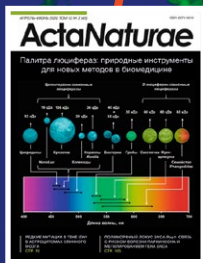


ActaNaturae

№60



Streptomyces phaeochromogenes БВ-204 – штамм-продуцент антрахинона К-1115А, нового ингибитора биосинтеза белка

А. Р. Белик, Ю. В. Закалюкина, В. А. Алферова, Ю. А. Буюклян, И. А. Остерман, М. В. Бирюков

Использование современных механизм-ориентированных подходов к классическому скринингу позволяет найти не только новые биологически активные вещества, но и обнаружить новые перспективные свойства ранее открытых, но малоизученных молекул, что дает им шанс стать потенциальным лекарственным средством. Несмотря на то, что соединение К-1115А открыто более 25 лет назад и получены некоторые данные об антибактериальной активности его гомологов, активность данного вещества и механизм его действия до сих пор не были изучены. В исследовании с помощью двойной репортерной системы pDualrep2 обнаружен продуцент К-1115А и установлено, что это соединение ингибирует синтез белка.

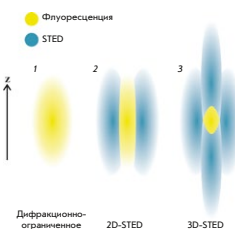


Электронная микрофотография штамма *S. phaeochromogenes* БВ-204

Ультроструктурная 3D-микроскопия для биомедицины. Принципы, применение, перспективы

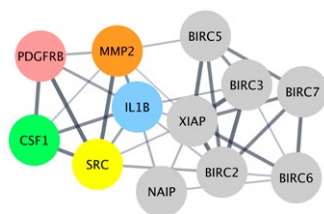
К. Е. Мочалов, Д. С. Коржов, А. В. Алтунина, О. И. Агапова, В. А. Олейников

Современные биомедицинские исследования зачастую требуют трехмерного микроскопического анализа ультроструктуры биологических объектов. В обзоре рассмотрены принципы и возможные приложения таких методик, как просвечивающая электронная микроскопия серийных срезов; техники на основе сканирующей электронной микроскопии (СЭМ): матричная томография, СЭМ с фокусированным ионным пучком и серийная СЭМ поверхности блока. Описаны техники 3D-анализа на базе современных методов оптической микроскопии сверхвысокого разрешения. Проведен сравнительный анализ преимуществ и недостатков рассмотренных подходов.



Сужение эффективной области излучения за счет STED-подавления периферийного излучения

Исследование активации сигнальных путей в TRAIL-резистентных макрофагоподобных клетках острого миелоидного лейкоза



Сети БВВ продуктов идентифицированных генов-концентраторов *IL1B*, *SRC*, *PDGFRB*, *MMP2* и *CSF1* с антиапоптотическими представителями семейства IAP

Я. В. Ломовская, К. С. Краснов, М. И. Кобякова, А. А. Колотова, А. М. Ермаков, А. С. Сенотов, И. С. Фадеева, Е. И. Фетисова, А. И. Ломовский, А. И. Звягина, В. С. Акатов, Р. С. Фадеев

Острый миелоидный лейкоз (ОМЛ) – злокачественное новообразование, которое характеризуется крайне низкой излечиваемостью и выживаемостью. Воспалительное микроокружение и индуцированное им созревание (дифференцировка) клеток ОМЛ способствует уклонению этих клеток от эффекторов противоопухолевого иммунитета. Один из ключевых молекулярных эффекторов иммунного надзора – цитокин TRAIL – рассматривается в качестве перспективной платформы для создания селективных противоопухолевых препаратов. Впервые с помощью биоинформатического анализа транскриптома выявлен основной регулятор – ген *IL1B*, связывающий провоспалительную активацию и формирование устойчивости к TRAIL у макрофагоподобных клеток THP-1ad.

Наноантитело широкого спектра к гемагглюнину вируса гриппа А подтипа Н3

Д. В. Щербяков, Д. В. Воронина, И. А. Фаворская, И. Б. Есмагамбетов, И. А. Алексеева, А. И. Коробкова, Е. И. Рябова, А. А. Деркаев, В. Ю. Кан, А. Ш. Джаруллаева, А. И. Тухватулин, А. С. Банделюк, М. М. Шмаров, Д. Ю. Логунов, А. Л. Гинцбург

Моноклональные антитела (мАт) и их антигенсвязывающие фрагменты являются перспективным средством борьбы с инфекционными заболеваниями. Наноантитела (ВНН) имеют ряд преимуществ перед классическими мАт, особенно в случае вирусных инфекций. В данной работе выделены три клона ВНН, узнающие неперекрывающиеся эпитопы в структуре НА и активные в отношении НА различных штаммов вируса гриппа H3N2 с широкой реактивностью к различным штаммам гриппа H3N2, а также получены и охарактеризованы наноантитела, слитые с Fc-фрагментом (ВНН-Fc).



Схема получения ВНН. Стратегия иммунизации животного и отбора наноантител

Acta Naturae

ТОМ 16, № 1 (60), ЯНВАРЬ—МАРТ 2024
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, 2024

Номер подписан в печать 29 марта 2024 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

- Л. Г. Завилейский, Д. Д. Первушин
Посттранскрипционная регуляция экспрессии
генов через непродуктивный сплайсинг 4
- К. Е. Мочалов, Д. С. Коржов, А. В. Алтунина,
О. И. Агапова, В. А. Олейников
Ультрaструктурная 3D-микроскопия
для биомедицины. Принципы,
применение, перспективы 14

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ СТАТЬИ

- А. Р. Белик, Ю. В. Закалюкина, В. А. Алферова,
Ю. А. Буюклян, И. А. Остерман, М. В. Бирюков
Streptomyces phaeochromogenes БВ-204 —
штамм-продуцент антрахинона К-1115А,
нового ингибитора биосинтеза белка 30

СОДЕРЖАНИЕ

- Д. О. Колесников, Е. Р. Григорьева,
М. А. Номеровская, Д. С. Решетин,
А. В. Шалыгин, Е. В. Казначеева
**Влияние ионов кальция
на электрофизиологические свойства
одиночных каналов ANO6** 40
- Я. В. Ломовская, К. С. Краснов, М. И. Кобякова,
А. А. Колотова, А. М. Ермаков, А. С. Сенотов,
И. С. Фадеева, Е. И. Фетисова, А. И. Ломовский,
А. И. Звягина, В. С. Акатов, Р. С. Фадеев
**Исследование активации сигнальных путей
в TRAIL-резистентных макрофагоподобных
клетках острого миелоидного лейкоза** 48
- В. Д. Мороз, Н. Б. Гасанов, А. Д. Егоров,
А. С. Малоголовкин, М. О. Нагорных,
Е. Н. Субчева, Е. С. Колосова, А. Ю. Физикова,
Р. А. Иванов, А. В. Карабельский
**Метод получения рекомбинантных VSV
с подтверждением биологической активности** ... 59
- Н. И. Пашкевич, Д. В. Вильянен,
А. Ф. Марцинкевич,
М. М. Борисова-Мубаракшина, С. С. Осочук
**Влияние липосом различного состава
на кожу и ее производные после
термического ожога II–IIIА степени** 67
- Т. А. Семашко, Г. Ю. Фисунов, Е. А. Цой,
Д. Р. Харрасов, И. К. Чудинов, Д. В. Евсютина,
Г. Ю. Шевелёв, В. М. Говорун
**Современные подходы к *de novo*
синтезу протяженных фрагментов ДНК:
сборка широкого репертуара
последовательностей** 77
- О. Ю. Сусова, С. Ш. Каршиева, А. А. Костюков,
Н. И. Моисеева, Е. А. Зайцева, К. В. Калабина,
Е. Жусинайте, К. Гильдеманн, Н. М. Смирнов,
А. Ф. Арутюнян, А. Л. Жузе
**Димерные бисбензимидазолпирролы
DB₂Pu(n) – АТ-сайт-специфичные лиганды:
синтез, физико-химический анализ
и исследования биологической активности** 86
- Д. В. Щебляков, Д. В. Воронина,
И. А. Фаворская, И. Б. Есмагамбетов,
И. А. Алексеева, А. И. Коробкова, Е. И. Рябова,
А. А. Деркаев, В. Ю. Кан, А. Ш. Джаруллаева,
А. И. Тухватулин, А. С. Банделюк,
М. М. Шмаров, Д. Ю. Логунов, А. Л. Гинцбург
**Наноантитело широкого спектра
к гемагглютиниру вирусу гриппа А
подтипа НЗ** 101
- D. Xu, J. Fu, X. Liu, Y. Hong, X. Chen, S. Li,
J. Hou, K. Zhang, C. Zhou, C. Zeng, G. Zheng,
H. Wu, T. Wang
**ELABELA-APJ Axis Enhances Mesenchymal
Stem Cell Proliferation and Migration via the
METTL3/PI3K/AKT Pathway** 111
- Правила для авторов 119

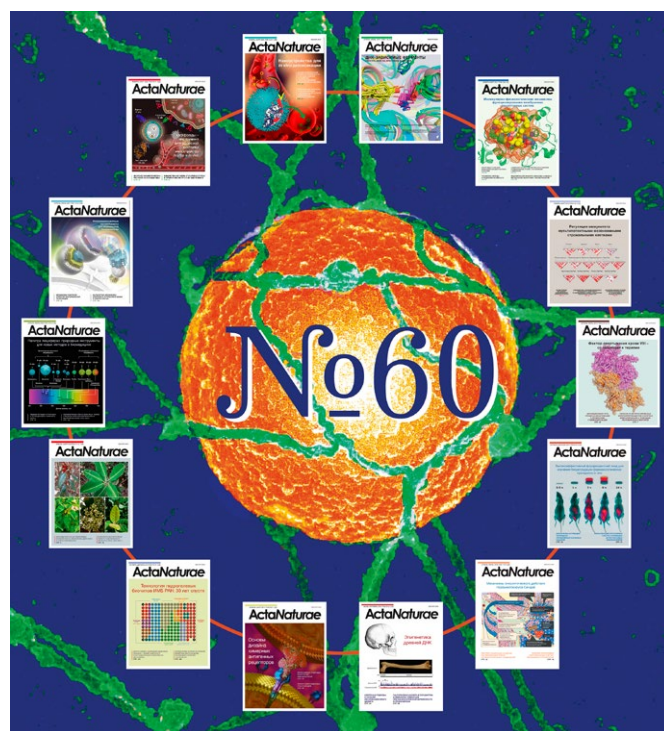


РИСУНОК НА ОБЛОЖКЕ

УДК 577.21

Посттранскрипционная регуляция экспрессии генов через непродуктивный сплайсинг

Л. Г. Завилейский^{1,2}, Д. Д. Первущин^{2*}¹Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, Москва, 119192 Россия²Сколковский институт науки и технологий, Москва, 121205 Россия

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

Поступила в редакцию 03.12.2023

Принята к печати 01.03.2024

DOI: 10.32607/actanaturae.27337

РЕФЕРАТ Непродуктивный сплайсинг – это посттранскрипционный механизм контроля экспрессии генов эукариот, при котором в результате регулируемого альтернативного сплайсинга в белоккодирующих транскриптах возникают преждевременные стоп-кодоны, что приводит к их деградации по пути нонсенс-опосредованного распада. Этот механизм особенно характерен для генов РНК-связывающих белков, которые контролируют уровни экспрессии друг друга и других генов с помощью множественных авто- и кросс-регуляторных каскадов. Нарушения непродуктивного сплайсинга приводят к развитию различных заболеваний, в том числе опухолей, и потенциально могут служить терапевтическими мишенями. В данном обзоре обсуждаются типы событий непродуктивного сплайсинга, механизмы авто- и кросс-регуляции, избегание нонсенс-опосредованного распада и проблемы идентификации непродуктивных изоформ. Приведены примеры нарушений непродуктивного сплайсинга при заболеваниях и терапевтические стратегии для их коррекции с помощью антисмысловых олигонуклеотидов и малых молекул.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА непродуктивный сплайсинг, нонсенс-опосредованный распад, сплайсинг, регуляция, антисмысловые олигонуклеотиды.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ NMD – нонсенс-опосредованный распад (Nonsense Mediated Decay); РТС – преждевременный стоп-кодон (premature termination codon); ЭЭС – экзон-экзонное соединение; АС – альтернативный сплайсинг; РСБ – РНК-связывающий белок; НТО – нетранслируемая область; SSO – переключающий сплайсинг антисмысловой олигонуклеотид (splice-switching antisense oligonucleotide).

ВВЕДЕНИЕ

Экспрессия генов эукариот контролируется большим числом факторов, которые поддерживают баланс между синтезом и деградацией мРНК [1, 2]. Появление нонсенс-мутаций и сдвигающих рамку считывания ошибок сплайсинга приводит к возникновению изоформ мРНК, содержащих преждевременные стоп-кодоны (premature termination codons, РТС). У эукариот существует система селективной деградации таких транскриптов, называемая нонсенс-опосредованным распадом (NMD) [3].

То, каким образом система NMD распознает РТС и отличает их от нормальных, долгое время оставалось неизвестным [4]. Современная модель предполагает, что распознавание РТС происходит в цитоплазме с участием белков, связанных с экзон-экзонными соединениями (ЭЭС), которые депонируются на пре-

мРНК в процессе сплайсинга [5, 6]. Во время первого раунда трансляции белки ЭЭС, находящиеся внутри рамки считывания, вытесняются с пре-мРНК рибосомой (рис. 1А) [7–9]. Поскольку нормальный сайт терминации трансляции обычно находится в последнем экзоне [10], оставшиеся связанными с пре-мРНК белки ЭЭС, находящиеся за пределами рамки считывания, служат сигналом о том, что появился РТС (рис. 1Б). Наличие ЭЭС в 50–55 нуклеотидах или далее в направлении 3'-конца от стоп-кодона запускает каскад деградации транскрипта, центральную роль в котором играет белок UPF1, фосфорилированная форма которого привлекает эндонуклеазу SMG6 и другие факторы, вызывающие деаденирование и удаление 5'-кепа у пре-мРНК, что, в свою очередь, запускает деградацию транскрипта клеточными экзонуклеазами [9, 11–13]. Есть и другие модели, в ко-

торых преждевременность стоп-кодона определяется расстоянием от него до поли(А)-хвоста, а также модели, в которых РТС вызывает деградацию мРНК независимо от белков ЭЭС [14–18]. Существование ЭЭС-независимого механизма NMD объясняет наличие большого количества мишеней NMD в дрожжах, несмотря на почти полное отсутствие у них сплайсинга [19, 20].

