S рРНК, с которой фактор взаимодействует во время сборки митохондриальной рибосомы – был применен метод MALDI-TOF масс-спектрометрии. Изучение METTL17 и других факторов сборки митохондриальной рибосомы имеет не только фундаментальную, но и практическую значимость: нарушение сборки миторибосомы зачастую сопровождается развитием митохондриальных заболеваний человека.

**КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА** митохондриальная рибосома, факторы сборки рибосомы, метилтрансферазы, метилирование РНК, MALDI-TOF масс-спектрометрия.

## ВВЕДЕНИЕ

В сборку митохондриальной рибосомы вовлечено множество факторов, которые выполняют свою функцию в строгом порядке [1, 2]. Нарушение работы одного из факторов сборки может существенно снизить эффективность созревания рибосомных частиц. Один из консервативных факторов сборки митохондриальной рибосомы – белок METTL17 из класса I SAM-зависимых метилтрансфераз, об-

ладает сигналом митохондриальной локализации и взаимодействует с малой субчастицей митохондриальной рибосомы во время сборки [3–5].

Фактор METTL17 играет важную роль в созревании малой субчастицы митохондриальной рибосомы, во время сборки рибосомы METTL17 взаимодействует с несколькими интермедиатами малой субчастицы в месте, где в зрелых рибосомах происходит связывание мРНК [4, 5]. Связывание METTL17

приводит к конформационным изменениям 12S рРНК малой субчастицы в области спиралей 31–34 [4, 5]. В отсутствие METTL17 сборка митохондриальной рибосомы протекает некорректно: показано, что нокаут гена белка METTL17 приводит к снижению уровня, но не полному исчезновению метилирования двух нуклеотидных остатков в 12S рРНК [3], что связано с нарушением взаимодействия с интермедиатом сборки миторибосомы известных РНК-метилтрансфераз [6–9]. Ошибки в созревании миторибосом в отсутствие METTL17 приводят к дефектам митохондриальной трансляции и дыхательной функции митохондрий [3–5]. На уровне организма снижение синтеза METTL17 ассоциировано с развитием атаксии Фридрейха, одного из наиболее распространенных митохондриальных заболеваний [4].

Очевидно, что METTL17 крайне важен для корректной сборки миторибосомы, однако потенциальная метилтрансферазная функция, которой может обладать этот фактор, не изучена. Дело в том, что на основе сходства последовательности и наличия в структуре метилтрансферазного домена и сайта связывания S-аденозилметионина METTL17 относится к семейству SAM-связывающих метилтрансфераз класса I. Из структур METTL17 человека и трипаносомы следует, что варианты METTL17 в этих организмах могут связывать SAM, чего, однако, не наблюдается в дрожжевом гомологе [4, 5]. На основании этих фактов можно предположить, что фактор METTL17 потенциально обладает до сих пор не изученной метилтрансферазной активностью.

Мы обратили внимание на то, что во время сборки METTL17 взаимодействует с 12S рРНК в области спиралей 31–34 [4, 5] и предположили, что он может модифицировать какой-то нуклеотидный остаток в этой области рРНК. Известны пять сайтов метилирования митохондриальной 12S рРНК, каждый из которых метилируется соответствующей метилтрансферазой [6–12]. Тем не менее, мы допустили, что какая-то модификация могла быть упущена из виду, и решили проверить гипотезу о том, что METTL17 метилирует участок 12S митохондриальной рРНК в области спиралей 31–34. Общий ход работы и эксперименты, проведенные для проверки гипотезы о мишени METTL17, показаны на рис. 1.

## ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

### Инактивация гена *Mettl17*

Для инактивации гена *Mettl17* в клеточной линии NIH-3T3 использовали систему CRISPR-Cas9. Гидовая РНК с лучшим рейтингом

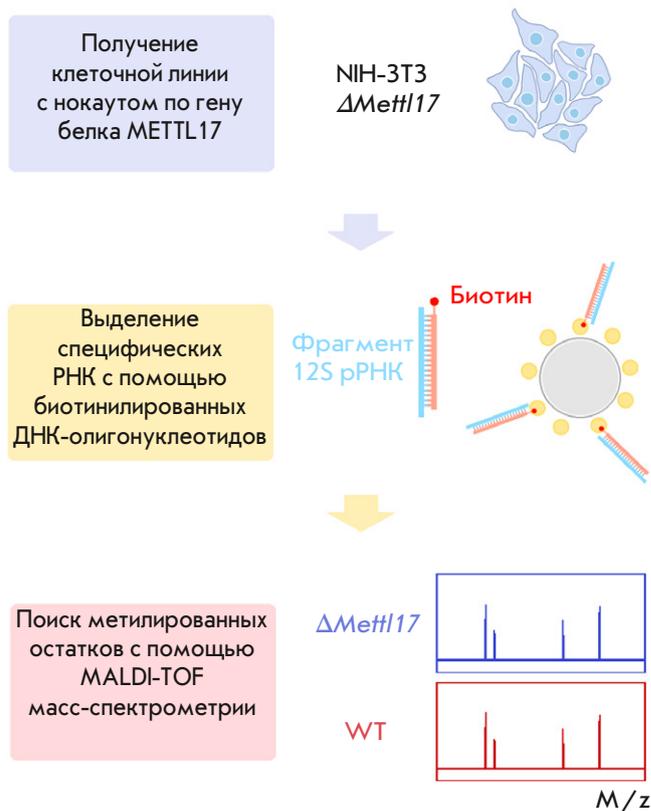


Рис. 1. Схема поиска мишени метилирования митохондриального фактора METTL17

(5'-GACATTTACCTGTAGAGCCGG-3') для внесения разреза в третий экзон гена *Mettl17* была подобрана с помощью сервиса Benchling CRISP designing tool (<https://benchling.com>). Генетическую конструкцию создавали с использованием двух ДНК-олигонуклеотидов, содержащих последовательность гидовой РНК и адаптеры для лигирования в плазмиду (последовательность гидовой РНК показана серым, комплементарная последовательность – светло-серым):



Гибридизацию олигонуклеотидов проводили в буфере для T4-ДНК-лигазы (Thermo Scientific, США): добавляли олигонуклеотиды до концентрации 1 мкМ каждого, инкубировали в течение 5 мин при 95°C и оставляли остывать в закрытом термостате до температуры 30°C. 1 мкл полученного раствора дуплексов лигировали в плазмиду pSpCas9(BB)-2A-GFP (PX458, Addgene #48138), порезанную по сайтам узнавания эндонуклеазы ре-

стрикции BpiI [13]. Лигазной смесью трансформировали компетентные клетки *Escherichia coli* (штамм JM109), колонии выращивали на чашке с добавлением ампициллина (50 мкг/мл). Из ночных культур выделяли плазмидную ДНК с помощью набора реактивов Plasmid Miniprep («Евроген», Россия). Наличие вставки в плазмиде проверяли методом секвенирования по Сэнгеру с помощью праймера на промотор U6 (5'-GACATCATATGCTTACCGT-3').

Клетки линии NIH-3T3 дикого типа трансфицировали плазмидой со вставкой гидовой РНК с использованием реагента Lipofectamine 3000 (Thermo Scientific). Для трансфекции взяли 100000 клеток, 500 нг плазмиды и 1.5 мкл липофектамина. Через 24 ч после трансфекции клетки отбирали по флуоресценции белка GFP с помощью клеточного сортера FACS Aria III BD, сигнал регистрировали при длинах волн поглощения/испускания 488/530 нм. Отобранные клетки рассеивали на моноклоны в 96-луночный планшет (по 200 мкл среды в лунку). Дальнейшее культивирование отдельных моноклонов проводили в лунках 24-луночного планшета. Для проверки нокаута гена *Mettl17* из клеток выделяли суммарную ДНК с помощью раствора QuickExtract DNA Extraction Solution (Lucigen). Далее проводили ПЦР, амплифицируя фрагмент с областью, в которую вносили разрез.

Праймеры для ПЦР:

**Прямой праймер:**

5'-GTGAGAAACTGCGGGAAGGG-3'

**Обратный праймер:**

5'-AGCCSTACCTTGTTTTTCCAGG-3'.

Наличие мутации в гене *Mettl17*, приводящей к инактивации гена, проверяли путем секвенирования амплифицированных фрагментов по Сэнгеру.

### Культивирование клеточных линий

Клетки NIH-3T3 дикого типа и  $\Delta$ *Mettl17* культивировали при температуре 37°C и 5% CO<sub>2</sub> в среде DMEM/F12 (Gibco) с добавлением FBS до 10% объема, раствора GlutaMAX (2 mM L-аланин-L-глутамин) смеси антибиотиков (100 ед/мл пенициллина и 100 мкг/мл стрептомицина). Клетки растили в культуральных матрасах (25 см<sup>2</sup>) для адгезивных клеток. При конfluence 90–100% клетки пересеивали: клетки дикого типа в разведении 1:10, клетки  $\Delta$ *Mettl17* – 1:4. Клетки ополаскивали раствором PBS, после чего снимали раствором 1× Трипсин-EDTA (Gibco) в PBS, ресуспендировали необходимую долю клеток в свежей среде.

Большие объемы клеток для выделения суммарной РНК наращивали в чашках Петри диаметром

150 мм. Для сбора клеток вначале удаляли большую часть среды, затем клетки снимали с помощью культурального скребка. Среду с клетками центрифугировали в течение 5 мин при температуре +4°C на скорости 1000 об/мин, далее среду удаляли, а осадок клеток замораживали и хранили при температуре –80°C до проведения эксперимента.

### Выделение фрагментов 12S рРНК и MALDI-TOF масс-спектрометрия

Суммарную РНК выделяли с использованием реагента ExtractRNA («Евроген»). Осадки клеток размораживали во льду и гомогенизировали в растворе ExtractRNA (1 мл на 100 мг клеток) в приборе Precellys Evotution в пробирках объемом 15 мл (Tissue grinding CKmix50\_15ml). Разрушение проводили при 6000 об/мин в течение 20 с, программу запускали дважды, в перерыве охлаждая раствор во льду в течение 5 мин. После разрушения клеток суммарную РНК выделяли в соответствии с протоколом для реагента ExtractRNA; полученные образцы РНК растворяли в воде miliQ до концентрации 5–7 мг/мл.

Фрагменты 12S рРНК выделяли с помощью трех биотинилированных ДНК-олигонуклеотидов, комплементарных участкам 12S рРНК:

1. 5'-[biotin]GGTTTGCTGAAGATGGCGGTATAT-AGGCTGAATTAGCAAG-3'

2. 5'-[biotin]CCCATTTTCATTTGGCTACACCTTGAC-СТАACGTTTTTATGT-3'

3. 5'-[biotin]GCAAGAGATGGTGAGGTAGAGCGGG-GTTTTATCGATTATAGAACA-3'.

Раствор суммарной РНК (2 мл, 2 мг/мл) с олигонуклеотидом (100 пмоль/мл) в 6× SSC-буфере прогревали при 95°C в течение 5 мин в термостате, после чего охлаждали в закрытом термостате до 40°C. После гибридизации раствор обрабатывали РНКазой T1 (Thermo Scientific) в концентрации 1 U/мл в течение 1.5 ч при температуре 37°C. После инкубации ДНК/РНК-дуплексы выделяли с помощью стрептавидиновых шариков Dynabeads M-280 Streptavidin (Thermo Scientific) по 100 мкл магнитных шариков на пробу. Магнитные шарики трижды промывали 6× SCC-буфером, далее их добавляли к раствору и инкубировали в течение 30 мин при комнатной температуре при перемешивании. После инкубации магнитные шарики промывали последовательно 3× SCC-буфером (4 раза), 1× буфером (3 раза), 0.1× буфером (3 раза). Перед последней промывкой шарики переносили в чистую пробирку. Для элюции РНК пробовали два метода: элюция 100 мкл 0.1× SCC-буфера с 6 M мочевиной (70°C, 5 мин на шейкере при 1000 об/мин) и элюция ДНКазой I (100 мкл раствора ДНКазы в 1× буфере

для ДНКазы, инкубация 30 мин при 37°C в термостате при регулярном перемешивании). Элюат отбирали на магнитном штативе и переносили в чистую пробирку. Добавляли изопропанол до 50%, NH<sub>4</sub>OAc до 1 М, 0.5 мкл Glycoblue и оставляли на ночь при температуре -20°C.

На следующий день РНК осаждали центрифугированием на максимальных оборотах (+4°C 15 мин), осадок промывали холодным 80% этанолом и высушивали при температуре 42°C в термостате. Осадок РНК растворяли в 1× RNA Loading Dye (Thermo Scientific) и наносили на полиакриламидный 12% гель с 7 М мочевиной, гель окрашивали раствором этидия бромидом. Полоски, соответствующие фрагментам РНК, вырезали из геля, измельчали и дважды промывали раствором 25 мМ цитрата аммония с 50% ацетонитрила, после чего высушивали в 100% ацетонитриле. Для масс-спектрометрии MALDI-TOF кусочки геля высушивали на воздухе, после чего обрабатывали раствором РНКазы Т1 в 50 мМ цитрате аммония в течение 3 ч при 37°C. В качестве матрицы для MALDI масс-спектрометрии использовали раствор 50 мг/мл 2,5-дигидроксibenзойной кислоты с добавлением 0.5% ТФУ и 30% ацетонитрила. К 0.5 мкл цитратного раствора РНК-олигонуклеотидов добавляли 1.5 мкл матрицы, после чего смесь наносили на мишень и высушивали. Анализ проводили с помощью прибора Ultraflex III BRUKER с УФ-лазером (Nd, 335 нм) с детекцией положительных ионов.

### Программное обеспечение

С помощью общедоступного ресурса Mongo Oligo Mass Calculator [14] был сгенерирован упорядоченный по массе список всех олигонуклеотидов, полученных в результате расщепления участков митохондриальной 12S рРНК РНКазой Т1. Этот список был рассчитан на основе последовательности, полученной из открытого банка последовательностей NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>). Последовательность митохондриальной 12S рРНК домашней мыши (*Mus musculus*) получена из референсной последовательности митохондриального генома (NC\_005089).

### РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

В настоящей работе нами была проверена гипотеза о том, что фактор METTL17 метилирует участок 12S рРНК, с которым он взаимодействует во время сборки митохондриальной рибосомы. В первую очередь получили клеточную линию с нокаутом по гену белка METTL17, позволяющую сравнить метилирование участка 12S рРНК в норме и в отсутствие фактора METTL17. Для проверки метили-

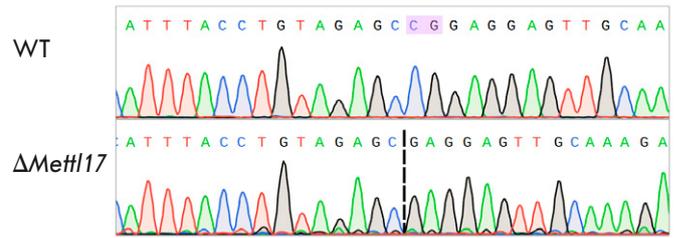


Рис. 2. Сравнение последовательности гена белка METTL17 в линии NIH-3T3 дикого типа (WT) и с нокаутом ( $\Delta Metll17$ ), секвенирование по Сэнгеру

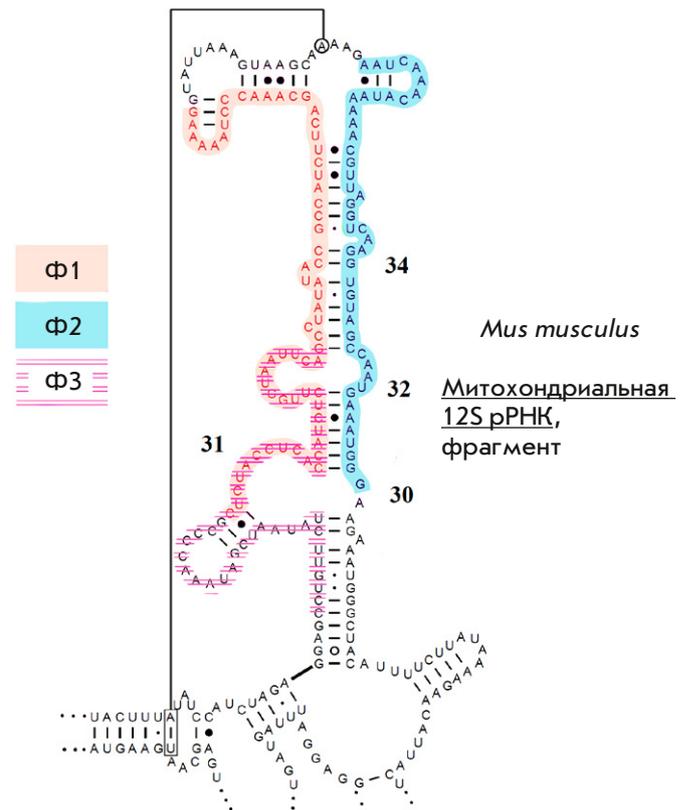
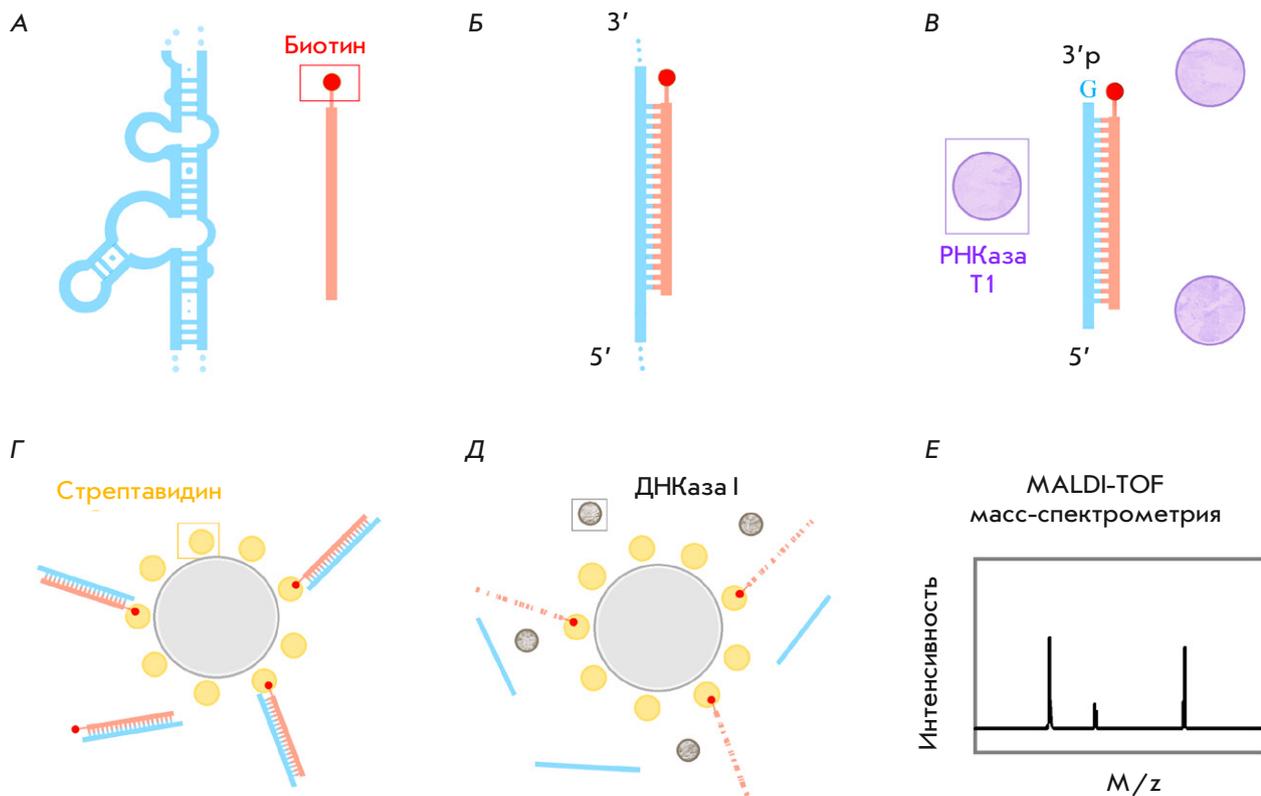


Рис. 3. Фрагменты 12S рРНК мыши, проанализированные с помощью масс-спектрометрии (Ф1, Ф2, Ф3). Два фрагмента (Ф1, Ф3) частично перекрываются. Изображение адаптировано из ресурса [15]

рования 12S рРНК использовали метод выделения специфических РНК с помощью биотинилированных ДНК-олигонуклеотидов. Фрагменты РНК выделяли из клеток дикого типа и клеток с нокаутом по гену белка METTL17. Выделенные и очищенные образцы РНК анализировали с помощью MALDI-TOF масс-спектрометрии. Сравнение масс РНК из клеток дикого типа и из линии с нокаутом и с предварительно рассчитанными теоретическими



**Рис. 4.** Схема выделения фрагментов рННК с помощью биотинилированных олигонуклеотидов. А – участок 12S рННК (показан голубым) и биотинилированный олигонуклеотид (коралловый, биотин – красный). Б – после отжига вторичные структуры рННК расплавляются, происходит гибридизация участка рННК и олигонуклеотида. В – после обработки РНКазой Т1 остается ДНК-рННК-дуплекс, РНКазы Т1 разрезают оцРНК после остатков гуаниловой кислоты, оставляя 3'-фосфат. Г – дуплексы ДНК-рННК связываются с магнитными шариками за счет биотин-стрептавидинового взаимодействия. Д – после обработки ДНКазой I ДНК разрушается, рННК переходит в раствор. Е – анализ выделенных фрагментов рННК с помощью MALDI-TOF масс-спектрометрии

массами позволило нам проверить гипотезу о метилировании рРНК фактором METTL17.

#### Получение клеточной линии NIH-3T3 $\Delta$ Mettl17

В работе использовали клеточную линию NIH-3T3 – линию адгезивных клеток фибробластического типа, полученную из эмбриональной ткани мыши. Ген *Mettl17* инактивировали с помощью производного плазмиды рХ458 [13], кодирующего компоненты системы CRISPR/Cas9 (ген белка Cas9 и последовательность гидовой РНК). Гидовую РНК подбирали таким образом, чтобы вносить разрез в начало третьего экзона гена *Mettl17*.

В результате была получена клеточная линия с делецией 2 п.н. в экзоне 3 гена *Mettl17*. Такая делеция приводит к сдвигу рамки считывания и инактивации гена. Наличие мутации в гене было проверено с помощью секвенирования по Сэнгеру (рис. 2).

#### Анализ метилирования фрагментов 12S рРНК

Для проверки метилирования мы выбрали участок 12S рРНК в области спиралей 31–34, с которым взаимодействует METTL17. Это крупный структурированный участок РНК, включающий в себя двухцепочечные фрагменты (рис. 3). Из-за этого мы приняли решение разбить данный участок на три фрагмента (рис. 3), выделили и проанализировали каждый из них по отдельности.

Специфические фрагменты 12S рРНК выделяли с использованием опубликованного ранее подхода [9, 16, 17] с небольшими изменениями на стадии элюции. Общая схема эксперимента представлена на рис. 4. Специфические фрагменты рРНК выделяли с помощью биотинилированных ДНК-олигонуклеотидов, комплементарных интересующим нас фрагментам рРНК длиной 40–50 остатков. После гибридизации и образования ДНК-рННК-

дуплексов раствор обрабатывали РНКазой Т1, вносящей разрез в оцРНК после гуаниловых остатков. Таким образом, ДНК-РНК-дуплексы остаются в растворе, в то время как вся оцРНК разрушается.

ДНК-РНК-дуплексы выделяли из раствора с помощью стрептавидиновых магнитных шариков, РНК элюировали и разделяли в полиакриламидном геле для нахождения фрагментов необходимой длины (рис. 5). Мы пробовали элюировать РНК с помощью раствора мочевины при нагревании в соответствии с ранее опубликованной методикой [9], а также с помощью раствора ДНКазы (рис. 5). При элюции мочевиной мы столкнулись с тем, что, помимо интересующих фрагментов РНК, в раствор попадает биотинилированный ДНК-олигонуклеотид. Обработка ДНКазой позволяет не только элюировать РНК, но и избавиться от ДНК в растворе. Нанесение элюата на гель позволяет отделить фрагменты РНК от молекул ДНКазы, поэтому применение ферментативной элюции не затрудняет проведение масс-спектрометрического анализа.

Перед масс-спектрометрическим анализом полосы на геле, соответствующие фрагментам РНК, вырезали из геля и дополнительно обрабатывали РНКазой Т1, которая расщепляла РНК на фрагменты меньшей длины. Максимальный вес среди полученных фрагментов составил 6.2 кДа, длина фрагментов составила до 20 нуклеотидных остатков. Теоретические массы всех фрагментов рассчитывали предварительно с помощью онлайн-ресурса [14].

В результате анализа гидролизатов трех фрагментов 12S рРНК из клеток дикого типа и клеток

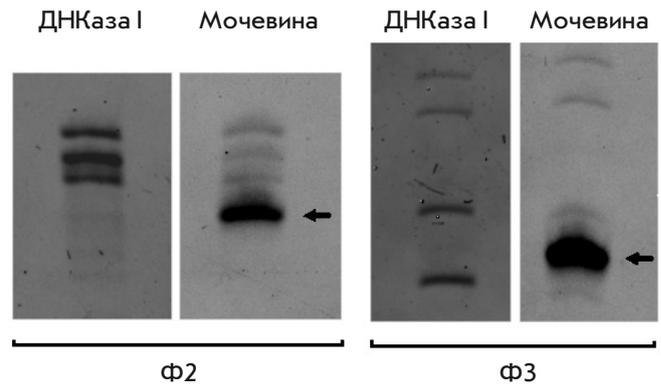


Рис. 5. Результаты выделения фрагментов РНК (Ф2, Ф3) на геле. Элюция проведена с помощью мочевины и ДНКазы I. ДНК-олигонуклеотид, попадающий в раствор при элюции мочевиной, показан стрелкой

*ΔMettl17* получены масс-спектры, позволяющие определить, есть ли в РНК клеток дикого типа дополнительная метильная группа, которая отсутствует в клетках *ΔMettl17*. При наличии дополнительной СН<sub>3</sub>-группы вес фрагмента был бы больше на 14 Да. На рис. 6–8 представлены масс-спектры трех фрагментов, сверху показан результат для клеток с нокаутом, снизу – для клеток дикого типа. По результатам масс-спектрометрического анализа мы определили, что участок 12S рРНК, взаимодействующий с METTL17, в клетках дикого типа не метилирован, масса фрагментов не изменяется при нокауте гена белка METTL17.