Ранее считалось, что основная функция NMD состоит в предотвращении трансляции усеченных и поэтому вредоносных белков [21]. Однако в последнее время появляется все больше свидетельств того, что NMD повсеместно используется для регуляции уровня экспрессии генов [22, 23]. Например, многие РНК-связывающие белки (РСБ) используют NMD для подавления собственной экспрессии через петлю отрицательной обратной связи, при которой белковый продукт гена связывается с кодирующей его мРНК и индуцирует в ней альтернативный сплайсинг (АС), приводящий к появлению РТС [24, 25]. Аналогичным образом может происходить кросс-регуляция, причем в большинстве известных случаев факторы сплайсинга регулируют таким способом экспрессию друг друга [26, 27]. Механизм, при котором альтернативный сплайсинг и NMD посттранскрипционно регулируют уровни экспрессии генов, встречается у всех известных эукариот и часто является эволюционно консервативным [26, 28] и называется регулируемым непродуктивным сплайсингом (regulated unproductive splicing and translation, RUST), или просто непродуктивным сплайсингом [22, 29].

ВИДЫ НЕПРОДУКТИВНОГО СПЛАЙСИНГА

Для регулируемой деградации транскриптов через NMD необходим альтернативный сплайсинг, при котором из пре-мРНК образуются несколько изоформ зрелой мРНК. Из многообразия событий АС обычно выделяют несколько основных типов, таких, как пропуск кассетного экзона, использование альтернативного 5'- или 3'-сплайс-сайта, удержание интрона, выбор одного из нескольких взаимоисключающих экзонов, однако существуют и более сложные типы событий АС [30, 31].

АС может приводить к появлению РТС в транскрипте несколькими способами. Наиболее изучены так называемые ядовитые (poison) экзоны, которые в кодирующей изоформе пропускаются, а при включении в транскрипт приводят к образованию РТС (рис. 2А) [29, 32, 33]. Ядовитые экзоны могут содержать стоп-кодон как в составе самого экзона, так и индуцировать РТС в экзонах, расположенных за ними в направлении 3'-конца, за счет сдвига рамки считывания (рис. 2Б). Обратным является слу-

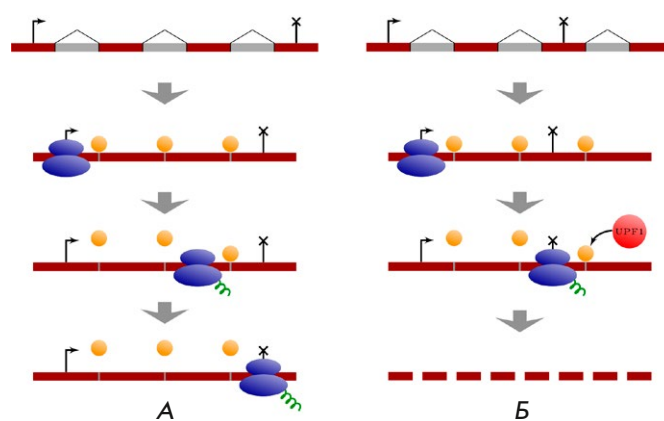


Рис. 1. ЭЭС-зависимый механизм нонсенс-опосредованного распада. А – комплексы ЭЭС (оранжевые круги) вытесняются с мРНК рибосомой во время первого раунда трансляции. Б – оставшиеся связанными с мРНК комплексы ЭЭС за пределами рамки считывания служат сигналом о том, что появился РТС

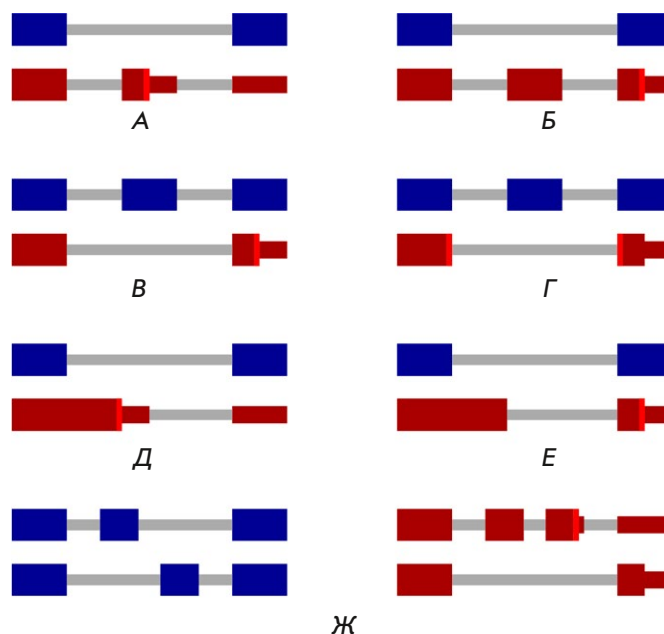


Рис. 2. Типы непродуктивного сплайсинга. Белок-кодирующие изоформы обозначены синим цветом. Непродуктивные изоформы обозначены красным цветом. РТС обозначены вертикальными красными линиями. А – ядовитый экзон с РТС. Б – ядовитый экзон, вызывающий РТС посредством сдвига рамки. В – необходимый экзон, вызывающий РТС посредством сдвига рамки. Г – необходимый экзон, вызывающий РТС на ЭЭС. Д – альтернативный 5'-сайт сплайсинга, вызывающий РТС за счет удержания интрона. Е – альтернативный 5'-сайт сплайсинга, вызывающий РТС посредством сдвига рамки. Ж – пара взаимоисключающих экзонов

чай так называемого необходимого (essential) экзона, который в кодирующей изоформе включается и вызывает появление РТС при пропуске (рис. 2В) [24]. Следует отметить, что необходимые экзоны обычно имеют длину, не кратную трем, и вызывают сдвиг рамки считывания, приводящий к образованию РТС в следующих за ними экзонах. Однако длина некоторых необходимых экзонов кратна трем, а РТС образуется на ЭЭС, возникающем на месте их пропуска (рис. 2Г). Активация альтернативных 5'- или 3'-сплайс-сайтов также может приводить к образованию РТС как за счет сдвига рамки считывания, так и за счет образования новых ЭЭС (рис. 2Д,Е). Пары взаимоисключающих экзонов могут приводить к сдвигу рамки считывания если оба экзона включаются одновременно, или оба пропускаются одновременно (рис. 2Ж). Таким образом, РТС может возникать в результате включения стоп-кодона в транскрипт как на месте самого события АС, так и в экзонах, следующих за ним в направлении 3'-конца.

Отдельный интерес представляют события сплайсинга в 3'-нетранслируемых областях (3'-НТО) генов. Стоп-кодон, предшествующий 3'-НТО, не является преждевременным, но если на расстоянии 50 нуклеотидов или более от него в направлении 3'-конца имеется интрон, то вырезание такого интрона автоматически создает NMD-мишень. Например, экспрессия AU-богатого РНК-связывающего фактора AUF1 регулируется консервативными альтернативно сплайсируемыми элементами в 3'-НТО [34]. 3'-НТО транскриптов, экспрессия которых повышается при инактивации системы NMD, имеют в среднем большую медианную длину и обогащены интронами [35]. При этом большинство мРНК, кодирующих факторы NMD, сами имеют длинные 3'-НТО и служат мишенями NMD, что указывает на то, что их экспрессия является саморегулируемой [35, 36]. Активность сплайсинга в 3'-НТО широко распространена в онкогенах, значительно повышена в опухолях и коррелирует с плохим прогнозом [37, 38]. Таким образом, непродуктивный сплайсинг не ограничивается преждевременной терминацией трансляции внутри кодирующей области и обладает значительным регуляторным потенциалом в 3'-НТО.

АННОТАЦИЯ СОБЫТИЙ НЕПРОДУКТИВНОГО СПЛАЙСИНГА

Современные базы данных содержат курируемые вручную или полученные в результате автоматической аннотации списки транскриптов, являющихся NMD-мишенями. Также существуют инструменты для систематической классификации событий АС, приводящих к образованию мишеней NMD [39].

В базах данных ENSEMBL и GENCODE, мишени NMD аннотируются по так называемому 50-нуклеотидному правилу. Действительно, наличие ЭЭС на расстоянии более 50 нуклеотидов после стоп-кодона обладает наибольшей предсказательной силой среди признаков NMD-транскриптов [40, 41]. Тем не менее значительная часть транскриптов, отвечающих на инактивацию NMD, не подходит под это правило [40, 42], а некоторые гены, экспрессия которых зависит от NMD, аннотированы как некодирующие. Согласно данным, полученным в экспериментах по инактивации факторов NMD, наличие коротких открытых рамок считывания в 5'-области (upstream open reading frames, uORF) может быть вторым по важности признаком, определяющим чувствительность транскрипта к NMD [40].

Неполнота существующей аннотации NMD-транскриптов объясняется тем, что уровень их экспрессии очень мал, поэтому они не попадают в базы данных. Секвенирование РНК длинными чтениями показало, что многие субстраты NMD очень нестабильны, а заметный уровень их экспрессии появляется только при ингибировании NMD [43]. Существует экспериментальный подход к идентификации низко экспрессируемых NMD-транскриптов, который основан на секвенировании фракции РНК, обогащенной комплексами ЭЭС [44]. Эта фракция содержит частично сплайсированную, но еще не транслированную РНК. С помощью этого метода обнаружено большое число неаннотированных ранее консервативных ЭЭС, причем 70% экзонов, которые поддерживаются этими данными, не кратны трем, а среди оставшихся многие содержат стоп-кодоны [44].

Неаннотированные события непродуктивного сплайсинга можно обнаружить, опираясь на эволюционный консерватизм нуклеотидных последовательностей интронов. Например, ген *BRD3* содержит консервативный интронный участок, который представляет собой криптический ядовитый экзон, причем его экспрессия в тканях человека подтверждается транскриптомными данными [44]. Примечательно то, что его паралог, *BRD2*, также содержит ядовитый экзон, но в негомологичном интроне, причем оба ядовитых экзона окружены и регулируются консервативными структурами РНК [44].

АВТО- И КРОСС-РЕГУЛЯТОРНЫЙ НЕПРОДУКТИВНЫЙ СПЛАЙСИНГ

Стимулом к запуску авторегуляторного непродуктивного сплайсинга часто является накопление белкового продукта гена. Например, белок RBM10

связывается с собственной пре-мРНК и индуцирует пропуск двух необходимых экзонов, что приводит к смещению баланса сплайс-изоформ в сторону образования мишеней NMD, и уровень экспрессии RBM10 снижается [45]. По этому принципу регулируется экспрессия многих генов, задействованных в сплайсинге, например членов семейства серин-аргинин-богатых (SR) белков [46–50], *CLK* [51, 52], *TIAL1* [53], *PTB* [54, 55], *hnRNPD* [56], а также некоторых рибосомных белков [57, 58].

При кросс-регуляторном непродуктивном сплайсинге один белок связывается с пре-мРНК другого и способствует образованию или подавлению NMD-изоформ. Такая форма регуляции также распространена среди РСБ из семейства SR [59]. Например, белок SRSF3 наряду с авторегуляторным включением ядовитых экзонов в собственную пре-мРНК вызывает включение ядовитых экзонов в транскрипты своих паралога *SRSF2*, *SRSF5* и *SRSF7* [48]. Помимо SR-белков таким же образом регулируются и другие пары паралога, такие, как *PTBP1/PTBP2* [60], *RBM10/RBM5* [45], *RBFox2/RBFox3* [61], *hnRNPD/hnRNPD* [56] и *hnRNPL/hnRNPLL* [62]. Вообще, кросс-регуляция между паралогами – это весьма частое явление для многих РСБ, которое характеризуется быстрой эволюционной динамикой, в частности быстрым возникновением и исчезновением ядовитых экзонов [26].

Кросс-регуляторный непродуктивный сплайсинг имеет важное значение не только для РСБ. Например, он обуславливает тканеспецифическую экспрессию гена *MID1*, кодирующего ассоциированную с микротрубочками убиквитин-лигазу, дисфункция которой приводит к патологиям эмбрионального развития [27, 63]. Регулируемый непродуктивный сплайсинг важен для многих физиологических процессов, таких, как эмбриональное развитие [64], клеточная дифференцировка [65], ответ на стресс [66–68], патогенез нейродегенеративных заболеваний [69, 70] и др.

В регуляции непродуктивного сплайсинга могут участвовать как активаторы, так и репрессоры сплайсинга. Увеличение концентрации репрессора или понижение концентрации активатора включения ядовитого экзона приводят к его пропуску, вследствие чего уровень экспрессии гена-мишени увеличивается (рис. 3А). Аналогично, уменьшение концентрации репрессора или увеличение концентрации активатора включения необходимого экзона подавляют его пропуск, что также приводит к увеличению уровня экспрессии гена-мишени (рис. 3Б). Следует отметить, что некоторые РСБ могут быть как активаторами, так и репрессорами сплайсинга, а выбор между активацией и репрессией зависит

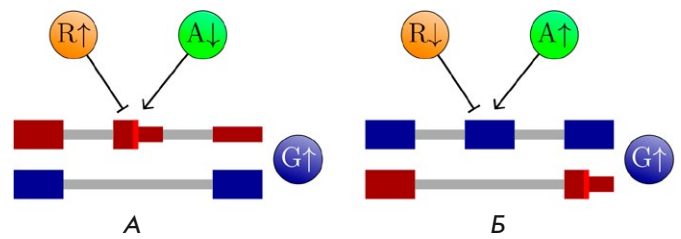


Рис. 3. Регуляция непродуктивного сплайсинга. R обозначает репрессор сплайсинга, А – активатор сплайсинга, G – ген-мишень. Цвета экзонов такие же, как на рис. 2. А – увеличение концентрации R или уменьшение концентрации A приводит к пропуску ядовитого экзона, и экспрессия G увеличивается. Б – уменьшение концентрации R или увеличение концентрации A подавляет пропуск необходимого экзона, и экспрессия G также увеличивается

от положения их сайта связывания на мРНК [71]. Например, PTBP1 стимулирует включение ядовитого экзона в гене *DCLK2*, что приводит к повышению уровня его экспрессии в нейрональных тканях, в которых экспрессия PTBP1 понижена [72]. В то же самое время PTBP1 подавляет включение ядовитого экзона в гене *IQGAP1*, вследствие чего уровень его экспрессии в мозге снижается.

Многие мишени непродуктивного сплайсинга сами являются РСБ и регулируют уровни включения экзонов в других РСБ, что создает множественные регуляторные петли как с положительными, так и с отрицательными обратными связями. Отрицательные обратные связи обеспечивают механизмы авторегуляции для поддержания гомеостаза, а положительные обратные связи могут создавать бистабильные системы для включения экспрессии [73]. Например, ген *Sxl* дрозофилы использует оба этих механизма, что приводит к его автоиндукции при малых концентрациях и, одновременно, предотвращает вредоносное перепроизводство белка [74]. Для достижения такой регуляции РСБ могут действовать одновременно как активаторы и репрессоры сплайсинга, связываясь сразу с несколькими сайтами на пре-мРНК, чем, вероятно, и объясняется высокая эволюционная консервативность нуклеотидных последовательностей вокруг событий непродуктивного сплайсинга [75].

ИЗБЕГАНИЕ NMD

Как было обнаружено, не все РТС, встречающиеся в транскриптах, вызывают NMD. Процесс, называемый избеганием NMD (NMD escape), играет важную роль в патогенезе многих заболеваний [76–78]. Избегание NMD может вызываться сквоз-

ным прочитыванием РТС (readthrough) при трансляции. Частота сквозного прочитывания РТС зависит от типа терминирующих кодонов (UAA, UAG или UGA), а в некоторых популяциях клеток, избегающих NMD, она может достигать 20% [79, 80]. Избегание NMD также может вызываться реинициацией трансляции [81]. Различие состоит в том, что при сквозном прочитывании образуется полно-размерный белок, а при реинициации трансляции образуются N-концевой усеченный белок и короткий C-концевой пептид.

Интересной особенностью избегания NMD в гене гомеостатического регулятора железа человека (HFE) является координация между NMD и интронным полиаденилированием [82]. Показано, что его мРНК содержит четыре сайта альтернативного полиаденилирования, один из которых обеспечивает избегание NMD за счет отрезания фрагмента, содержащего ЭЭС. Альтернативное полиаденилирование может способствовать избеганию NMD, если преждевременная терминация транскрипции отсекает часть нетранслируемой области, содержащую ЭЭС, и РТС превращается в нормальный стоп-кодон (рис. 4). Исследование транскриптомных данных показало, что транскрипты, избегающие NMD с помощью альтернативного полиаденилирования, действительно экспрессируются в тканях человека [83]. Наличие сайта интронного полиаденилирования в гене *TAU* человека, который связан с болезнью Альцгеймера, также способствует избеганию NMD [84]. Следует отметить, что котранскрипционный сплайсинг может предотвращать преждевременную терминацию транскрипции в сайтах интронного полиаденилирования, функциональным результатом которой после трансляции также является образование N-концевого усеченного белка [85].

Эффективность NMD зависит от положения РТС и свойств всего транскрипта в целом. Исследование большой панели опухолевых транскриптомов подтвердило, что каноническая модель ЭЭС является наиболее важным фактором, определяющим эффективность NMD [41]. Длина 3'-нетранслируемой области, близость к старт-кодону, расстояние между РТС и нормальным стоп-кодоном, длина экзона, в котором расположен РТС, и многие другие факторы оказывают существенное влияние на эффективность NMD. В том числе структура РНК, которая может изменять эффективные расстояния между *цис*-элементами в транскрипте и сайты связывания белковых факторов, таких, как PABPC1, по-видимому, имеющих эволюционно консервативную функцию по поддержанию правильной терминации трансляции и противодействию активации NMD [86]. Наличие *цис*-регуляторных мотивов многих

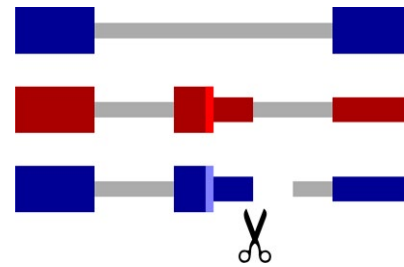


Рис. 4. Альтернативное полиаденилирование способствует избеганию NMD, отсекая часть нетранслируемой области, содержащую ЭЭС. При этом РТС (вертикальная красная линия) превращается в нормальный стоп-кодон (вертикальная синяя линия)

факторов сплайсинга, таких, как SRSF1, PABPN1, SNRPB2 и ACO1, также оказывает влияние на эффективность NMD [41].

NMD зависит от вытеснения белков ЭЭС рибосомой, а значит механизмы контроля трансляции также должны влиять на его активность. Поскольку микроРНК ингибируют трансляцию, они могут способствовать избеганию NMD [87], однако конкретных примеров микроРНК, которые стабилизируют субстраты NMD с помощью этого механизма, в настоящее время не известно. У встречающихся в природе нонсенс-мутантов микроРНК могут, наоборот, подавлять избегание NMD за счет связывания с расширенной 3'-НТО, образующейся за РТС [88]. Интересно также то, что микроРНК могут подавлять активность всего каскада NMD в целом. Например, микроРНК *mir-128*, уровень экспрессии которой повышается в дифференцирующихся нейрональных клетках, подавляет экспрессию *UPF1* и основного компонента комплекса ЭЭС *MLN51*, тем самым ослабляя ответ системы NMD и усиливая экспрессию белков, контролирующих развитие нейронов [89].

ЗАБОЛЕВАНИЯ, СВЯЗАННЫЕ С НЕПРОДУКТИВНЫМ СПЛАЙСИНГОМ И NMD

С работой системы NMD и непродуктивным сплайсингом связаны множество заболеваний (табл. 1). Например, нонсенс-мутации в генах *CFTR* и *hERG* вызывают муковисцидоз и синдром удлиненного QT-интервала, соответственно, в результате деградации их транскриптов системой NMD [90, 91]. Делеции, вызывающие сдвиг рамки считывания, также вызывают дефицит важных белков. Известным примером является мышечная дистрофия Дюшенна, часто обусловленная делециейми в гене *DMD*, нарушающими рамку считывания [92–94].

Таблица 1. Заболевания, связанные с непродуктивным сплайсингом и NMD

Ген	Заболевание	Причина, регулятор и терапия	Ссылка
<i>SCN1A</i>	Синдром Драве и другие эпилепсии	Гаплонедостаточность <i>SCN1A</i> из-за мутаций, в том числе в интроне 20, увеличивающих включение ядовитого экзона. SSO для переключения на продуктивную изоформу (в мышинной модели)	[95, 96]
<i>SYNGAP1</i>	Аутизм и умственная отсталость	Гаплонедостаточность <i>SYNGAP1</i> из-за мутаций, в том числе в сплайс-сайте. РТВР1/2 способствуют NMD-изоформе. SSO для переключения на продуктивную изоформу (в мышинной модели и органоидах)	[96, 97]
<i>HTT</i>	Болезнь Хантингтона	Экспансия CAG-повторов. Снижение экспрессии <i>HTT</i> за счет увеличения включения ядовитого экзона с помощью SSO или малых молекул перорально: бранаплам (NCT05111249), РТС518 (NCT05358717)	[98]
<i>DMD</i>	Мышечная дистрофия Дюшенна	Сдвиг рамки в результате делеции. Этеплирсен, SSO, индуцирующий пропуск экзона 51 для восстановления рамки и экспрессии укороченного, но функционального дистрофина (одобрен FDA)	[92, 93]
<i>CFTR</i>	Муковисцидоз	Нонсенс-мутация в экзоне 23. Увеличение экспрессии <i>CFTR</i> за счет подавления включения экзона с мутацией с помощью SSO	[90]
<i>hERG</i>	Синдром удлиненного QT-интервала	Нонсенс-мутация в предпоследнем экзоне. Увеличение экспрессии <i>hERG</i> за счет удержания последнего интрона с помощью SSO	[91]
<i>PCCA</i>	Пропионовая ацидемия	Мутация в криптическом экзоне. <i>HNRNPA1</i> в норме подавляет включение ядовитого экзона, но мутация разрушает его сайт связывания и создает энхансер. Увеличение экспрессии <i>PCCA</i> за счет переключения на продуктивную изоформу с помощью SSO	[99]
<i>FUS</i>	Боковой амиотрофический склероз (ALS)	Мутации в сигнале локализации, вызывающие накопление <i>FUS</i> в цитоплазме. В норме <i>FUS</i> подавляет включение необходимого экзона в свою мРНК. Поскольку мутантный <i>FUS</i> локализован в цитоплазме, авторегуляторная петля разрушается. SSO на 5'-конец необходимого экзона переключает сплайсинг на непродуктивную изоформу в клеточной линии	[100]
<i>SNRNPB</i>	Церебро-костомандибулярный синдром	Мутации в ядовитом экзоне увеличивают уровень его включения и снижают экспрессию <i>SNRNPB</i>	[101]
<i>BRD9</i>	Меланома и другие опухоли	Мутантный <i>SF3B1</i> увеличивает включение ядовитого экзона <i>BRD9</i>	[102]
<i>EZH2</i>	Миелоидный лейкоз	Мутантный <i>SRSF2</i> увеличивает включение ядовитого экзона <i>EZH2</i>	[103]
<i>SRSF1</i>	Опухоли	<i>KHDRBS1</i> переключает сплайсинг <i>SRSF1</i> на продуктивную изоформу	[104]
<i>SRSF3,6,11</i>	Глиобластома	Рост уровня <i>METTL3</i> приводит к включению метки m ⁶ A в мРНК <i>SRSF3,6,11</i> и переключению их сплайсинга на продуктивную изоформу	[105]
<i>CYR61</i>	Рак груди	Гипоксия	[106]
<i>LDHA</i>	Рак груди	Гипоксия	[107]

Мутации в сплайс-сайтах могут вызывать переключение альтернативного сплайсинга на непродуктивную изоформу. Так происходит в гене *SYNGAP1*, непродуктивный сплайсинг которого регулируется РТВР1/2, что обеспечивает его тканеспецифичную экспрессию. В результате активации альтернативного 3'-сплайс-сайта возникает NMD-изоформа, уровень экспрессии гена падает, что приводит к развитию аутизма и умственной отсталости [96, 97].

Однако не только мутации в кодирующей области и сплайс-сайтах способны создавать мишени

NMD. К патологическим изменениям могут приводить мутации в интронах и некодирующих экзонах, причем механизм этих изменений не всегда очевиден. Например, мутации в интроне 20 гена *SCN1A* увеличивают степень включения ядовитого экзона, что является причиной синдрома Драве [95, 96]. Мутации в ядовитом экзоне гена *SNRNPB* вызывают церебро-костомандибулярный синдром [101]. Предположительно, они создают или разрушают сайт связывания РСБ, активирующего или подавляющего включение ядовитого экзона, но какие именно факторы регулируют эти процессы в на-

стоящее время неизвестно. Мутация в криптическом ядовитом экзоне гена *PCCA*, вызывающая пропионовую ацидемию, – редкий случай, когда известен механизм дерегуляции непродуктивного сплайсинга [99]. Эта мутация находится в сайте связывания фактора HNRNPA, который в норме подавляет включение ядовитого экзона, но мутация разрушает этот сайт и одновременно создает энхансер сплайсинга, в результате чего экспрессия *PCCA* снижается [99].

Наряду с мутациями вблизи событий непродуктивного сплайсинга к заболеваниям также может приводить неправильная работа РСБ. Точечная мутация в факторе сплайсинга *SRSF2*, наблюдаемая с высокой частотой у пациентов с острым миелоидным лейкозом [103, 108], вызывает включение ядовитого экзона в транскрипты метилазы гистонов *EZH2*, что ведет к снижению уровня ее экспрессии и, как следствие, к развитию подавляемых ею миелоидных новообразований [103]. Мутации в факторе сплайсинга *SF3B1*, часто наблюдаемые при миелодиспластических синдромах [109], увеличивают уровень включения ядовитого экзона в гене *BRD9*, в результате чего его экспрессия падает, что приводит к ускоренному росту и метастазированию меланом [102]. Метилирование транскриптов *SRSF3*, *SRSF6* и *SRSF11* в результате повышенной экспрессии метилтрансферазы *METTL3*, часто наблюдаемой в глиобластомах, приводит к пропуску ядовитых экзонов и увеличивает уровни экспрессии этих генов [105]. Примечательно, что подавление экспрессии *METTL3* в клеточных линиях глиобластомы приводит к снижению пролиферации и миграции клеток отчасти за счет изменения сплайсинга таких мишеней SR-белков, как *BCL-X* и *NCOR2* [105].

В некоторых случаях патологические изменения непродуктивного сплайсинга индуцируются состоянием ткани, хотя конкретный регулятор сплайсинга неизвестен. Так, например, гипоксия, характерная для многих солидных опухолей, приводит к вырезанию интрона 3 из пре-мРНК индуктора ангиогенеза *CYR61* – белка, который способствует пролиферации и миграции клеток [110–112]. В физиологических условиях интрон 3 удерживается, что ведет к образованию транскрипта, чувствительного к NMD, но при гипоксии регуляция через непродуктивный сплайсинг нарушается и экспрессия *CYR61* увеличивается, способствуя васкуляризации опухоли [106]. Гипоксия также способствует снижению экспрессии альтернативной изоформы гена *LDHA* за счет непродуктивного сплайсинга, однако физиологический эффект этого снижения пока не вполне ясен [107].