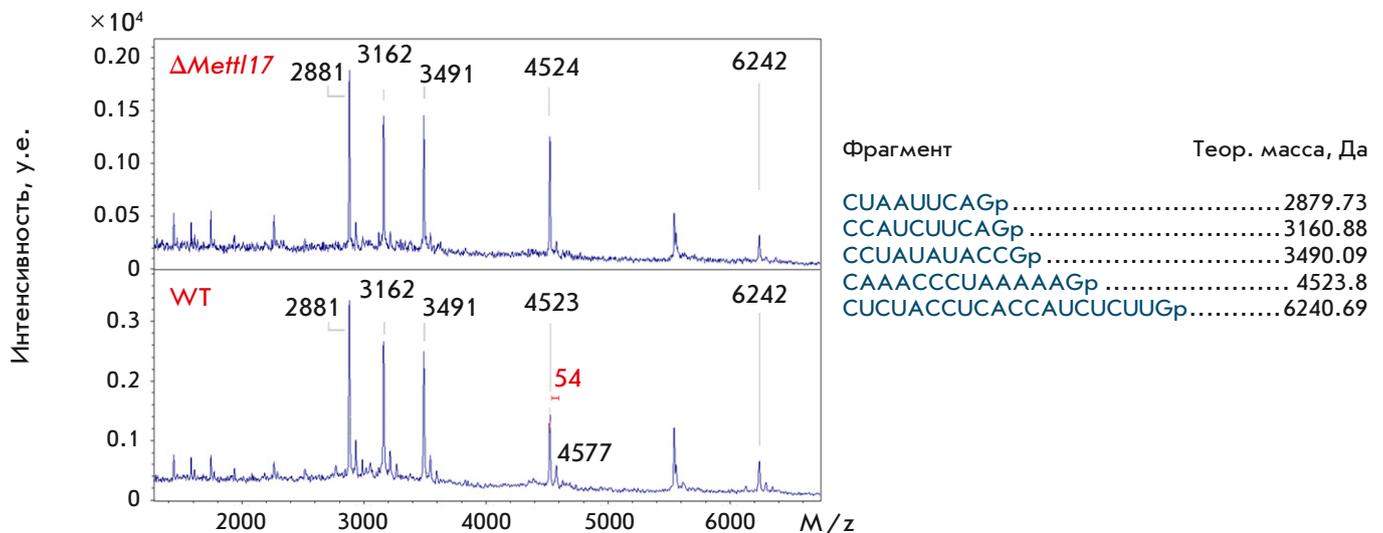


Рис. 6. Масс-спектры Фрагмента 1 (пики на РНК из линии с нокаутом гена белка METTL17 показаны сверху, линии дикого типа – снизу). Масс-спектр получен в линейном режиме. Теоретически рассчитанные пики для Фрагмента 1 подписаны

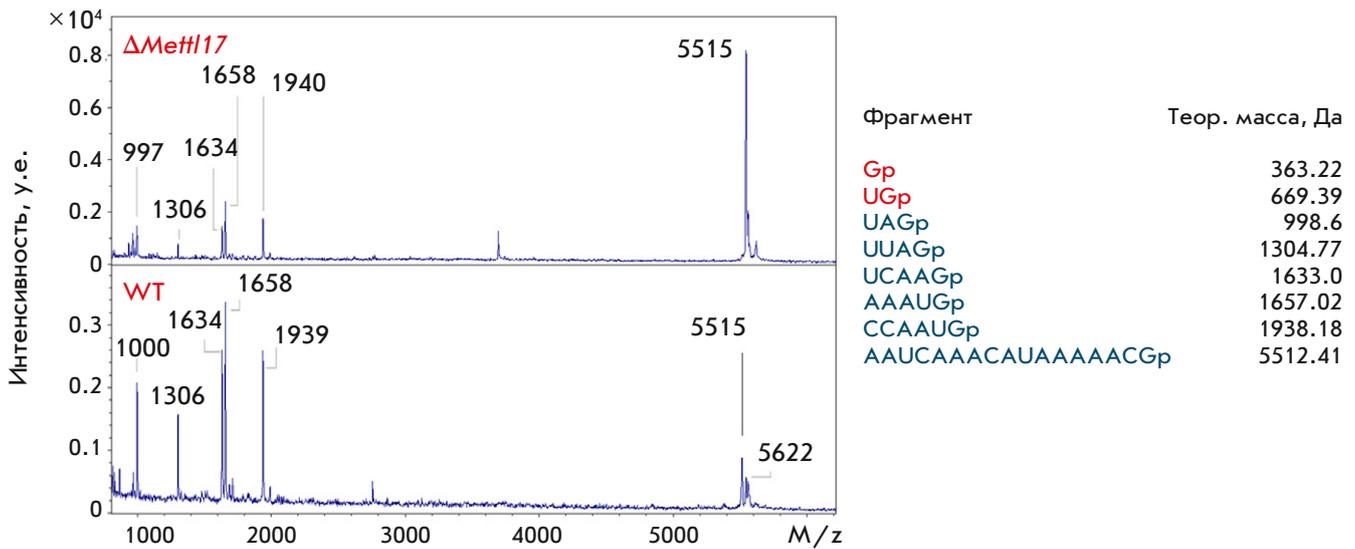


Рис. 7. Масс-спектры Фрагмента 2 (пики на РНК из линии с нокаутом гена белка METTL17 показаны сверху, линии дикого типа – снизу). Масс-спектр получен в линейном режиме. Пики, теоретически рассчитанные для Фрагмента 2, подписаны

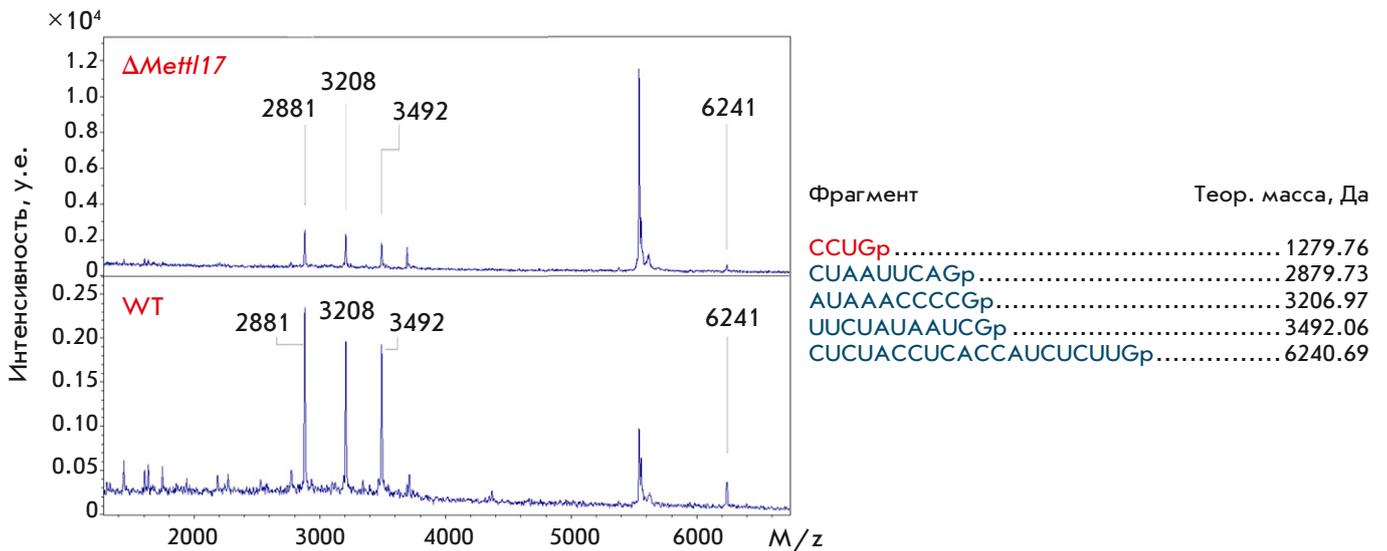


Рис. 8. Масс-спектры Фрагмента 3 (пики в РНК из линии с нокаутом гена белка METTL17 показаны сверху, линии дикого типа – снизу). Масс-спектр получен в линейном режиме. Пики, теоретически рассчитанные для Фрагмента 3, подписаны

На полученных масс-спектрах присутствуют все фрагменты с предсказанной массой, за исключением двух коротких фрагментов (1–2 нуклеотидных остатка) на хроматограмме Фрагмента 2 (рис. 7) и фрагмента длиной 4 нуклеотидных остатка на хроматограмме Фрагмента 3 (рис. 8). В первом случае масса фрагмента была очень мала, из-за этого ее не удалось зафиксировать. Во втором случае мы предполагаем, что фрагмент CCUGp не попал в раствор из-за того, что был отщеплен РНКазой T1. Этот участок расположен на конце анализиру-

емого фрагмента, поэтому возможно отщепление РНКазой из-за короткой длины двухцепочечного участка. Несмотря на это, в процессе эксперимента была проверена вся область 12S рРНК, близко контактирующая с METTL17. Это позволяет заключить, что METTL17 не метилирует фрагмент 12S рРНК в области спиралей 31–34, приводя к изменению пространственной конформации этого участка рРНК.

Таким образом, мы предполагаем, что в сборке малой субчастицы миторибосомы METTL17 играет

в основном структурную роль, не связанную с метилированием. Так, подтверждается предположение [2, 3] о том, что METTL17 – это фактор сборки митоторибосомы, произошедший от метилтрансфераз и сохранивший характерную укладку и способность связывать SAM по крайней мере в некоторых группах организмов, который, вероятно, потерял метилтрансферазную активность и работает как структурный фактор сборки малой субчастицы митохондриальной митоторибосомы.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В рамках настоящей статьи проверена гипотеза о наличии метилтрансферазной активности у белка METTL17 – фактора сборки малой субчастицы митохондриальной рибосомы. Показано, что METTL17 не метилирует область 12S рРНК, с которой он кон-

тактирует во время сборки, несмотря на то, что этот фактор сохраняет черты, характерные для SAM-зависимых метилтрансфераз класса I. На основании этого мы полагаем, что во время эволюционного процесса фактор METTL17 потерял свою исходную функцию и на данный момент выполняет структурную роль в процессе сборки митохондриальной рибосомы. ●

*Работа выполнена при поддержке гранта РФФ (№ 17-75-30027).*

*Авторы благодарят Программу развития МГУ за доступ к приборам CelenoX и SeqStudio, использовавшихся для оценки трансфекции и роста клеток и секвенирования генетических конструкций соответственно.*

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Bogenhagen D.F., Ostermeyer-Fay A.G., Haley J.D., Garcia-Diaz M. // Cell Reports. 2018. V. 22. № 7. P. 1935–1944.
- Lopez Sanchez M., Krüger A., Shiriaev D.I., Liu Y., Rorbach J. // Int. J. Mol. Sci. 2021. V. 22. № 8. P. 3827.
- Shi Z., Xu S., Xing S., Yao K., Zhang L., Xue L., Zhou P., Wang M., Yan G., Yang P., et al. // FASEB J. 2019. V. 33. № 11. P. 13040–13050.
- Ast T., Itoh Y., Sadre S., McCoy J.G., Namkoong G., Chicherin I., Joshi P.R., Kamenski P., Suess D.L.M., Amunts A., et al. // bioRxiv. 2022. <https://doi.org/10.1101/2022.11.24.517765>
- Harper N.J., Burnside C., Klinge S. // Nature. 2023. V. 614. № 7946. P. 175–181.
- Metodiev M.D., Spähr H., Loguercio Polosa P., Meharg C., Becker C., Altmueller J., Habermann B., Larsson N.G., Ruzzenente B. // PLoS Genet. 2014. V. 10. № 2. P. e1004110.
- van Haute L., Hendrick A.G., D'Souza A.R., Powell C.A., Rebelo-Guiomar P., Harbour M.E., Ding S., Fearnley I.M., Andrews B., Minczuk M. // Nucl. Acids Res. 2019. V. 47. № 19. P. 10267–10281.
- Chen H., Shi Z., Guo J., Chang K.J., Chen Q., Yao C.H., Haigis M.C., Shi Y. // J. Biol. Chem. 2020. V. 295. № 25. P. 8505–8513.
- Laptev I., Shvetsova E., Levitskii S., Serebryakova M., Rubtsova M., Zgoda V., Bogdanov A., Kamenski P., Sergiev P., Dontsova O. // Nucl. Acids Res. 2020. V. 48. № 14. P. 8022–8034.
- Boehringer D., O'Farrell H.C., Rife J.P., Ban N. // J. Biol. Chem. 2012. V. 287. № 13. P. 10453–10459.
- Laptev I., Shvetsova E., Levitskii S., Serebryakova M., Rubtsova M., Bogdanov A., Kamenski P., Sergiev P., Dontsova O. // RNA Biol. 2020. V. 17. № 4. P. 441–450.
- Powell C.A., Minczuk M. // RNA Biol. 2020. V. 17. № 4. P. 451–462.
- Ran F.A., Hsu P.D., Wright J., Agarwala V., Scott D.A., Zhang F. // Nat. Protoc. 2013. V. 8. P. 2281–2308.
- <http://rna.rega.kuleuven.be/masspec/mongo.htm>
- Cannone J.J., Subramanian S., Schnare M.N., Collett J.R., D'Souza L.M., Du Y., Feng B., Lin N., Madabusi L.V., Müller K.M., et al. // BMC Bioinformatics. 2002. V. 3. P. 2.
- Golovina A., Dzama M., Osterman I., Sergiev P., Serebryakova M., Bogdanov A., Dontsova O. // RNA. 2012. V. 18. № 9. P. 1725–1734.
- Golovina A., Sergiev P., Golovin A., Serebryakova M., Demina I., Govorun V., Dontsova O. // RNA. 2009. V. 15. № 6. P. 1134–1141.

УДК 578.2:577:576.5:622.244

# Противовирусная активность *in vitro* нового производного индол-3-карбоновой кислоты в отношении SARS-CoV-2

А. Н. Наровлянский<sup>1\*</sup>, М. В. Филимонова<sup>2</sup>, Н. Г. Цышкова<sup>2</sup>, А. В. Пронин<sup>1</sup>, Т. В. Гребенникова<sup>1</sup>, Э. В. Карамов<sup>1</sup>, В. Ф. Ларичев<sup>1</sup>, Г. В. Корнилаева<sup>1</sup>, И. Т. Федякина<sup>1</sup>, И. В. Должикова<sup>1</sup>, М. В. Мезенцева<sup>1</sup>, Е. И. Исаева<sup>1</sup>, В. В. Полосков<sup>1</sup>, Л. С. Коваль<sup>2</sup>, В. П. Маринченко<sup>2</sup>, В. И. Суринова<sup>2</sup>, А. С. Филимонов<sup>2</sup>, А. А. Шитова<sup>2</sup>, О. В. Солдатова<sup>2</sup>, А. В. Санин<sup>1</sup>, И. К. Зубашев<sup>1</sup>, А. В. Пономарев<sup>1</sup>, В. В. Веселовский<sup>3</sup>, В. В. Козлов<sup>1,4</sup>, А. В. Степанов<sup>3</sup>, А. В. Хомич<sup>4</sup>, В. С. Козлов<sup>1</sup>, С. А. Иванов<sup>2</sup>, П. В. Шегай<sup>2</sup>, А. Д. Каприн<sup>2</sup>, Ф. И. Ершов<sup>1</sup>, А. Л. Гинцбург<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Национальный исследовательский центр эпидемиологии и микробиологии имени почетного академика Н.Ф. Гамалеи Министерства здравоохранения Российской Федерации (ФГБУ «НИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи» Минздрава России), Москва, 123098 Россия

<sup>2</sup>Национальный медицинский исследовательский центр радиологии Министерства здравоохранения Российской Федерации (ФГБУ «НМИЦ радиологии» Минздрава России), Обнинск, 249036 Россия

<sup>3</sup>Институт органической химии им. Н.Д. Зелинского РАН, Москва, 119991 Россия

<sup>4</sup>ООО «Гамасинтез», Москва, 123098 Россия

\*E-mail: narovl@yandex.ru

Поступила в редакцию 03.10.2023

Принята к печати 26.10.2023

DOI: 10.32607/actanaturae.26623

**РЕФЕРАТ** Пандемия коронавирусной инфекции COVID-19 позволила по-новому оценить угрозу, исходящую от коронавирусов, и перейти к фундаментальному анализу этого семейства и поиску эффективных противоковидных препаратов. Идут работы по актуализации вакцин против COVID-19 и продолжается поиск низкомолекулярных противоковидных препаратов-кандидатов на лекарство для амбулаторного назначения. Обсуждаются возможности и способы ускорения разработки противовирусных препаратов против других патогенов в рамках подготовки к следующей пандемии. В 2012–2015 гг. Н.Г. Цышкова и соавт. синтезировали группу близких по химической структуре к арбидолу водорастворимых низкомолекулярных соединений, обладающих противовирусной активностью. Среди них ряд соединений на основе аминокислотных эфиров 5-метоксииндол-3-карбоновой кислоты. Из этой довольно обширной группы соединений достоверным противовирусным эффектом в отношении SARS-CoV-2 в исследованиях *in vitro* обладал только один – дигидрохлорид 6-бром-1-метил-5-метокси-2-(1-пиперидинометил)-3-(2-диэтиламиноэтокси)карбониллиндола. В концентрации 52.0 мкМ данное соединение полностью ингибирует репродукцию вируса SARS-CoV-2 с инфекционной активностью 10<sup>6</sup> ТЦИД<sub>50</sub>/мл. Концентрационные зависимости свидетельствуют о специфичности действия исследуемого соединения. Выявлена интерферон-индуцирующая активность; обнаружено подавление синцитиеобразования, индуцированного шиповидным белком (S-гликопротеином) SARS-CoV-2, на 89%. Указанное соединение с учетом его синтетической доступности, высокой активности (IC<sub>50</sub> = 1.06 мкг/мл) и высокого индекса селективности (SI = 78.6) отвечает требованиям, необходимым для разработки противовирусного средства для профилактики и лечения COVID-19.

**КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА** SARS-CoV-2, производное индол-3-карбоновой кислоты, противовирусная активность, культура клеток.

**СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ** ВОЗ – Всемирная организация здравоохранения; ВЭМК – вирус энцефаломиокардита; ИФН – интерферон; ИК – инфракрасный спектр; МС – масс-спектр; ТЦИД<sub>50</sub> – 50% тканевая цитопатогенная инфекционная доза; ЦПД – цитопатогенное действие; T<sub>пл</sub> – температура плавления;

ЭТС – эмбриональная телячья сыворотка; ЯМР  $^1\text{H}$  – ядерный магнитный резонанс на ядрах  $^1\text{H}$ ;  $\text{CC}_{50}$  – 50% цитотоксическая концентрация соединения; COVID-19 – COroNaVirus Disease 2019 – коронавирусная инфекция 2019 года; DMEM – питательная среда Dulbecco's Modified Eagle Medium; GFP – зеленый флуоресцентный белок, green fluorescent protein;  $\text{IC}_{50}$  – 50% ингибирующая концентрация; S-гликопротеин – шиповидный белок вируса SARS-CoV-2; SARS-CoV-2 – Severe acute respiratory syndrome-related coronavirus 2, коронавирус 2 тяжелого острого респираторного синдрома – *Coronaviridae: Coronavirinae: Betacoronavirus: Sarbecovirus*; SI – индекс селективности, рассчитывается как отношение  $\text{CC}_{50}$  к  $\text{IC}_{50}$  ( $\text{SI} = \text{CC}_{50}/\text{IC}_{50}$ ).

## ВВЕДЕНИЕ

5 мая 2023 года ВОЗ объявила «о прекращении чрезвычайной ситуации в области общественного здравоохранения в связи с распространением коронавируса» [1]. Таким образом, завершилась пандемия, которая продолжалась 3 года 1 месяц и 24 дня. По данным ВОЗ, по состоянию на 12 июля 2023 года в мире было зарегистрировано 767 972 961 подтвержденный случай COVID-19, включая 6 950 655 смертей. В России зарегистрировано 22 967 718 подтвержденных случаев COVID-19 и 399 715 смертей [2]. Однако даже по оценке ВОЗ число умерших от COVID-19 превышает 20 млн человек [3].

Несмотря на объявление о завершении пандемии и констатации снижения общего числа заражений, нельзя сказать, что эпидемия COVID-19 полностью прекратилась. Появились новые подварианты вируса (ХВВ.1.16 и ХВВ.2.3) и именно поэтому идут работы по актуализации вакцин против COVID-19 и продолжается поиск низкомолекулярных противовирусных препаратов-кандидатов на лекарство для амбулаторного назначения. Кроме того, примерно у 65 млн больных выявлены долгосрочные последствия инфекции SARS-CoV-2, обозначенные как «состояния после COVID-19», или «длительная COVID» [4].

Пандемия коронавирусной инфекции COVID-19 позволила по-новому оценить угрозу, исходящую от коронавирусов, и перейти к фундаментальному анализу этого семейства и поиску эффективных противовирусных препаратов. Таким образом, по-прежнему необходимы эффективные стратегии лечения COVID-19. Во время пандемии был апробирован целый ряд противовирусных препаратов, таких, как Ремдесивир, нуклеозидные ингибиторы (АТ-527 и молнупиравир), ингибитор основной протеазы (Мрго) Нирматрелвир, комплекс Нирматрелвир-ритонавир и молнупиравир, и иммуномодуляторы – барицитиниб, тоцилизумаб и кортикостероиды и др. [5]. Однако практически не разработаны эффективные низкомолекулярные пероральные противовирусные препараты для амбулаторного лечения [6].

В 2012–2015 гг. Н.Г. Цышкова и соавт. синтезировали группу близких по химической структуре

к арбидолу водорастворимых низкомолекулярных соединений, обладающих противовирусной активностью. Среди них ряд соединений на основе аминокислотных эфиров 5-метоксииндол-3-карбоновой кислоты [7]. Из этой довольно обширной группы достоверным противовирусным эффектом в отношении SARS-CoV-2 в исследованиях *in vitro* обладало только одно соединение, которое и было исследовано в настоящей работе.

## ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

**Исследуемое соединение** – дигидрохлорид 6-бром-1-метил-5-метокси-2-(1-пиперидинометил)-3-(2-диэтиламиноэтокси)карбонилиндола (**1**) (рис. 1) – получено [7] в ФГБУ «НМИЦ радиологии» Минздрава России.

Синтез соединения **1** проводили по многостадийной схеме, представленной на рис. 2.

В работе использовали растворители и реактивы, включая этил-5-гидрокси-1,2-диметил-1*H*-индол-3-карбоксилат, фирмы Acros Organics. Температуры плавления измеряли на блоке Кофлера. ИК-спектры записывали на Фурье-спектрометре Bruker ALPHA T. Спектр  $^1\text{H}$ -ЯМР раствора в  $\text{DMSO}-d_6$  регистрировали на спектрометре Bruker AC-200 при 298 К. Масс-спектр (EI) получен на приборе SHIMADZU LCMS-8040 методом прямого ввода образца в режиме сканирования при положительной ионизации (Q3+Scan).

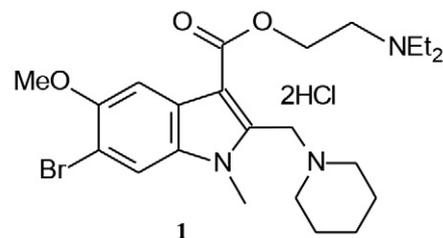


Рис. 1. Дигидрохлорид 6-бром-1-метил-5-метокси-2-(1-пиперидинометил)-3-(2-диэтиламиноэтокси)карбонилиндола (соединение **1**)

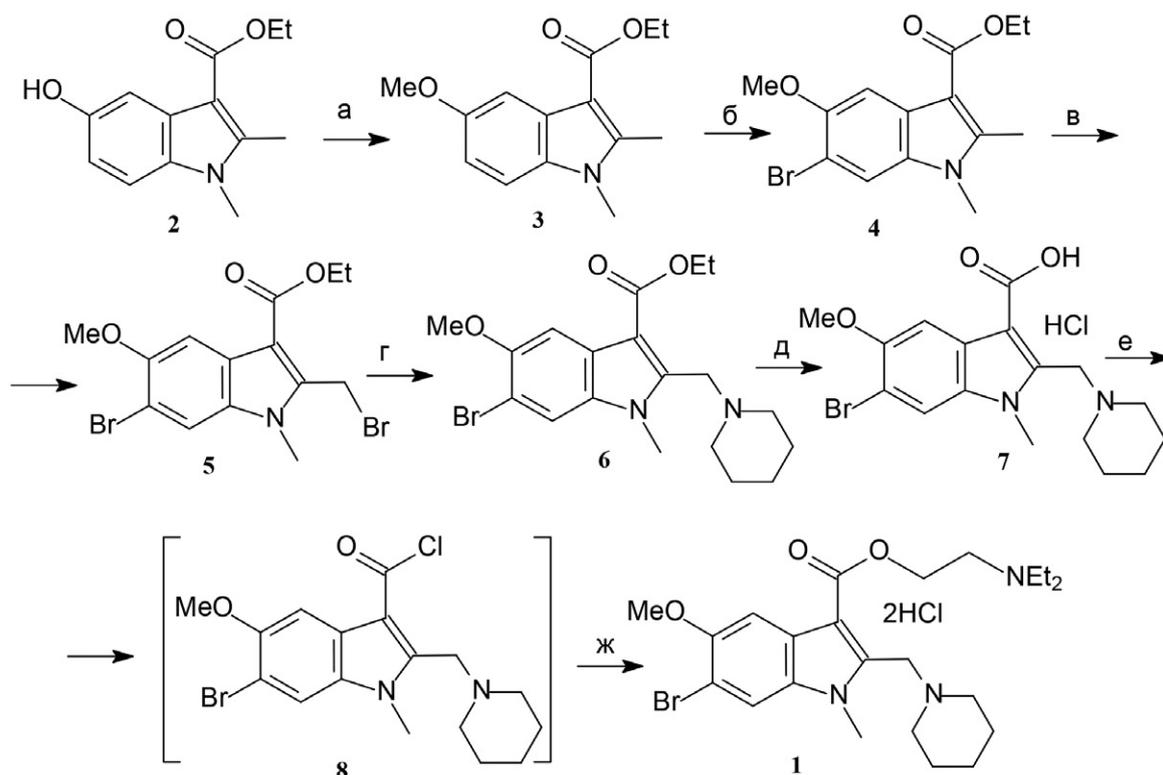


Рис. 2. Реагенты и условия: а. 1) водн. NaOH, диоксан, 2)  $\text{Me}_2\text{SO}_4$ , 20°C; б. N-бромсукцинимид,  $\text{CCl}_4$ , кип.; в. N-бромсукцинимид,  $(\text{PhCOO})_2$ ,  $\text{CCl}_4$ , облучение (лампа 100 Вт), кип.; г. пиперидин, PhH, 20°C; д. 1) водн. NaOH, EtOH, кип., 2) HCl (конц.); е.  $\text{SOCl}_2$ , диоксан, ДМФА (кат.), 60°C; ж. 1)  $\text{Et}_2\text{NCH}_2\text{CH}_2\text{OH}$ ,  $\text{Et}_3\text{N}$ , PhH, кип., 2) HCl,  $\text{Et}_2\text{O}$ , ацетон, 20°C

### 1,2-Диметил-5-метокси-3-этоксикарбонилиндол (3)

К раствору 4.66 г (0.02 моль) соединения 2 в 40.0 мл диоксана при 20°C прибавили 40.0 мл 10% раствора NaOH, затем по каплям 4.0 мл диметилсульфата (0.042 моль). Реакционную смесь перемешивали 2 ч, затем разбавляли водой и охлаждали (4°C). Выпавший осадок отфильтровывали, промывали водой и высушивали в вакууме (2 Торр) над  $\text{P}_2\text{O}_5$ . Получено 4.65 г (94%) соединения 3 в виде кристаллов с  $T_{\text{пл}}$  113°C (лит.  $T_{\text{пл}}$  117.5–118°C [8]).

### 6-Бром-1,2-диметил-5-метокси-3-этоксикарбонилиндол (4)

Смесь 4.65 г (0.0188 моль) соединения 3 и 3.36 г (0.0188 моль) N-бромсукцинимид в 75.0 мл  $\text{CCl}_4$  нагревали при кипячении в течение 5 ч. Осадок (сукцинимид) отфильтровывали из горячей реакционной смеси. Фильтрат упарили (на 1/3) и охладили. Выпавший осадок отфильтровывали, промыли  $\text{CCl}_4$  на фильтре и сушили в вакууме (2 Торр). Получено 3.3 г (54%) соединения 4 в виде кристаллов с  $T_{\text{пл}}$  156°C (лит.  $T_{\text{пл}}$  164–165°C [8]).

### 6-Бром-2-бромметил-5-метокси-1-метил-3-этоксикарбонилиндол (5)

Смесь 3.3 г (0.0101 моль) соединения 4, 1.81 г (0.0101 моль) N-бромсукцинимид и 0.1 г перекиси бензоила в 30.0 мл  $\text{CCl}_4$  кипятили при освещении (лампа 100 Вт) в течение 5 ч. После отделения осадка сукцинимид фильтрованием из горячей смеси и охлаждения фильтрата (20°C), выпавший осадок отфильтровывали, промыли  $\text{CCl}_4$  на фильтре и сушили в вакууме (2 Торр). Получено 3.16 г (78%) соединения 5 в виде кристаллов с  $T_{\text{пл}}$  142°C (лит.  $T_{\text{пл}}$  141–142°C [8]).

### 6-Бром-1-метил-5-метокси-2-(1-пиперидинометил)-3-этоксикарбонилиндол (6)

Раствор 4.0 г (0.01 моль) соединения 5 и 1.7 г (0.02 моль) пиперидина в 50.0 мл бензола выдерживали 12 ч при комнатной температуре. Выпавший осадок (бромгидрат пиперидина) отфильтровывали, фильтрат сконцентрировали в вакууме досуха. Кристаллизацией остатка из этанола получено 1.7 г (82.9%) соединения 6 в виде кристаллов

с  $T_{пл}$  124–125°C (лит.  $T_{пл}$  124–125°C [8]). Найдено: % С 55.72, Н 6.20, N 7.02.  $C_{19}H_{25}BrN_2O_3$ . Вычислено: % С 55.75, Н 6.16, N 6.84.

**Гидрохлорид 6-бром-1-метил-5-метокси-2-(1-пиперидинометил)-индол-3-карбоновой кислоты (7)**

Раствор 6.0 г (0.15 моль) NaOH и 4.1 г (0.01 моль) соединения **6** в 60.0 мл этанола и 3.0 мл воды кипятили в течение 3 ч. Реакционную смесь охладил, разбавил водой (10 мл) и подкислил концентрированной соляной кислотой. Выпавший осадок отфильтровали, промыли на фильтре водой, сушили в вакууме (2 Торр) над  $P_2O_5$ . Получено 4.10 г (98%) соединения **7** в виде кристаллов с  $T_{пл}$  236–238°C. Найдено: % С 48.68, Н 5.32, N 6.65.  $C_{17}H_{22}BrClN_2O_3$ . Вычислено: % С 48.88, Н 5.31, N 6.71.

**Дигидрохлорид 6-бром-1-метил-5-метокси-2-(1-пиперидинометил)-3-(2-диэтиламиноэтокси)-карбонилиндола (1)**

К перемешиваемому раствору 1.67 г (0.004 моль) гидрохлорида **7** в 30.0 мл диоксана прибавили 3.0 мл (0.041 моль) хлористого тионила и 2 капли диметилформаида. Реакционную смесь нагревали при 60°C в течение 3 ч, затем сконцентрировали в вакууме досуха и остаток промыли эфиром. Полученный порошкообразный хлорангидрид **8** без дополнительной очистки растворили в 25 мл бензола и обработали смесью 1.2 мл (0.008 моль) N-диэтиламиноэтанола и 1.12 мл (0.008 моль) триэтиламина. Реакционную смесь нагревали при 80°C в течение 2 ч, затем охлаждали. Выпавший осадок (гидрохлорид триэтиламина) отфильтровали и промыли горячим бензолом. Объединенный фильтрат сконцентрировали в вакууме досуха, остаток промыли гексаном и сушили в вакууме. К раствору полученного продукта в 10 мл ацетона прибавили 2 мл (~30%) эфирного раствора хлористого водорода. Реакционную смесь сконцентрировали в вакууме досуха, остаток кристаллизовали из 2-пропанола. Получено 1.9 г (85.2%) соединения **1** с  $T_{пл}$  237–240°C и следующими физико-химическими характеристиками.

**ИК (KBr,  $\nu$ ,  $cm^{-1}$ )**

859, 1041, 1114, 1148, 1197, 1303, 1393, 1426, 1449, 1483, 1650, 1694 (C=O), 2354–2700, 2942, 3397, 3588 (рис. 3).

**Спектр  $^1H$ -ЯМР (200 МГц, ДМСО)**

$\delta$  10.76 (уш. с, 1H), 10.23 (уш. с, 1H), 8.03 (с, 1H), 7.65 (с, 1H), 4.87 (д,  $J = 4.8$  Hz, 2H), 4.76 (т,  $J = 5.1$  Hz, 2H), 3.95 (с, 3H), 3.93 (с, 3H), 3.61 (м, 2H), 3.50–3.06 (м, 8H), 2.15–1.33 (м, 6H), 1.26 (т,  $J = 7.2$  Hz, 6H) (рис. 4).

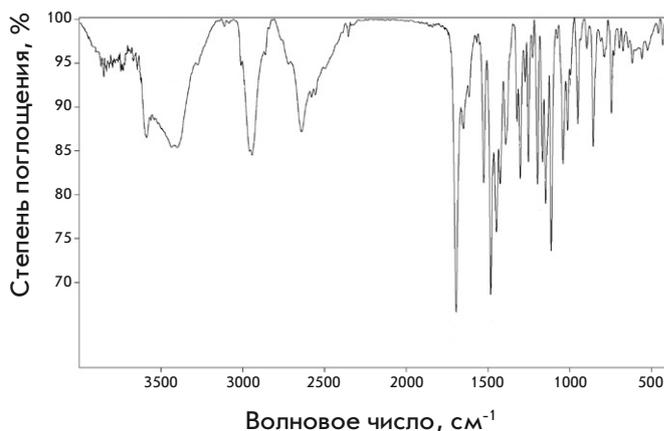


Рис. 3. ИК-спектр соединения **1**

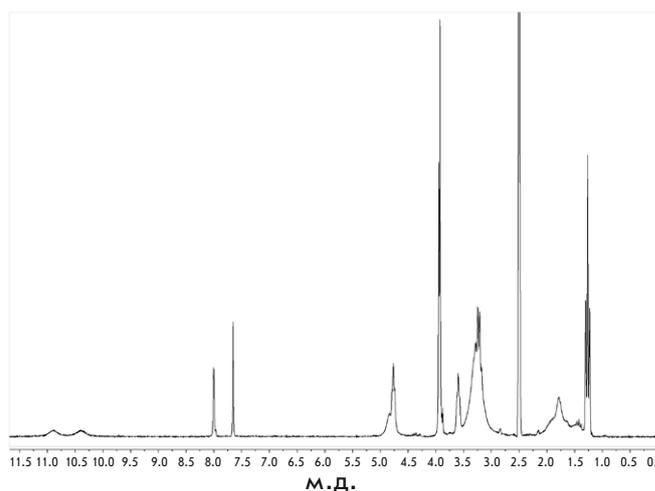


Рис. 4.  $^1H$ -ЯМР-спектр соединения **1**

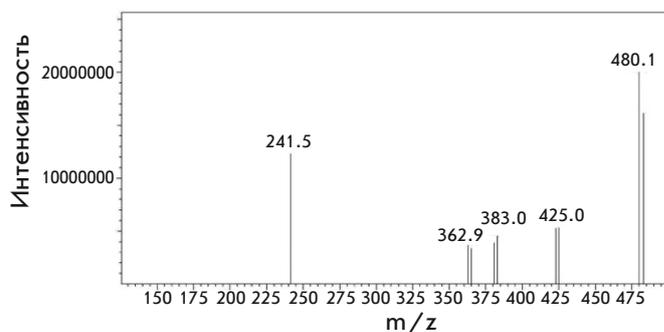


Рис. 5. Масс-спектр соединения **1**

**Масс-спектр**

HRMS (ESI): найдено  $m/z$  480.1860 [M+H]; вычислено для  $C_{23}H_{35}BrN_3O_3 + 480.1862$  (рис. 5).