МОДУЛЯЦИЯ НЕПРОДУКТИВНОГО СПЛАЙСИНГА

Модуляция непродуктивного сплайсинга – многообещающая стратегия терапии многих заболеваний. Изменять сплайсинг позволяют переключающие сплайсинг антисмысловые олигонуклеотиды (*splice-switching antisense oligonucleotides*, SSO) [113]. Комплементарно связываясь с последовательностью пре-мРНК, SSO блокируют сайты сплайсинга и/или сайты связывания РСБ, тем самым способствуя выбору нужного события альтернативного сплайсинга [113].

SSO для изменения непродуктивного сплайсинга можно разделить на три группы: SSO для увеличения экспрессии полноразмерного белка (индукция пропуска ядовитых экзонов), SSO для сохранения экспрессии укороченного белка, когда экспрессия полноразмерного белка невозможна (индукция пропуска части экзонов или удержания интронов) и SSO для снижения экспрессии (индукция включения ядовитых экзонов).

SSO первой группы могут использоваться для лечения заболеваний, вызванных дефицитом функционального белка, например из-за мутаций в генах *SYNGAP1*, *SCN1A*, *PCCA* и *SNRPB* [95–97, 99, 101]. SSO второй группы необходимы, если в результате нонсенс-мутации или делеции со сдвигом рамки считывания возникает РТС. Они позволяют избежать деградации транскрипта и сохранить экспрессию укороченного белкового продукта. Технически SSO второй группы могут индуцировать пропуск экзона с нонсенс-мутацией (как в гене *PCCA*) или удержание интрона в направлении 3'-конца от РТС (как в гене *hERG*). Пропуск кодирующих экзонов может быть полезным в случае делеции со сдвигом рамки считывания для того, чтобы восстановить рамку (как в гене *DMD*). Уже одобрен ряд действующих таким образом препаратов для лечения мышечной дистрофии Дюшенна [94]. SSO третьей группы можно использовать, если необходимо подавить накопление белка. Например, мутации в гене *FUS*, разрушающие сигнал его ядерной локализации и вызывающие экспорт в цитоплазму, ассоциированы с боковым амиотрофическим склерозом [114, 115]. Поскольку для подавления экспрессии *FUS* через непродуктивный сплайсинг его белковый продукт должен находиться в ядре, экспорт мутантного белка из ядра разрушает петлю авторегуляции, что усугубляет его накопление в цитоплазме и способствует образованию агрегатов, обладающих цитотоксическим эффектом [100, 116–118].

Несмотря на все положительные стороны SSO, их доставка к целевым органам и тканям встречается со множеством трудностей. Необходимость разра-

ботки системы доставки и использование повышенных доз препарата, чтобы достичь его необходимой концентрации, приводят к росту цены и увеличению риска побочных эффектов [119]. Альтернативой являются малые молекулы – модуляторы сплайсинга, обладающие большей биодоступностью, чем SSO.

Известно достаточно много низкомолекулярных соединений, которые связываются с факторами сплайсинга, изменяя сплайсинг многих генов одновременно [119]. Также на сегодняшний день найдено несколько молекул, специфично связывающихся с конкретными РНК [98, 119–122]. Среди них наиболее изучен ридиплам, который модулирует сплайсинг гена *SMN2* и может быть использован для лечения спинальной мышечной атрофии [121]. Бранаплам, сходный по структуре и механизму действия с ридипламом, способствует включению криптоического ядовитого экзона в гене *HTT*, что снижает его экспрессию и замедляет прогрессирование болезни Хантингтона [122]. Аналогичным эффектом обладает молекула РТС518, которая сейчас находится во второй фазе клинических исследований [120].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В результате взаимодействия между альтернативным сплайсингом и NMD возник эволюционно-консервативный механизм посттранскрипционной регуляции генной экспрессии, называемый непродуктивным сплайсингом. Непродуктивный сплайсинг сложнейшим образом поддерживает баланс уровней экспрессии генов через авто- и кросс-регуляторные петли, содержащие как положительные, так и отрицательные обратные связи. Он тесно связан с множеством других клеточных процессов, таких, как интронное полиаденилирование, регуляция трансляции и взаимодействие с микроРНК. Нарушения в регуляции непродуктивного сплайсинга являются причиной многих заболеваний, многообещающую стратегию лечения которых предлагают переключающие сплайсинг антисмысловые олигонуклеотиды. ●

Авторы выражают благодарность Д.А. Скворцову за критические замечания.

Данная работа выполнена при поддержке гранта Российского научного фонда (№ 22-14-00330).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Borbolis F., Syntichaki P. // *Mech. Ageing Dev.* 2015. V. 152. P. 32–42.
- Dassi E. // *Front. Mol. Biosci.* 2017. V. 4. P. 67.
- Lykke-Andersen S., Jensen T.H. // *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 2015. V. 16. № 11. P. 665–677.
- He F., Peltz S.W., Donahue J.L., Rosbash M., Jacobson A. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1993. V. 90. № 15. P. 7034–7038.
- Le Hir H., Gatfield D., Izaurralde E., Moore M.J. // *EMBO J.* 2001. V. 20. № 17. P. 4987–4997.
- Le Hir H., Izaurralde E., Maquat L.E., Moore M.J. // *EMBO J.* 2000. V. 19. № 24. P. 6860–6869.
- Nagy E., Maquat L.E. // *Trends Biochem. Sci.* 1998. V. 23. № 6. P. 198–199.
- Karousis E.D., Nasif S., Mühlemann O. // *Wiley Interdiscip. Rev. RNA.* 2016. V. 7. № 5. P. 661–682.
- Popp M.W., Maquat L.E. // *Cell.* 2016. V. 165. № 6. P. 1319–1322.
- Kurosaki T., Popp M.W., Maquat L.E. // *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 2019. V. 20. № 6. P. 384.
- Isken O., Maquat L.E. // *Genes Dev.* 2007. V. 21. № 15. P. 1833–1856.
- Loh B., Jonas S., Izaurralde E. // *Genes Dev.* 2013. V. 27. № 19. P. 2125–2138.
- Unterholzner L., Izaurralde E. // *Mol. Cell.* 2004. V. 16. № 4. P. 587–596.
- Fang Y., Bateman J.F., Mercer J.F., Lamandé S.R. // *J. Cell Sci.* 2013. V. 126. Pt 12. P. 2551–2560.
- Kurosaki T., Maquat L.E. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2013. V. 110. № 9. P. 3357–3362.
- Hogg J.R., Goff S.P. // *Cell.* 2010. V. 143. № 3. P. 379–389.
- Hurt J.A., Robertson A.D., Burge C.B. // *Genome Res.* 2013. V. 23. № 10. P. 1636–1650.
- Singh G., Rebbapragada I., Lykke-Andersen J. // *PLoS Biol.* 2008. V. 6. № 4. P. e111.
- Lopez P.J., Séraphin B. // *RNA.* 1999. V. 5. № 9. P. 1135–1137.
- Malabat C., Feuerbach F., Ma L., Saveanu C., Jacquier A. // *Elife.* 2015. V. 4. P. e06722.
- Maquat L.E. // *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 2004. V. 5. № 2. P. 89–99.
- Lewis B.P., Green R.E., Brenner S.E. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2003. V. 100. № 1. P. 189–192.
- Lareau L.F., Brooks A.N., Soergel D.A., Meng Q., Brenner S.E. // *Adv. Exp. Med. Biol.* 2007. V. 623. P. 190–211.
- Pervouchine D., Popov Y., Berry A., Borsari B., Frankish A., Guigó R. // *Nucl. Acids Res.* 2019. V. 47. № 10. P. 5293–5306.
- Nasif S., Contu L., Mühlemann O. // *Semin. Cell Dev. Biol.* 2018. V. 75. P. 78–87.
- Lareau L.F., Brenner S.E. // *Mol. Biol. Evol.* 2015. V. 32. № 4. P. 1072–1079.
- García-Moreno J.F., Romao L. // *Int. J. Mol. Sci.* 2020. V. 21. № 24. P. 9424.
- Kalyna M., Simpson C.G., Syed N.H., Lewandowska D., Marquez Y., Kusenda B., Marshall J., Fuller J., Cardle L., McNicol J., et al. // *Nucl. Acids Res.* 2012. V. 40. № 6. P. 2454–2469.
- Lareau L.F., Inada M., Green R.E., Wengrod J.C., Brenner S.E. // *Nature.* 2007. V. 446. № 7138. P. 926–929.
- 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.
- Carvill G.L., Mefford H.C. // *Curr. Opin. Genet. Dev.* 2020. V. 65. P. 98–102.
- Leclair N.K., Anczuków O. // *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 2022. V. 23. № 12. P. 777.
- Wilson G.M., Sun Y., Sellers J., Lu H., Penkar N., Dillard

- G., Brewer G. // *Mol. Cell Biol.* 1999. V. 19. № 6. P. 4056–4064.
35. Yepiskoposyan H., Aeschmann F., Nilsson D., Okoniewski M., Mühlemann O. // *RNA.* 2011. V. 17. № 12. P. 2108–2118.
36. Huang L., Lou C.H., Chan W., Shum E.Y., Shao A., Stone E., Karam R., Song H.W., Wilkinson M.F. // *Mol. Cell.* 2011. V. 43. № 6. P. 950–961.
37. Chan J.J., Zhang B., Chew X.H., Salhi A., Kwok Z.H., Lim C.Y., Desi N., Subramaniam N., Siemens A., Kinanti T., et al. // *Nat. Cell Biol.* 2022. V. 24. № 6. P. 928–939.
38. Guo T., You K., Chen X., Sun Y., Wu Y., Wu P., Jiang Y. // *Cell Death Discov.* 2022. V. 8. № 1. P. 320.
39. Hsu M.K., Lin H.Y., Chen F.C. // *PLoS One.* 2017. V. 12. № 4. P. e0174798.
40. Colombo M., Karousis E.D., Bourquin J., Bruggmann R., Mühlemann O. // *RNA.* 2017. V. 23. № 2. P. 189–201.
41. Lindeboom R.G., Supek F., Lehner B. // *Nat. Genet.* 2016. V. 48. № 10. P. 1112–1118.
42. Tani H., Imamachi N., Salam K.A., Mizutani R., Ijiri K., Irie T., Yada T., Suzuki Y., Akimitsu N. // *RNA Biol.* 2012. V. 9. № 11. P. 1370–1379.
43. Karousis E.D., Gypas F., Zavolan M., Mühlemann O. // *Genome Biol.* 2021. V. 22. № 1. P. 223.
44. Kovalak C., Donovan S., Bicknell A.A., Metkar M., Moore M.J. // *Genome Biol.* 2021. V. 22. № 1. P. 132.
45. Sun Y., Bao Y., Han W., Song F., Shen X., Zhao J., Zuo J., Saffen D., Chen W., Wang Z., et al. // *Nucl. Acids Res.* 2017. V. 45. № 14. P. 8524–8540.
46. Änkö M.L., Morales L., Henry I., Beyer A., Neugebauer K.M. // *Nat. Struct. Mol. Biol.* 2010. V. 17. № 8. P. 962–970.
47. Sureau A., Gattoni R., Dooghe Y., Stévenin J., Soret J. // *EMBO J.* 2001. V. 20. № 7. P. 1785–1796.
48. Änkö M.L., Müller-McNicoll M., Brandl H., Curk T., Gorup C., Henry I., Ule J., Neugebauer K.M. // *Genome Biol.* 2012. V. 13. № 3. P. R17.
49. Sun S., Zhang Z., Sinha R., Karni R., Krainer A.R. // *Nat. Struct. Mol. Biol.* 2010. V. 17. № 3. P. 306–312.
50. Stoilov P., Daoud R., Nayler O., Stamm S. // *Hum. Mol. Genet.* 2004. V. 13. № 5. P. 509–524.
51. Hillman R.T., Green R.E., Brenner S.E. // *Genome Biol.* 2004. V. 5. № 2. P. R8.
52. Duncan P.I., Stojdl D.F., Marius R.M., Bell J.C. // *Mol. Cell Biol.* 1997. V. 17. № 10. P. 5996–6001.
53. Le Guiner C., Gesnel M.C., Breathnach R. // *J. Biol. Chem.* 2003. V. 278. № 12. P. 10465–10476.
54. Wollerton M.C., Gooding C., Wagner E.J., Garcia-Blanco M.A., Smith C.W. // *Mol. Cell.* 2004. V. 13. № 1. P. 91–100.
55. Rahman L., Bliskovski V., Reinhold W., Zajac-Kaye M. // *Genomics.* 2002. V. 80. № 3. P. 245–249.
56. Kemmerer K., Fischer S., Weigand J.E. // *RNA.* 2018. V. 24. № 3. P. 324–331.
57. Takei S., Togo-Ohno M., Suzuki Y., Kuroyanagi H. // *Nucl. Acids Res.* 2016. V. 44. № 12. P. 5585–5596.
58. Cuccurese M., Russo G., Russo A., Pietropaolo C. // *Nucl. Acids Res.* 2005. V. 33. № 18. P. 5965–5977.
59. Leclair N.K., Brugiolo M., Urbanski L., Lawson S.C., Thakar K., Yurieva M., George J., Hinson J.T., Cheng A., Graveley B.R., Anczuków O. // *Mol. Cell.* 2020. V. 80. № 4. P. 648–665.
60. Spellman R., Llorian M., Smith C.W. // *Mol. Cell.* 2007. V. 27. № 3. P. 420–434.
61. Jangi M., Boutz P.L., Paul P., Sharp P.A. // *Genes Dev.* 2014. V. 28. № 6. P. 637–651.
62. Rossbach O., Hung L.H., Schreiner S., Grishina I., Heiner M., Hui J., Bindereif A. // *Mol. Cell Biol.* 2009. V. 29. № 6. P. 1442–1451.
63. Winter J., Lehmann T., Krauss S., Trockenbacher A., Kijas Z., Foerster J., Suckow V., Yaspo M.L., Kulozik A., Kalscheuer V., et al. // *Hum. Genet.* 2004. V. 114. № 6. P. 541–552.
64. McIlwain D.R., Pan Q., Reilly P.T., Elia A.J., McCracken S., Wakeham A.C., Itie-Youten A., Blencowe B.J., Mak T.W. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2010. V. 107. № 27. P. 12186–12191.
65. Wong J.J., Ritchie W., Ebner O.A., Selbach M., Wong J.W., Huang Y., Gao D., Pinello N., Gonzalez M., Baidya K., et al. // *Cell.* 2013. V. 154. № 3. P. 583–595.
66. Karam R., Lou C.H., Kroeger H., Huang L., Lin J.H., Wilkinson M.F. // *EMBO Rep.* 2015. V. 16. № 5. P. 599–609.
67. Li Z., Vuong J.K., Zhang M., Stork C., Zheng S. // *RNA.* 2017. V. 23. № 3. P. 378–394.
68. Gardner L.B. // *Mol. Cell Biol.* 2008. V. 28. № 11. P. 3729–3741.
69. Qiu H., Lee S., Shang Y., Wang W.Y., Au K.F., Kamiya S., Barmada S.J., Finkbeiner S., Lui H., Carlton C.E., et al. // *J. Clin. Invest.* 2014. V. 124. № 3. P. 981–999.
70. Polymenidou M., Lagier-Tourenne C., Hutt K.R., Huelga S.C., Moran J., Liang T.Y., Ling S.C., Sun E., Wancewicz E., Mazur C., et al. // *Nat. Neurosci.* 2011. V. 14. № 4. P. 459–468.
71. Hamid F.M., Makeyev E.V. // *Nucl. Acids Res.* 2017. V. 45. № 21. P. 12455–12468.
72. Mironov A., Petrova M., Margasyuk S., Vlasenok M., Mironov A.A., Skvortsov D., Pervouchine D.D. // *Nucl. Acids Res.* 2023. V. 51. № 7. P. 3055–3066.
73. Müller-McNicoll M., Rossbach O., Hui J., Medenbach J. // *J. Mol. Cell Biol.* 2019. V. 11. № 10. P. 930–939.
74. Moschall R., Gaik M., Medenbach J. // *FEBS Lett.* 2017. V. 591. № 11. P. 1471–1488.
75. Ni J.Z., Grate L., Donohue J.P., Preston C., Nobida N., O'Brien G., Shiue L., Clark T.A., Blume J.E., Ares M. // *Genes Dev.* 2007. V. 21. № 6. P. 708–718.
76. Litchfield K., Reading J.L., Lim E.L., Xu H., Liu P., Al-Bakir M., Wong Y.N.S., Rowan A., Funt S.A., Merghoub T., et al. // *Nat. Commun.* 2020. V. 11. № 1. P. 3800.
77. Dyle M.C., Kolakada D., Cortazar M.A., Jagannathan S. // *Wiley Interdiscip. Rev. RNA.* 2020. V. 11. № 1. P. e1560.
78. Cheng M.M., Cao Y.Y. // *Yi Chuan.* 2020. V. 42. № 4. P. 354–362.
79. Bidou L., Hatin I., Perez N., Allamand V., Panthier J.J., Rousset J.P. // *Gene Ther.* 2004. V. 11. № 7. P. 619–627.
80. Tate W.P., Poole E.S., Mannerling S.A. // *Prog. Nucl. Acid. Res. Mol. Biol.* 1996. V. 52. P. 293–335.
81. Zhang J., Maquat L.E. // *EMBO J.* 1997. V. 16. № 4. P. 826–833.
82. Martins R., Proença D., Silva B., Barbosa C., Silva A.L., Faustino P., Romão L. // *PLoS One.* 2012. V. 7. № 4. P. e35461.
83. Gilat R., Shweiki D. // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2007. V. 353. № 2. P. 487–492.
84. Ngian Z.K., Tan Y.Y., Choo C.T., Lin W.Q., Leow C.Y., Mah S.J., Lai M.K., Chen C.L., Ong C.T. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2022. V. 119. № 37. P. e2204179119.
85. Vlasenok M., Margasyuk S., Pervouchine D. // *Nucl. Acids Res. Genom. Bioinform.* 2023. V. 5. № 2. P. lqad051.
86. Eberle A.B., Stalder L., Mathys H., Orozco R.Z., Mühlemann O. // *PLoS Biol.* 2008. V. 6. № 4. P. e92.
87. Choe J., Cho H., Lee H.C., Kim Y.K. // *EMBO Rep.* 2010. V. 11. № 5. P. 380–386.
88. Zhao Y., Lin J., Xu B., Hu S., Zhang X., Wu L. // *Elife.* 2014. V. 3. P. e03032.
89. Bruno I.G., Karam R., Huang L., Bhardwaj A., Lou C.H., Shum E.Y., Song H.W., Corbett M.A., Gifford W.D., Geicz J., et al. // *Mol. Cell.* 2011. V. 42. № 4. P. 500–510.

90. Kim Y.J., Sivetz N., Layne J., Voss D.M., Yang L., Zhang Q., Krainer A.R. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2022. V. 119. № 3. e2114858118.
91. Gong Q., Stump M.R., Zhou Z. // *J. Mol. Cell. Cardiol.* 2011. V. 50. № 1. P. 223–229.
92. Mendell J.R., Rodino-Klapac L.R., Sahenk Z., Roush K., Bird L., Lowes L.P., Alfano L., Gomez A.M., Lewis S., Kota J., et al. // *Ann. Neurol.* 2013. V. 74. № 5. P. 637–647.
93. McDonald C.M., Shieh P.B., Abdel-Hamid H.Z., Connolly A.M., Cifaloni E., Wagner K.R., Goemans N., Mercuri E., Khan N., Koenig E., et al. // *J. Neuromuscul. Dis.* 2021. V. 8. № 6. P. 989–1001.
94. Aartsma-Rus A., Corey D.R. // *Nucl. Acid Ther.* 2020. V. 30. № 2. P. 67–70.
95. Carvill G.L., Engel K.L., Ramamurthy A., Cochran J.N., Roovers J., Stamberger H., Lim N., Schneider A.L., Hollingsworth G., Holder D.H., et al. // *Am. J. Hum. Genet.* 2018. V. 103. № 6. P. 1022–1029.
96. Lim K.H., Han Z., Jeon H.Y., Kach J., Jing E., Weyn-Vanhenryck S., Downs M., Corriero A., Oh R., Scharner J., et al. // *Nat. Commun.* 2020. V. 11. № 1. P. 3501.
97. Yang R., Feng X., Arias-Cavieres A., Mitchell R.M., Polo A., Hu K., Zhong R., Qi C., Zhang R.S., Westneat N., et al. // *Neuron*. 2023. V. 111. № 10. P. 1637–1650.
98. Keller C.G., Shin Y., Monteys A.M., Renaud N., Beibel M., Teider N., Peters T., Faller T., St-Cyr S., Knehr J., et al. // *Nat. Commun.* 2022. V. 13. № 1. P. 1150.
99. Spangsborg Petersen U.S., Dembic M., Martínez-Pizarro A., Richard E., Holm L.L., Havelund J.F., Doktor T.K., Larsen M.R., Færgeman N.J., Desviat L.R., Andresen B.S. // *Mol. Ther. Nucl. Acids*. 2024. V. 35. № 1. P. 102101.
100. Zhou Y., Liu S., Liu G., Oztürk A., Hicks G.G. // *PLoS Genet.* 2013. V. 9. № 10. P. e1003895.
101. Lynch D.C., Revil T., Schwartzentruber J., Bhoj E.J., Innes A.M., Lamont R.E., Lemire E.G., Chodirker B.N., Taylor J.P., Zackai E.H., et al. // *Nat. Commun.* 2014. V. 5. P. 4483.
102. Inoue D., Chew G.L., Liu B., Michel B.C., Pangallo J., D'Avino A.R., Hitchman T., North K., Lee S.C., Bitner L., et al. // *Nature*. 2019. V. 574. № 7778. P. 432–436.
103. Rahman M.A., Lin K.T., Bradley R.K., Abdel-Wahab O., Krainer A.R. // *Genes Dev.* 2020. V. 34. № 5–6. P. 413–427.
104. Ghigna C., Giordano S., Shen H., Benvenuto F., Castiglioni F., Comoglio P.M., Green M. R., Riva S., Biamonti G. // *Mol. Cell*. 2005. V. 20. № 6. P. 881–890.
105. Li F., Yi Y., Miao Y., Long W., Long T., Chen S., Cheng W., Zou C., Zheng Y., Wu X., et al. // *Cancer Res.* 2019. V. 79. № 22. P. 5785–5798.
106. Hirschfeld M., zur Hausen A., Bettendorf H., Jäger M., Stickeler E. // *Cancer Res.* 2009. V. 69. № 5. P. 2082–2090.
107. Han J., Li J., Ho J.C., Chia G.S., Kato H., Jha S., Yang H., Poellinger L., Lee K.L. // *Sci. Rep.* 2017. V. 7. № 1. P. 4108.
108. Kim E., Ilagan J.O., Liang Y., Daubner G.M., Lee S.C., Ramakrishnan A., Li Y., Chung Y.R., Micol J.B., Murphy M.E., et al. // *Cancer Cell*. 2015. V. 27. № 5. P. 617–630.
109. Jiang M., Chen M., Liu Q., Jin Z., Yang X., Zhang W. // *Front. Oncol.* 2023. V. 13. P. 1116438.
110. Chen Y., Du X.Y. // *J. Cell. Biochem.* 2007. V. 100. № 6. P. 1337–1345.
111. Chen C.C., Mo F.E., Lau L.F. // *J. Biol. Chem.* 2001. V. 276. № 50. P. 47329–47337.
112. Huang Y.T., Lan Q., Lorusso G., Duffey N., Rüegg C. // *Oncotarget*. 2017. V. 8. № 6. P. 9200–9215.
113. Bennett C.F. // *Annu. Rev. Med.* 2019. V. 70. P. 307–321.
114. Kino Y., Washizu C., Aquilanti E., Okuno M., Kurosawa M., Yamada M., Doi H., Nukina N. // *Nucl. Acids Res.* 2011. V. 39. № 7. P. 2781–2798.
115. Dormann D., Rodde R., Edbauer D., Bentmann E., Fischer I., Hruscha A., Than M.E., Mackenzie I.R., Capell A., Schmid B., et al. // *EMBO J.* 2010. V. 29. № 16. P. 2841–2857.
116. Maharana S., Wang J., Papadopoulos D.K., Richter D., Poznaniakovsky A., Poser I., Bickle M., Rizk S., Guillén-Boixet J., Franzmann T.M., et al. // *Science*. 2018. V. 360. № 6391. P. 918–921.
117. Patel A., Lee H. O., Jawerth L., Maharana S., Jahnel M., Hein M.Y., Stoykov S., Mahamid J., Saha S., Franzmann T.M., et al. // *Cell*. 2015. V. 162. № 5. P. 1066–1077.
118. Sun Z., Diaz Z., Fang X., Hart M.P., Chesi A., Shorter J., Gitler A.D. // *PLoS Biol.* 2011. V. 9. № 4. P. e1000614.
119. Schneider-Poetsch T., Chhipi-Shrestha J.K., Yoshida M. // *J. Antibiot. (Tokyo)*. 2021. V. 74. № 10. P. 603–616.
120. Estevez-Fraga C., Tabrizi S.J., Wild E.J. // *J. Huntingtons Dis.* 2022. V. 11. № 4. P. 351–367.
121. Paik J. // *CNS Drugs*. 2022. V. 36. № 4. P. 401–410.
122. Krach F., Stemick J., Boerstler T., Weiss A., Lingos I., Reischl S., Meixner H., Ploetz S., Farrell M., Hehr U., et al. // *Nat. Commun.* 2022. V. 13. № 1. P. 6797.

УДК 616-076.4; 53.086

Ультраструктурная 3D-микроскопия для биомедицины. Принципы, применение, перспективы

К. Е. Мочалов¹, Д. С. Коржов^{1,2}, А. В. Алтунина^{1,3}, О. И. Агапова⁴, В. А. Олейников^{1,2*}¹Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, Москва, 117997 Россия²Национальный исследовательский ядерный университет «МИФИ», Москва, 115409 Россия³Московский физико-технический институт (национальный исследовательский университет), Долгопрудный, Московская область, 141701 Россия⁴Национальный медицинский исследовательский центр трансплантологии и искусственных органов им. академика В.И. Шумакова Минздрава России, Москва, 123182 Россия

*E-mail: voleinik@mail.ru

Поступила в редакцию 08.11.2023

Принята к печати 29.12.2023

DOI: 10.32607/actanaturae.27323

РЕФЕРАТ Современные биомедицинские исследования зачастую требуют трехмерного микроскопического анализа ультраструктуры биологических объектов и материалов. Усовершенствование традиционных методов оптической, электронной и зондовой микроскопии, исходно позволяющих получать двумерные изображения и данные для целей реконструкции трехмерных структур, требует концептуальных технических и методических решений. В обзоре рассмотрены принципы и возможные приложения таких методик, как просвечивающая электронная микроскопия серийных срезов; техники на основе сканирующей электронной микроскопии (СЭМ): матричная томография, СЭМ с фокусированным ионным пучком и серийная СЭМ поверхности блока. Описаны техники 3D-анализа на базе современных методов оптической микроскопии сверхвысокого разрешения: стохастической оптической реконструкции и микроскопии с истощением стимулированного излучения, а также методы ультраструктурной 3D-микроскопии на базе сканирующей зондовой микроскопии и возможности их объединения с оптическими техниками. Проведен сравнительный анализ преимуществ и недостатков рассмотренных подходов.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА ультраструктурная 3D-микроскопия, электронная микроскопия, томография, оптическая микроскопия сверхвысокого разрешения, сканирующая зондовая микроскопия, биомедицинские исследования.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ ЭМ, EM – электронная микроскопия, Electron Microscopy; СЭМ, SEM – сканирующая электронная микроскопия, Scanning Electron Microscopy; ПЭМ, TEM – просвечивающая электронная микроскопия, Transmission Electron Microscopy; OM – оптическая микроскопия; СЗМ – сканирующая зондовая микроскопия; STORM – микроскопия стохастической оптической реконструкции, STochastic Optical Reconstruction Microscopy; STED – микроскопия с истощением стимулированного излучения, Stimulated Emission Depletion; ssTEM – просвечивающая электронная микроскопия серийных срезов, serial sectioning Transmission Electron Microscopy; АТ – матричная томография, Array Tomography; АТUM-SEM – сканирующий электронный микроскоп с автоматизированным ленточным сбором срезов ультрамикротомы, Automated Tape Collecting Ultramicrotome Scanning Electron Microscopy; SBF-SEM – последовательная сканирующая электронная микроскопия торцевых поверхностей, Serial Block-Face Scanning Electron Microscopy; FIB-SEM – сканирующая электронная микроскопия с фокусированным ионным пучком, Focused Ion Beam Scanning Electron Microscopy; ЭТ – электронная томография; ЭКТ – электронная криотомография; STA – усреднение субтомограммы, Subtomogram Averaging; AE – альвеолоциты, Alveolar Epithelial cells; SMLM – микроскопия локализации одиночных молекул, Single-Molecule Localization Microscopy; PBS – поляризационный светоделитель, Polarizing Beam Splitter; WS – монохроматор, Wave Selector; PM – фазовый модулятор, Phase Modulator; SMF – одно-

довое оптическое волокно, Single Mode Fiber; DC – дихроичное зеркало, DiChroic mirror; DF – дихроичный фильтр, Dichroic Filter; EF – интерференционный фильтр, Extracting Filter; MMF – многомодовое волокно, Multi-Mode Fiber; APD – лавинный фотодиод, Avalanche Photodiode; EMCCD – устройство умножения электронов с зарядовой связью; PALM – фотоактивированная оптическая микроскопия, Photo-Activated Light Microscopy; PAINT – точечное накопление для отображения наноразмерной топографии, Point Accumulation For Imaging In Nanoscale Topography; MINFLUX – микроскопия с минимальными потоками фотонов, Minimal Photon Fluxes; СЗНТ – сканирующая зондовая нанотомография; ФРТ (PSF) – функция рассеяния точки, Point Spread Function.