**Элементный анализ**

Найдено: % С 49.89, Н 6.76, N 7.48; Вычислено: % С 49.92, Н 6.56, N 7.59;  $C_{23}H_{36}BrCl_2N_3O_3$ .

**Растворимость** соединения **1** определяли в соответствии с Общей фармакопейной статьей (ОФС.1.2.1.0005.15) [9] и заключили, что дигидрохлорид 6-бром-1-метил-5-метокси-2-(1-пиперидинометил)-3-(2-диэтиламиноэтокси)карбонилдола **1** относится к легко растворимым.

### Клетки

В эксперименте использовали перевиваемую линию клеток почки африканской зеленой мартышки (*Chlorocebus aethiops*) Vero E6, клеточную линию 293T (субклон трансформированной эмбриональной линии клеток почки человека, НЕК 293, которая хорошо подвергается трансфекции и поддерживает высокие уровни экспрессии вирусного белка), а также клеточную линию мышинных фибробластов L-929. Все линии клеток предоставлены Всероссийской коллекцией клеточных культур при ФГБУ «НИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи» Минздрава России.

### Животные

Беспородные белые мыши (самцы весом 12,0–14,0 г) получены из питомника ООО «НЭО Маркет» (вет. свидетельство 250 № 0679392). Эксперименты проводили в соответствии с правилами, принятыми Европейской Конвенцией по защите позвоночных животных, используемых в экспериментальных и иных научных целях [10].

Животных распределяли на группы (интактную и четыре экспериментальных по три мыши в каждой) методом случайной выборки с учетом массы тела. Содержание, питание, уход за животными и выведение их из эксперимента осуществляли в соответствии с Правилами лабораторной практики, принятыми в Российской Федерации [11]. Протокол исследования № 43 от 03.05.23 был рассмотрен и одобрен этическим комитетом Центра.

### Вирусы

Пандемический штамм коронавируса человека SARS-CoV-2 с инфекционной активностью  $10^6$  ТЦИД<sub>50</sub>/мл для клеток Vero E6 (клинический изолят: hCoV-19/Russia/Moscow-PMVL-12/2020 (EPI\_ISL\_572398)); вирус энцефаломиокардита мышей (ВЭМК), штамм «Колумбия SK-Col-SK» с титром  $10^7$  ТЦИД<sub>50</sub>/мл. Вирусы получены из Государственной коллекции вирусов Института вирусологии им. Д.И. Ивановского ФГБУ «НИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи» Минздрава России.

### Определение цитотоксичности соединения (1)

Культуру клеток Vero E6 в питательной среде DMEM компании Gibco (Thermo FS) с добавлени-

ем 5% ЭТС (5 об. %), L-глутамин (2 мМ) и смеси антибиотиков (150 Ед/мл пенициллина и 150 Ед/мл стрептомицина) высевали в тест-планшеты в присутствии соединения **1** и без него и инкубировали в течение 96 ч при температуре  $37 \pm 0,5^\circ\text{C}$  в атмосфере 5% CO<sub>2</sub>. Состояние монослоя и жизнеспособность клеток оценивали ежедневно. Затем удаляли культуральную среду из планшетов и в каждую лунку к монослою культуры клеток добавляли по 100 мкл среды РС (среда DMEM с 2% ЭТС Gibco (Thermo FS)) и 20 мкл раствора CellTiter 96@ Aqueous One Solution Cell Proliferation Assay (MTS) (Promega, G3582) [12]. Инкубировали в течение 3 ч при  $37 \pm 0,5^\circ\text{C}$ , результаты учитывали на автоматическом ридере BIO-RAD при длине волны 490 нм, используя референс-фильтр 630 нм. Концентрацию раствора соединения **1**, вызывающую уменьшение значения оптической плотности при  $\lambda = 490$  нм на 50% по сравнению с контролем, принимали за 50% цитотоксическую дозу (CC<sub>50</sub>).

### Проведение эксперимента по определению противовирусной активности

Использовали 24-часовой монослой культуры клеток, предварительно промытый средой РС, который обрабатывали нетоксичными для клеток концентрациями соединения **1** (т.е. ниже, чем величина CC<sub>50</sub>). Клетки Vero E6 обрабатывали вирусом SARS-CoV-2 через 60 мин после внесения соединения **1**. Использовали следующие контроли: положительный контроль – культура клеток, инфицированная различными разведениями SARS-CoV-2 (от  $10^{-1}$  до  $10^{-7}$ ), без соединения **1**; негативный контроль 1 – неинфицированная культура клеток без соединения **1**; негативный контроль 2 – неинфицированная культура клеток, в которую вносили по 100 мкл растворов соединения **1** в различных концентрациях. Каждую концентрацию соединения **1** исследовали в четырех параллелях. Тест-планшеты инкубировали в течение 96 ч при температуре  $37 \pm 0,5^\circ\text{C}$  в атмосфере 5% CO<sub>2</sub> до полного проявления ЦПД вируса в вирусном контроле в ожидаемом диапазоне. Противовирусную активность соединения **1** определяли визуально под микроскопом через 96 ч после инфицирования по ингибированию ЦПД вируса в культуре клеток Vero E6. За титр вируса принимали величину, обратную последнему разведению, в котором развивалось ЦПД. ТЦИД<sub>50</sub> рассчитывали по методу Рида–Менча для каждой концентрации исследуемого препарата и контрольного титрования вируса. Результат оценивали по  $\Delta\lg_{\max}$  – максимальному снижению значения заражающей вирусной дозы в опыте по сравнению с контролем, выраженному в десятичных логарифмах. За ми-

нимально эффективную вирусингибирующую концентрацию принимали концентрацию соединения **1**, снижающую титр вируса не менее чем на 1.5 lg. Для получения статистически значимых результатов эксперименты проводили трижды.

### Определение эффективности ингибирования синцитиеобразования

Клетки 293Т котрансфицировали в течение 48 ч плазмидой, содержащей полноразмерный S-гликопротеин (pVAX-1-S-glycoprotein; «Евроген», Россия), и плазмидой, кодирующей GFP (pUCHR-IRES-GFP), с помощью Transporter™ 5 transfection reagent. Далее к выращенному в 96-луночных планшетах монослою клеток Vero E6 добавляли различные концентрации соединения **1**, после чего в лунки вносили суспензию эффекторных клеток 293Т-S-GFP (соотношение клеток 3 : 1). Через 2 ч количество образовавшихся синцитиев оценивали с помощью флуоресцентной микроскопии. Эффективность подавления слияния клеток, индуцированного S-гликопротеином SARS-CoV-2, оценивали по сравнению с контролем (без внесения соединения) с помощью программного обеспечения GraphPadPrism 5.0 и выражали в процентах.

### Определение ИФН-индуцирующей активности

Забор крови у животных проводили методом декапитации в пробирки без антикоагулянта через 2, 24, 48, 72 ч после однократного внутривенного введения соединения **1** в дозе 121.2 мкмоль/мышь (70 мкг/мышь) или 0.2 мл дистиллированной воды (плацебо, контроль без препарата). Активность ИФН в сыворотке крови мышей определяли на клеточной линии мышинных фибробластов L-929. В работе использовали трехдневный монослой перевиваемой клеточной линии L-929, выращенный на среде 199 и DMEM (1 : 1) с добавлением 7% ЭТС, L-глутамина и антибиотиков: 150 Ед/мл пенициллина и 150 Ед/мл стрептомицина. ИФН в сыворотке крови определяли при титровании проб в культуре фибробластов L-929 мыши с использованием в качестве индикаторного вируса ВЭМК мыши, находя конечное разведение ИФН, которое защищало 50% клеток от цитопатогенного действия 100 ТЦИД<sub>50</sub> вируса.

### Статистический анализ

Расчет значений 50% цитотоксической концентрации (CC<sub>50</sub>) и 50% эффективной концентрации (IC<sub>50</sub>) выполняли общепринятыми для биологических исследований методами при помощи пакета программ Microsoft Excel 5.0 и GraphPad Prism 6.01. За рабочую модель для анализа CC<sub>50</sub> принимали 4-параметрическое уравнение логистической кривой (пункты

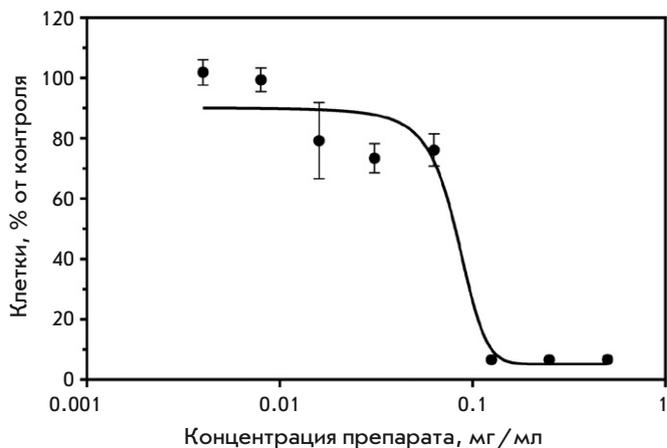


Рис. 6. Определение цитотоксического действия соединения **1** через 96 ч после добавления к культуре клеток Vero E6 (с использованием витального красителя MTS). CC<sub>50</sub> = 83.32 мкг/мл

меню «Нелинейная регрессия» – «Sigmoidal dose-response (variable slope)»). Для анализа IC<sub>50</sub> принимали 4-параметрическое уравнение логистической кривой (пункты меню «Нелинейная регрессия» – «log (inhibitor) vs. response (variable slope)»). На основании полученных данных рассчитывали индекс селективности (SI) по уравнению:  $SI = CC_{50} / IC_{50}$ .

## РЕЗУЛЬТАТЫ

### Определение цитотоксичности соединения **1**

На основании данных, полученных при изучении цитотоксического действия соединения **1** на культуру клеток Vero E6 с использованием витального красителя MTS, построили аналитическую кривую, из которой определили значение CC<sub>50</sub> для соединения **1**. Концентрация, уменьшающая значение оптической плотности на 50% по сравнению с контролем, составила 83.32 мкг/мл (144.30 мкМ) (рис. 6).

### Определение противовирусной активности соединения **1**

Противовирусную активность соединения **1** определяли по снижению инфекционного титра вируса (ТЦИД<sub>50</sub>/мл) в культуре клеток Vero E6 (табл. 1).

Как видно из табл. 1, исследуемое соединение обладает достоверной дозозависимой антивирусной активностью *in vitro*, что указывает на специфический характер действия соединения, и полностью подавляет репродукцию вируса SARS-CoV-2 при концентрации 52.0 мкМ (30 мкг/мл), т.е. на 6 lg ТЦИД<sub>50</sub>. В вирусологических исследованиях противовирусный эффект лекарственных средств

Таблица 1. Действие соединения 1 на репродукцию SARS-CoV-2

Концентрация соединения 1, мкМ (мкг/мл)	ТЦИД <sub>50</sub>	Контроль вируса	$\Delta \lg_{\max}$ максимальное снижение заражающей вирусной дозы в опыте по сравнению с контролем, выраженное в десятичных логарифмах
52.0 (30.0)	10 <sup>0</sup>	10 <sup>6</sup>	6
26.0 (15.0)	10 <sup>1</sup>	10 <sup>6</sup>	5
13.0 (7.5)	10 <sup>3</sup>	10 <sup>6</sup>	3

Примечание: ТЦИД<sub>50</sub> – 50% тканевая цитопатогенная инфекционная доза.

Таблица 2. Активность ИФН в сыворотке крови мышей

Время после введения соединения 1 или плацебо мышам, ч	Титр ИФН (Ед/мл)	
	Соединение 1 (70 мкг/мышь)	Плацебо (контроль без препарата)
2	40	< 4
24	20	
48	20	
72	20	

принято считать удовлетворительным, если  $\Delta \lg$  ТЦИД<sub>50</sub>  $\geq 2.0$  [13].

Значение IC<sub>50</sub> для изучаемого соединения, рассчитанное с помощью программного обеспечения GraphPadPrism 6.01, составило 1.84 мкМ (1.06 мкг/мл). Значение индекса селективности (SI), рассчитанное как отношение CC<sub>50</sub> к IC<sub>50</sub> ( $SI = CC_{50}/IC_{50}$ ), составило 78.6.

### Исследования эффективности ингибирования синцитиеобразования, индуцированного шиповидным белком (S-гликопротеином) вируса SARS-CoV-2

Проведены дополнительные исследования в системе синцитиеобразования, опосредованного шиповидным белком (S-гликопротеином) SARS-CoV-2. Обнаружено подавление синцитиеобразования, индуцированного шиповидным белком (S-гликопротеином) SARS-CoV-2, на 89%.

### Определение интерферон (ИФН)-индуцирующего действия соединения 1

Результаты титрования представлены в табл. 2.

Показано, что соединение 1 обладало ИФН-индуцирующей активностью при его однократном внутрибрюшинном введении в дозе 121.2 мкмоль/мышь (70 мкг/мышь).

### ОБСУЖДЕНИЕ

Коронавирус, открытый и описанный в 60-х гг. прошлого столетия, не привлекал к себе значительного

внимания, поскольку вызывал легко протекающие острые респираторные инфекции [14, 15]. Однако пандемия коронавирусной инфекции COVID-19 изменила отношение к коронавирусам и привела к поиску противовирусных средств, эффективных в отношении SARS-CoV-2. Поиск и разработка лекарственных средств для применения при пандемической коронавирусной инфекции тесно связаны с точкой приложения к вирусной репродукции и эффектам его действия при лечении больных. Исходя из последних опубликованных данных, инфекцию SARS-CoV-2 разделяют на четыре стадии, связанные с различными требованиями к лекарственным препаратам [16–18]. Так, стадия до контакта с SARS-CoV-2 предпочтительна для профилактической вакцинации, нейтрализующих антител и профилактических противовирусных препаратов. На следующей стадии, когда произошло заражение и идет репликация вируса, эффективно применение антител и противовирусных внутривенных и/или пероральных препаратов. К настоящему времени установлено, что эффект от лечения наблюдается, если антитела против SARS-CoV-2 вводить в течение 10 дней после появления симптомов [19, 20]; а пероральные противовирусные препараты могут оказывать эффект в течение 3–5 дней после появления симптомов [17, 21]. Известно, что репродукция вируса SARS-CoV-2 возрастает примерно в течение 3–5 дней после появления клинических симптомов, а затем снижается в течение двух-трех дней. Последующие клинические события связаны с на-

рушением регуляции иммунного ответа на SARS-CoV-2 [22]. Однако у некоторых больных рецидивы симптомов COVID-19 и наличие вируса выявляли значительно позже, что свидетельствовало о сохранности и репродукции вируса в отдельных компартментах на поздних сроках [23]. Таким образом, стало понятно, что для подавления реактивации вируса на поздних сроках заболевания также необходим доступный пероральный противовирусный и иммуномодулирующий низкомолекулярный препарат, который можно использовать при реактивации инфекции.

Обширный поиск позволил выявить значительное число соединений с анти-SARS-CoV-2-активностью в доклинических и клинических исследованиях (низкомолекулярные соединения, моноклональные антитела, ингибиторы пептидов, макромолекулярные ингибиторы, а также использование РНК-терапии и клеточной терапии) [24–26].

Имеющиеся противовирусные химиотерапевтические препараты, подавляющие вирусную репродукцию, в том числе аномальные нуклеозиды, ингибиторы вирусспецифических белков и ферментов, в отличие от вакцин, как правило, эффективны в отношении большего круга патогенных вирусов. Однако в ходе их применения нередко развиваются побочные эффекты и также формируются резистентные штаммы вируса, что приводит к рецидиву и обострению заболевания [27, 28].

Одним из широко используемых отечественных противовирусных препаратов является умифеновир (Арбидол, международное наименование Umifenovirum) [29], который включен в методические рекомендации по профилактике и лечению COVID-19 [18]. По данным Leneva и соавт. [30], умифеновир обладает противовирусным действием и ингибирует слияние вирусной оболочки с клеточными мембранами. Это приводит к невозможности проникновения вируса в клетку и подавлению его репродукции. Показано, что умифеновир ингибирует репликацию SARS-CoV-2 в клетках Vero E6 [31, 32]. Однако низкая биодоступность и нерастворимость в воде ограничили терапевтическую эффективность Арбидола и не позволили ему занять лидирующие позиции среди противоковидных лекарственных препаратов [33, 34].

Лекарственный препарат, который предполагается разработать на основе дигидрохлорид 6-бром-

1-метил-5-метокси-2-(1-пиперидинометил)-3-(2-диэтиламиноэтокси)карбонилндола, по-видимому, будет направлен предпочтительно на профилактику заражения и подавление репродукции SARS-CoV-2. Именно на этой стадии необходимо подавить репликацию и репродукцию вируса в соседних клетках и стимулировать реакции врожденного иммунитета путем активации рецепторов и индукции системы интерферона. По-видимому, этому может содействовать способность соединения в концентрации 52.0 мкМ полностью подавлять репродукцию вируса SARS-CoV-2 в клетках и обнаруженный эффективный механизм ингибирования синцитиеобразования, индуцированного шиповидным белком (S-гликопротеином) вируса SARS-CoV-2. Выявленная способность соединения индуцировать интерфероны, по-видимому, может свидетельствовать о его потенциале активировать систему интерферона и реакции врожденного иммунитета, что также позволяет использовать разрабатываемый препарат для подавления происходящих при COVID-19 следующих друг за другом этапов иммунной дисрегуляции.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Полученные результаты демонстрируют противовирусный эффект синтезированного соединения **1** в отношении SARS-CoV-2 в исследованиях *in vitro*. В концентрации 52.0 мкМ данное соединение полностью ингибирует репродукцию вируса SARS-CoV-2 с инфекционной активностью  $10^6$  ТЦИД<sub>50</sub>/мл. Концентрационные зависимости свидетельствуют о специфичности действия исследуемого соединения и указывают на перспективность разработанного соединения и возможность дальнейшего его изучения *in vivo* на экспериментальных животных. Соединение **1**, благодаря его синтетической доступности, высокой активности ( $IC_{50} = 1.06$  мкг/мл) и высокого индекса селективности ( $SI = 78.6$ ), отвечает требованиям, необходимым для разработки противовирусного средства для профилактики и лечения COVID-19. ●

*Работа выполнена в рамках государственного задания Министерства здравоохранения Российской Федерации (тема № 056-00119-21-00).*

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- ВОЗ объявила об окончании пандемии коронавируса. <https://www.rbc.ru/society/05/05/2023/645503499a79477d05bf2bb4><https://www.rbc.ru/society/05/05/2023/645503499a79477d05bf2bb4>
- WHO Coronavirus (COVID-19) Dashboard (WHO, accessed 12.06.2023); <https://covid19.who.int/>
- LIVE: Media briefing on COVID-19 and global health issues. World Health Organization (WHO). <https://www.youtube.com/watch?v=B0oBevft4bs>

4. Crook H., Raza S., Nowell J., Young M., Edison P. // *BMJ*. 2021. V. 374. № 1648. P. 1–18.
5. Coopersmith C.M., Antonelli M., Bauer S.R., Deutschman C.S., Evans L.E., Ferrer R., Hellman J., Jog S., Kesecioglu J., Kissoon N., et al. // *Crit. Care Med*. 2021. V. 49. № 4. P. 598–622.
6. Good S.S., Westover J., Jung K.H., Zhou X.J., Moussa A., La Colla P., Collu G., Canard B., Sommadossi J.P. // *Antimicrob. Agents Chemother*. 2021. V. 65. № 4. P. e02479–20.
7. Филимонова М.В., Цышкова Н.Г., Наровлянский А.Н., Маринченко В.П., Коваль Л.С., Парфенова Т.М., Измestьева А.В., Ершов Ф.И. Патент RU 2552422 С2. Российская Федерация. МПК C07D209/42(2006.01); A61K31/404(2006.01); A61P31/12(2006.01). 2015.
8. Trofimov F.A., Tsyshkova N.G., Grinev A.N. // *Chem. Heterocycl. Compd*. 1973. V. 9. P. 282–285.
9. Общая фармакопейная статья (ОФС.1.2.1.0005.15). Государственная фармакопея Российской Федерации. 14 изд. Т. 1. М., 2015. <https://pharmacopoeia.ru/ofs-1-2-1-0005-15-rastvorimost/>
10. European Convention for the Protection of Vertebrate Animals Used for Experimental and other Scientific Purposes (ETS 123). // Strasbourg, 1986. 11 p.
11. ГОСТ. Руководство по содержанию и уходу за лабораторными животными. Правила оборудования помещений и организации процедур; Guidelines for accommodation and care of animals. Environment, housing and management. МКС 13.020.01. Дата введения 2016-07-01. <https://docs.cntd.ru/document/1200127789>
12. CellTiter 96® Aqueous One Solution Cell Proliferation Assay (MTS) («Promega», G3582). Instructions for use of products G3580, G3581 and G3582. Technical Bulletin.
13. Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных средств // под ред. Миронова А.Н. Ч. 1. М.: Гриф и К, 2012. С. 527–551.
14. Tyrrell D.A.J., Bynoe M.L. // *Br. Med. J*. 1965. V. 1. P. 1467–1470.
15. Almeida J.D., Berry D., Cunningham C., Hamre D., Hofstad M.S., Mallucci L., McIntosh K., Tyrrell D.A.J. // *Nature*. 1968. V. 220. № 16. P. 650.
16. Cascella M., Rajnik M., Aleem A., Dulebohn S.C., Di Napoli R. Features, Evaluation and Treatment Coronavirus (COVID-19). // *StatPearls [Internet]*. Treasure Island (FL): StatPearls Publ., 2023.
17. Toussi S.S., Hammond J.L., Gerstenberger B.S., Andersen A.S. // *Nat. Microbiol*. 2023. V. 8. P. 771–786.
18. Временные методические рекомендации. «Профилактика, диагностика и лечение новой коронавирусной инфекции (COVID-19). Версия 17 (09.12.2022)».
19. Fact Sheet for Health Care Providers Emergency Use Authorization (EUA) of Bamlanivimab and Etesevimab. Eli Lilly and Company, 2022.
20. Fact Sheet for Health Care Providers Emergency Use Authorization (EUA) of REGEN-COV (Casirivimab and Imdevimab). Regeneron, 2022.
21. Petty L.A., Malani P.N. // *JAMA*. 2022. V. 327. № 24. P. 2464.
22. Vetter P., Eberhardt C.S., Meyer B., Murillo M., Torriani G., Pigny F., Lemeille S., Cordey S., Laubscher F., Vu D.L. et al. // *mSphere*. 2020. V. 5. № 6. P. e00827–20.
23. Deo R., Choudhary M.C., Moser C., Ritz J., Daar E.S., Wohl D.A., Greninger A.L., Eron J.J., Currier J.S., Hughes M.D., et al. // *Ann. Intern. Med*. 2023. V. 176. № 3. P. 348–354.
24. Li G., Hilgenfeld R., Whitley R., De Clercq E. // *Nat. Rev. Drug Discov*. 2023. V. 22. № 6. P. 449–475.
25. Zaki M.M., Lesha E., Said K., Kiaee K., Robinson-McCarthy L., George H., Hanna A., Appleton E., Liu S., Ng A.H.M., et al. // *Sci. Adv*. 2021. V. 7. № 33. P. eabg5995.
26. Meganck R.M., Baric R.S. // *Nat. Med*. 2021. V. 27. № 3. P. 401–410.
27. Samson M., Pizzorno A., Abed Y., Boivin G. // *Antiviral Res*. 2013. V. 98. № 2. P. 174–185.
28. Wyles D.L. // *J. Infect. Dis*. 2013. V. 207. № 1. P. 33–39.
29. WHO Collaborating Centre for Drug Statistics Methodology. J05 Antivirals for systemic use. J05AX Other antivirals. [https://www.whocc.no/atc\\_ddd\\_index/?code=J05AX](https://www.whocc.no/atc_ddd_index/?code=J05AX).
30. Leneva I.A., Russell R.J., Boriskin Y.S., Hay A.J. // *Antiviral Res*. 2009. V. 81. № 2. P. 132–140.
31. Leneva I., Kartashova N., Poromov A., Gracheva A., Korchevaya E., Glubokova E., Borisova O., Shtro A., Loginova S., Shchukina V., et al. // *Viruses*. 2021. V. 13. № 8. P. 1665.
32. Ge Y., Tian T., Huang S., Wan F., Li J., Li S., Wang X., Yang H., Hong L., Wu N., et al. // *Signal Transduct. Target Ther*. 2021. V. 6. № 1. P. 165.
33. Chen C., Zhang Y., Huang J., Yin P., Cheng Z., Wu J., Chen S., Zhang Y., Chen B., Lu M., et al. // *Front. Pharmacol*. 2021. V. 12. P. 683296.
34. Арчаков А.И., Гусева М.К., Учайкин В.Ф., Ипатова О.М., Доцицин Ю.Ф., Тихонова Е.Г., Медведева Н.В., Прозоровский В.Н., Стрекалова О.С., Широин А.В. Патент РСТ/WO2010128889A1, РФ. МПК А61К9/19. 2010.

УДК 577.29

# Производное красителя BODIPY для необратимого флуоресцентного маркирования эукариотических клеток и их одновременного цитометрического анализа

А. Ю. Фролова, С. В. Кутяков, В. И. Мартынов, С. М. Деев, А. А. Пахомов\*

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

\*E-mail: alpah@mail.ru

Поступила в редакцию 19.10.2023

Принята к печати 03.11.2023

DOI: 10.32607/actanaturae.26879

**РЕФЕРАТ** В настоящей работе мы синтезировали производное зеленого флуоресцентного красителя 1,3,5,7-тетраметил-BODIPY с гептильным заместителем в 8-положении. Полученное высокогидрофобное соединение было способным быстро и необратимо связываться с эукариотическими клетками. Инкубация клеток с красителем в течение различного времени либо при различных концентрациях позволила контролировать степень их мечения и уровень флуоресценции. Это позволило нам модулировать уровень флуоресценции различных культур эукариотических клеток и потом различать их по уровню флуоресцентного сигнала в зеленом канале в цитометрических экспериментах. Помеченные клетки можно объединить и далее тестировать в одной пробирке в идентичных условиях с использованием каналов, в которых краситель не флуоресцирует. Этот подход протестирован на ряде культур опухолевых клеток, содержащих рецептор HER2 на своей поверхности. Представленность рецептора в этих клетках была проанализирована в одной пробирке за один прием с использованием лиганда к HER2 на основе гибридного белка DARPIn9\_29-mCherry, флуоресцирующего в красной области спектра.

**КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА** флуоресценция, хромофор, цитометрия, проточная цитофлуориметрия, BODIPY, мечение клеток, клеточный анализ.

**СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ** BDP-C7 – 8-гептил-1,3,5,7-тетраметил-BODIPY; BODIPY – 4,4-дифтор-4-бор-3а,4а-диазо-s-индацен; DARPIn – искусственный белок с анкириновыми повторами (Designed Ankyrin Repeat Protein); HER2 – рецептор 2 эпидермального фактора роста человека.

## ВВЕДЕНИЕ

Проточная цитофлуориметрия – это метод, широко применяемый при изучении функционирования живых систем, разработке новых лекарств, а также в медицине для анализа образцов и выборе стратегии лечения. Метод основан на мечении клеток флуоресцентными красителями, часто конъюгированными с адресными белками (к примеру, антителами) к различным поверхностным маркерам, что позволяет фенотипировать клетки в популяции [1, 2]. Часто при анализе приходится сравнивать культуры клеток друг с другом, к примеру, оценивать параметры клеток в сравнении с контрольными образцами. В этом случае проводится параллельный анализ образцов в одинаковых условиях. Однако обеспечить полностью идентичные условия

при подготовке клеточных образцов от эксперимента к эксперименту невозможно, учитывая неизбежные ошибки пробоподготовки, связанные с пипетированием, возможно также влияние человеческого фактора.

В настоящей работе разработан подход, позволяющий анализировать в одной пробирке сразу несколько культур клеток, даже если исходно они не отличаются по параметрам, детектируемым цитометрическим методом. Для этого разные образцы клеток предварительно окрашивают неспецифическим красителем так, чтобы каждая из анализируемых культур обладала разной интенсивностью флуоресценции в одном из каналов детекции цитометра. Это возможно, если обработать клетки липофильным красителем, неспецифически связывающимся

с мембранными структурами клетки, в течение разного времени либо при разной концентрации.

### ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

#### Синтез 8-гептил-4,4-дифтор-1,3,5,7-тетраметил-4-бор-3а,4а-диазаиндацена (BDP-C7)

Октаноилхлорид (1 мл, 10 ммоль) и 2,4-диметилпиррол (650 мг, 4 ммоль) последовательно растворяли в сухом дихлорметане (50 мл), предварительно продутом аргоном. Смесь перемешивали в течение 3 ч при комнатной температуре в атмосфере аргона. Затем добавляли триэтиламин (3 мл, 22 ммоль) и через 15 мин при 0°C порционно (за 3 раза) добавляли эфират трифторида бора (3 мл, 24 ммоль). Смесь далее перемешивали при 0°C в течение 3 ч. После окончания реакции полученную смесь пропустили через короткую колонку, заполненную силикагелем, в качестве элюента использовали толуол. Растворитель упаривали, продукт реакции выделяли колоночной хроматографией на силикагеле с использованием толуола в качестве элюента. Выход 558 мг (40%). <sup>1</sup>H-NMR (400 МГц, CDCl<sub>3</sub>): δ 0.89 (t, 3H, CH<sub>3</sub>CH<sub>2</sub>), 1.31 (m, 6H, CH<sub>3</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>), 1.48 (m, 2H, CCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>), 1.63 (m, 2H, CCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>), 2.41 (s, 6H, CH<sub>3</sub>), 2.51 (s, 6H, CH<sub>3</sub>), 2.92 (t, 2H, CCH<sub>2</sub>), 6.05 (s, 2H, CH). <sup>13</sup>C-NMR (101 МГц, CDCl<sub>3</sub>): δ 14.0, 14.4, 16.3, 22.6, 28.5, 29.0, 30.4, 31.7, 31.9, 76.7, 77.0, 77.3, 121.5, 131.4, 140.3, 146.7, 153.7. <sup>19</sup>F-NMR (376 МГц, CDCl<sub>3</sub>): δ 146.66 (q, J <sup>19</sup>F-<sup>11</sup>B = 32.3 Гц).

#### Спектрофотометрия

Спектры поглощения и эмиссии флуоресценции измеряли с использованием спектрофотометра Cary50 Bio (Varian) и спектрофлуориметра Cary Eclipse (Varian) соответственно. Квантовый выход флуоресценции измеряли с использованием гомологичного производного BODIPY: 8-децен-1,3,5,7-тетраметил-BODIPY [3–5], в качестве стандарта (квантовый выход стандарта в DMSO считали равным 0.99).

#### Клеточные культуры

Клетки аденокарциномы молочной железы человека SKBR3, сверхэкспрессирующие онкомаркер HER2 [6], модифицированные клетки карциномы молочной железы мыши EMT6/P, сверхэкспрессирующие HER2 (EMT-HER2) [7], а также клетки рака шейки матки человека HeLa с нормальным уровнем экспрессии HER2 [8] культивировали в среде DMEM (Gibco, Thermo Fisher Scientific, Inc., США), содержащей 10% фетальной бычьей сыворотки (FBS, Gibco, Thermo Fisher Scientific, Inc.), 100 ед/мл пенициллина, 0.1 мг/мл стрептомицина и 0.25 мкг/мл амфотерицина (Gibco, Thermo Fisher Scientific, Inc.),

при 37°C и 5% CO<sub>2</sub> в условиях повышенной влажности. Питательную среду обновляли каждые 2 дня. При культивировании использовали раствор Версена (PBS и 0.02% EDTA).

#### Проточная цитофлуориметрия

Клетки SKBR3, EMT-HER2 и HeLa снимали раствором Версена, осаждали при 125 g в течение 5 мин, удаляли супернатант и добавляли к клеткам PBS, содержащий 10% FBS, до концентрации 5×10<sup>3</sup> клеток/мкл. Затем к 3 мкл клеточной суспензии добавляли 100 мкл раствора красителя **BDP-C7** в заданной концентрации в PBS, содержащем 1% ДМСО. Клетки инкубировали при комнатной температуре в течение заданного времени, осаждали при 500 g в течение 30 с и удаляли супернатант. Далее к клеткам либо добавляли 100 мкл PBS и проводили цитометрический анализ, либо добавляли раствор PBS, содержащий 1 мкМ белка DAPI-mCherry, инкубировали в течение 5 мин и после осаждения, удаления раствора белка и добавления 100 мкл PBS проводили цитометрический анализ. Использовали проточный цитофлуориметр Novocyt 3000 VYB (ACEA Biosciences, США). Зеленый канал детекции (FITC): возбуждение лазером 488 нм, детекция эмиссии через светофильтр 530/30 нм; красный канал детекции (PE-Texas Red): возбуждение лазером 561 нм, детекция эмиссии через светофильтр 615/20 нм. Перед анализом уровня флуоресценции клеток сначала проводили отбор событий, соответствующих живым клеткам (гейтинг в каналах A-FSC / A-SSC), а затем отбирали события, соответствующие неагрегированным клеткам (гейтинг в каналах A-FSC / H-FSC) [9].

#### Изучение жизнеспособности клеток

Клетки HeLa, культивируемые в полной питательной среде DMEM, высевали в 96-луночный планшет (10<sup>4</sup> клеток) и растили в течение ночи. Перед тестированием удаляли культуральную среду и вносили 100 мкл свежей, содержащей BDP-C7 в заданной концентрации и 1% ДМСО. Вещество **BDP-C7** было протестировано в диапазоне концентраций от 33 нМ до 20 мкМ в трех повторах. Растворы образцов готовили при помощи последовательного разбавления концентрированного образца в 2.5 раза. К контрольным клеткам добавляли культуральную среду, содержащую 1% ДМСО. Затем проводили инкубацию в течение ночи, отбирали жидкость и вносили в каждую лунку по 100 мкл раствора метилтиазолилдифенилтетразолия бромид (МТТ) концентрацией 5 мг/мл в бессывороточной культуральной среде и далее инкубировали клетки при 37°C в течение 3 ч. Затем супернатант удаляли и добавляли

100 мкл ДМСО для растворения кристаллов формазана. Измеряли оптическую плотность при помощи планшетного ридера Infinite M1000 Pro (Tecan, Австрия) при 570 и 640 нм.

### РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Для демонстрации применимости предлагаемого подхода в качестве красителя выбрали производное 1,3,5,7-тетраметил-BODIPY, содержащего гептильный заместитель в 8-положении (**BDP-C7**, *рис. 1А*). Производные BODIPY характеризуются высокой яркостью и фотостабильностью, обладают узкими полосами возбуждения и эмиссии флуоресценции, что позволяет им минимально «интерферировать» с другими красителями [10–14]. Описаны примеры использования BODIPY, в том числе и в цитометрических задачах [15–17]. Метильные группы в **BDP-C7** защищают хромофор от взаимодействий с внешней средой, а гептильный заместитель повышает гидрофобность красителя и способствует необратимому связыванию красителя с клеточными мембранными структурами. **BDP-C7** синтезировали, начиная с октаноилхлорида, по протоколу, оработанному нами ранее на гомологичных соединениях [3, 18, 19] (*рис. 1А*).

При растворении в ДМСО краситель демонстрировал узкие полосы возбуждения и эмиссии флуоресценции, максимумы поглощения света и эмиссии флуоресценции равнялись 497 и 507 нм соответственно (*рис. 1Б*). Коэффициент экстинкции равнялся  $87300 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ , а квантовый выход флуоресценции – 99%. Таким образом, **BDP-C7** является ярким флуоресцентным красителем и идеально подходит для детекции в «зеленом» канале большинства флуориметрических приборов с возбуждением лазером 488 нм и детекцией в диапазоне 495–525 нм.

Для тестирования окрашивания эукариотических клеток красителем **BDP-C7** использовали клеточную культуру HeLa, широко применяемую в рутинных клеточных экспериментах. Сначала клетки окрашивали при различной концентрации **BDP-C7** в течение небольшого периода времени. Клетки инкубировали в течение 2 мин в PBS, содержащем **BDP-C7** в заданной концентрации и 1% ДМСО. После инкубации несвязавшийся краситель отмывали, клетки анализировали на проточном цитофлуориметре (*рис. 2А,Б*). Из *рис. 2А* видно, что концентрации 1 нМ достаточно, чтобы хорошо отличить обработанные клетки от контрольных необработанных. При 1 мкМ красителя, вероятно, происходит практически максимальное насыщение клетки красителем, обработка большими концентрациями приводит только к незначительному росту уровня флуоресценции. Видно, что образцы, обработанные 1, 10, 100 нМ и 10 мкМ, красителя **BDP-C7** хорошо отличаются друг от друга и от контроля. Таким образом, за счет окрашивания клеток HeLa красителем **BDP-C7** удалось получить пять популяций, хорошо различимых в одном канале детекции. Видно, что число таких популяций можно довести как минимум до шести за счет области в районе 10 нМ.

Обработка образцов клеток красителем **BDP-C7** в одинаковой концентрации, но в течение разного времени (*рис. 2В,Г*) также позволила получить клетки с разным уровнем зеленой флуоресценции, однако этот эффект был не таким значительным. Из *рис. 2В* видно, что увеличение времени инкубации от 1 до 10 мин приводит к увеличению уровня флуоресценции клеток менее чем на порядок, при этом при инкубации в течение 10 мин наблюдается уширение пика за счет плеча в области низких интенсивностей, а с увеличением времени ин-

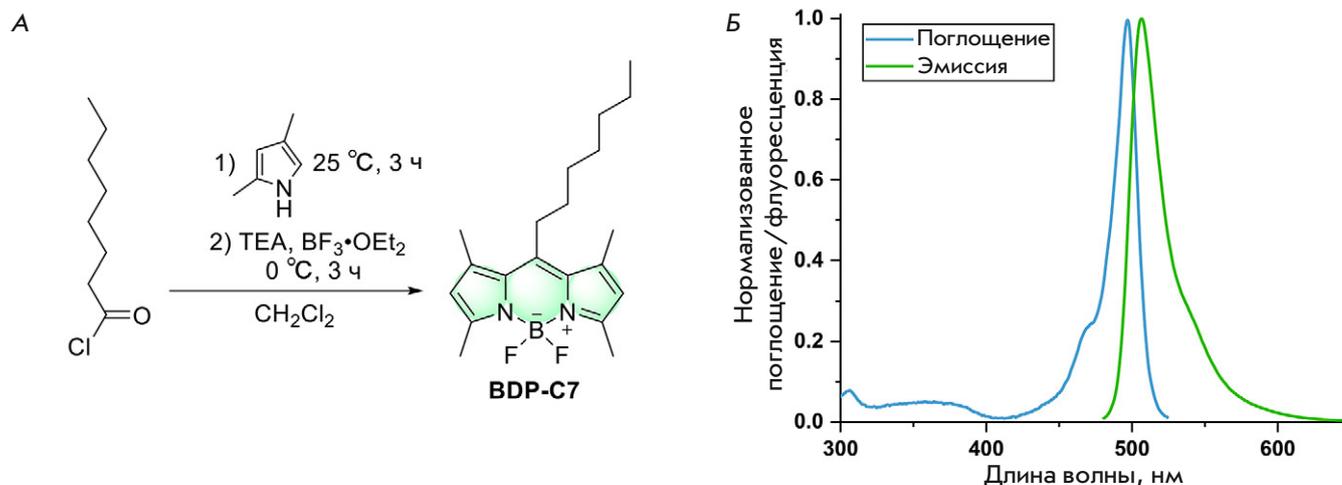
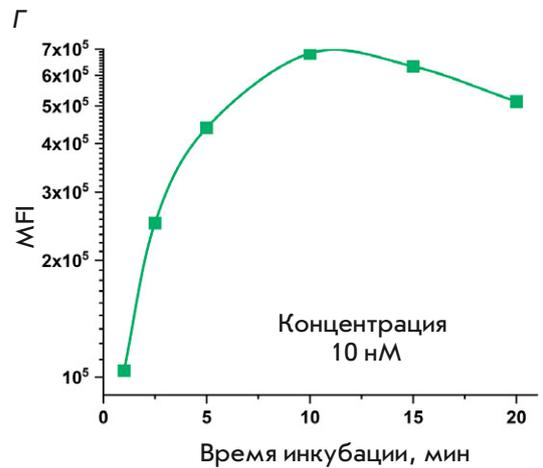
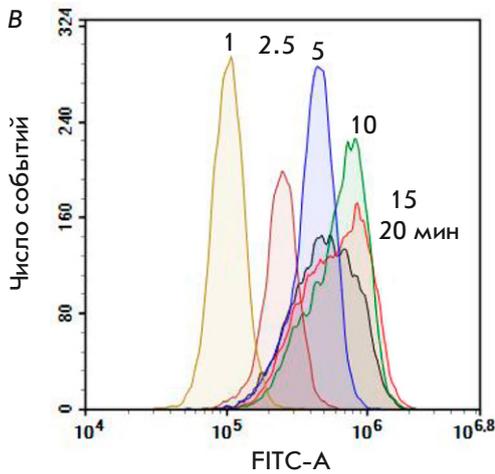
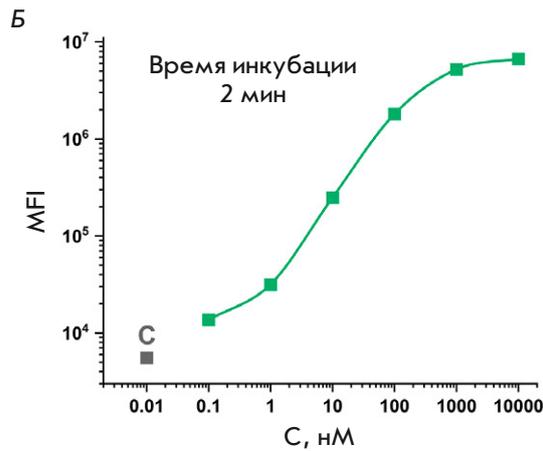
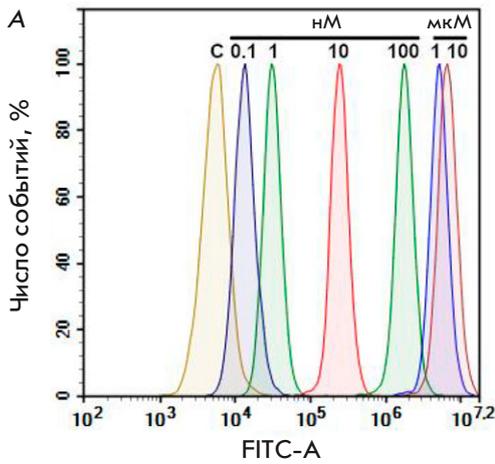


Рис. 1. Синтез красителя **BDP-C7** (А) и его спектры поглощения и эмиссии флуоресценции в ДМСО (Б)



**Рис. 2.** Цитометрический анализ клеток HeLa, обработанных красителем **BDP-C7** в течение 2 мин при концентрации от 0.1 нМ до 10 мкМ (А, Б) и при 10 нМ в течение 1–20 мин (В, Г). С – контрольные клетки, без обработки красителем. Приведены гистограммы интенсивностей в зеленом канале флуоресценции с возбуждением при 488 нм и эмиссией 530/30 нм (А, В) и медианные значения флуоресценции (MFI) клеточных популяций (Б, Г)

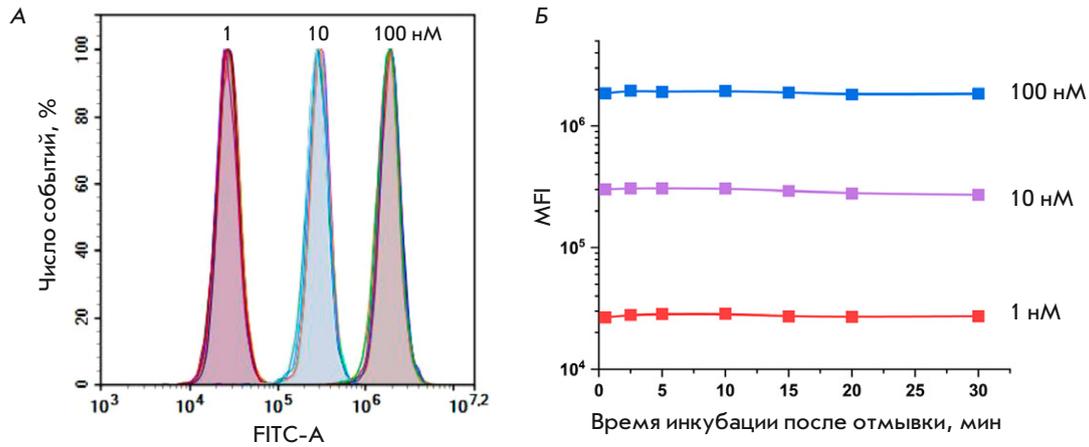
кубации до 15 и 20 мин, помимо уширения пиков, происходит уменьшение медианной флуоресценции клеток. Вероятнее всего, это связано с изменением морфологии клеток за 10–20 мин инкубации в неоптимальных условиях (1% ДМСО в PBS). При других концентрациях **BDP-C7** эффект был аналогичным (данные не показаны). Таким образом, инкубация клеток с красителем более 5 мин лишена практического смысла из-за изменений, происходящих в клетках в неблагоприятных условиях, и возникающего из-за этого уширения пиков, тем более что обработка красителем при разных концентрациях в течение короткого времени позволяет добиться на несколько порядков большей разницы флуоресцентного сигнала клеток (рис. 2А,Б).

Далее мы проверили, происходит ли отмывка красителя и изменение флуоресцентного сигнала после связывания **BDP-C7** с клетками. Для этого после отмывки несвязавшегося красителя клетки инкубировали в PBS в течение различных промежутков времени, а затем анализировали на проточном цитофлуориметре (рис. 3А). Во всех

протестированных образцах уровень флуоресцентного сигнала практически не менялся со временем (рис. 3). Мы не тестировали время более 30 мин, так как обычно такого периода времени достаточно для проведения манипуляций, необходимых для цитофлуориметрического анализа.

Также мы проверили, может ли краситель проявлять цитотоксичность в использованных концентрациях. Цитотоксичность проверяли с использованием стандартного МТТ-теста при концентрациях красителя вплоть до 20 мкМ (рис. 4). **BDP-C7** не проявлял токсичности во всем протестированном диапазоне концентраций.

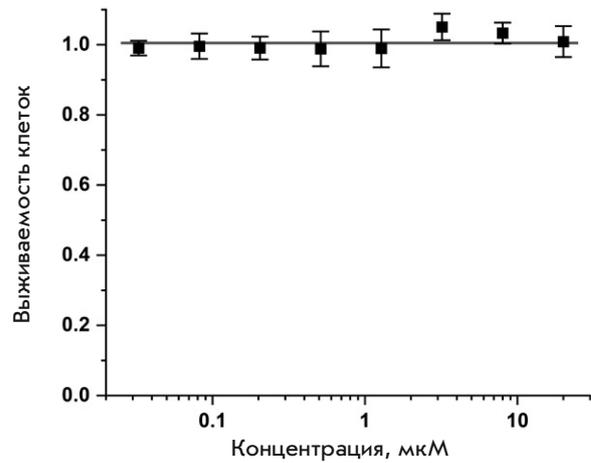
Применимость подхода маркировки клеточных культур с помощью окрашивания зеленым флуоресцентным красителем **BDP-C7** в разных концентрациях мы проверяли на культурах клеток HeLa, SKBR3 и EMT-HER2. Эти клетки отличаются друг от друга уровнем экспрессии поверхностного онкомаркера – рецептора 2 эпидермального фактора роста человека (human epidermal growth factor receptor 2, HER2). Считается, что клетки HeLa со-



**Рис. 3.** Анализ отмывки красителя **BDP-C7** от клеток. Цитометрический анализ клеток HeLa, обработанных красителем в концентрации 1, 10 и 100 нМ в течение 2 мин. Клетки после отмывки от несвязавшегося красителя и инкубации в буфере PBS в течение заданного времени. Приведены гистограммы интенсивностей в зеленом канале флуоресценции (А) и медианные значения флуоресценции (MFI) клеточной популяции (Б) при разном времени инкубации после отмывки

держат небольшое (нормальное) количество HER2 на поверхности [8], тогда как в SKBR3 [6] и искусственно полученных EMT-HER2 рецептор гиперэкспрессирован [7]. Представленность рецептора на поверхности клеток можно проверять с использованием флуоресцентно меченных антител к HER2 [20, 21], а также лигандов на основе искусственных белков с анкириновыми повторами (Designed Ankyrin Repeat Proteins, DARPins). Мы использовали гибридный белок DARPIn9\_29-mCherry [22], где DARPIn9\_29 – это адресный белок, эффективно связывающийся с HER2, а mCherry – красный флуоресцентный белок, обеспечивающий флуоресценцию конструкции в красной области видимого спектра.

Сначала мы по отдельности покрасили клеточные культуры красителем **BDP-C7** и DARPIn9\_29-mCherry, чтобы оценить уровень представленности HER2 на различных культурах. Чтобы отличить клеточные культуры друг от друга в зеленом канале, клетки SKBR3, HeLa и EMT-HER2 обрабатывали 2 мин раствором PBS, содержащим 1% ДМСО и **BDP-C7** в концентрации 1, 10 и 100 нМ соответственно (рис. 5). Из наложения гистограмм флуоресценции клеток в зеленом канале видно, что после окрашивания **BDP-C7** культуры довольно хорошо отличаются друг от друга по уровню флуоресцентного сигнала (рис. 5B). После окрашивания клеток белком DARPIn9\_29-mCherry в красном канале по онкомаркеру HER2 (рис. 5B) культура HeLa хорошо отличалась от EMT-HER2, тогда как используемые нами клетки SKBR3 имели промежуточное значение флуоресценции.



**Рис. 4.** Цитотоксичность красителя **BDP-C7** согласно МТТ-тесту на клетках HeLa

Чтобы сравнить представленность онкомаркера HER2 на анализируемых культурах в идентичных условиях, мы смешали клетки SKBR3, HeLa и EMT-HER2 в одной пробирке и потом обработали белком DARPIn9\_29-mCherry (рис. 6). Видно, что если клетки предварительно не маркировать с помощью **BDP-C7**, то после окрашивания культура HeLa, содержащая небольшое количество HER2 на поверхности, частично отделяется от клеток, которые сверхэкспрессируют рецептор, однако отличить SKBR3 и EMT-HER2 друг от друга невозможно (рис. 6A,Б).

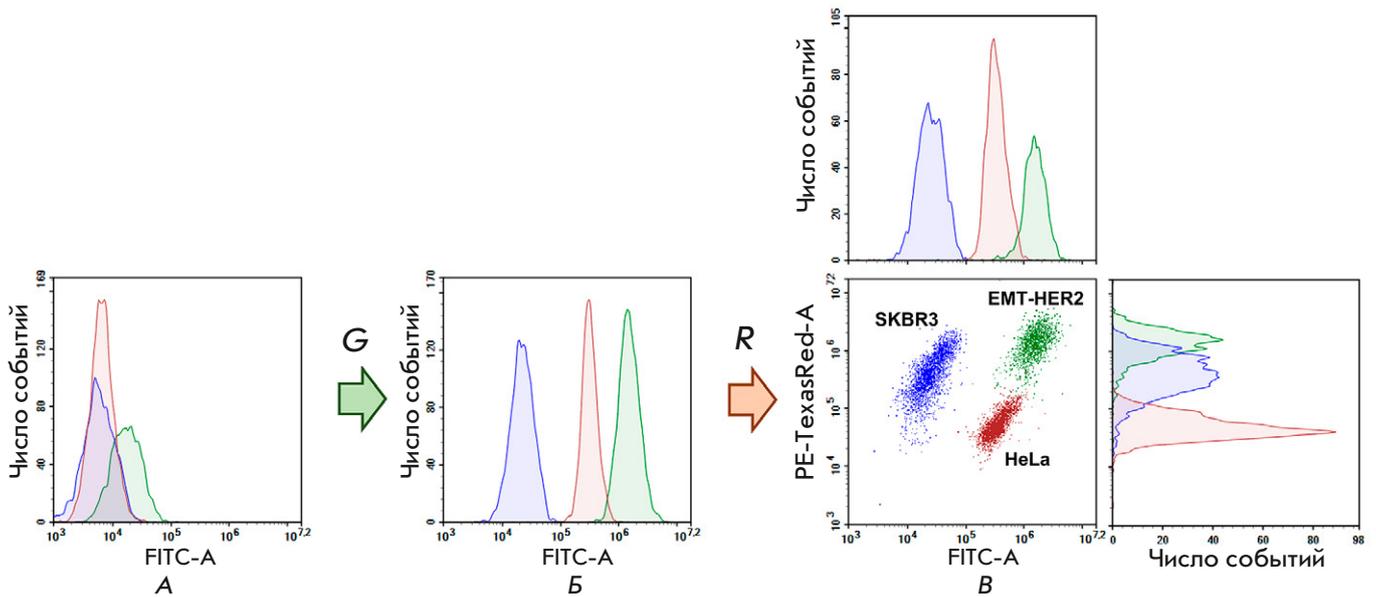


Рис. 5. Цитометрический анализ клеток SKBR3, HeLa и EMT-HER2: без обработки (А), обработанных по отдельности сначала зеленым красителем **BDP-C7** в концентрации 1, 10 и 100 нМ соответственно (Б), затем красным лигандом к онкомаркеру HER2 (DARPin9\_29-mCherry, В). Приведено наложение результатов, полученных для каждой клеточной линии в параллельных экспериментах. Данные для HeLa показаны бордовым цветом, для SKBR3 – синим, для EMT-HER2 – зеленым

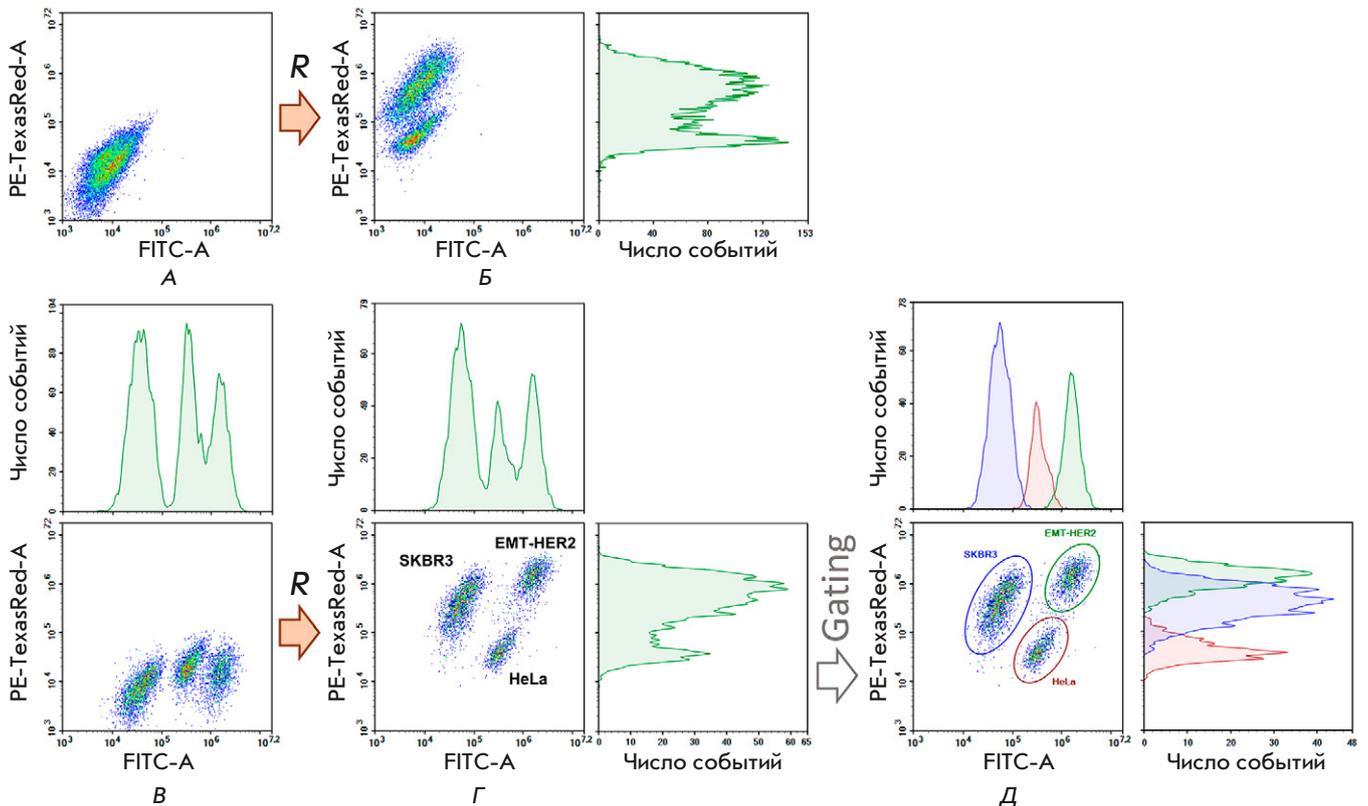


Рис. 6. Цитометрический анализ клеток HeLa, SKBR3 и EMT-HER2, смешанных вместе до окрашивания (А) и обработанных затем красным лигандом к онкомаркеру HER2 (DARPin9\_29-mCherry, Б). Клетки (В) были предварительно покрашены зеленым красителем **BDP-C7** в различных концентрациях, отмыты и смешаны в одной пробирке, а затем обработаны DARPin9\_29-mCherry (Г). Д – выделение отдельных популяций клеток и анализ их флуоресценции в зеленом (FITC) и красном (PE-Texas Red) каналах

**Таблица 1.** Сравнение результатов цитометрического анализа представленности HER2 на опухолевых клетках EMT-HER2, SKBR3 и HeLa, полученных в трех независимых экспериментах, а также в эксперименте с культурами клеток, предварительно маркированных красителем **BDP-C7** и смешанных в одной пробирке

Клеточная культура	Параллельные эксперименты		В одной пробирке	
	MFI*	HPCV**	MFI*	HPCV**
EMT-HER2	1 410 051	61.08%	1 380 511	61.64%
SKBR3	411 140	86.96%	410 552	100.83%
HeLa	46 678	123.57%	39 616	38.15%

\*MFI – медианное значение флуоресценции в красном канале (PE-Texas Red).

\*\*HPCV – коэффициент вариации полуширины пика (half-peak coefficient of variation).

$HPCV = FWHM / (2.36 \times X) \times 100\%$ , где FWHM полуширина пика, X среднее значение набора данных.

Если же клетки перед смешиванием маркировать **BDP-C7** (рис. 6B), то после окрашивания белком DARPIn9\_29-mCherry на точечной диаграмме, показывающей уровень флуоресценции клеток в зеленом и красном каналах, наблюдаются три четко различимых популяции клеток (рис. 6Г). Проведя гейтинг по этим популяциям клеток, можно по уровню флуоресцентного сигнала в зеленом канале определить их принадлежность к той или иной культуре (рис. 6Д), так как каждая культура была помечена зеленым флуоресцентным красителем в разной концентрации. В красном канале можно определить уровень флуоресценции каждой популяции по анализируемому онкомаркеру HER2.

Мы сопоставили результаты анализа представленности HER2 в тестируемых культурах согласно данным, полученным в трех экспериментах на каждой культуре клеток по отдельности, и данным, полученным в одной пробирке после маркировки клеток **BDP-C7** (табл. 1), и обнаружили практически полное совпадение результатов. Согласно полученным данным, в используемой нами линии SKBR3 онкомаркера HER2 на порядок больше, чем в HeLa, а в клетках EMT-HER2 представленность HER2 еще в 3.5 раза выше.

Разработанный подход позволяет смешивать в одной пробе несколько популяций клеток и ана-

лизировать их в одной пробирке в полностью идентичных условиях. Это позволяет минимизировать возможные артефакты, связанные с разбросом концентраций действующих на клетку веществ, вызванным ошибками пипетирования при пробоподготовке или неаккуратностью экспериментатора. Кроме того, настоящий подход позволяет экономить лиганды к анализируемым клеточным рецепторам, так как анализ происходит в одной пробирке, а не в своей для каждой культуры клеток. Это может быть актуальным, если лиганд коммерчески недоступен или качество лиганда различается в разных партиях. Наш подход позволяет экономить время, так как за один прогон можно проанализировать сразу несколько образцов. Стоит, однако, иметь в виду, что сначала надо потратить время на флуоресцентное маркирование культур клеток красителем при различных концентрациях и нужно подбирать концентрации так, чтобы клетки хорошо разделялись в канале флуоресценции красителя. Кроме того, использование лишнего красителя «отнимает» один канал детекции.

### ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В настоящей работе разработан подход, позволяющий проводить цитометрический анализ различных клеточных культур в одной пробирке, т.е. в полностью идентичных условиях. При этом можно анализировать клетки, которые изначально не различаются по каким-то «маркерным» рецепторам. С помощью красителя **BDP-C7** клетки можно маркировать в зеленом канале и задавать уровень флуоресцентного сигнала, желаемый в каждом отдельном эксперименте.

Вместо используемого в этой работе **BDP-C7** теоретически можно использовать другие флуоресцентные красители, однако надо иметь в виду, что краситель должен быть химически стабильным и достаточно ярким, чтобы обеспечить хороший контраст; высокогидрофобным, чтобы хорошо связываться с клетками неспецифично, и нетоксичным в используемых концентрациях. **BDP-C7** прекрасно удовлетворяет всем этим требованиям, тогда как красители, содержащие двойные связи и протяженные ароматические системы, могут легко окисляться в клетках и претерпевать за счет этого спектральные превращения. Многие полярные красители могут недостаточно хорошо накапливаться в мембранных структурах клетки и элиминироваться из клетки со временем. ●

*Работа поддержана Министерством науки и высшего образования Российской Федерации, соглашение № 075-15-2021-1049.*

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Manohar S.M., Shah P., Nair A. // *Bioanalysis*. 2021. V. 13. № 3. P. 181–198.
2. McKinnon K.M. // *Curr. Protoc. Immunol.* 2018. V. 120. № 1. P. 5.1.1–5.1.11.
3. Pakhomov A.A., Mironiuk V.B., Kononevich Y.N., Korlyukov A.A., Volodin A.D., Pryakhina T.A., Martynov V.I., Muzafarov A.M. // *Mendelev Comm.* 2017. V. 27. № 4. P. 363–365.
4. Pakhomov A.A., Kim E.E., Kononevich Y.N., Ionov D.S., Maksimova M.A., Khalchenia V.B., Maksimov E.G., Anisimov A.A., Shchegolikhina O.I., Martynov V.I., et al. // *Dyes Pigments*. 2022. V. 203. P. 110371.
5. Semenov A.N., Gvozdev D.A., Zlenko D.V., Protasova E.A., Khashimova A.R., Parshina E.Yu., Baizhumanov A.A., Lotosh N.Yu., Kim E.E., Kononevich Y.N., et al. // *Membranes*. 2022. V. 12. № 10. P. 905.
6. Jost C., Schilling J., Tamaskovic R., Schwill M., Honegger A., Plückthun A. // *Structure*. 2013. V. 21. № 11. P. 1979–1991.
7. Shipunova V.O., Komedchikova E.N., Kotelnikova P.A., Nikitin M.P., Deyev S.M. // *Pharmaceutics*. 2023. V. 15. № 3. P. 833.
8. Tang Q., Onitsuka M., Tabata A., Tomoyasu T., Nagamune H. // *Anticancer Res*. 2018. V. 38. № 7. P. 4319–4325.
9. Shipunova V.O., Komedchikova E.N., Kotelnikova P.A., Zelepukin I.V., Schulga A.A., Proshkina G.M., Shramova E.I., Kutscher H.L., Telegin G.B., Kabashin A.V., et al. // *ACS Nano*. 2020. V. 14. № 10. P. 12781–12795.
10. Loudet A., Burgess K. // *Chem. Rev.* 2007. V. 107. № 11. P. 4891–4932.
11. Marfin Y.S., Solomonov A.V., Timin A.S., Rummyantsev E.V. // *Curr. Med. Chem.* 2017. V. 24. № 25. P. 2745–2772.
12. Martynov V.I., Pakhomov A.A. // *Russ. Chem. Rev.* 2021. V. 90. № 10. P. 1213–1262.
13. Pakhomov A.A., Efremova A.V., Kononevich Y.N., Ionov D.S., Maksimova M.A., Volodin A.D., Korlyukov A.A., Dubinets N.O., Martynov V.I., Ivanov A.A., et al. // *ChemPhotoChem*. 2023. V. 7. № 5. P. e202200324.
14. Pakhomov A.A., Efremova A.V., Maksimova M.A., Kononevich Y.N., Ionov D.S., Dubinets N.O., Martynov V.I., Muzafarov A.M., Alfimov M.V. // *High Energy Chem*. 2023. V. 57. № 3. P. 192–199.
15. Qiu B., Simon M. // *Bio-Protoc*. 2016. V. 6. № 17. P. e1912.
16. Pakhomov A.A., Deyev I.E., Ratnikova N.M., Chumakov S.P., Mironiuk V.B., Kononevich Y.N., Muzafarov A.M., Martynov V.I. // *BioTechniques*. 2017. V. 63. № 2. P. 77–80.
17. Zhu J., Tan N.K., Kikuchi K., Kaur A., New E.J. // *Anal. Sens.* 2023. P. e202300049. doi.org/10.1002/anse.202300049.
18. Pakhomov A.A., Kononevich Y.N., Stukalova M.V., Svidchenko E.A., Surin N.M., Cherkaev G.V., Shchegolikhina O.I., Martynov V.I., Muzafarov A.M. // *Tetrahedron Lett*. 2016. V. 57. № 9. P. 979–982.
19. Pakhomov A.A., Kononevich Y.N., Korlyukov A.A., Martynov V.I., Muzafarov A.M. // *Mendelev Commun.* 2016. V. 26. № 3. P. 196–198.
20. Kuo W.-Y., Lin J.-J., Hsu H.-J., Chen H.-S., Yang A.-S., Wu C.-Y. // *Sci. Rep.* 2018. V. 8. № 1. P. 13735.
21. Swain S.M., Shastry M., Hamilton E. // *Nat. Rev. Drug Discov.* 2023. V. 22. № 2. P. 101–126.
22. Mironova K.E., Chernykh O.N., Ryabova A.V., Stremovskiy O.A., Proshkina G.M., Deyev S.M. // *Biochem. Mosc.* 2014. V. 79. № 12. P. 1391–1396.

УДК 577.32

# Система для самоактивируемой адресной фотодинамической терапии на основе мультимодального белка DARP-NanoLuc-SOPP3

Е. И. Шрамова<sup>1</sup>, А. Ю. Фролова<sup>1</sup>, В. П. Филимонова<sup>1</sup>, С. М. Деев<sup>1,2,3</sup>, Г. М. Прошкина<sup>1\*</sup><sup>1</sup>Институт биорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, Москва, 117997 Россия<sup>2</sup>Научно-исследовательская лаборатория «Биомаркер», Институт фундаментальной медицины и биологии Казанского федерального университета, Казань, 420008 Россия<sup>3</sup>Первый Московский государственный медицинский университет имени Сеченова (Сеченовский университет), 119991, Москва, Россия

\*E-mail: gmb@ibch.ru

Поступила в редакцию 20.11.2023

Принята к печати 28.11.2023

DOI: 10.32607/actanaturae.27331

**РЕФЕРАТ** Несмотря на значительный потенциал фотодинамической терапии (ФДТ) как малоинвазивного способа лечения, применение данного метода в онкологии имеет свои ограничения, такие, как 1) ограниченная глубина проникновения возбуждающего света вглубь ткани, что лишает возможности воздействовать на опухоли, локализующиеся глубоко в организме; 2) использование в качестве фотосенсибилизаторов химических медленно биodeградируемых молекул, что приводит к светоактивируемым фотодерматозам и гипертермией у пациентов. Для решения обозначенных проблем в данной работе предложена полностью биосовместимая адресная система для ФДТ без внешнего источника света, работающая на основе биолюминесцентного резонансного переноса энергии (BRET) от окисленной формы люциферазного субстрата к белковой молекуле фотосенсибилизатора SOPP3. BRET-активируемая система представлена мультимодальным белком DARP-NanoLuc-SOPP3, который содержит помимо BRET-пары NanoLuc-SOPP3 адресный модуль DARPin, обеспечивающий тропность данного белка к опухолям, сверхэкспрессирующим рецептор второго типа эпидермального фактора роста человека (HER2). В опытах *in vitro* и на модели 3D-сфероидов доказана фотоиндуцируемая без внешнего источника света цитотоксичность данной системы в отношении HER2-положительных клеток аденокарциномы рака яичника человека. Кроме того, в опытах на животных с подкожными HER2-положительными опухолями показано селективное накопление DARP-NanoLuc-SOPP3 в опухолевом очаге. Предложенная полностью биосовместимая система для адресной BRET-индуцированной терапии позволяет преодолеть: 1) необходимость во внешнем источнике излучения; 2) побочный фототоксический эффект от аберрантного накопления химических ФС. Полученные результаты демонстрируют большой потенциал полностью белковой самовозбуждающейся BRET-системы для адресной ФДТ.

**КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА** биолюминесцентный резонансный перенос энергии, адресная фотодинамическая терапия.

**СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ** BRET (bioluminescence resonance energy transfer) – биолюминесцентный резонансный перенос энергии; HER2 (human epidermal growth receptor II) – рецептор второго типа эпидермального фактора роста человека; ФДТ – фотодинамическая терапия; ФС – фотосенсибилизатор.

## ВВЕДЕНИЕ

В настоящее время фотодинамическая терапия (ФДТ) широко применяется в онкологии при неоперабельных опухолях, раке кожи и сетчатки, а также для облучения поверхностного эпителия органов, до-

ступных для катетеров и эндоскопов [1–3]. Ключевые компоненты ФДТ – фотосенсибилизатор (ФС), возбуждающий свет определенной длины волны и молекулярный кислород. При фотовозбуждении ФС в присутствии молекулярного кислорода генериру-

ет синглетный кислород и/или свободные радикалы, вызывающие окислительный стресс, и, как следствие, апоптоз или некроз клетки [4]. К очевидным достоинствам ФДТ по сравнению с другими методами онкотерапии следует отнести низкую общую токсичность, минимальную инвазивность и высокую селективность. Малая инвазивность и высокая селективность достигаются за счет сочетания двух факторов: 1) фотосенсибилизатор активируется только под действием света определенной длины волны и 2) активные формы кислорода (АФК), время жизни которых невелико (и этим ограничивается их диффузия в клетке), генерируются в непосредственной близости от возбужденного ФС, что приводит к локализованной гибели клеток. Именно поэтому ФДТ считается одним из наиболее привлекательных фотонных методов терапии опухолей. ФДТ, эффективно воздействующая на опухоль, также является щадящим методом по отношению к организму в целом.

Однако метод ФДТ имеет два существенных ограничения: 1) небольшая глубина (всего 1–2 мм) проникновения возбуждающего света видимого/ближнекрасного диапазона (400–900 нм) вглубь ткани в силу его рассеяния клеточными структурами [5]; 2) индуцируемая дневным светом фототоксичность химических ФС вследствие их медленной биодеградация в организме человека и накоплению в коже. Например, известно, что одобренные к клиническому применению ФС на основе тетрапирроловых препаратов (порфирины, хлорины) и аминоклевулиновой кислоты накапливаются в тканях пациента, вызывая индуцированные солнечным светом фотодерматозы и гипертермию [6, 7].

Чтобы преодолеть проблему проникновения возбуждающего света в организм, в экспериментальной онкологии активно развивается направление, основанное на создании самовозбуждающихся систем для ФДТ [8]. В основе работы таких систем лежит биолюминесцентный резонансный перенос энергии (BRET, bioluminescence resonance energy transfer) от окисленной формы люциферазного субстрата (донора) к ФС (акцептору). За последние 10 лет разработано несколько систем для BRET-активируемой ФДТ, основанных на конъюгатах химических ФС с люциферазой и показавших свою эффективность в исследованиях *in vivo* [9–14].

Новым направлением в BRET-активируемой ФДТ является разработка систем, основанных на полностью биосовместимых материалах, например, с использованием генетических гибридов люцифераз и белковых фототоксинов. В настоящее время существуют только три системы, показывающих возможность использования биоматериалов для BRET-активируемой ФДТ.

В 2020 году Kim E. и соавт. разработали BRET-индуцированные системы на основе гибридов люциферазы RLuc и фототоксических белков (KillerRed и miniSOG) [15]. Специфическое действие BRET-индуцированной системы в отношении раковых клеток обусловлено присутствием в составе молекулы белка «люцифераза–фототоксичный белок» лидерного пептида WLEAAYQRFL, специфичного к рецептору интегринa b1 (ITGb1). В отсутствие внешнего источника света было продемонстрировано специфическое BRET-индуцированное действие данной системы в отношении первичных опухолевых линий, полученных от пациентов с раком молочной железы, а также на мышинных моделях с ксенографтными опухолями.

В 2022 году нашей группой была предложена полностью генетически кодируемая BRET-индуцируемая система для ФДТ глубоких опухолей [16]. Генно-инженерная люцифераза NanoLuc [17], используемая в качестве внутреннего источника света, и фототоксический флавопротеин miniSOG [18], действующий как генератор АФК, были объединены в одну генетическую конструкцию. Используя псевдотипированные лентивирусы, специфичные к HER2-онкомаркеру, нами показана возможность адресной доставки созданной генетической конструкции непосредственно в опухолевые клетки в организме животного, причем удалось добиться ингибирования роста не только первичного узла, но и метастазов. Будучи генетически кодируемой, данная конструкция может быть доставлена к опухолям, находящимся на любой глубине в организме. Позднее, используя фототоксичный белок SOPP3 [19] (аналог miniSOG, характеризующийся высоким квантовым выходом генерации синглетного кислорода), мы разработали адресную систему доставки BRET-активируемой белковой пары NanoLuc-SOPP3 в составе HER2-специфичных липосом и доказали эффективность работы данной системы на модели подкожной ксенографтной опухоли, а также на модели глубоких внутрибрюшинных диссеминированных опухолей [20].

Очевидно, что создание BRET-индуцируемых систем, основанных на полностью биосовместимых и биодegradируемых материалах, позволяет преодолеть не только проблему доставки возбуждающего света к глубинным тканям, но и проблему токсичности химических ФС.

В данной работе мы предлагаем использовать мультимодальный адресный белок DARP-NanoLuc-SOPP3, который содержит не только BRET-пару NanoLuc-SOPP3, но и адресный модуль DARPin, обеспечивающий тропность данного белка к опухоль-ассоциированному антигену рака молочной же-

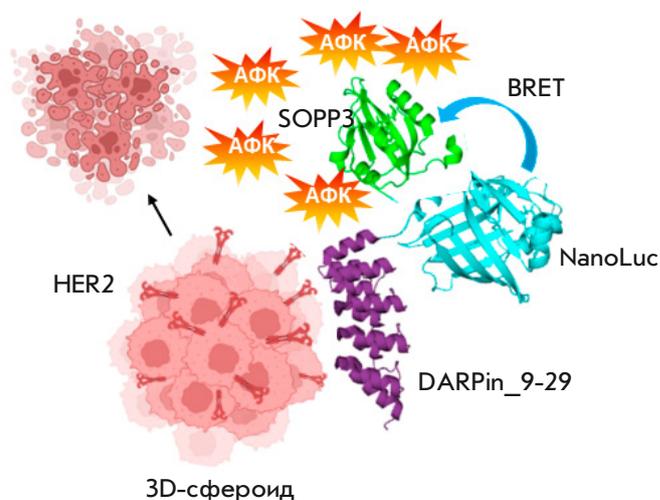
лезы и яичников человека. На модели 3D-сфероидов показано, что *DARP-NanoLuc-SOPP3* может использоваться для адресной BRET-индуцированной ФДТ. Схема эксперимента представлена на рис. 1.

### ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

#### Клонирование гена *DARP-NanoLuc-SOPP3*

Кодирующую последовательность *DARPin\_9-29* амплифицировали с плазмиды *pET22-DARP-mCherry* [21] с использованием набора специфических праймеров T7 forward (5'-TAA TAC GAC TCA CTA TAG GG-3') и *Dp-nano-rev* (5'-GTG AAG AAG ACC ATC ATC GCG GCG CCA CCA CCA CTG CTC CCG GG-3'). Кодирующую последовательность гена люциферазы *NanoLuc* амплифицировали с плазмиды *pNL1.1.CMV* (Promega) с использованием специфических праймеров *Dp-nano-dir* (5'-GT GGT GGC GCG ATG GTC TTC ACA CTC GAA GAT-3') и *Nano-G4S-Bam-rev* (5'-GTA CGG ATC CGC TCC CTC CGC CAC CCG CCA GAA TGC GTT CGC ACA G-3'). 5'-Области праймеров *Dp-nano-dir* и *Dp-nano-rev* взаимно комплементарны, что позволяет проводить лигирование кодирующих последовательностей *DARPin\_9-29* и *NanoLuc* во время амплификации. ПЦП-фрагмент, кодирующий *DARP-NanoLuc*, обрабатывали рестриктазами *NdeI/BamHI* и клонировали в вектор *pET24*, обработанный этими же рестриктазами. Кодирующую последовательность гена *SOPP3* амплифицировали с плазмиды *pET24-SOPP3* (любезно предоставлена А.А. Пахомовым, ИБХ РАН) с использованием специфических праймеров *mS-Bam-dir* (5'-CAT CAC GGA TCC GAA AAG AGC TTT GTG ATT ACC-3') и *mS-Hind-rev* (5'-GTA CAA GCT TGC CAT CAA CCT GCA CAC CAA T-3'). Полученный ПЦП-фрагмент обрабатывали рестриктазами *BamHI/HindIII* и лигировали с вектором *pET24-DARP-NanoLuc*, обработанным этим же набором рестриктаз. Правильность финальной конструкции доказывали секвенированием. Кодирующая последовательность гена *DARP-NanoLuc-SOPP3* соответствует белку с первичной структурой:

```
MDLGKKLLEAARAGQDDEVRLMANGADVNAH
DFYGITPLHLAANFGHLEIVEVLLKHGADVNAFD
YDNTPLHLAADAGHLEIVEVLLKYGADVNASDRD
GHTPLHLAAREGHLEIVEVLLKNGADVNAQDKFG
KTAFDISIDNGNEDLAEILQEFPKPSTPPGSSGGA
MVFTLEDFVGDWRQTAGYNLDQVLEQGGVSSLF
QNLGVSVTPIQRIVLSGENGLKIDIHVIIPYEGLSG
DQMGQIEKIFKVVPVDDHNFKVILHYGTLVIDG
VTPNMIDYFGRPYEGIAVFDGKKITVTGTWNGN
KIIDERLINPDGSLFRVTINGVTGWRLCERILAGG
GGSGSEKSFVITDPRLPDNPPIFASDGFLELTEYSR
```



**Рис. 1.** Система на основе мультимодального белка *DARP-NanoLuc-SOPP3* для адресной BRET-индуцированной ФДТ. Адресный модуль *DARPin* обеспечивает связывание BRET-пары *NanoLuc-SOPP3* с *HER2*-рецепторами раковых клеток в составе сфероидов. В присутствии люциферазного субстрата происходит безызлучательный перенос энергии (BRET) от окисленной формы субстрата на фотосенсибилизатор *SOPP3*. Часть энергии идет на выработку активных форм кислорода (АФК), что вызывает гибель раковой клетки. Рисунок сделан с помощью ресурса *BioRender.com* (<https://www.biorender.com>)

```
EEILGRNGRFLQGPETDQATVQKIRDAIRDQREIT
VQLINYTKSGKKFLNLLNLQPIRDQKGELQAFIGV
QVDGKLAALЕННННННННННННННННННННННННН
```

#### Экспрессия гена *DARP-NanoLuc-SOPP3*

Ген целевого белка экспрессировали в штамме *Escherichia coli* Rosetta(DE3), трансформированном плазмидой *pET24-DARP-NLuc-SOPP3*. Трансформанты выращивали при 37°C в жидкой среде LB в присутствии канамицина и хлорамфеникола (30 и 34 мкг/мл соответственно) с аэрацией до достижения культурой оптической плотности  $OD_{600}$  0.6–0.8. Экспрессию гена индуцировали добавлением изопропил- $\beta$ -D-1-тиогалактопиранозида (ИПТГ) до конечной концентрации 0.4 мМ. После добавления ИПТГ клетки растили при 37°C в течение 4 ч, а затем при 18°C в течение ночи. Клеточную суспензию осаждали центрифугированием при 4000 g в течение 10 мин при комнатной температуре. Полученные осадки хранили при -20°C. Для выделения белка клетки размораживали, ресуспендировали в промывочном буфере (50 мМ Трис-HCl, 500 мМ NaCl, 10 мМ имидазол, pH 8.0). Клетки разрушали с помощью ультразвукового дезинтегратора *Sonopulse HD 3100* (Bandeline, Германия) в режиме:

10 с – ультразвуковая обработка; 10 с – охлаждение, 5 циклов. Осветленный клеточный лизат получали центрифугированием при 20000 *g* в течение 30 мин при 4°C. Супернатант наносили на агарозную колонку Ni-NTA (Qiagen), предварительно уравновешенную промывочным буфером. Колонку промывали 5-кратным объемом промывочного буфера и элюировали белок буфером, содержащим 50 мМ Трис-HCl, 500 мМ NaCl, 500 мМ имидазол, pH 8.0.

### Оценка величины биолюминесцентного резонансного переноса

Для того чтобы рассчитать эффективность биолюминесцентного резонансного переноса от донора к акцептору в системе DARP-NanoLuc-SOPP3, проводили измерение спектров люминесценции DARP-NanoLuc-SOPP3 и белка NanoLuc в присутствии 10 мкМ фуримазина. Измерения проводили с использованием планшетного флуориметра Infinite 1000 Pro (Tecan, Австрия) в диапазоне длин волн 400–600 нм с шагом 2 нм и интегральным временем 10 мс. Значение BRET рассчитывали как соотношение энергии, излучаемой акцептором (DARP-NanoLuc-SOPP3) и донором (NanoLuc). Из-за перекрывания спектров испускания донора и акцептора для определения эффективности переноса энергии требуется вычитание сигналов, обусловленных излучением донора в отсутствие акцептора [22–25]. Таким образом, эффективность переноса энергии представляет собой отношение величины эмиссии системы «донор–акцептор» (белок DARP-NanoLuc-miniSOG) на длине волны максимума испускания акцептора к величине эмиссии этой системы на длине волны максимума испускания донора за вычетом этого же отношения, детектированного по спектру испускания свободного донора (белок NanoLuc).

$$BRET\ VALUE = \frac{E_{DARP-NanoLuc-SOPP3(\lambda\ max\ acceptor)}}{E_{DARP-NanoLuc-SOPP3(\lambda\ max\ donor)}} - \frac{E_{NanoLuc(\lambda\ max\ acceptor)}}{E_{NanoLuc(\lambda\ max\ donor)}}$$

### Клеточные культуры

В работе использовали следующие клеточные линии: HEK293T (высокотрансфицируемые клетки, экспрессирующие Т-антиген SV40, полученные на основе клеток почки эмбриона человека), SKOV3 (карцинома яичников человека), SKOV3.ip1-Kat (клеточная линия, стабильно экспрессирующая дальний красный флуоресцентный белок TurboFP635; исходная родительская линия SKOV3.ip1 представляет собой клеточную линию, выделенную из внутрибрюшинного асцита иммунодефицитной мыши, которой интраперитонеально были введены клетки аденокарциномы яичника человека SKOV3), EA.hy926 (гибридная клеточная линия

на основе первичных клеток пупочной вены человека и клеток аденокарциномы легкого человека A549), VJ-5TA (иммортиализованные фибробласты hTERT, полученные на основе клеток крайней плоти человека), HeLa (карцинома шейки матки). Клетки культивировали в стандартных условиях (37°C во влажной атмосфере с 5% CO<sub>2</sub>) в среде RPMI 1640 или DMEM («ПанЭко», Россия), содержащей 2 мМ L-глутамин («ПанЭко»), 10% фетальной бычьей сыворотки (Gibco) и антибиотик (10 ЕД/мл пенициллина, 10 мкг/мл стрептомицина, «ПанЭко»).

### Получение клеточных линий, стабильно экспрессирующих флуоресцентный белок GFP

За день до трансфекции клетки HEK293T засеивали в 6-луночный планшет в концентрации 0.6×10<sup>6</sup> клеток/мл в полной ростовой среде без антибиотика. В день трансфекции ростовую среду заменяли на среду без сыворотки и антибиотика. Лентивирусные плазмиды третьего поколения pMDLg/pRRE, pRSV-Rev, pCMV-VSV-G, а также репортерную плазмиду pWPT-GFP смешивали в соотношении 2:1:0.4:2 в среде, не содержащей сыворотку и антибиотик. Суммарно на лунку 6-луночного планшета добавляли 2 мкг pMDLg/pRRE, 1 мкг pRSV-Rev, 0.4 мкг pCMV-VSV-G и 2 мкг pWPT-GFP. Затем к раствору ДНК добавляли 20 мкл реагента для трансфекции (TransIntro<sup>®</sup> PL transfection reagent, TransGen Biotech, КНР), осторожно перемешивали и инкубировали в течение 15 мин при комнатной температуре. ДНК-липосомные комплексы добавляли к клеткам, инкубировали в течение 4–6 ч, после чего среду заменяли полной средой для культивирования. Вирусные частицы собирали через 24, 48 и 72 ч, объединяли и центрифугировали (10 мин при 500 *g*). Вирусы добавляли к клеткам EA.hy926 и VJ-5TA при достижении культурой ~70% конфлюэнтности монослоя и центрифугировали (в планшетах) в течение 90 мин при 1200 *g* в присутствии 8 мкг/мл полибрена. Через 7 ч среду с лентивирусными частицами заменяли свежей полной ростовой средой. Флуоресценцию GFP оценивали с помощью флуоресцентного микроскопа Axiovert 200 (Carl Zeiss, ФРГ) и методом проточной цитометрии через 72 ч.

### Конъюгация DARP-NanoLuc-SOPP3 с флуоресцентными красителями

SOPP3 представляет собой слабый флуорофор. Чтобы быть видимым при проведении проточной цитометрии или конфокальной микроскопии, DARP-NanoLuc-SOPP3 конъюгировали с N-гидроксисукцинимидными эфирами красителей (AF488 и Cy5.5, «Люмипроб», Россия). Конъюгацию

проводили в 20 мМ фосфатном буфере (рН 8.0) в присутствии 10-кратного молярного избытка красителя. Реакцию вели в течение 1 ч при комнатной температуре. Очистку конъюгата «белок-краситель» от непрореагировавшего красителя проводили с использованием гель-проникающей хроматографии на колонке с сефадексом G25 (Cytiva).

### Проточная цитометрия

Экспрессию GFP в клетках EA.hy926 и VJ-5TA после лентивирусной трансдукции, а также анализ функциональной активности HER2-специфичного модуля в составе белка DARP-NanoLuc-SOPP3 определяли с использованием проточной цитометрии на приборе NovoCyte 3000 (AceaBio, США). Для этого клетки (EA.hy926, EA.hy926-GFP, VJ-5TA, VJ-5TA-GFP или SKOV3.ip1-Kat) снимали с подложки раствором Версена («ПанЭко»), промывали фосфатно-солевым буфером и проводили анализ.

Для оценки способности связывания DARP-NanoLuc-SOPP3 с рецептором HER2, клетки (HER2-положительные клетки SKOV3.ip1-Kat, клетки рака шейки матки HeLa с нормальным уровнем экспрессии рецептора HER2, а также эндотелиальные клетки EA.hy926 и клетки стромы VJ-5TA) инкубировали с 300 нМ конъюгата DARP-NanoLuc-SOPP3-AF488 в полной ростовой среде (10 мин при 37°C). Клетки промывали 3 раза фосфатно-солевым буфером и анализировали на приборе NovoCyte 3000.

Флуоресценцию GFP или AF488 возбуждали лазером с длиной волны 488 нм и детектировали в канале 530 ± 30 нм (канал FITC).

### Конфокальная микроскопия

Связывание адресного модуля в составе DARP-NanoLuc-SOPP3 с рецептором HER2 на поверхности клеток SKOV3.ip1, для которых характерна сверхэкспрессия данного рецептора, изучали с использованием конфокальной микроскопии. Около 3500 клеток линии SKOV3.ip1 высевали в лунки 96-луночного планшета со стеклянным дном (Eppendorf) и культивировали в течение ночи. На следующий день к клеткам добавляли 250 нМ конъюгата DARP-NanoLuc-SOPP3-Cy5.5 (концентрация указана по красителю). Инкубацию клеток с конъюгатом проводили в течение 20 и 180 мин. Ядра окрашивали 10 нМ Hoechst33342 в течение 10 мин при 37°C. Клетки трижды промывали фосфатно-солевым буфером, добавляли среду FluoroBright (Gibco) и анализировали с помощью конфокального микроскопа LSM 980 (Carl Zeiss), используя масляный иммерсионный объектив 63× Plan-Apochromat. Флуоресценцию Hoechst33342 возбуждали лазером

с длиной волны 405 нм, детекцию проводили при 410–520 нм, Cy5.5 возбуждали лазером с длиной волны 639 нм, флуоресценцию детектировали при 642–755 нм.

Изображения сфероидов анализировали с помощью конфокального микроскопа LSM 980, используя сухой объектив × 10 и режим Z-стека. TurboFP635 возбуждали лазером с длиной волны 543 нм, детекцию флуоресценции проводили в диапазоне 642–755 нм, флуоресценцию GFP возбуждали лазером с длиной волны 488 нм и детектировали при 497–562 нм.

### Получение 3D-сфероидов

Получение 3D-сфероидов на основе антиадгезивных агарозных матриц проводили по [26] с модификациями. Вкратце, 81-луночные агарозные формочки готовили из 1% агарозы, расплавленной в фосфатно-солевом буфере, и помещали в лунки 12-луночного планшета. Клетки SKOV3.ip1-Kat, EA.hy926 или VJ-5TA снимали с подложки, промывали культуральной средой и подсчитывали. Для получения сфероидов из клеток одного типа 150 мкл клеточной суспензии, содержащей 10<sup>6</sup> клеток SKOV3.ip1-Kat, наслаивали на каждую агарозную формочку. Для получения сфероидов, состоящих из разных типов клеток (эпителиальных, эндотелиальных и стромальных), на каждую агарозную лунку наслаивали по 150 мкл суспензии, содержащей 5×10<sup>5</sup> клеток SKOV3.ip1-Kat, 2.5×10<sup>5</sup> клеток EA.hy926 и 2.5×10<sup>5</sup> клеток VJ-5TA. После этого агарозные формы заливали полной культуральной средой. Для того чтобы осадить клетки на дно агарозной формы, планшеты центрифугировали в течение 1 мин при 100 g. Сфероиды формировались в течение 2 дней.