ВВЕДЕНИЕ

Для проведения современных исследований биологических объектов и наноматериалов требуются совершенствование и развитие методов трехмерного наномасштабного анализа спектральных, морфологических и оптических свойств наноструктурированных образцов.

Традиционно для задач двумерной визуализации принято использовать методы, основанные на трех базовых микроскопических техниках: электронной микроскопии (ЭМ) [1], оптической микроскопии (ОМ) [2] и сканирующей зондовой микроскопии (СЗМ) [3]. Стоит отметить, что данные подходы имеют весьма широкие области применений, но отличаются основными характеристиками и дают различные типы информации об исследуемых объектах. Так ЭМ и СЗМ позволяют получать изображения с пространственным разрешением в несколько нанометров, что дает возможность выявлять различные компоненты внутренней структуры клеток. Существенными недостатками данных методов являются малое поле зрения и невозможность получения информации о составе образца. В противовес этому применение в ОМ высокоспецифичного иммуоокрашивания (в том числе и многоцветного) дает возможность адресно реконструировать пространственное распределение интересующих объектов, например, мембранных белков, ответственных за какие-либо процессы межклеточного взаимодействия. При этом для ОМ во многих случаях сохраняется возможность работать с живыми тканями. Основным недостатком метода является ограниченное дифракционным пределом разрешение. Из критерия Аббе $d > \lambda/2n$ следует, что высокое пространственное разрешение достигается при малых длинах волн и большом коэффициенте преломления среды. При использовании конфокальной оптической микроскопии можно добиться аксиального (ось Z) разрешения до 500 нм и до 250 нм в латеральной (XY) плоскости. Тем не менее данное ограничение удается обойти за счет современной компьютерной обработки и использования многолучевого освещения, на чем основаны такие методы, как микроскопия стохастической оптической реконструкции (STochastic Optical Reconstruction Microscopy,

STORM) [4] и микроскопия с истощением стимулированного излучения (Stimulated Emission Depletion, STED) [5].

Следующим этапом в развитии вышеописанных методик является переход к трехмерному анализу, так как в большинстве случаев именно особенности трехмерной организации биологических объектов и материалов имеют определяющее влияние на их функциональную активность и биологические свойства. По этой причине в последнее время появилось множество работ, посвященных различным подходам к решению данной проблемы. Таким образом, целью данного обзора является рассмотрение последних достижений в области получения трехмерных изображений с наноразмерным разрешением.

МЕТОДЫ УЛЬТРАСТРУКТУРНОЙ 3D-МИКРОСКОПИИ НА БАЗЕ ЭМ

Основными методами электронной микроскопии являются сканирующая электронная микроскопия (СЭМ) и просвечивающая электронная микроскопия (ПЭМ); каждый из этих методов был по-своему модифицирован для получения трехмерных изображений. Создание подобных изображений основано на получении множества 2D-изображений сечений образца и соединении их в единое 3D-изображение (рис. 1).

Наиболее развитые методы получения трехмерных изображений, использующие данный подход, представлены на рис. 2. К основным отличиям, влияющим на выбор подхода для конкретной задачи [6], относятся способ создания последовательности изображений срезов [7], анализируемый объем, а также максимальное пространственное разрешение.

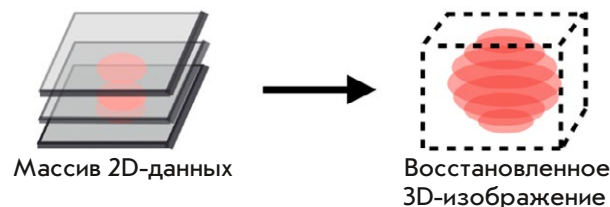


Рис. 1. Основной принцип получения трехмерных изображений

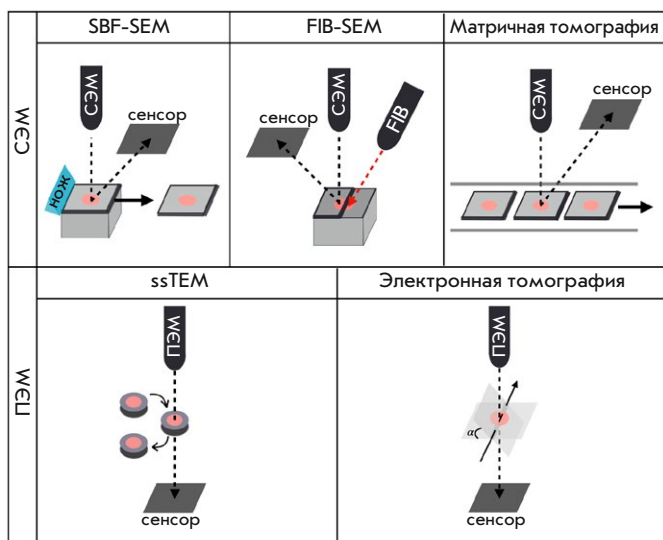


Рис. 2. Методы получения трехмерных изображений с использованием ПЭМ и СЭМ. Независимо от типа микроскопии первым шагом является пробоподготовка, заключающаяся в использовании полимерных сред для иммобилизации образца с последующим выполнением срезов. Среди методов фиксации образца наибольшую популярность получили заливка метакрилатом [8], криофиксация, замораживание с температурной заливкой, а также криосрезы Токаяши [9]. Следующий шаг – накопление массива 2D-изображений с помощью ПЭМ или СЭМ. Полученные изображения необходимо выравнивать по осям ХУ, а также устранять возможные повороты, что особенно важно для систем, в которых исследуются отдельные срезы (ssTEM и матричная томография). Далее из полученного массива выделяют область, которая должна быть на итоговом изображении. Последним шагом является создание полноценного 3D-изображения из полученных 2D-сегментов с помощью специализированного программного обеспечения

Первым из методов 3D-микроскопии на основе ЭМ была ПЭМ серийных срезов (serial sectioning TEM, ssTEM) [10], которая представляет собой ПЭМ с последовательным исследованием тонких срезов, полученных на ультрамикротоме. Главным достоинством ssTEM является возможность неограниченного исследования по глубине. В настоящее время метод доведен до предела своих возможностей и активно применяется во множестве исследований [11, 12]. Пример работы данного метода приведен на рис. 3.

Главный недостаток метода ssTEM – его трудоемкость [13] – необходимость по отдельности изготавливать и исследовать большое количество срезов, а также техническая сложность. Срезы имеют множество артефактов: механические загрязнения

ssTEM: стопки Гольджи

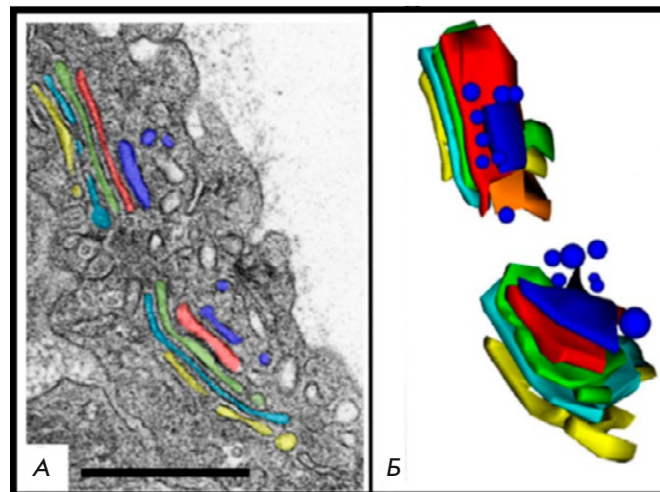


Рис. 3. ssTEM-изображение стопок Гольджи в клетке AE1 легкого мыши. Одна из ЭМ-микрофотографий серии с цветовой ручной сегментацией (А). 3D-модель стопок Гольджи, полученная в ПЭМ на основе девяти последовательных срезов с сегментированными вручную цистернами обеих стопок (Б). Масштабная линейка 500 нм. Рисунок взят из работы [6]

[14], дыры, трещины, сжатия [15], складки и неравномерную толщину среза или несущей пленки [16], что может помешать корректной обработке данных. Еще большей проблемой является возможность утраты части срезов из-за складок или повреждений [17, 18]. В таких случаях полученное изображение может быть некорректным и требует отдельных усилий по устранению потерь.

Метод матричной томографии (Array Tomography, AT) во многом аналогичен ssTEM, но использует СЭМ вместо ПЭМ. Подобное изменение позволило использовать в качестве подложки предметные стекла, кремниевые пластины, покровные стекла с проводящим покрытием [19, 20]. В отличие от сетки для ПЭМ такие подложки имеют в разы больший размер, а значит, позволяют собирать больше срезов. Пример работы метода представлен на рис. 4.

В качестве подложки также может выступать специальная лента, что позволяет в автоматизированном режиме получать тысячи срезов одного образца. Данный подход получил название сканирующей электронной микроскопии с автоматизированным ленточным сбором срезов ультрамикротомом (Automated Tape Collecting Ultramicrotome SEM, ATUM-SEM) [21]. Для получения срезов используют ультрамикротом со специальным УМТ-ножом с ван-

Матричная томография: клетки AE2 в фиброзной паренхиме лёгкого мыши

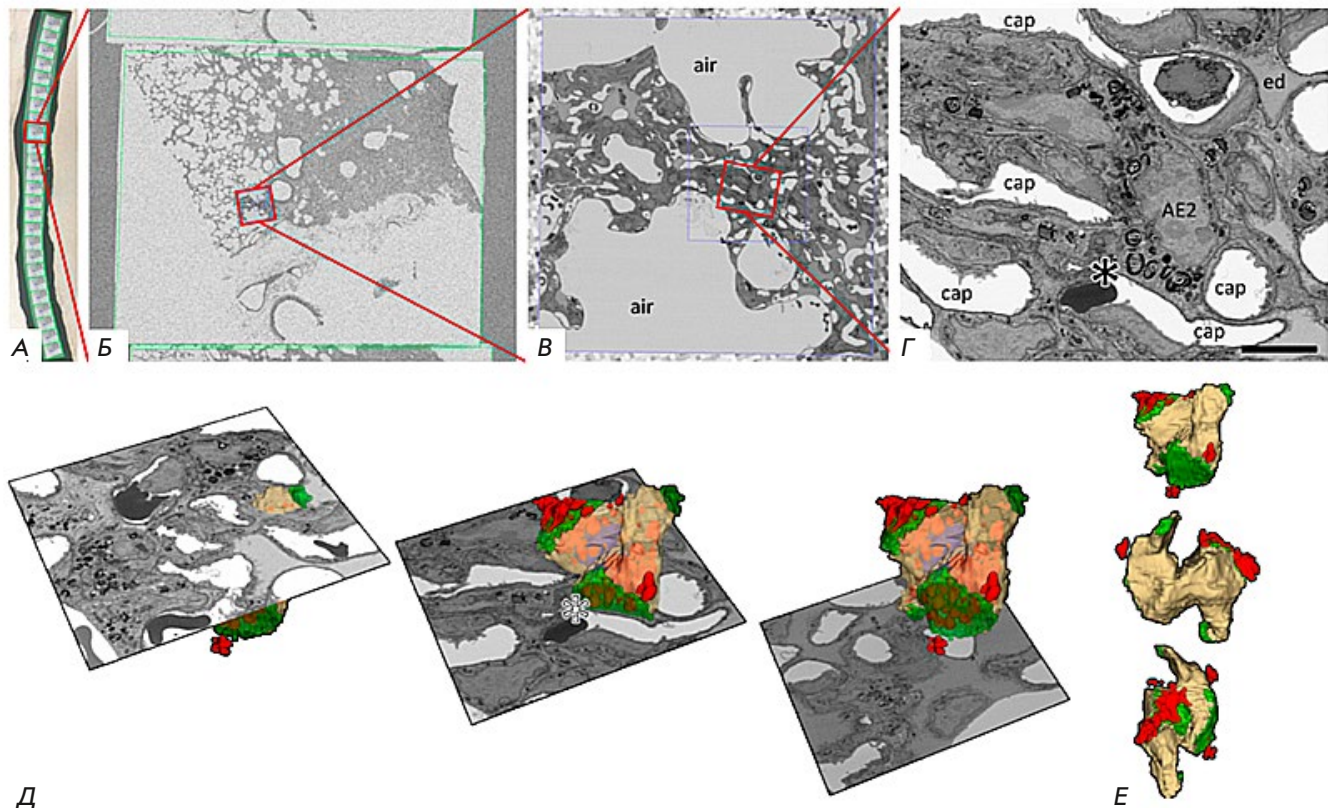


Рис. 4. АТ-изображение клетки AE2 в фиброзной паренхиме легкого мыши. А–Г – последовательное увеличение СЭМ-изображения от одного из срезов ленты (А). Звездочка на Г соответствует одной клетке AE2 в области фиброзной ткани – масштабная линейка 5 мкм. 3D-реконструкция клетки AE2 (Д). Показаны три отдельные плоскости сечения из последовательности записанных изображений. 3D-реконструкция клетки AE2 при разных углах поворота (Е). Рисунок взят из работы [6]

ночкой. Плавающие в воде фрагменты собираются движущейся лентой, которая при желании может сворачиваться в катушку. Далее ленту разрезают на части, прикрепляют к кремниевым пластинам и получают СЭМ-изображения [19]. Из преимуществ данной методики стоит отметить возможность применения постокрашивания, что позволяет получить дополнительное контрастирование [22]. Из всех методик ЭМ ATUM-SEM имеет самое большое поле зрения, ограниченное только шириной ножа ультрамикротомы. Недостатки данной методики в целом такие же, как и в случае ssTEM, однако они не так существенны из-за более крупных матриц и автоматизированного сбора срезов.