### Анализ BRET-индуцируемой цитотоксичности DARP-NanoLuc-SOPP3 на монослойной (2D) культуре и сфероидах (3D-культура)

Для оценки BRET-индуцируемой цитотоксичности белка DARP-NanoLuc-SOPP3 в отношении монослойной культуры SKOV3.ip1-Kat, EA.hy926 или VJ-5TA высевали в 96-луночные планшеты с плотностью 35 000 клеток/мл для SKOV3.ip1-Kat и 25 000 клеток/мл для EA.hy926 и VJ-5TA. Клетки культивировали в течение ночи в стандартных условиях. Затем к клеткам добавляли DARP-NanoLuc-SOPP3 в разных концентрациях (от 1.8 мкМ до 0). Инкубировали с белком в течение 20 мин, затем в лунки вносили раствор люциферазного субстрата (30 мкМ). Клетки инкубировали в течение 72 ч в стандартных условиях. Цитотоксичность анализировали с помощью МТТ-теста, основанного на способности

митохондриальных дегидрогеназ конвертировать водорастворимый тетразолиевый краситель 3-(4,5-диметилтиазол-2-ил)-2,5-дифенилтетразолий бромид в формазан, который кристаллизуется внутри клеток и имеет пурпурную окраску [27]. Культуральную среду удаляли из лунок 96-луночного планшета и в каждую лунку вносили по 100 мкл (0.5 г/л) раствора МТТ («ПанЭко»). Планшеты инкубировали в течение 1 ч при 37°C, среду удаляли, образовавшиеся кристаллы формазана растворяли в ДМСО (100 мкл/лунка).

Для оценки BRET-индуцируемой цитотоксичности белка DARP-NanoLuc-SOPP3 в отношении 3D-культуры использовали сфероиды, выращенные в течение двух дней. В день эксперимента к клеткам добавляли DARP-NanoLuc-SOPP3 в разных концентрациях (от 20 мкМ до 0). После 2 ч инкубации в каждую лунку добавляли 30 мкМ фуримазина, после чего клетки дополнительно инкубировали еще 72 ч в стандартных условиях. Для анализа цитотоксичности каждый сфероид в объеме 10 мкл из агарозной формы переносили в лунку 96-луночного планшета. Затем в лунку вносили 90 мкл раствора МТТ до конечной концентрации 0.5 г/л, инкубировали при 37°C в течение 1 ч. После окончания инкубации раствор МТТ аккуратно удаляли пипеткой, кристаллы формазана растворяли в ДМСО (100 мкл/лунка).

Поглощение раствора формазана измеряли при длине волны 570 нм с использованием планшетного флуориметра Infinite M100 Pro (Tecan). Относительную жизнеспособность клеток рассчитывали по соотношению поглощения в опытной и контрольной лунке. В качестве контрольной лунки использовали клетки, обработанные 30 мкМ раствором люциферазного субстрата. Значение концентрации DARP-NanoLuc-SOPP3, вызывающее ингибирование роста 50% клеток в популяции ( $IC_{50}$ ), рассчитывали с использованием программного обеспечения GraphPad Prism (версия 9.4.0, GraphPad Software, Калифорния, США).

### **Анализ накопления DARP-NanoLuc-SOPP3 в HER2-положительной ксенографтной опухоли *in vivo***

Эксперимент на животных одобрен Комиссией по контролю за содержанием и использованием животных Института биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН (протокол 368/2022 от 19.12.2022). Самки мышей линии Balb/c Nude (в возрасте 8 недель) куплены в лицензированном питомнике Пуццино, поставляющем свободных от патогенной флоры животных (SPF animals). Животных содержали в стерильных

условиях с неограниченным доступом к стерильной пище и воде.

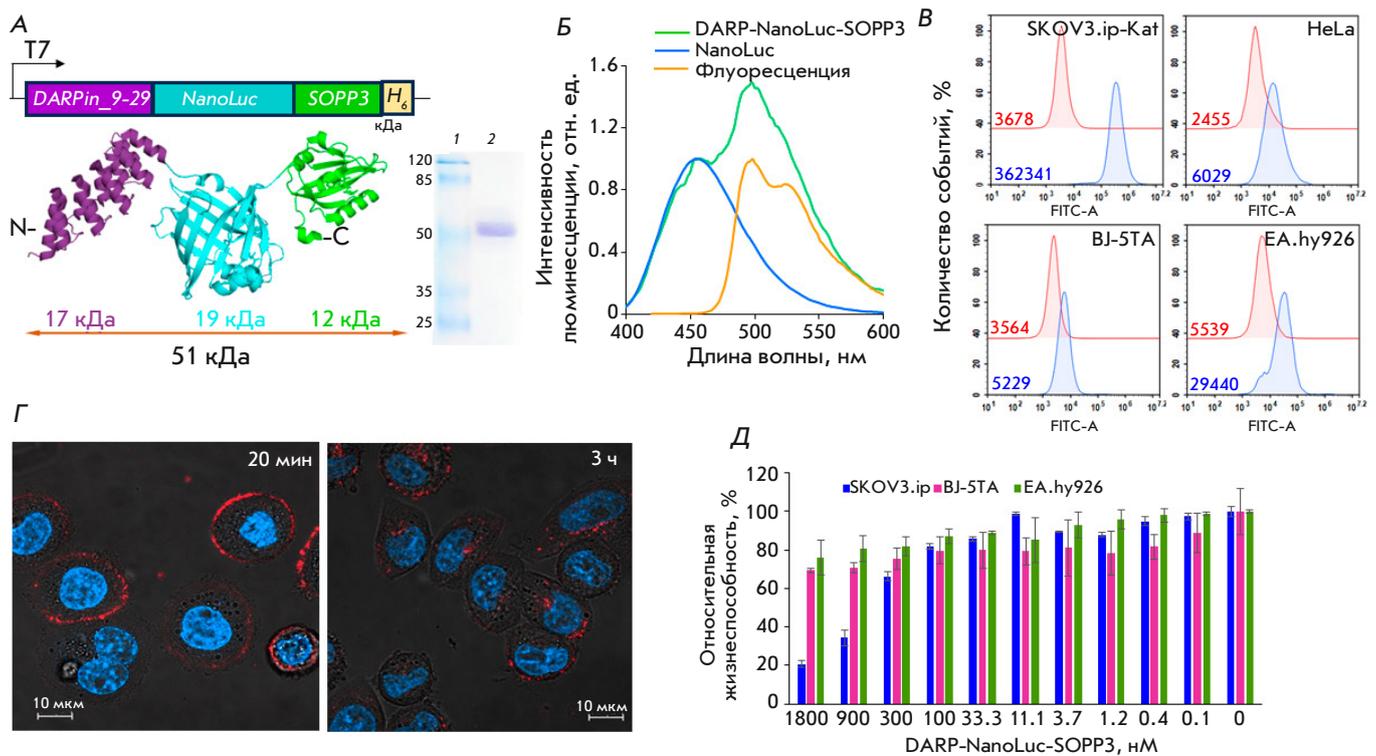
Для получения подкожной HER2-положительной ксенографтной модели суспензию клеток SKOV3 ( $2 \times 10^6$  клеток) в 30% ростовом субстрате Matrigel (Corning) инокулировали подкожно в правый бок мыши. Изучение биораспределения DARP-NanoLuc-SOPP3 в организме животного начинали при достижении опухоли объема 200 мм<sup>3</sup>. Примерно через 3 недели после прививки опухоли животным в ретро-орбитальный синус вводили 100 мкл 40-мкМ конъюгата DARP-NanoLuc-SOPP3-Cy5.5 (концентрация указана по красителю). Распределение DARP-NanoLuc-SOPP3-Cy5.5 в организме животного оценивали с использованием системы прижизненного биоимиджинга IVIS Spectrum (PerkinElmer, США). Параметры возбуждения/эмиссии для визуализации были следующими: 640/680, 640/700, 640/720, 640/740, 640/760, 640/780, 675/720, 675/740, 675/760, 675/780, 710/760 и 710/780 нм. Спектральное разделение изображения осуществляли с помощью программного обеспечения IVIS Spectrum.

## **РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ**

### **Получение белка DARP-NanoLuc-SOPP3 для адресной BRET-индуцируемой ФДТ и его функциональная характеристика в 2D-культуре**

Для создания адресной BRET-индуцируемой системы, имеющей полностью белковую природу, мы получили генетическую конструкцию, кодирующую в одной рамке считывания адресный модуль, специфичный к онкомаркеру HER2, ген люциферазы NanoLuc и ген фототоксичного белка SOPP3 (рис. 2). В качестве адресной молекулы в данной конструкции использовали HER2-специфичный белок неиммуноглобулинового скаффолда DARP<sub>in</sub>\_9-29, который способен взаимодействовать с рецептором HER2 с высокой аффинностью (1 нМ) [28]. HER2 представляет собой опухоль-ассоциированный антиген, сверхэкспрессия которого характерна для многих опухолей человека: рака молочной железы, легких, желудка, яичников, простаты [29, 30].

Генетическую конструкцию, кодирующую DARP<sub>in</sub>-NanoLuc-SOPP3, получали как описано в «Экспериментальной части» (рис. 2А). Белок DARP<sub>in</sub>-NanoLuc-SOPP3 очищали с помощью аффинной металл-хелатной хроматографии. По результатам электрофореза в денатурирующем полиакриламидном геле (рис. 2А) видно, что выделенный белок соответствует расчетной молекулярной массе (51 кДа). О функциональной активности фототоксического модуля SOPP3 в составе гибридной конструкции DARP<sub>in</sub>-NanoLuc-SOPP3



**Рис. 2.** Система на основе мультимодального белка DARP-NanoLuc-SOPP3 для адресной BRET-индуцированной ФДТ: характеристика *in vitro*. **А** – схема генетической конструкции DARP-NanoLuc-SOPP3 и соответствующего ей белка. Электрофореграмма очищенного препарата белка представлена справа от схемы. Дорожка 1 – универсальный маркер молекулярных масс, дорожка 2 – DARP-NanoLuc-SOPP3. **Б** – нормированные спектры люминесценции NanoLuc (голубая кривая) и DARP-NanoLuc-SOPP3 (зеленая кривая) в присутствии 10 мкМ фуримазина. Оранжевая кривая соответствует нормированному спектру флуоресценции DARP-NanoLuc-SOPP3, полученного при возбуждении лазером 460 нм. **В** – рецептор-специфическое взаимодействие DARP-NanoLuc-SOPP3-FITC с клетками, экспрессирующими разный уровень рецептора HER2. Представлены данные проточной цитометрии для канала флуоресценции флуоресцеин-5-изотиоцианата (FITC,  $\lambda_{ex} = 488$  нм,  $\lambda_{em} = 530 \pm 30$  нм). Красные линии на пиктограммах соответствуют клеткам (контроль), не конъюгированным с флуоресцентным красителем, синие линии – клеткам, обработанным DARP-NanoLuc-SOPP3-FITC. Численные значения на пиктограммах соответствуют медианам интенсивности флуоресценции. **Г** – совмещенные конфокальные изображения клеток SKOV3.ip1 в синем и красном каналах флуоресценции после инкубации с DARP-NanoLuc-SOPP3-Cy5.5 в течение 20 мин и 3 ч. Ядра окрашены Hoechst33342. **Д** – BRET-индуцированная цитотоксичность *in vitro* DARP-NanoLuc-SOPP3 в присутствии 30 мкМ фуримазина. Представлены данные для клеток SKOV3.ip1, EA.hy926 и BJ-5TA. Масштабная линейка на конфокальных изображениях соответствует 10 мкм

судили по спектру флуоресценции, который идеально совпадает с опубликованными данными [19] (рис. 2Б). Эффективность биOLUMИНЕСЦЕНТНОГО резонансного переноса энергии (величина BRET) в системе DARP-NanoLuc-SOPP3 определяли, исходя из люминесцентных спектров белков DARP-NanoLuc-SOPP3 и NanoLuc, прописанных в присутствии люциферазного субстрата фуримазина (рис. 2Б). Величина BRET составила 1.14, что согласуется с нашими предыдущими данными для белка NanoLuc-SOPP3 [20].

Функциональную активность адресного модуля DARPin в составе гибридного белка оценивали

по способности DARP-NanoLuc-SOPP3 взаимодействовать с рецептором HER2 на поверхности раковых клеток. С этой целью DARP-NanoLuc-SOPP3 конъюгировали с флуоресцентным красителем (как описано в «Экспериментальной части»), связывание флуоресцентного конъюгата с рецептором HER2 изучали методом проточной цитометрии и конфокальной микроскопии. Как видно из рис. 2В, связывание DARP-NanoLuc-SOPP3 является строго специфичным в отношении клеток SKOV3.ip-Kat, характеризующихся сверхэкспрессией рецептора HER2 (сдвиг медианы флуоресценции обработанных конъюгатом клеток относительно контроля возраст-

тает ~ в 100 раз). Тогда как в эпителиальных клетках HeLa, характеризующихся нормальным уровнем экспрессии рецептора HER2, равно как и в HER2-отрицательных стромальных клетках (EA.hy926 и BJ5-TA), наблюдается незначительный сдвиг медианы флуоресценции (в 2.5–5 раз) (рис. 2B). Методом конфокальной микроскопии показано, что DARPin-NanoLuc-SOPP3-Cy5.5 эффективно связывается с поверхностью клеточной мембраны SKOV3.ip1 в течение 20 мин (рис. 2Г). Дальнейшая инкубация ведет к интернализации DARP-NanoLuc-SOPP3 и через 3 ч весь белок оказывается внутри клетки, о чем свидетельствует наличие красных пикселей в цитоплазме (рис. 2Г). Опыт по BRET-индуцированной цитотоксичности в отношении монослойной культуры (2D) HER2-положительных SKOV3.ip1-клеток показал, что DARP-NanoLuc-SOPP3 в присутствии фуримазина вызывает фототоксический эффект, при этом  $IC_{50}$ , рассчитанная с помощью программы GraphPad Prism, составляет 588.6 нМ.

#### Функциональная характеристика DARP-NanoLuc-SOPP3 в 3D-культуре

Известно, что 2D-модели не являются оптимальной системой для тестирования цитотоксичности лекарств, поскольку не отражают многих свойств опухоли в организме, обусловленных ее трехмерной организацией, таких, как градиент молекулярного кислорода, питательных веществ и метаболитов, наличие межклеточных контактов с клеточным матриксом и клетками стромы. В конечном счете, именно специфическое микроокружение опухоли обуславливает гетерогенность метаболизма, паттерна генной экспрессии и, как следствие, устойчивости раковых клеток к терапевтическим препаратам. 3D-модели рака человека, или сфероиды, предоставляют лучшую платформу для исследований эффективности лекарств, чем обычная 2D-культура, поскольку позволяют воспроизвести важные аспекты микроокружения опухоли, наиболее приближенные к *in vivo* моделям. Именно поэтому мы оценивали BRET-индуцированную цитотоксичность DARP-NanoLuc-SOPP3 на культуре сфероидов, сформированных из клеток аденокарциномы яичников (SKOV3.ip1) и клеток стромы, представленной модифицированными клетками пупочной вены человека EA.hy926 и клетками модифицированных фибробластов BJ-5TA.

Чтобы иметь возможность следить за структурой сфероидов с помощью конфокальной микроскопии, с использованием лентивирусной трансдукции были получены клеточные линии EA.hy926 и BJ-5TA, стабильно экспрессирующие ген *GFP*.

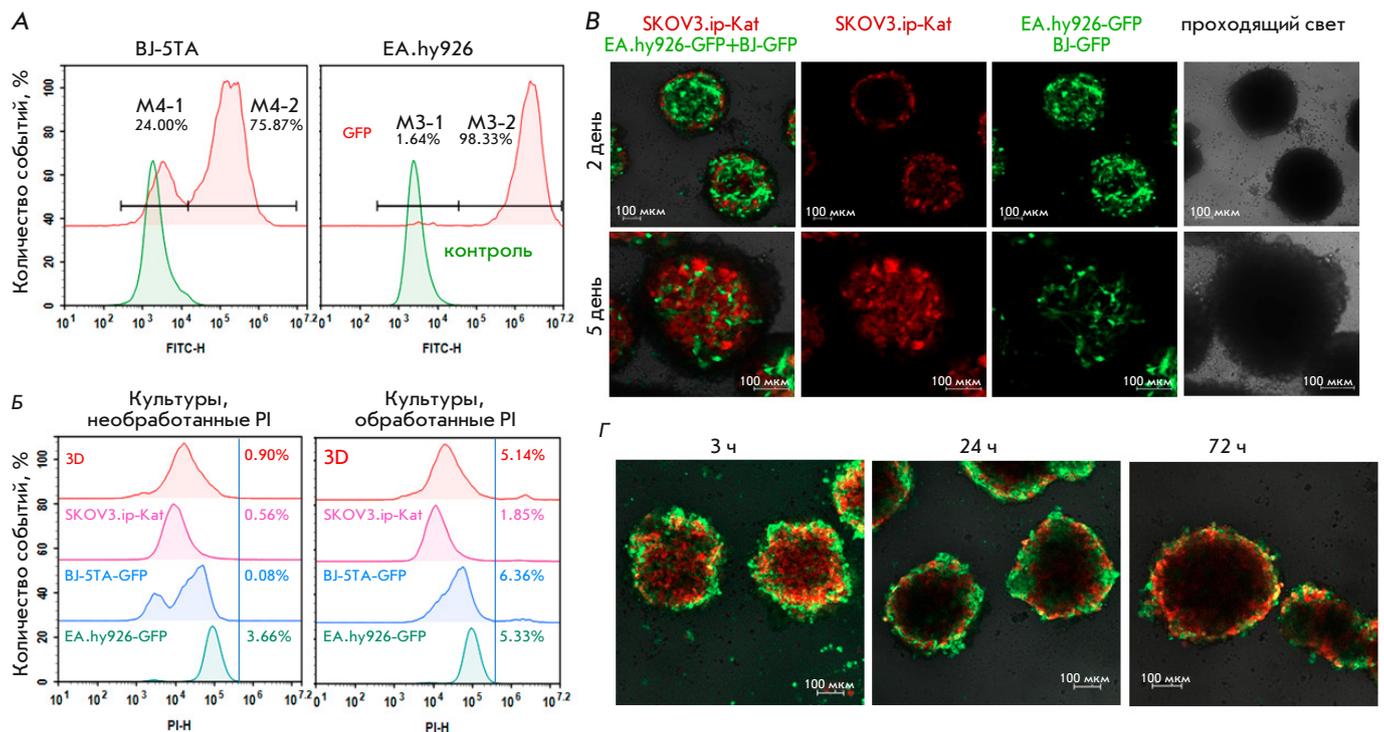
Эффективность трансдукции оценивали с использованием проточной цитометрии. Как видно из рис. 3А, уровень трансдукции геном *GFP* клеток EA.hy926 и BJ-5TA составил 98.33 и 75.87% соответственно.

Жизнеспособность клеток в составе сфероидов изучали с помощью проточной цитометрии по наличию мертвых клеток в культуре, детектируемых йодистым пропидием. В этом эксперименте использовали сфероиды, полученные на основе клеток SKOV3.ip1-Kat, EA.hy926-GFP и BJ-5TA-GFP. В качестве контроля использовали исходные клеточные линии. Сфероиды на 5-й день роста разрушали трипсином, окрашивали йодистым пропидием и измеряли флуоресценцию в канале йодистого пропидия. Как видно из рис. 3Б, количество мертвых клеток в сфероиде сопоставимо с количеством мертвых клеток в культуре исходных клеточных линий на соответствующий день культивирования при сопоставимом количестве анализируемых клеток.

Сфероиды формировали как описано в «Экспериментальной части». Как видно из рис. 3В, формируемые структуры имеют морфологию сфероидов с ярко выраженной стромальной сетью (зеленые тяжи на рис. 3В). При культивировании сфероиды заметно увеличиваются в объеме, и к пятому дню культивирования клетки стромы почти полностью покрываются клетками аденокарциномы яичника, что идеально согласуется с ранее опубликованными данными для сфероидов подобного состава [31].

Для того чтобы изучить взаимодействие DARP-NanoLuc-SOPP3 со сфероидом, нами были получены сфероиды на основе флуоресцентных клеток SKOV3.ip-Kat и клеток EA.hy926 и BJ-5TA, немодифицированных *GFP*. Для визуализации взаимодействия DARP-NanoLuc-SOPP3 с рецептором HER2 на поверхности сфероидов использовали конъюгат DARP-NanoLuc-SOPP3 с FITC. Как видно из рис. 3Г, DARP-NanoLuc-SOPP3-FITC эффективно взаимодействует со сфероидом, о чем говорит зеленая корона вокруг сфероидов. Со временем происходит уменьшение зеленого флуоресцентного сигнала на поверхности сфероидов, что говорит о проникновении DARP-NanoLuc-SOPP3 внутрь сфероидов.

BRET-индуцированную фототоксичность, вызываемую DARP-NanoLuc-SOPP3, изучали на сфероиде, сформированном из клеток SKOV3.ip-Kat, EA.hy926-GFP и BJ-5TA-GFP. Как видно из рис. 4А, под действием DARP-NanoLuc-SOPP3 в присутствии фуримазина наблюдается изменение во времени морфологии структуры сфероидов. Отметим, что в промежутке 19–72 ч уменьшается флуоресцентный сиг-

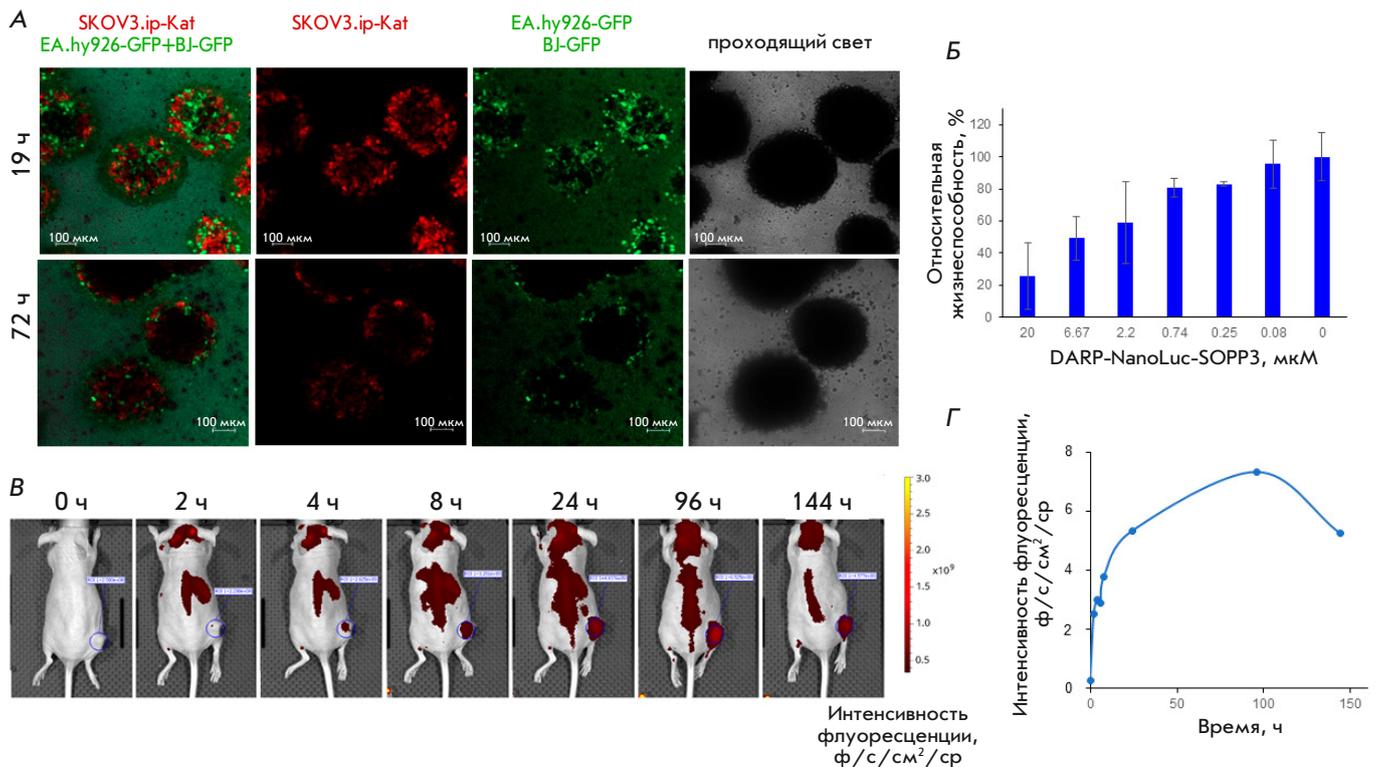


**Рис. 3.** Функциональная характеристика DARP-NanoLuc-SOPP3 в 3D-культуре. **А** – оценка эффективности лентивирусной трансдукции геном *GFP* клеточных линий BJ-5TA и EA.hy926 методом проточной цитометрии. На пиктограммах зеленые кривые соответствуют нетрансдуцированным клеткам (контроль автофлуоресценции), красные – трансдуцированная культура. Численные значения соответствуют значениям интенсивности флуоресценции в канале FITC ( $\lambda_{\text{exc}} = 488 \text{ нм}$ ,  $\lambda_{\text{em}} = 530 \pm 30 \text{ нм}$ ) для трансдуцированных клеточных линий. **Б** – оценка жизнеспособности сфероидов на 5-й день культивирования. Представлены данные проточной цитометрии по окрашиванию монослойных культур (указаны на пиктограммах) и сфероидов (3D) йодистым пропидием (PI) (канал PI:  $\lambda_{\text{exc}} = 488 \text{ нм}$ ,  $\lambda_{\text{em}} = 615 \pm 20 \text{ нм}$ ). На левой пиктограмме приведены неокрашенные клетки (контроль автофлуоресценции), на правой – после инкубации с PI. Численные значения соответствуют количеству окрашенных PI клеток, выраженному в процентах от общего количества событий. **В** – конфокальные изображения сфероидов, полученных на основе клеток SKOV3.ip-Kat, EA.hy926-GFP и BJ-5TA-GFP. Представлены изображения сфероидов на 2-й и 5-й день культивирования в совмещенных красном и зеленом каналах флуоресценции (крайний левый столбец) и с разбивкой по каналам флуоресценции. Крайний правый столбец соответствует изображению сфероидов в проходящем свете. **Г** – оценка взаимодействия DARP-NanoLuc-SOPP3-FITC со сфероидом, полученными на основе клеток SKOV3.ip-Kat, EA.hy926 и BJ-5TA. Представлены конфокальные изображения сфероидов через различное время инкубации (3, 24 и 72 ч) с DARP-NanoLuc-SOPP3-FITC (0.5 мкМ, концентрация указана по красителю). Масштабная линейка на конфокальных изображениях соответствует 100 мкм

нал не только для HER2-положительных клеток аденокарциномы SKOV3.ip-Kat, но и для клеток стромы. BRET-индуцированная цитотоксичность DARP-NanoLuc-SOPP3 в присутствии фуримазина оказалась в ~10 раз ниже в отношении 3D-культуры по сравнению с 2D-культурой ( $IC_{50}$ , рассчитанная с помощью GraphPad Prism 10.1.0, составила 6.58 мкМ, *рис. 4Б*).

Для изучения роли адресного модуля DARPin в селективном накоплении DARP-NanoLuc-SOPP3 в HER2-положительных опухолях животных с помощью системы прижизненного биоимиджинга IVIS на мышцах с ксенографтными подкожными опухолями на основе клеток SKOV3 была исследована дина-

мика накопления конъюгата DARP-NanoLuc-SOPP3 с красителем Cyanine 5.5 в опухоли. Через 2 ч после внутривенного введения животному 40-мкМ раствора DARP-NanoLuc-SOPP3-Cy5.5 (концентрация указана по красителю) в опухоли начинает детектироваться флуоресцентный сигнал, который постепенно усиливается, достигая максимума к 96 ч (*рис. 4В,Г*), после чего снижается. Полученные результаты позволяют заключить, что адресный модуль DARPin в составе BRET-пары NanoLuc-SOPP3 позволяет не только быстро (в течение первых 2–4 ч после инъекции) накопиться препарату в опухоли, но и избежать накопления в жизненно важных органах.



**Рис. 4.** BRET-индуцированная цитотоксичность DARP-NanoLuc-SOPP3 в 3D-культуре и биораспределение *in vivo*. **А** – конфокальные изображения сфероидов (SKOV3.ip-Kat, EA.hy926-GFP и BJ-5TA-GFP) после инкубации в течение 19 и 72 ч с DARP-NanoLuc-SOPP3 (300 мкМ). **Б** – BRET-индуцированная цитотоксичность DARP-NanoLuc-SOPP3 в отношении сфероидов, сформированных из клеток аденокарциномы яичника и клеток стромы. **В** – распределение DARP-NanoLuc-SOPP3-Су5.5 в организме мыши с ксенографтной подкожной HER2-положительной опухолью (обведена синей пунктирной линией) на основе клеток SKOV3. **Г** – зависимость интенсивности флуоресценции (выражена в фотонах в секунду на см<sup>2</sup> настерадиан) от времени. График построен на основании данных, соответствующих средней яркости области опухоли на рис. **В** (синяя пунктирная линия) в определенный момент времени

### ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Традиционная ФДТ представляет собой очень перспективный подход к лечению злокачественных опухолей благодаря пространственной и временной избирательности и минимальной инвазивности по отношению к здоровым клеткам. Однако глубина проникновения света, необходимая для активации ФС, равно как и aberrантное накопление химических ФС в клетках кожи, приводящее к нежелательным светоактивируемым реакциям, сдерживают широкое применение ФДТ в клинике [5, 32]. Решить эти проблемы позволит создание BRET-активируемых систем, состоящих из полностью биосовместимых компонентов.

В данном исследовании нами создана система для адресной HER2-специфичной BRET-активируемой ФДТ на основе мультимодального белка DARP-NanoLuc-SOPP3, состоящего из адресного модуля, специфичного к онкомаркеру HER2, и белковой пары для BRET-индуцированной ФДТ NanoLuc-SOPP3. В опытах *in vitro* и на модели 3D-сфероидов

доказана фотоиндуцируемая без внешнего источника света цитотоксичность данной системы в отношении HER2-положительных клеток аденокарциномы яичников человека, кроме того, в опытах на животных с подкожными HER2-положительными опухолями показано селективное накопление DARP-NanoLuc-SOPP3 в опухолевом очаге. Учитывая опубликованные данные, согласно которым время полужизни люминесцентного сигнала в системе NanoLuc-фуримазин составляет более 2 ч [17], а также наши данные по BRET-индуцированной фототоксичности NanoLuc-SOPP3 [20], мы полагаем, что мультимодальный белок DARP-NanoLuc-SOPP3 может использоваться в терапии *in vivo* при схеме введения белка и люциферазного субстрата фуримазина, обеспечивающей длительное, одновременное и высокое поддержание в опухоли этих компонентов, ключевых для BRET-индуцированной ФДТ.

Наши результаты демонстрируют большой потенциал разработанной белковой самовозбуждающейся адресной BRET-системы для ФДТ.

На основании проведенных исследований можно заключить, что предложенная в данной работе полностью биосовместимая система для адресной ВРЕТ-индуцированной терапии на основе белка DARP-NanoLuc-SOPP3 позволяет преодолеть два основных ограничения традиционной ФДТ: 1) побочный фототоксический эффект от аберрантного накопления химических ФС и вызванные этим светоактивируемые реакции; 2) необходимость внешне-

го источника излучения, зачастую в виде дорогостоящих в силу высокотехнологичной конфигурации, устройств. ●

*Работа выполнена при финансовой поддержке  
Российского научного фонда № 21-74-30016  
«Органотипические модели опухолей  
с использованием микрофлюидных технологий».*

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Li X., Lovell J.F., Yoon J., Chen X. // Nat. Rev. Clin. Oncol. 2020. V. 17. № 11. P. 657–674.
- Dolmans D.E., Fukumura D., Jain R.K. // Nat. Rev. Cancer. 2003. V. 3. № 5. P. 380–387.
- Shramova E.I., Kotlyar A.B., Lebedenko E.N., Deyev S.M., Proshkina G.M. // Acta Naturae. 2020. V. 12. № 3. P. 102–113.
- Li X., Kwon N., Guo T., Liu Z., Yoon J. // Angew. Chem. Int. Ed. Engl. 2018. V. 57. № 36. P. 11522–11531.
- Fan W., Huang P., Chen X. // Chem. Soc. Rev. 2016. V. 45. № 23. P. 6488–6519.
- Borgia F., Giuffrida R., Caradonna E., Vaccaro M., Guarneri F., Cannavo S.P. // Biomedicines. 2018. V. 6. № 1. P. 1–12.
- Pallet N., Karras A., Therivet E., Gouya L., Karim Z., Puy H. // Clin. Kidney J. 2018. V. 11. № 2. P. 191–197.
- An Y., Xu D., Wen X., Chen C., Liu G., Lu Z. // Adv. Hlth. Mater. 2023. P. e2301326.
- Hsu C.Y., Chen C.W., Yu H.P., Lin Y.F., Lai P.S. // Biomaterials. 2013. V. 34. № 4. P. 1204–1212.
- Kim S., Jo H., Jeon M., Choi M.G., Hahn S.K., Yun S.H. // Chem. Commun. (Camb.). 2017. V. 53. № 33. P. 4569–4572.
- Kim Y.R., Kim S., Choi J.W., Choi S.Y., Lee S.H., Kim H., Hahn S.K., Koh G.Y., Yun S.H. // Theranostics. 2015. V. 5. № 8. P. 805–817.
- Yang Y., Hou W., Liu S., Sun K., Li M., Wu C. // Biomacromolecules. 2018. V. 19. № 1. P. 201–208.
- Al-Ani A.W., Zhang L., Ferreira L., Turyanska L., Bradshaw T.D., Thomas N.R. // Nanomedicine. 2019. V. 20. P. 102005.
- Yan H., Forward S., Kim K.H., Wu Y., Hui J., Kashiparekh A., Yun S.H. // Biomaterials. 2023. V. 296. P. 122079.
- Kim E.H., Park S., Kim Y.K., Moon M., Park J., Lee K.J., Lee S., Kim Y.P. // Sci. Adv. 2020. V. 6. № 37. P. eaba3009.
- Shramova E.I., Chumakov S.P., Shipunova V.O., Ryabova A.V., Telegin G.B., Kabashin A.V., Deyev S.M., Proshkina G.M. // Light Sci. Appl. 2022. V. 11. № 1. P. 38–50.
- Hall M.P., Unch J., Binkowski B.F., Valley M.P., Butler B.L., Wood M.G., Otto P., Zimmerman K., Vidugiris G., Machleidt T., et al. // ACS Chem. Biol. 2012. V. 7. № 11. P. 1848–1857.
- Shu X., Lev-Ram V., Deerinck T.J., Qi Y., Ramko E.B., Davidson M.W., Jin Y., Ellisman M.H., Tsien R.Y. // PLoS Biol. 2011. V. 9. № 4. P. e1001041.
- Westberg M., Bregnhøj M., Etzerodt M., Ogilby P.R. // J. Phys. Chem. B. 2017. V. 121. № 40. P. 9366–9371.
- Shramova E.I., Filimonova V.P., Frolova A.Yu., Pichkur E.N., Fedotov V.R., Konevega A.L., Deyev S.M., Proshkina G.M. // Eur. J. Pharm. Biopharm. 2023. V. 193. P. 208–217.
- Mironova K.E., Chernykh O.N., Ryabova A.V., Stremovskiy O.A., Proshkina G.M., Deyev S.M. // Biochemistry (Moscow). 2014. V. 79. № 12. P. 1391–1396.
- Pfleger K.D., Eidne K.A. // Nat. Methods. 2006. V. 3. № 3. P. 165–174.
- Proshkina G.M., Shramova E.I., Shilova O.N., Ryabova A.V., Deyev S.M. // J. Photochem. Photobiol. B. 2018. V. 188. P. 107–115.
- Shramova E.I., Proshkina G.M., Deyev S.M., Petrov R.V. // Dokl. Biochem. Biophys. 2018. V. 482. № 1. P. 288–291.
- Shramova E.I., Proshkina G.M., Deyev S.M., Petrov R.V. // Dokl. Biochem. Biophys. 2017. V. 474. № 1. P. 228–230.
- Sogomonyan A.S., Shipunova V.O., Soloviev V.D., Larionov V.I., Kotelnikova P.A., Deyev S.M. // Acta Naturae. 2022. V. 14. № 1. P. 92–100.
- Mosmann T. // J. Immunol. Methods. 1983. V. 65. № 1–2. P. 55–63.
- Pluckthun A. // Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol. 2015. V. 55. P. 489–511.
- Yarden Y. // Oncology. 2001. V. 61 Suppl 2. P. 1–13.
- Yan M., Schwaederle M., Arguello D., Millis S.Z., Gatalica Z., Kurzrock R. // Cancer Metastasis Rev. 2015. V. 34. № 1. P. 157–164.
- Swaminathan S., Ngo O., Basehore S., Clyne A.M. // ACS Biomater. Sci. Eng. 2017. V. 3. № 11. P. 2999–3006.
- Mallidi S., Anbil S., Bulin A.L., Obaid G., Ichikawa M., Hasan T. // Theranostics. 2016. V. 6. № 13. P. 2458–2487.

UDC 576.32/.36

# Membrane Partitioning of TEMPO Discriminates Human Lung Cancer from Neighboring Normal Cells

O. K. Gasymov<sup>1\*</sup>, M. J. Bakhishova<sup>1</sup>, R. B. Aslanov<sup>1</sup>, L. A. Melikova<sup>1,2</sup>, J. A. Aliyev<sup>2</sup><sup>1</sup>Institute of Biophysics, Ministry of Science and Education Republic of Azerbaijan, Baku, AZ1171 Azerbaijan<sup>2</sup>National Center of Oncology, Azerbaijan Republic Ministry of Health, Baku, AZ1012 Azerbaijan

\*E-mail: oktaygasimov@gmail.com

Received: May 05, 2023; in final form, October 12, 2023

DOI: 10.32607/actanaturae.19426

**ABSTRACT** The plasma membranes of normal and cancer cells of the lung, breast, and colon tissues show considerably different lipid compositions that greatly influence their physicochemical properties. Partitioning of the spin probe 2,2,6,6-tetramethylpiperidine-1-oxyl (TEMPO) into the membranes of human lung normal and carcinoma cells was assessed by EPR spectroscopy to estimate the impact of the lipid compositions. The goal was to reveal potential strategies for cancer therapy attributable to the membrane properties. The study was conducted at pH values of 7.3 and 6.2, relevant to the microenvironments of normal and cancer cells, respectively. The TEMPO partitioning was examined in the temperature interval of 283–317K to reveal the efficacy of local hyperthermia used in chemotherapy. Results indicate that the TEMPO partitioning coefficient for the membranes of human lung carcinoma cells is significantly higher compared with that of neighboring normal cells. Increased partition coefficients were observed at relatively higher temperatures in both normal and cancer cells. However, compared to the normal cells, the cancer cells demonstrated higher partition coefficients in the studied temperature range. The data obtained with C12SL (spin-labeled analog of lauric acid) indicate that increased membrane dynamics of the cancer cells is a possible mechanism for enhanced partitioning of TEMPO. Free energy values for partitioning estimated for pH values of 6.2 and 7.3 show that TEMPO partitioning requires 30% less energy in the cancer cells at pH 7.3. TEMPO and its derivatives have previously been considered as theranostic agents in cancer research. Data suggest that TEMPO derivatives could be used to test if complementary alkalization therapy is effective for cancer patients receiving standard chemotherapy with local hyperthermia.

**KEYWORDS** electron paramagnetic resonance, TEMPO partitioning, lung carcinoma, cell membrane lipid composition, cell membrane sensitivity.

**ABBREVIATIONS** NSCLC – non-small cell lung cancer; FAS – fatty acid synthase; SCD1 – stearyl-CoA desaturase 1; EPR – Electron Paramagnetic Resonance.

## INTRODUCTION

Cancer cells, even within the same tumor mass, show heterogeneity in both the phenotypic and functional levels. The heterogeneity of the cancer cell population is dynamic and susceptible to significant modifications by various factors during cancer development [1, 2]. In the course of development, cancer cells acquire new capabilities, such as evading apoptosis, self-sufficiency in growth signals, insensitivity to anti-growth signals, tissue invasion and metastasis, limitless replicative potential, and sustained angiogenesis. It is contended that these capabilities are shared in all types of human tumors [3]. Metastasis of cancer cells is the major cause of mortality in cancer patients. Epithelial-mesenchymal transition in cancer cells (carcinomas) is

critical for the development of metastasis capability. Several steps are involved in metastatic progression, during which cancer cells lose their polarity, cell-to-cell adhesion, etc. All these changes are manifested in the cell membranes that play a fundamental role in cell functioning [3, 4].

One of the main components of a cell membrane is a lipid bilayer that contains various lipids, such as asymmetrically arranged phospholipids, sphingolipids, glycolipids, cholesterol, etc. [5–7]. A wide variety of proteins, called transmembrane proteins, are embedded in the cell membranes and protrude on one or both sides. There are also peripheral membrane proteins that temporarily associate with the membranes of the cells to perform various functions. Both

membrane-embedded and -associated proteins and peptides play a critical role in cell functioning, particularly in cellular signal transduction. Often, for the cells to execute specific functions, the actions of these proteins need to be regulated in an orchestrated manner [4, 8–10]. Most studies related to cell membrane functions are devoted to investigating the proteins involved in various signaling pathways [11]. However, the lipid compositions provide not only specific hydrophobic environments for the proper folding of the membrane proteins, but also modulate their functions and participate in the maintenance of cell architecture [5–7]. Yet, relatively little attention has been paid to the functional role of lipids and lipid domains in the cell membrane.

A large body of evidence has been accumulated that supports the critical role of lipid compositions in healthy cell membranes and their significant alterations in various diseases, including cancer [12–14].

Lipid compositions play a pivotal role in cell functioning. Based on this observation, modulation of cell membrane components and/or properties has been proposed as a new therapeutic strategy for cancer therapy [13]. Lateral arrangements of the lipids in the membranes of the cells are heterogeneous and described as membrane lipid domains [15–18]. The lipid domains composed of various types of lipids are functional as lipids but indirectly can also influence and/or modulate membrane function. The specific composition of each lipid domain determines its distinct physicochemical properties [12, 14]. The lipid compositions of the membranes of cancer cells are significantly altered compared to those of healthy controls [13, 14, 19]. These findings provide the basis to characterize cancer cells by studying the lipid micro-environment of the membranes.

Lipid reprogramming of cancer cells and their possible mechanisms of action have also been investigated for lung cancer, particularly in non-small cell lung cancer (NSCLC). Lipid composition is also pivotal for NSCLC cell migration. It has been shown that migration of these cells can be inhibited considerably by cholesterol depletion in lipid rafts [20]. Progression of many types of cancer cells, including NSCLC, requires altered and enhanced fatty acid metabolism to support cell division and growth. In preclinical models, inhibition of acetyl-CoA carboxylase, the enzyme that regulates *de-novo* fatty acid synthesis, represses tumor growth in NSCLC [21, 22].

Overexpression of fatty acid synthase (FAS), a lipogenic enzyme, is observed in various types of cancer, including lung, colon, and prostate cancers. FAS provides a *de-novo* fatty acid synthesis that modifies the lipid compositions of cancer cells [23]. Stearoyl-CoA

desaturase 1 (SCD1) is another protein involved in lipid metabolism that plays an essential role in the malignant transformation of lung cancer cells [24, 25]. Desaturation and prolongation of fatty acids have been shown for lung cancer cells. In the desaturation event, each double bond in the *cis* configuration creates a twist in the acyl chain that, in turn, increases the membrane fluidity. Increased membrane fluidity induced by desaturation stimulates cancer metastasis and is associated with poor prognosis in lung cancer patients.

Electron Paramagnetic Resonance spectroscopy (EPR) with the use of various nitroxide probes has been developed as a powerful tool to characterize the lipid micro-environment of the cell membranes. Characterization of the lipid micro-environments of the cell membranes of healthy and cancer tissues is important to understand the functional changes in the cancer cell membranes associated with lipid components. The sensitivity of cancer cell membranes to relevant environmental conditions is an important attribute in developing a method for preferential drug delivery to cancer cells using the differences in the properties of the lipid domains. Previously, to segregate the contribution of only lipid components of the cell membranes, we investigated the properties of liposomes fabricated using lipids extracted from human lung cancer and normal cells [26, 27]. The liposomes composed of the cancer cell lipids showed significantly enhanced partitioning of spin probe 2,2,6,6-tetramethylpiperidine-1-oxyl (TEMPO) compared to those fabricated using normal cell lipids. In the current study, the partitioning of TEMPO into the membranes of live cells of human lung normal and carcinoma tissues was examined. A wide assortment of nitroxide spin probes can be used to characterize different regions of the cell membrane. TEMPO, used in this study, does not show any affinity to the membrane proteins and, therefore, provides a characterization of the lipid phase of the membrane as a separate component. However, unlike the studies performed in liposomes, the lipid phase of the membrane is modified by the presence of membrane proteins. The experiments were performed in a temperature interval of 283–317 K, the highest value of which matches the condition used in local hyperthermia [28, 29]. The experiments at pH 6.2 mimic the acidic environment created in cancer development [30–32]. The study revealed differences in parameters (polarity, micro-viscosity, and the energy required to transfer TEMPO from the aqueous to the membrane environment) between the membranes of cancer and healthy cells. Compared with previous works on liposomes [26, 27], the results obtained in this study indicate that pro-

teins embedded in the cell membranes significantly alter the dynamics of the lipid fraction, making them more dynamic and permeable to small molecules. The determined temperature and pH sensitivities of the cell membranes may help to choose or create the appropriate conditions for cancer therapy.

## MATERIAL AND METHODS

### Human lung tissue collection

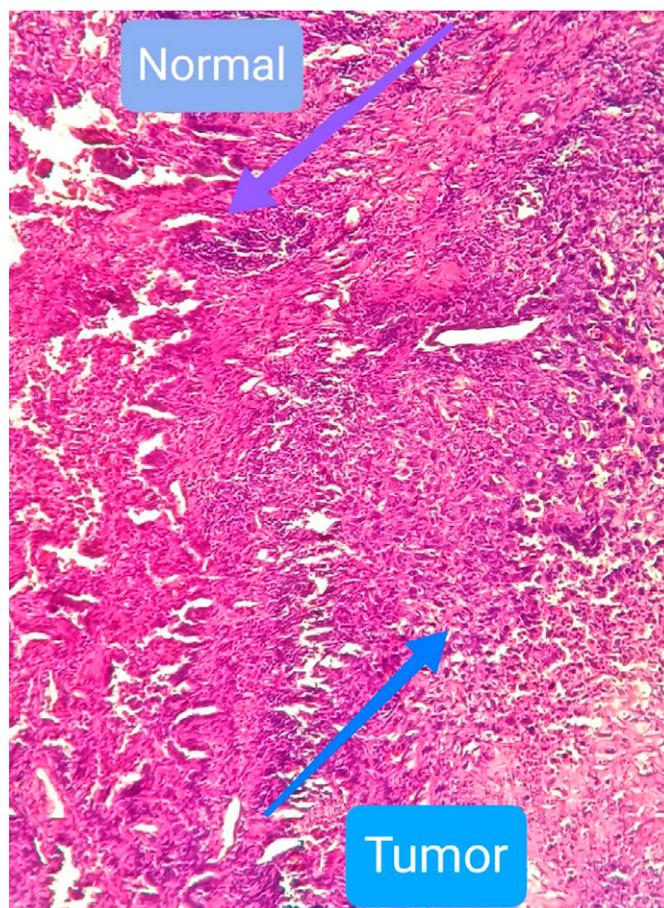
Human lung tissues were collected immediately after the surgery on lung carcinoma patients in accordance with the tenets of the Declaration of Helsinki and approved by the review board of the Azerbaijan National Center of Oncology. Informed consent was obtained from each donor. Lung carcinoma patients were selected after computed tomography. The cancer diagnosis for individuals was confirmed after biopsy and subsequent histopathological grade (aggressiveness) evaluations. Experiments were performed on five individuals. However, due to similar findings, here we report, as an example, a case of a 52-year-old male who did not receive chemo- or radiation therapy before the surgery. The results for this case were more characteristic and, therefore, analyzed thoroughly. The pathology findings on the surgical lung tissue were consistent with Stage II, pT2bN0Mx, non-small cell lung cancer. Bulk lung tissue was segregated into cancer (carcinoma) and neighboring normal (also referred to as healthy) tissues by the pathologist. Normal and cancer cells in the investigated lung tissue are indicated in *Fig. 1*. Experiments with spin-labeled lauric acid (C12SL) were performed with the surgical tissue of the patient with the following pathology findings: 53-years-old male, lung adenocarcinoma, Stage II, pT-3N0Mx.ICD-O: 8260/3, invasive.

### Preparation of epithelial cell suspension from lung tissue

The fresh lung tissue (about 2-3 h after the surgery) was washed thoroughly with PBS buffer to remove blood. Afterward, the tissue was cut into small pieces and then homogenized in PBS buffer using a glass homogenizer. The homogenized lung tissue was washed three times with PBS solution and then centrifuged (Eppendorf 5418) to remove the cell debris. Obtained cell suspension was used for the experiments. The intactness of the cells was assessed by Zeta-potential measurements as shown previously [33].

### EPR spectroscopy

EPR measurements were performed using a Bruker ELEXSYS E580 spectrometer at X-band frequency with variable temperature accessory. The aqueous



**Fig. 1.** Normal and cancer cells in lung tissue

suspension of lung carcinoma and neighboring normal cells with TEMPO were placed into Pyrex capillary tubes with an I.D. of 0.6 mm. EPR spectra were recorded with the following instrument parameters: scan width: 100 Gauss; sweep time: 40 s; modulation amplitude: 1 Gauss; modulation frequency: 100 kHz; microwave power: 0.47 mW; and time constant: 0.1 s. Before the measurements, the samples were kept for 5 minutes at each temperature to ensure that the sample temperature matched the set temperatures.

### Partitioning of TEMPO in the membranes of human lung normal and carcinoma cells

TEMPO dissolved in an aqueous solution displays a well-known EPR spectrum with three components resulting from nitrogen hyperfine interactions. However, TEMPO incubated in the cell environment shows a composite EPR spectrum, the third component (located in a high magnetic field) of which is partially resolved. The difference in the nitrogen splitting constant of TEMPO in hydrophobic (cell membrane) and hydrophilic (aqueous) environments is the reason for the split of the third component. Consequently,

the EPR spectra of TEMPO incubated with cells in an aqueous environment reflect the partitioning of TEMPO in the lipid fraction of the cell membrane and aqueous environments. To resolve the spectral components, the EPR spectra of TEMPO were analyzed using the LabVIEW program developed by Christian Altenbach (<https://sites.google.com/site/altenbach/>), using the spectral simulation code written in FORTRAN [34]. Along with computer simulations, rotational correlation times of TEMPO were also calculated using the following formula that uses the peak heights and line widths of the first derivative EPR spectra [35]:

$$\tau_c = 6.5 \times 10^{-10} W_0 [(h_0/h_{-1})^{1/2} - 1],$$

where  $W_0$  is the width (in Gauss) of the central component, while  $h_0$  and  $h_{-1}$  are the heights of the central and high-magnetic field components of the first derivative EPR spectrum. As mentioned above, the EPR spectra resulting from the partitioning of TEMPO in the system are composite and consist of two components. Therefore, the formula above was applied after the decomposition of the EPR spectra into lipophilic and hydrophilic components. Because of the close similarity of the correlation times obtained from the software and the formula, data are shown only as deduced from the software.

Double integrals of the EPR spectral components ( $I_{mbr}$  and  $I_{aq}$  represent TEMPO confined in the membrane and aqueous environments, respectively) were employed to calculate partition coefficients with the following formula:  $K = I_{mbr}/(I_{mbr} + I_{aq})$ . To characterize the EPR spectral components, the membrane and aqueous environments were described as lipophilic and hydrophilic, respectively. Apparently, a partition coefficient depends on both the concentration of the lipid fractions and the number of lung cells in the aqueous system [36]. For an accurate comparison of the data related to the partition coefficients, the same amount (by weight) of cancer and normal cell suspensions were used. Both cancer and normal cell suspensions were incubated with TEMPO (150  $\mu$ M total concentration) for about 30 min. The experimental conditions used in this study allow us to compare the partition coefficients of the normal and cancer cells directly.

The temperature dependence of the equilibrium constant  $K$  (partition coefficient in our case) was used to calculate the free energy changes required to transfer TEMPO molecules from the aqueous to the lipid phase of the membranes of the healthy and cancer cells.

$$\log K = -\Delta G/RT$$

Similarly, the temperature dependence of the rotational correlation times of TEMPO was used to determine the activation energies for rotational motions in the membranes of the healthy and cancer cells.

#### Dynamics of the lipid domain of the cell membrane evaluated by spin-labeled lauric acid analog (C12SL)

Experimental procedures with C12SL, the chemical structure of which is shown below in the relevant *Figure*, were similar to that of TEMPO described in section 2.4. In contrast to TEMPO, C12SL was dissolved in ethanol. An equal amount of each cell suspension (0.1 mg/ml) was incubated with 200  $\mu$ M of C12SL for 30 min. A high concentration of C12SL was employed to monitor both the dynamics of the lipid domain and its maximal incorporation capacity in healthy and cancer cells. The attained complex EPR spectra were analyzed with a multi-component EPR program [34]. Analyses of the EPR spectra of C12SL were performed in two steps. In the first step, free C12SL, not incorporated into the cell membrane, was removed to decrease the number of fitting parameters. Removal of free C12SL spectra was performed using the EPR program “FreeRemover”, which is part of the program package [34]. In the second step, the spectra that lack “free” spectral components were analyzed by the multi-component EPR spectral analysis as described above.

### RESULTS AND DISCUSSION

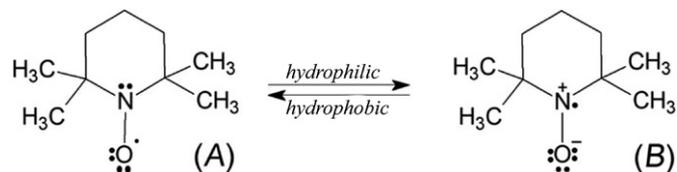
As indicated above, the lipid compositions in the healthy and cancer cells of various tissues significantly differ from each other [12–14]. The lipid compositions of the cells determine the specific properties of the cell membranes, such as membrane fluidity, permeability, the temperature of phase transition, etc. These characteristics of the membranes are essential from a therapeutic point of view, particularly for drug delivery applications. TEMPO does not show any binding properties toward the proteins. Therefore, the use of TEMPO in membrane research allows for a selective characterization of the lipid phase. Unlike the findings obtained in liposomes [26, 27], in this case, lipid phase properties are modified by the membrane proteins of the corresponding cells. Below, we provide experiments of TEMPO partitioning into the membranes of the cells at the temperature of 283–317 K interval and pH values of 7.3 and 6.2, conditions that are relevant for cancer therapeutics.

#### Partitioning of TEMPO into the membranes of healthy and cancer human lung cells

The EPR spectra of TEMPO incubated with human lung cancer and healthy cells at pH 7.3 are shown

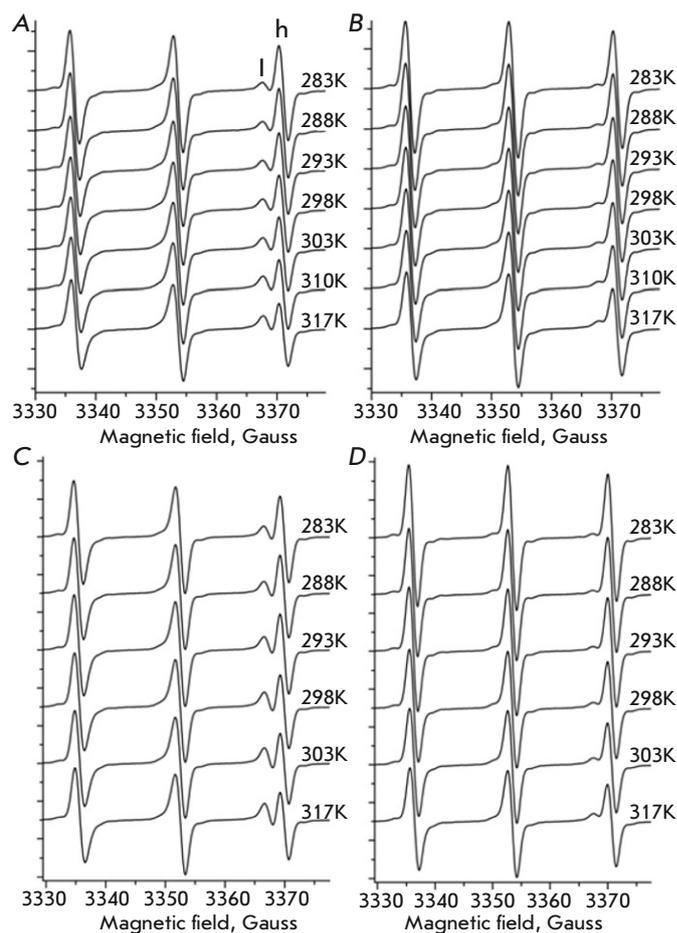
in Figs. 2A,B, respectively. Components of the EPR spectra in the high magnetic field split into two peaks labeled as l (lipophylic) and h (hydrophilic). Thus, each EPR spectrum is composed of two components resulting from the partitioning of TEMPO between the cell membrane (lipophylic) and aqueous (hydrophilic) phases. The relative amplitudes of the high-field components of EPR spectra indicate that the partition of TEMPO is significantly different for cancer and healthy cells (Fig. 2). At pH 7.3, the relative amount of TEMPO in the membranes of the cancer cells is significantly higher compared to that in healthy cells. Interestingly, differences in TEMPO partitioning are even higher at pH 6.2 compared to those at pH 7.3 (Fig. 2A,C). EPR spectra in the temperature interval of 283–317 K indicate that an increase in temperature further augments the relative amount of TEMPO in the membranes of both cell types. However, compared to healthy cells, the membranes of cancer cells incorporate more TEMPO molecules in the respective conditions.

To describe the EPR spectra of TEMPO in environments with significantly different hydrophobicity values, one should consider the following aspects. The observed splits of the EPR components in a high magnetic field arise from the small differences in the isotropic hyperfine coupling constants ( $A_{iso}$ ) and  $g$  factors of the nitroxide spin probe in each environment. These differences are explained as changes in the relative contribution of two canonical structures of TEMPO as shown below [37].



Polar solvents like the aqueous solution tend to stabilize the structure (B) in which the unpaired electron density is localized on the N-atom. The increased relative contribution of structure (B) gives rise to the nitrogen hyperfine coupling constant. In contrast, structure (A), in which the unpaired electron density is localized on the oxygen atom, is preferentially stabilized in a hydrophobic environment. Therefore, the nitrogen hyperfine coupling constant is lower in a hydrophobic environment compared to that of a hydrophilic environment.

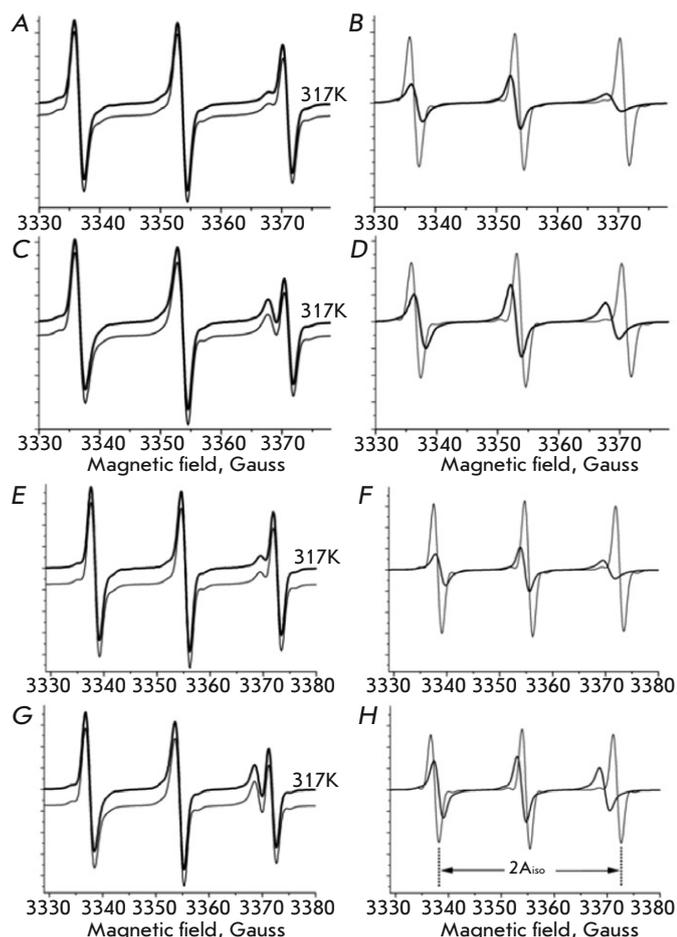
Decompositions of the EPR spectra of TEMPO incubated with cancer and healthy cells of the human lung at 317K using the two-component model, as an example, are shown in Fig. 3. The composite EPR spectra simulated from the resolved parameters are indistinguishable from the experimental spectra (Fig. 3A,C,E,G). Therefore, the simulated composite EPR



**Fig. 2.** EPR spectra of TEMPO resulted from the partitioning in the membranes of human lung normal and carcinoma cells. EPR spectra of TEMPO for carcinoma (A) and healthy (B) cells at pH 7.3 and at various temperature values. EPR spectra of TEMPO for carcinoma (C) and healthy (D) cells at pH 6.2 and at various temperature values. The l and h symbols denote the spectral components of the EPR spectra of TEMPO localized in lipophilic (cell membrane) and hydrophilic (aqueous) regions. The symbols l and h indicate the “lipophilic” and “hydrophobic” components of TEMPO, respectively. The temperature for each spectrum is shown in the Kelvin scale

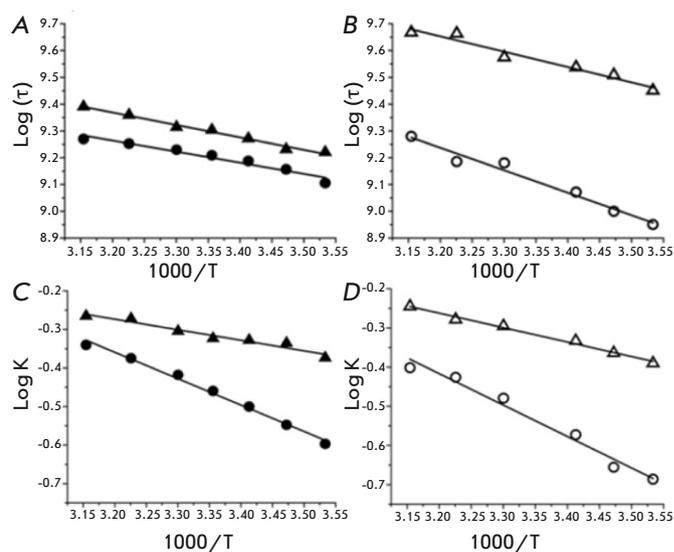
spectra are vertically shifted for easy visualization. The EPR spectra of the resolved components (Fig. 3B,D,F,H) are in full agreement with the above-mentioned suggestion. Indeed, a mismatch in the positions of the EPR components ( $g$  values) and nitrogen hyperfine coupling constant ( $2A_{iso}$ , Fig. 3H) is evident. In all evaluated samples, the EPR spectra of TEMPO in the aqueous environments (thin lines in Figs. 3B,D,F,H representing healthy and cancer cells at pH values of 7.3 and 6.2) show identical  $2A_{iso}$  values of 34.5 Gauss (Table 1).