Получение СЭМ-изображений возможно не только со срезов, но и с поверхности оставшейся части образца, на чем и основана методика под уже достаточно устоявшимся в российской терминологии названием «последовательная сканирующая электронная микроскопия торцевых поверхностей»

(SBF-SEM, Serial Block-Face Scanning EM). Верхняя часть залитого смолой образца удаляется, а оставшаяся поверхность сканируется СЭМ. Применение данного подхода позволяет устранить такие проблемы, как выравнивание положения, искажения, сжатие и повреждение срезов. Проблему при этом представляет накопление заряда в изолирующей заливочной смоле, что ухудшает качество изображения. По этой причине требуется дополнительная металлизация. При использовании электронного пучка с высокой интенсивностью существует риск повреждения полимера, что также снижает разрешение и уменьшает пластичность, необходимую для качественного среза поверхности [23, 24]. В таком подходе также отсутствует возможность постокрашивания, что требует от исходного образца хорошего контраста и проводимости. Примером работы метода может служить рис. 5А.

Для среза поверхности возможно применение фокусированного ионного пучка. Данный подход

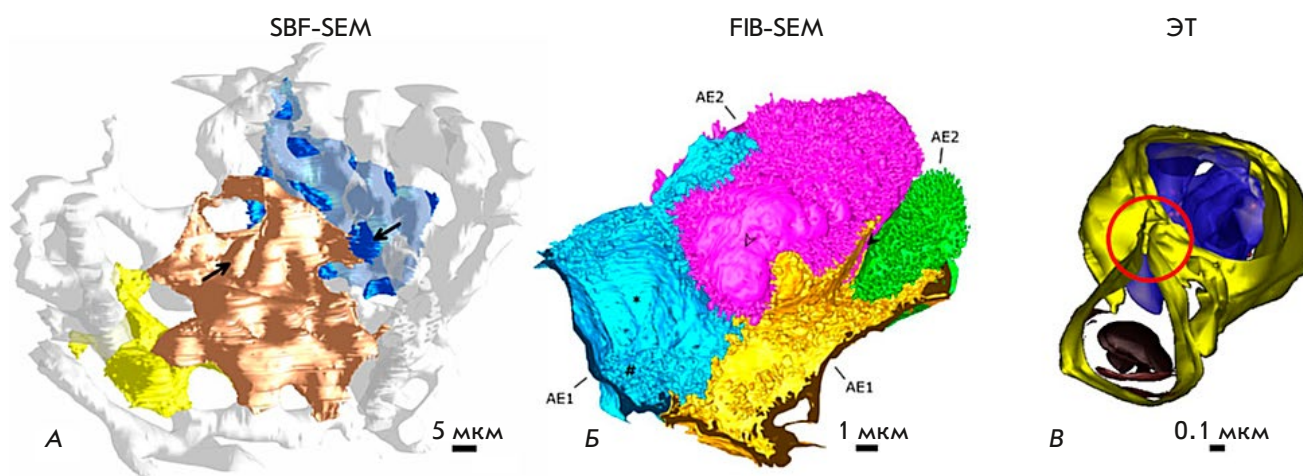


Рис. 5. 3D-реконструкции, полученные с помощью серийной сканирующей электронной микроскопии с блочной поверхностью (SBF-SEM), СЭМ с послойным травлением фокусированным ионным пучком (FIB-SEM) и электронной томографии (ЭТ). 3D-реконструкция альвеолоцитов типа 1 (AE1) человека (желтый, золотой, синий) и альвеолярно-капиллярной сети (белый) на основе набора данных SBF-SEM. Стрелки указывают положение ядер клеток AE1 (А). 3D-реконструкция практически всей клетки альвеолоцита типа 2 (AE2) человека (розовый) с частями соседних клеточных доменов AE1 (синий, желтый) и дополнительной клетки AE2 (зеленый) на основе набора данных FIB-SEM (Б). 3D-реконструкция пластинчатого тела (вверху) и аутофагосомы (внизу) внутри клетки AE2 (легкое мыши) на основе набора данных ЭТ (В). Различимы отдельные липидные мембраны, что в данном случае указывает на связь двух органелл (красный кружок). Рисунок взят из работы [6]

получил название СЭМ с фокусированным ионным пучком (FIB-SEM, Focused Ion Beam Scanning EM). Во всем остальном логика работы прибора аналогична SBF-SEM. Конструктивно FIB-SEM состоит из двух источников излучения – расположенная сверху электронная оптика для сканирующего пучка и ионная оптика сбоку для срезающего пучка. Оба пучка фокусируются в одной точке и таким образом происходит непрерывное сканирование всего объема образца [25]. В зависимости от тока ионного пучка существует возможность как точного среза малой области, так и грубое срезание больших слоев. Применение данного метода позволяет увеличить осевое разрешение с 20 нм для ультрамикротомографа до 5 нм для ионного пучка. За подобное увеличение осевого разрешения приходится расплачиваться латеральным, потому что перефокусировка возможна только в области нескольких десятков микрон. Еще одно преимущество ионного пучка – возможность разрезать более твердые и нестабильные материалы, а также образцы без внедрения смолы. FIB-SEM уже применялся для детализации субклеточных структур и показал высокую степень детализации изображений [26, 27]. Результат работы можно увидеть на *рис. 5Б*.

Еще один метод трехмерного анализа – электронная томография (ЭТ) [28]. В отличие от всех вышеописанных методов ЭТ создает не физические,

а виртуальные срезы образца. Методика пробоподготовки аналогична случаю ПЭМ и СЭМ и включает химическую или криофиксацию, окраску или пометку антителами [29]. Таким образом, исследование происходит как при комнатной температуре при заливке смолой, так и при криотемпературе в случае замороженных образцов. Ниже будет уделено отдельное внимание аспекту работы ЭТ при криогенных температурах, использование которых породило отдельную методику – электронную криотомографию (ЭКТ) [30]. Также имеется возможность исследования суспензий частиц размером менее сотен нанометров (например, вирусов, органелл, макромолекул) путем нанесения на углеродную пленку или слой замерзшей воды [31].

По принципу работы ЭТ аналогичен компьютерной томографии, где излучение направляется под различными углами и таким образом создаются виртуальные срезы. Отличием между ними является то, что в компьютерной томографии рентгеновская трубка с камерой вращаются вокруг образца, а в ЭТ образец поворачивается при неподвижной камере. Подобное конструктивное изменение приводит к тому, что изображение получается не с 360°, а только с 70° от нормали к образцу в исходном положении. Такое ограничение получило название «недостающий клин» [32], или в случае использования нескольких направлений наклона «недостаю-

щий конус» [33]. Разрешение, достигаемое при использовании данного метода, значительно выше, чем в других подходах к 3D-анализу с использованием ЭМ, но оно сильно зависит от таких параметров, как толщина объекта, ускоряющее напряжение, калибровка наклона гониометра и совмещение полученных изображений. Необходимость достижения минимального соотношения сигнал/шум, страдающего от неупругого рассеяния, накладывает ограничения на возможный размер образца. Так, в ЭТ традиционно применяют ускоряющие напряжения в 200–300 кВ, что позволяет исследовать образцы до 300 нм. Использование более толстых образцов при этом снижает возможное разрешение [34]. Частично обойти это ограничение можно либо за счет метода фильтрации энергии [35], либо за счет увеличения ускоряющего напряжения. Например, в работе [36] использование ускоряющего напряжения в 400 кВ позволило исследовать образец толщиной 1 мкм. Из-за подобных ограничений в размере исследуемой области данный метод лучше всего подходит для изучения субклеточных структур размером менее 100 нм, что продемонстрировано на *рис. 5В*. Приложение ЭТ к более толстым структурам возможно при изготовлении серии срезов с последующим их сложением как в предыдущих методах [27, 37]. Необходимо отметить, что, несмотря на вышеуказанные ограничения, метод ЭТ, в частности ЭКТ, обладает абсолютно рекордными показателями для всех видов 3D-микроскопии с точки зрения достигаемого пространственного разрешения. Так, с использованием процедуры усреднения субтомограммы (STA, subtomogram averaging), применение которой требует, однако, присутствия существенного для усреднения количества одинаковых наноразмерных объектов, например, белковых молекул, была достигнута рекордная величина пространственного разрешения 3D-реконструкции – 2.8 Å [30].

Тем не менее широкое внедрение методов ЭТ и ЭКТ существенно затрудняется их достаточной сложностью, поэтому они развиваются и применяются довольно небольшим количеством исследовательских групп [28, 30, 38–40].

МЕТОДЫ УЛЬТРАСТРУКТУРНОЙ 3D-МИКРОСКОПИИ НА ОСНОВЕ СВЕРХРАЗРЕШАЮЩИХ МЕТОДИК ОМ

Традиционно оптическая визуализация биологических структур осуществлялась с помощью конфокальной микроспектрометрии [41], а также таких ее модификаций, как 4Pi-микроскопия [42–44]. Основным недостатком всех этих методик является низкое пространственное разрешение. По этой причине за последние два десятилетия были раз-

работаны и адаптированы для трехмерного анализа различные методики оптической микроскопии сверхвысокого разрешения, среди которых наиболее выделяются микроскопия стохастической оптической реконструкции (STochastic Optical Reconstruction Microscopy, STORM) [4] и микроскопия с истощением стимулированного излучения (Stimulated Emission Depletion, STED) [5]. Практическая важность данных методик заключается в возможности не только структурного анализа образца с нанометровым разрешением, но и возможности реконструкции пространственного распределения целевых объектов исследования за счет высокоспецифичного флуоресцентного иммуоокрашивания, являющегося неотъемлемым шагом в процессе пробоподготовки в любой из сверхразрешающих методик ОМ.

Первой методикой трехмерной микроскопии сверхвысокого разрешения является 3D-STORM [45]. Она относится к такому классу микроскопии, как микроскопия локализации одиночных молекул (SMLM). В основании данного класса методик лежит факт того, что определенные флуорофоры спонтанно «загораются» и «гаснут», что может быть выявлено при быстрой покадровой съемке. Таким образом на каждый кадр попадет излучение различных подмножеств флуоресцирующих молекул. Полученные изображения по-прежнему ограничены дифракционным пределом, однако положение отдельных молекул выявляется с высокой точностью на основании множества кадров специальным математическим аппаратом с использованием триангуляции Делоне [46]. Финальное 3D-изображение реконструируется с использованием данных статистической обработки тысяч локализаций.

Первой пространственно-локализованной с помощью STORM одиночной молекулой был миозин [47]. Для получения изображений молекулы (флуоресцентные зонды) были разрежены до такой степени, что их сигналы не перекрывались. Таким образом удалось с большой точностью найти положение каждого зонда. Совсем иной подход был выработан в работе [48], где применяли фотоперекрывающиеся циановые красители. Процесс измерения происходил следующим образом: излучение с низкой интенсивностью включало небольшое количество зондов, после чего записывалось изображение и вычислялось их положение; излучение с другой длиной волны отключало этот набор зондов и включало другой. Многократное повторение данной процедуры позволило сформировать полноценное трехмерное изображение образца. Пространственное разрешение, достигаемое таким методом, составляет от 20 до 30 нм. Вариацией STORM является методика

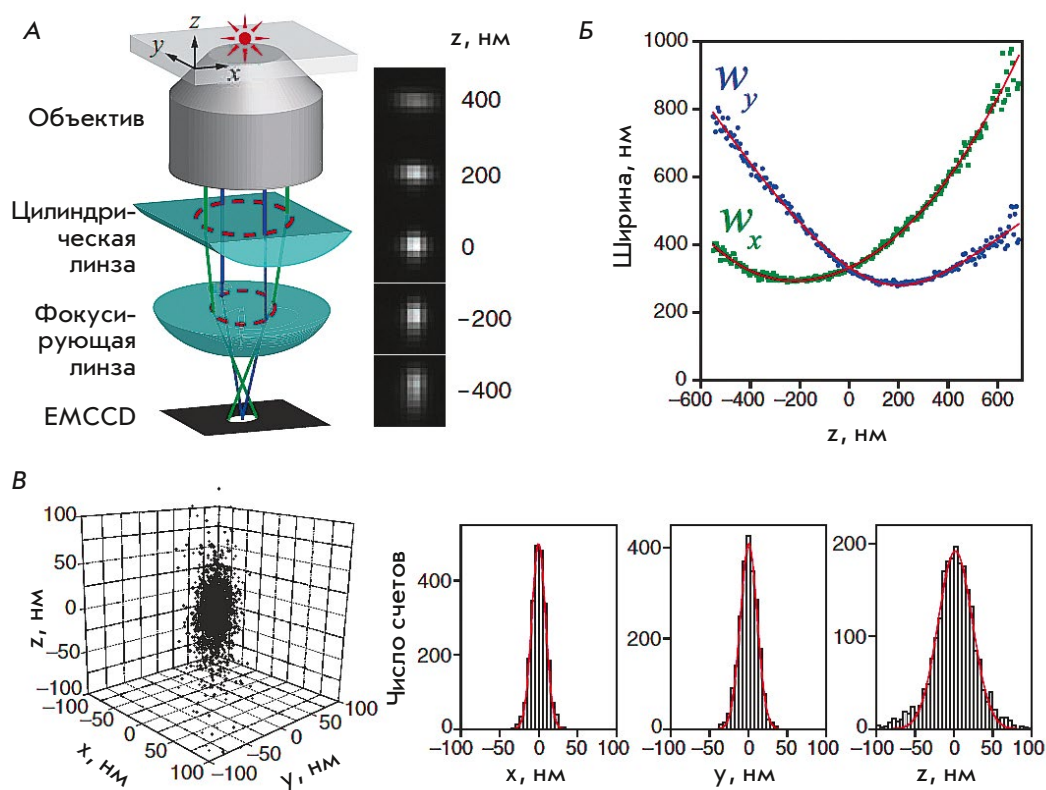


Рис. 6. Принцип методики 3D-STORM. (А) Оптическая схема определения аксиальной координаты излучающего объекта по анализу эллиптичности его изображения. На правой панели показаны изображения излучающего объекта в плоскостях X и Y в зависимости от аксиального положения. (Б) Примеры зависимостей эллиптичности изображения единичного флуорофора Alexa 647 для координат X и Y от фокусировки по оси Z . (В) Пример 3D-распределения локализаций одиночных излучающих объектов и соответствующие гистограммы распределения по направлениям X , Y и Z . Рисунок взят из работы [45]

PALM (Photo-Activated Light Microscopy), которая построена на аналогичном подходе, но вместо красителей используются фотоактивируемые белки [49]. Стоит отметить, что и в целом различия в методиках SMLM сводятся к используемым для специфического мечения флуорофорам. Так, например, в методе dSTORM (direct STORM) используются циановые красители (Cy5 и Alexa 647), переключаемые добавлением специального буфера, содержащего тиол и глюкозооксидазу [50], а широкий набор флуоресцентных меток для SMLM представлен в работах [51, 52]. Еще одна разновидность SMLM – метод PAINT (Point Accumulation For Imaging In Nanoscale Topography) использует диффундирующие красители, которые включаются только тогда, когда они временно прикреплены к целевой структуре [53, 54].