However, the  $2A_{iso}$  values of TEMPO incorporated into the membranes of the cells are significantly decreased and fall within an interval of 31.4–32.4 Gauss.



**Fig. 3.** Decompositions of the EPR spectra of TEMPO into components reflecting the lipophilic and hydrophilic environments. EPR spectra of TEMPO partitioning in human lung healthy and carcinoma cells at 317K and pH 7.3. (A) and (B) are the results of a two-component analysis (see Methods) and resolved components corresponding to lipophilic (sick line in B) and hydrophilic (thin line in B) for the healthy lung cells. The EPR spectrum from the fitting procedure (sick line in A) is indistinguishable from the experimental spectrum (thin line in A) and, therefore, vertically shifted for better illustration. (C) and (D) are the same as (A) and (B) but for the carcinoma cells. (E), (F), (G), and (H) indicate conditions corresponding to (A), (B), (C), and (D), respectively, but in pH 6.2.  $A_{150}$  is the isotropic hyperfine coupling constant

At pH 7.3,  $2A_{150}$  values for the EPR spectra of TEMPO incorporated in the membrane of healthy and cancer cells are 32.4 Gauss and 31.5 Gauss, respectively. Thus, the lipid fractions of the cancer cell membrane are more hydrophobic compared to those of the healthy cells. Interestingly, as judged from the  $A_{150}$  values of the EPR spectra of TEMPO, when increasing the pH from 6.2 to 7.3, a small increase in hydrophobicity was observed in the membranes of healthy cells (from 31.9 Gauss to 32.4 Gauss) but not in cancer cells (about



**Fig. 4.** Arrhenius plots for the parameters obtained from the EPR spectra of TEMPO partitioning in the healthy and carcinoma cells of the human lung tissue. Arrhenius plots for the rotational correlation times of TEMPO in the membrane environments of the cells at pH 7.3 (A) and 6.2 (B). Solid circles and solid triangles in (A) represent healthy and carcinoma cells, respectively. Open circles and triangles in (B) represent healthy and carcinoma cells, respectively. Arrhenius plots for the TEMPO partitioning coefficients in the healthy and carcinoma lung cells at pH values of 7.3 (C) and 6.2 (D). The definitions of symbols in (C) and (D) are the same as in (A) and (B), respectively.  $K$  and  $\tau$  are the partition coefficient and rotational correlation time, respectively

31.5 Gauss). As a result, at pH 6.2 the difference in hydrophobicity values is shrunken between healthy and cancer cell membranes.

TEMPO does not show any binding affinity toward proteins. Therefore, the EPR spectra of TEMPO assigned to the lipophilic phase displays the characteristics of the lipid fraction of the cell membranes. The partition coefficients for the cell membranes are significantly higher compared to those obtained in liposomes fabricated from the corresponding cells [26, 27]. Thus, the proteins embedded into the membranes modify lipid phase properties, resulting in augmented partitioning of TEMPO.

### Micro-viscosity of the lipid fraction of the cell membranes

Along with the decomposition of the EPR spectra of TEMPO, computer analysis also allows us to estimate the rotational correlation times of TEMPO corresponding to the spectral components in various environments. In lipid fractions, the rotational correlation times of TEMPO in cancer cells are decreased compared to those obtained in healthy cells at both pH values (7.3 and 6.2) and the used temperature range

**Table 1.** Parameters obtained from the EPR studies on the membranes of healthy and cancer cells of the human lung

Sample	$2A_{iso}$ , Gauss		$\Delta G_{\tau}$	$\Delta G_K$
	aqueous	membrane	kcal/mol	
Healthy cells, pH 7.3	34.5	32.4	$1.9 \pm 0.2$	$3.1 \pm 0.1$
Cancer cells, pH 7.3	34.5	31.5	$2.1 \pm 0.2$	$1.2 \pm 0.1$
Healthy cells, pH 6.2	34.4	31.9	$3.8 \pm 0.3$	$3.7 \pm 0.3$
Cancer cells, pH 6.2	34.5	31.4	$2.6 \pm 0.3$	$1.7 \pm 0.1$

(Fig. 4). For example, at room temperature and pH 7.3, rotational correlation times are about 490 ps and 617 ps (Fig. 4A) for TEMPO incorporated into cancer and healthy cell membranes, respectively. Faster rotation (corresponding to a lower correlation time) of TEMPO indicates a low viscosity of the surroundings. Since TEMPO molecules reside in the lipid fraction, the data indicate enhanced dynamics of the lipid fraction.

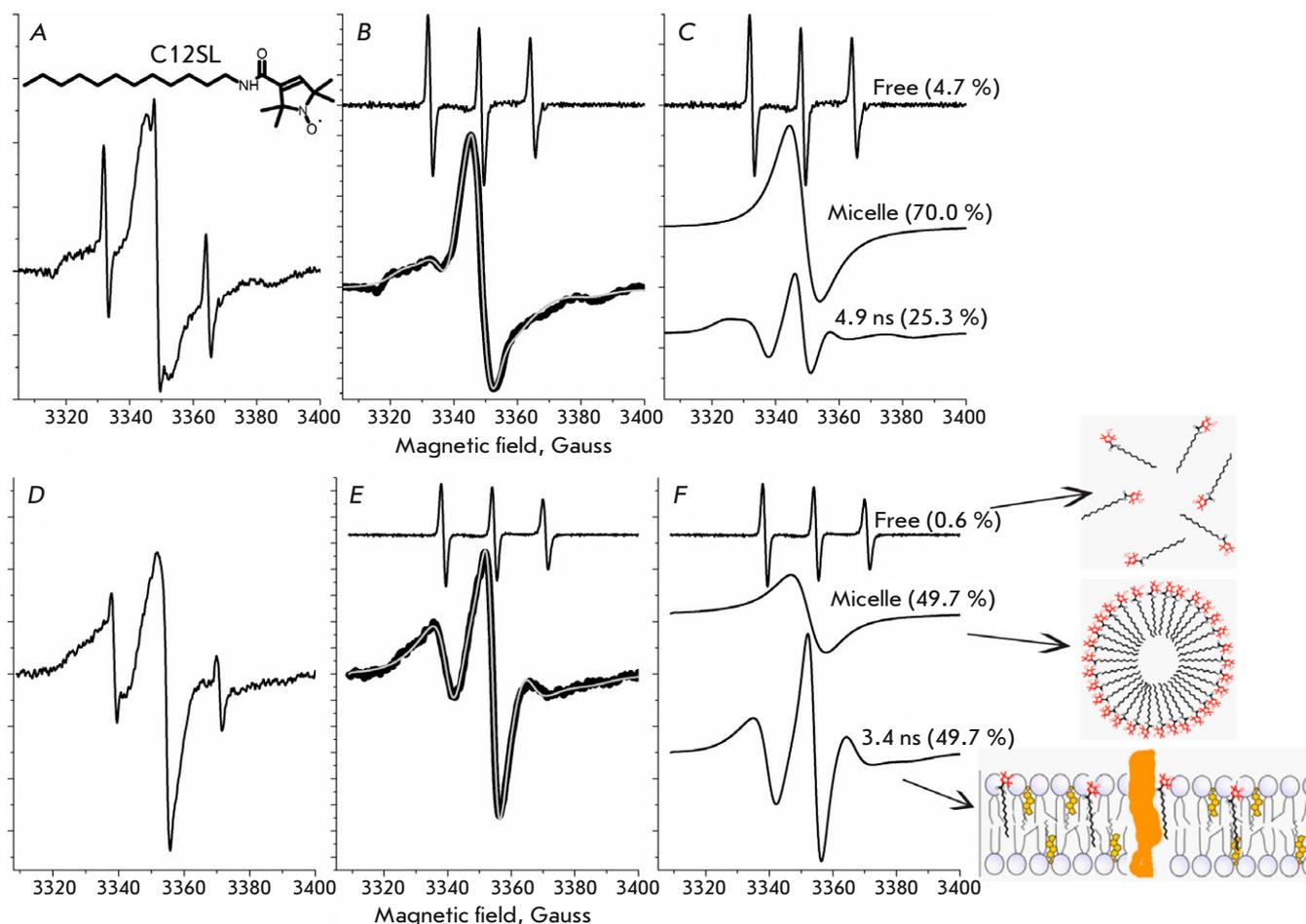
The Arrhenius plots for the correlation times obtained at various temperatures are shown in Fig. 4A,B. The activation energies of the rotational motions of TEMPO ( $\Delta G_{\tau}$ ) in the membranes of healthy and cancer cells of the human lung at pH values of 7.3 and 6.2 are shown in Table 1. The values of  $\Delta G_{\tau}$  for the membranes of healthy and cancer cells are very similar ( $\Delta G_{\tau}$  values are  $1.9 \pm 0.2$  and  $2.1 \pm 0.2$  kcal/mol, respectively), indicating the comparable micro-viscosities of the studied lipid fractions in both cases. At pH 6.2, increased values of  $\Delta G_{\tau}$  were observed for both cell types. However, the micro-viscosity of the membrane fractions of the healthy lung cells was higher compared to those of the cancer cells ( $\Delta G_{\tau}$  values are  $3.8 \pm 0.3$  and  $2.6 \pm 0.3$  kcal/mol, respectively).

### Efficiency of the transfer of TEMPO molecules from an aqueous to a lipid phase of cell membranes

Computer-assisted decompositions of the EPR spectra of TEMPO incubated with the healthy and cancer cells provided a means to conduct an evaluation of its partition coefficients. Several factors, such as lipid compositions, membrane dynamics, etc., may influence the partition of molecules (TEMPO in this study) between the membrane and the aqueous environment. Because TEMPO does not show any binding affinity toward proteins, equilibrium in the partitioning can be considered as a result of the passive incorporation of the molecules into the lipid fractions of the membranes. At this point, the term ‘passive incorporation’ indicates that the proteins localized on the cell membrane are not participating directly in this process. However, the membrane proteins may alter the properties of the lipid phase capable of influencing the partitioning characteristics of TEMPO in the cell membranes.

The Arrhenius plots for the partition coefficients ( $K$ ) obtained at various temperatures are shown in Fig. 4C,D. The standard Gibbs free energy change required to transform a TEMPO from an aqueous to a lipid phase of the membrane of healthy and cancer cells is shown in Table 1. At pH 7.3, free energy changes for the transfer of TEMPO from aqueous phase to lipid phase in healthy and cancer cell membranes are  $3.1 \pm 0.1$  kcal/mol and  $1.2 \pm 0.1$  kcal/mol, respectively. In the acidic transition from pH 7.3 to pH 6.2, the free energy changes of TEMPO transfer for healthy and cancer cell membranes increase by about 19% and 42%, reaching the values of  $3.7 \pm 0.3$  kcal/mol and  $1.7 \pm 0.1$  kcal/mol, respectively. Thus, more energy is required to transfer TEMPO to the cell membranes in an acidic pH. Data indicate that in lung tissue composed of both healthy and cancer cells TEMPO molecules will preferentially incorporate the membranes of cancer cells.

It is well established that during the progression of the disease, the cancer cells in hypoxic conditions increase glucose consumption via aerobic glycolysis (termed as the Warburg effect). This process results in the creation of an acidic micro-environment [30–32, 38–41]. Cancer cells effectively use the acidic micro-environment for mesenchymal transition and metastasis. If TEMPO is considered as a model for certain drugs, then for drug delivery, it would be beneficial to create normal pH (7.3) conditions for the cancer cells. Differences in the  $\Delta G_K$  values for healthy and cancer cells are almost identical for pH 7.3 and pH 6.2. However, the  $\Delta G_K$  value is at its smallest for cancer cells at pH 7.3, indicating that less energy is required to transfer TEMPO from the aqueous solution to the membrane. The current study has direct clinical value. TEMPO and its derivatives show significant anti-cancer effects when applied to various types of cancer, including lung cancer [42–47]. It is highly anticipated that TEMPO-benzoate, which shows significantly enhanced partitioning in liposome studies [26, 27], will also be very effective in the membranes of the corresponding cells. A FTIR study of the lipids extracted from the normal and cancer cells supports this finding.



**Fig. 5.** EPR spectra of C12SL incorporated into the lipid domain of the membranes of healthy and cancer cells of the human lung. (A), (B), and (C) are the EPR spectrum of C12SL (shown in (A)) incubated with the cell suspension of healthy lung tissue, separation of free and composite spectral components, and the spectral component of the EPR spectrum, respectively. The grey line (in (B)) is a computer-simulated spectrum from the best fit parameters of a two-component model. (D), (E), and (F) are the same as in (A), (B), and (C), but they were obtained from the cell suspension of lung cancer cells. The EPR spectra of C12SL were measured at room temperature. The schema provided in the bottom-right corner of the *Figure* illustrates C12SL in "free", "micelle" and "membrane-incorporated" situations. C12SL is a spin-labeled analog of lauric acid, the chemical structure of which is shown in *Fig. 5A*

In contrast to normal cells, the lipid fractions from the cancer cells are in a more disordered state. In addition, lipids from the cancer cells exhibit a non-cooperative temperature transition, as opposed to the cooperative temperature transition observed for the healthy cells. The results obtained from numerous human lung cancer samples will be published elsewhere.

**Evidence of increased dynamics of the lipid phase in the membranes of cancer cells compared to healthy cells**

The dynamics of the lipid phase of the membranes of healthy and cancer cells were assessed using a C12SL (*Fig. 5*). C12SL molecules possessing an amphiphilic nature are predisposed to incorporate the lipid phase of the membranes. However, the efficiency of the in-

corporation depends on the physicochemical properties of the membranes, mainly based on fluidity (dynamics). Because of the position of the nitroxide spin label on C12SL, the dynamic parameters obtained from EPR spectra will be related to the surface part of the membranes [48].

The EPR spectrum of C12SL incorporated into the membranes of healthy lung cells (pH 7.3, room temperature) is shown in *Fig 5A*. The best fit spectra obtained from a computer analysis indicate that two components (besides the free components) are sufficient to describe the composite EPR spectra (*Fig. 5B,C*). About 25% of C12SL is incorporated into the membranes of healthy cells and its rotational correlation time amounts to about 4.9 ns. Because of limited solubility, about 70% of C12SL is in micelle form in

aqueous environments. The broad singlet spectrum results from strong spin-spin exchange interactions where nitroxide spin labels are too close to each other. The EPR spectrum of C12SL incorporated into the membranes of the cancer cells of human lung tissue (Fig. 5D) is significantly different from those obtained from healthy cells (Fig. 5A). In contrast, about a two-fold higher amount of C12SL was incorporated into the membranes of cancer cells of the lung. Besides that, the dynamics of the C12SL incorporated into cancer cell membranes are significantly increased, as is apparent by the decreased rotational correlation time (3.4 ns versus 4.9 ns). Data indicates that the membranes of cancer cells are more loosely packed than those of healthy cells, resulting in more permeability. Consistent with other findings, in the case of cancer cells, a lower fraction (50% versus 70%) of the C12SL is in aggregated form. Thus, the experimental data obtained with C12SL clearly indicate that, compared to healthy cells, the membranes of cancer cells are more dynamic.

#### The cytotoxicity values (IC<sub>50</sub>) for TEMPO and its derivative compounds relevant to various applications

Nitroxides and their different derivatives exhibit numerous biologically significant functions [43]. Therefore, different objectives have been considered in their applications to various diseases, including cancer therapy. The drug applications require a unique range of IC<sub>50</sub> (the half-maximal inhibitory concentration) values. In cancer, nitroxides can be used as a radioprotector and contrast-enhancing agents in MRI (magnetic resonance imaging) [49]. For therapeutic applications, nitroxides possessing low cytotoxicity (therefore high IC<sub>50</sub> values) are preferable. TEMPO and 4-hydroxy-TEMPO (aka TEMPOL), exhibiting IC<sub>50</sub> values of 2.7 mM and 11.4 mM, respectively, are best suited for these purposes [50]. As an antiproliferative agent, the IC<sub>50</sub> values of TEMPOL for various cell lines related to breast, colon, liver, and ovary cancer fall in the range of 0.21–1.073 mM [51]. TEMPOL provides a significant adjuvant effect in cancer applications. In some cell lines for colon cancer, TEMPOL significantly enhances the cytotoxicity of the widely used anti-cancer drug doxorubicin. In the HCT116 cell lines, pretreatment with TEMPOL shows about a 7-fold decreased IC<sub>50</sub> value (from 0.38 mM to 0.053 mM). Some modified nitroxides show remarkable cytotoxicity against many cancer lines (IC<sub>50</sub> values of about 0.06 μM, including A549 cells, which are the culprit cell lines for human lung cancer [52]).

The current study is also relevant to cytotoxicity studies. It has been shown that nitroxide cytotoxicity

is strongly related to the lipid/water partition coefficients [53, 54]. Indeed, as shown above, the IC<sub>50</sub> value of the more lipophilic compound TEMPO is about 4-fold lower compared to that of the hydrophilic compound TEMPOL (just the –OH group attached to TEMPO). In line with these findings, benzoate group attachment to TEMPO dramatically enhances the partition coefficient in liposome studies [26, 27]. Thus, depending on the specific task at hand, the cytotoxicity of nitroxides (IC<sub>50</sub> values) can be considerably modified by an assortment of group attachments. The membrane partitioning values determined by the use of EPR spectroscopy can provide a preliminary, quick assessment of the cytotoxicity of nitroxide compounds.

#### CONCLUSIONS

TEMPO partitioning in the membranes of healthy and cancer cells of human lung tissues indicates that compared to healthy cells, the partition coefficients for the cancer cells are significantly higher. A positive correlation is observed between the temperature and the partition coefficient values for both cell types. The DG<sub>K</sub> values determined for TEMPO suggest that, compared to healthy cells, cancer cells more readily incorporate TEMPO molecules into their membrane. The lowest free energy change required to transfer TEMPO from an aqueous to a lipid phase of the membrane was observed in cancer cells at pH 7.3. Considering TEMPO as an anti-cancer drug for various types of cancer, in addition to standard chemotherapy, complementary alkalization therapy to change the acidic microenvironment to a slightly more alkaline one could be beneficial to some cancer patients. The TEMPO partitioning experiments described above were performed on four additional lung cancer patients. The characteristics of TEMPO partitioning were similar in all cases. However, the difference between the values of the TEMPO partitioning coefficients for lung normal and cancer cells varied and was case-dependent. The benefit derived from hyperthermia and/or alkalization may not be effective in all cases. Therefore, characterization of cells by TEMPO partitioning could be a valuable tool for choosing a proficient strategy for personalized cancer chemotherapy. Our experiments with C12SL indicate that the increased membrane dynamics in cancer cells could be a mechanism of enhanced partitioning of TEMPO. ●

*R. Gasanova assisted in EPR measurements.*

*The authors declare that they have no conflicts of interest.*

*This work was supported by the Azerbaijan Science Foundation (Grant No. EIF-MQM-ETS-2020-1(35)-08/07/3-M-07).*

REFERENCES

1. Meacham C.E., Morrison S.J. // *Nature*. 2013. V. 501. № 7467. P. 328–337.
2. Singh A.K., Arya R.K., Maheshwari S., Singh A., Meena S., Pandey P., Dormond O., Datta D. // *Int. J. Cancer*. 2015. V. 136. № 9. P. 1991–2000.
3. Hanahan D., Weinberg R.A. // *Cell*. 2000. V. 100. № 1. P. 57–70.
4. Rakoff-Nahoum S. // *Yale J. Biol. Med.* 2006. V. 79. № 3–4. P. 123–130.
5. Casares D., Escribá P.V., Rosselló C.A. // *Int. J. Mol. Sci.* 2019. V. 20. № 9. P. 2167.
6. Lorent J.H., Levental K.R., Ganesan L., Rivera-Longsworth G., Sezgin E., Doktorova M., Lyman E., Levental I. // *Nat. Chem. Biol.* 2020. V. 16. № 6. P. 644–652.
7. Stieger B., Steiger J., Locher K.P. // *Biochim. Biophys. Acta - Mol. Basis Dis.* 2021. V. 1867. № 5. P. 166079. <https://doi.org/10.1016/j.bbadis.2021.166079>.
8. Zulueta Díaz Y.L.M., Arnsfang E.C. // *Membranes*. 2021. V. 11. № 11. P. 828.
9. van Deventer S., Arp A.B., van Spriel A.B. // *Trends Cell Biol.* 2021. V. 31. № 2. P. 119–129.
10. Raghunathan K., Kenworthy A.K. // *Biochim. Biophys. Acta Biomembr.* 2018. V. 1860. № 10. P. 2018–2031.
11. Sackmann E., Tanaka M. // *Biophys. Rev.* 2021. V. 13. № 1. P. 123–138.
12. Hristova K., Selsted M.E., White S.H. // *J. Biol. Chem.* 1997. V. 272. № 39. P. 24224–24233.
13. Zalba S., ten Hagen T.L.M. // *Cancer Treat. Rev.* 2017. V. 52. P. 48–57.
14. Szlasa W., Zendran I., Zalesińska A., Tarek M., Kulbacka J. // *J. Bioenerg. Biomembr.* 2020. V. 52. № 5. P. 321–342.
15. Karnovsky M.J., Kleinfeld A.M., Hoover R.L., Klausner R.D. // *J. Cell Biol.* 1982. V. 94. № 1. P. 1–6.
16. Owen D.M., Gaus K. // *Front. Plant Sci.* 2013. V. 4. <https://doi.org/10.3389/fpls.2013.00503>.
17. Ursell T.S., Klug W.S., Phillips R. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2009. V. 106. № 32. P. 13301–13306.
18. Feigenson G.W. // *Biochim. Biophys. Acta Biomembr.* 2009. V. 1788. № 1. P. 47–52.
19. Preta G. // *Front. Cell Dev. Biol.* 2020. V. 8. P. 1–10.
20. Jeon J.H., Kim S.K., Kim H.J., Chang J., Ahn C.M., Chang Y.S. // *Lung Cancer*. 2010. V. 69. № 2. P. 165–171. <http://dx.doi.org/10.1016/j.lungcan.2009.10.014>.
21. Svensson R.U., Shaw R.J. // *Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol.* 2016. V. 81. № 1. P. 93–103.
22. Munir R., Lisec J., Swinnen J.V., Zaidi N. // *Br. J. Cancer*. 2019. V. 120. № 12. P. 1090–1098. <http://dx.doi.org/10.1038/s41416-019-0451-4>.
23. Swinnen J.V., Brusselmans K., Verhoeven G. // *Curr. Opin. Clin. Nutr. Metab. Care*. 2006. V. 9. № 4. P. 358–365.
24. Hess D., Chisholm J.W., Igal R.A. // *PLoS One*. 2010. V. 5. № 6. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0011394>.
25. Du A., Wang Z., Huang T., Xue S., Jiang C., Qiu G., Yuan K. // *MedComm - Oncol*. 2023. V. 2. № 1. P. 1–22.
26. Gasymov O., Bakhishova M., Gasanova R., Aslanov R., Melikova L., Aliyev J. // *Russ. J. Biol. Phys. Chemisrty*. 2022. V. 7. № 2. P. 261–267.
27. Bakhisova M., Aslanov R.B., Gasanova R.B., Melikova L., Aliyev J.A., Gasymov O.K. // *Trans. ANAS, Phys. Astron.* 2022. V. 52. № 5. P. 56–63.
28. Guisasola E., Asín L., Beola L., De La Fuente J.M., Baeza A., Vallet-Regí M. // *ACS Appl. Mater. Interfaces*. 2018. V. 10. № 15. P. 12518–12525.
29. Kang J.K., Kim J.C., Shin Y., Han S.M., Won W.R., Her J., Park J.Y., Oh K.T. // *Arch. Pharm. Res.* 2020. V. 43. № 1. P. 46–57.
30. Anemone A., Consolino L., Arena F., Capozza M., Longo D.L. // *Cancer Metastasis Rev.* 2019. V. 38. № 1–2. P. 25–49.
31. Gatenby R.A., Gawlinski E.T., Gmitro A.F., Kaylor B., Gillies R.J. // *Cancer Res.* 2006. V. 66. № 10. P. 5216–5223.
32. Gillies R.J., Pilot C., Marunaka Y., Fais S. // *Biochim. Biophys. Acta - Rev. Cancer*. 2019. V. 1871. № 2. P. 273–280.
33. Gasanova R.B., Melikova L.A., Gasymov O.K., Aliyev J.A. // *Mod. Achiev. Azerbaijan Med.* 2020. № 4. P. 112–117.
34. Budil D.E., Sanghyuk L., Saxena S., Freed J.H. // *J. Magn. Reson. - Ser. A*. 1996. V. 120. № 2. P. 155–189.
35. Keith A., Bulfield G., Snipes W. // *Biophys. J.* 1970. V. 10. № 7. P. 618–629.
36. Wu S.H. wei, McConnell H.M. // *Biochemistry*. 1975. V. 14. № 4. P. 847–854.
37. Griffith O.H., Dehlinger P.J., Van S.P. // *J. Membr. Biol.* 1974. V. 15. № 1. P. 159–192.
38. Gillies R.J., Robey I., Gatenby R.A. // *J. Nucl. Med.* 2008. V. 49. № 6. P. 24–43. doi: 10.2967/jnumed.107.047258.
39. Tennant D.A., Durán R.V., Gottlieb E. // *Nat. Rev. Cancer*. 2010. V. 10. № 4. P. 267–277.
40. Webb B.A., Chimenti M., Jacobson M.P., Barber D.L. // *Nat. Rev. Cancer*. 2011. V. 11. № 9. P. 671–677.
41. Ribeiro Md.L.C., Silva A.S., Bailey K.M., Kumar N.B., Seller T.A., et al. // *J. Nutr. Food Sci.* 2012. V. 1. № S2. P. 1–7.
42. Soule B.P., Hyodo F., Matsumoto K.I., Simone N.L., Cook J.A., Krishna M.C., Mitchell J.B. // *Antioxidants Redox Signal.* 2007. V. 9. № 10. P. 1731–1743.
43. Lewandowski M., Gwozdziński K. // *Int. J. Mol. Sci.* 2017. V. 18. № 11. P. 2490.
44. Suy S., Mitchell J.B., Samuni A., Mueller S., Kasid U. // *Cancer*. 2005. V. 103. № 6. P. 1302–1313.
45. Park W.H. // *Molecules*. 2022. V. 27. № 21. P. 7341.
46. Andreidesz K., Szabo A., Kovacs D., Koszegi B., Vantus V.B., Vamos E., Isbera M., Kalai T., Bognar Z., Kovacs K., et al. // *Int. J. Mol. Sci.* 2021. V. 22. № 16. P. 1406.
47. Wang M., Li K., Zou Z., Li L., Zhu L., Wang Q., Gao W., Wang Y., Huang W., Liu R., et al. // *Oncol. Lett.* 2018. V. 16. № 4. P. 4847–4854.
48. Widomska J., Raguz M., Dillon J., Gaillard E.R., Subczynski W.K. // *Biochim. Biophys. Acta Biomembr.* 2007. V. 1768. № 6. P. 1454–1465.
49. Liu Y.Q., Ohkoshi E., Li L.H., Yang L., Lee K.H. // *Bioorganic Med. Chem. Lett.* 2012. V. 22. № 2. P. 920–923. <http://dx.doi.org/10.1016/j.bmcl.2011.12.024>.
50. Guo X., Seo J.-E., Bryce S.M., Tan J.A., Wu Q., Dial S.L., Moore M.M., Mei N. // *Toxicol. Sci.* 2018. V. 163. № 1. P. 214–225.
51. Gariboldi M.B., Lucchi S., Caserini C., Supino R., Oliiva C., Monti E. // *Free Radic. Biol. Med.* 1998. V. 24. № 6. P. 913–923.
52. Zhao X.-B., Wu D., Wang M.-J., Goto M., Morris-Natschke S.L., Liu Y.-Q., Wu X.-B., Song Z.-L., Zhu G.-X., Lee K.-H. // *Bioorg. Med. Chem.* 2014. V. 22. № 22. P. 6453–6458.
53. Kroll C., Langner A., Borchert H.H. // *Free Radic. Biol. Med.* 1999. V. 26. № 7–8. P. 850–857.
54. Kroll C., Borchert H.H. // *Eur. J. Pharm. Sci.* 1999. V. 8. № 1. P. 5–9.

## ОБЩИЕ ПОЛОЖЕНИЯ

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

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

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

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

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

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

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

## ОФОРМЛЕНИЕ РУКОПИСЕЙ

Рукопись должна быть построена следующим образом:

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

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

## РЕКОМЕНДАЦИИ ПО НАБОРУ И ОФОРМЛЕНИЮ ТЕКСТА

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

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