Разработка метода 3D-SMLM на базе STORM основана на учете астигматизма изображений, полученных с различной глубины образца [55]. Это достигается введением в оптическую схему специальной цилиндрической линзы с малым радиусом кривизны, благодаря чему фокальные плоскости для X - и Y -направлений отличаются. Глубина залегания флуорофора вычисляется из изменения эллиптичности пространственного распределения его излучения. Принцип работы данного подхода представлен на рис. 6. Так на рис. 6Б наглядно показано

различие в минимумах эллиптичности для координат X и Y и способ определения истинного положения образца на координате Z по пересечению зависимостей эллиптичности по X и Y . Также на рис. 6В приведен пример трехмерного распределения локализации одиночных молекул, в данном случае флуорофора Alexa 647. Экспериментально наблюдаемый кластер локализаций (пресечений кривых эллиптичности) одной и той же молекулы связан с ее многократной активацией/деактивацией. Таким образом, возникает необходимость локализации достаточно большого (в данном случае 145) количества кластеров, которые далее статистически выравниваются по центру масс для создания общего трехмерного распределения локализаций – левая панель на рис. 6В.

В качестве примера практического применения данной методики можно привести визуализацию клетки серии BS-C-1, окрашенной первичными и вторичными антителами, а также красителями Cy3 и Alexa 647 [56]. Результат такого подхода продемонстрирован на рис. 7.

В отличие от 3D-SMLM в случае трехмерной оптической визуализации методом STED исследуемая область освещается не целиком, а точно с помощью двух сфокусированных лазеров. Первый лазер сканирует поверхность аналогично обычному

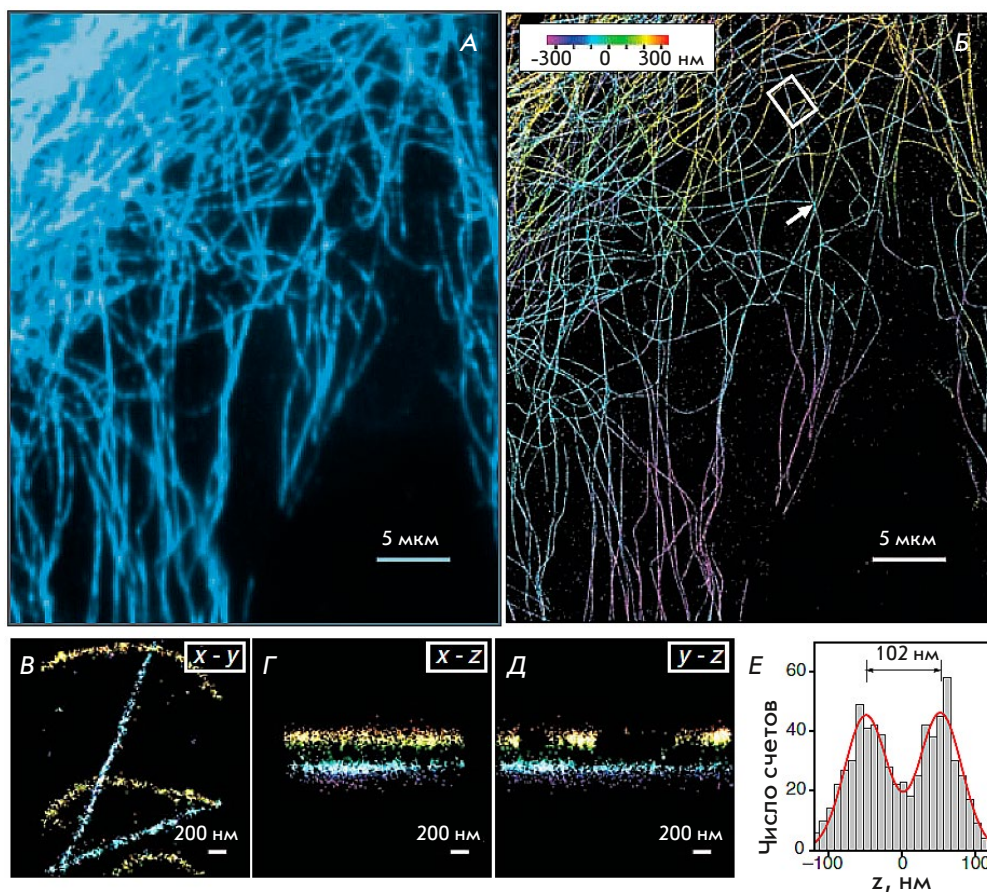


Рис. 7. Результаты, полученные с помощью методики 3D-STORM. (А) Широкопольное флуоресцентное изображение микротрубочек в клетке BS-C-1. (Б) Полученное в режиме 3D-STORM-изображение того же участка клетки BS-C-1, что и на панели (А). Данные об аксиальных координатах залегания представлены в шкале псевдоцвета. (В–Д) Поперечные сечения, соответствующие пяти нитям микротрубочек, в направлениях X-Y, X-Z и Y-Z в области клетки BS-C-1 – белый прямоугольник на (Б). (Е) Гистограмма Z-профиля двух микротрубочек, имеющих пересечение в проекции X-Y, построенная в области, указанной белой стрелкой, на панели (Б). Рисунок взят из работы [45]

конфокальному микроскопу, второй же имеет профиль пучка в фокальной плоскости в виде проекции тора и используется для подавления спонтанного излучения на краях исследуемой области с помощью вынужденного излучения. Разрешение в несколько десятков нанометров достигается за счет того, что регистрируемое излучение исходит ровно из центра пучка возбуждающего лазера [57]. Существенным фактором при этом является практически нулевая интенсивность в центре подавляющего пучка, иначе эффективность STED снижается за счет подавления излучения в исследуемой области [58]. В зависимости от распределения света в подавляющем пучке различают несколько типов STED: 1D-STED (направления X или Y) [59], 2D-STED (X и Y одновременно) [60], z-STED (вдоль оптической оси Z) и, наконец, 3D-STED

[61, 62]. Основной технической проблемой в случае 3D-STED является некогерентное объединение двух подавляющих лучей, один из которых имеет профиль, как у 2D-STED, а другой, как у z-STED. Такой подход позволяет также отдельно регулировать осевое и латеральное разрешение. Форма подавляющего луча задается созданием определенных фазовых паттернов. С этой целью используются пластины с фиксированной фазовой задержкой или пространственный модулятор света.

Традиционно в STED-микроскопии используют строго синхронизированные импульсные источники лазерного излучения, работающие по следующему принципу – после возбуждающего флуоресценцию импульса (около 80 пс, меньше времени жизни флуоресценции) следует суживающий пространственную область STED-импульс длительностью около

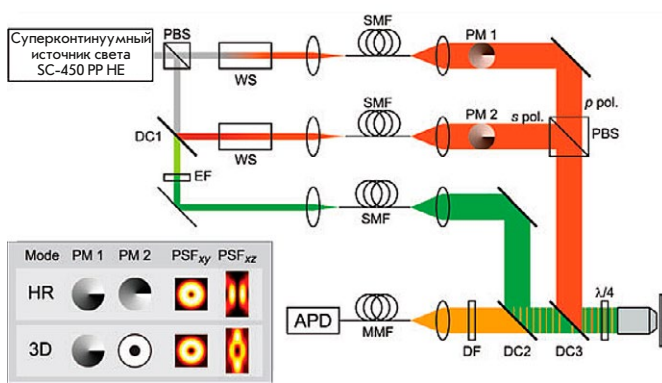


Рис. 8. Принципиальная схема установки для реализации методики 3D-STED с использованием суперконтинуумного лазера. Рисунок взят из работы [61]

250 пс. Однако расширение STED-микроскопии до видимого спектра потребовало использования сложной нелинейной оптики для формирования и синхронизации импульсов. Недавно [63] было показано, что STED-микроскопия может быть реализована с использованием непрерывных суперконтинуумных лазеров, что в значительной мере упрощает аппаратные комплексы для STED-микроскопии и может способствовать более широкому внедрению данной методики. Схема установки 3D-STED на суперконтинуумном лазере представлена на рис. 8.

Лазерное излучение делится поляризационным светоделителем (PBS) на два ортогонально (s и p) поляризованных луча. С помощью монохроматора (WS) из каждого луча выделяется необходимая длина волны, после чего происходит пространственная фильтрация пучка одномодовыми оптически волокнами (SMF). Далее профиль подавляющих пучков (выделены на рисунке красным) задается фазовыми пластинами (модуляторами) (PM1 и PM2), а итоговые лучи суммируются поляризационным светоделителем и подаются на вход объектива дихроичным зеркалом (DC3). В качестве возбуждающего излучения используется часть s поляризованного луча, прошедшая через дихроичное зеркало (DC1). Интерференционный (экстрагирующий) фильтр (EF) выделяет требуемую длину волны (выделена на рисунке зеленым), после чего пучок также подвергается пространственной фильтрации и подается на объектив дихроичным зеркалом (DC2). Четвертьволновая пластина перед объективом задает всем пришедшим лучам круговую поляризацию. Стоксов флуоресцентный сигнал (выделен на рисунке желтым) проходит оба дихроичных зеркала и фильтруется от возбуждающего излучения оптическим (дихроичным) НЧ-фильтром (DF), после чего фокусируется в многомодовое волокно (MMF),

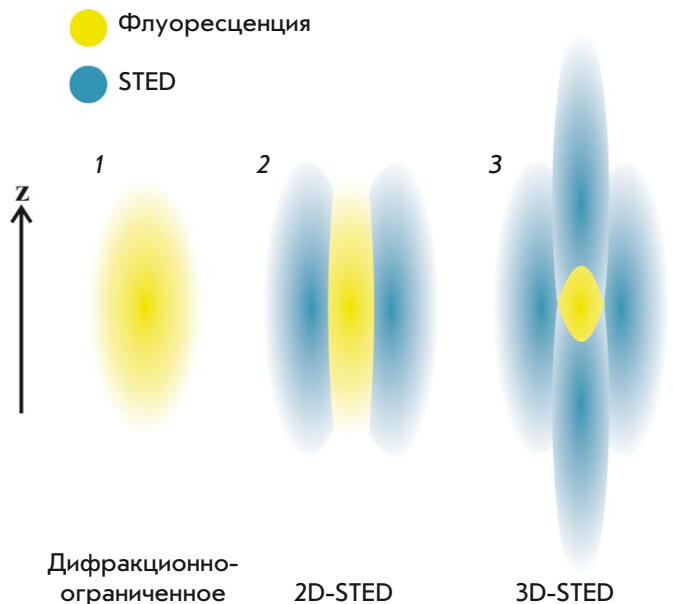


Рис. 9. Сужение эффективной области излучения за счет STED-подавления периферийного излучения. 1 – дифракционно-ограниченная флуоресцентная ФРТ, 2 – торообразный луч STED сужает диаметр флуоресцентной ФРТ, 3 – флуоресцентная ФРТ в случае 3D-STED

выступающее в роли конфокального отверстия, и регистрируется лавинным фотодиодом (APD). Сканирование происходит с помощью перемещения образца трехкоординатным пьезопозиционером. На рис. 8 также изображены функции рассеяния точки в нескольких направлениях, при использовании фазовых пластин для сверхвысокого латерального разрешения (HR) и получения 3D-изображений [64]. Сужение эффективной области излучения для 3D-STED подробнее показано на рис. 9.

Основными параметрами, влияющими на пространственное разрешение STED, являются интенсивность лазера и оптические aberrации. Для биологических образцов это значение составляет несколько десятков нанометров. В настоящее время ведутся работы по устранению aberrаций, возникающих при использовании длиннофокусных объективов и оптических окон, благодаря чему стали возможными безaberrационные 3D-изображения глубиной в десятки нанометров [65]. Пример работы 3D-STED представлен на рис. 10.

Важной особенностью метода является то, что наномасштабное разрешение достигается без математической обработки сигнала. Однако в последнее время ведутся работы по совмещению STED и SMLM, примером которых может служить методика 3D-MINFLUX (Minimal Photon Fluxes) с рекордным для флуоресцентной микроскопии разрешением в единицы нанометров [66, 67].

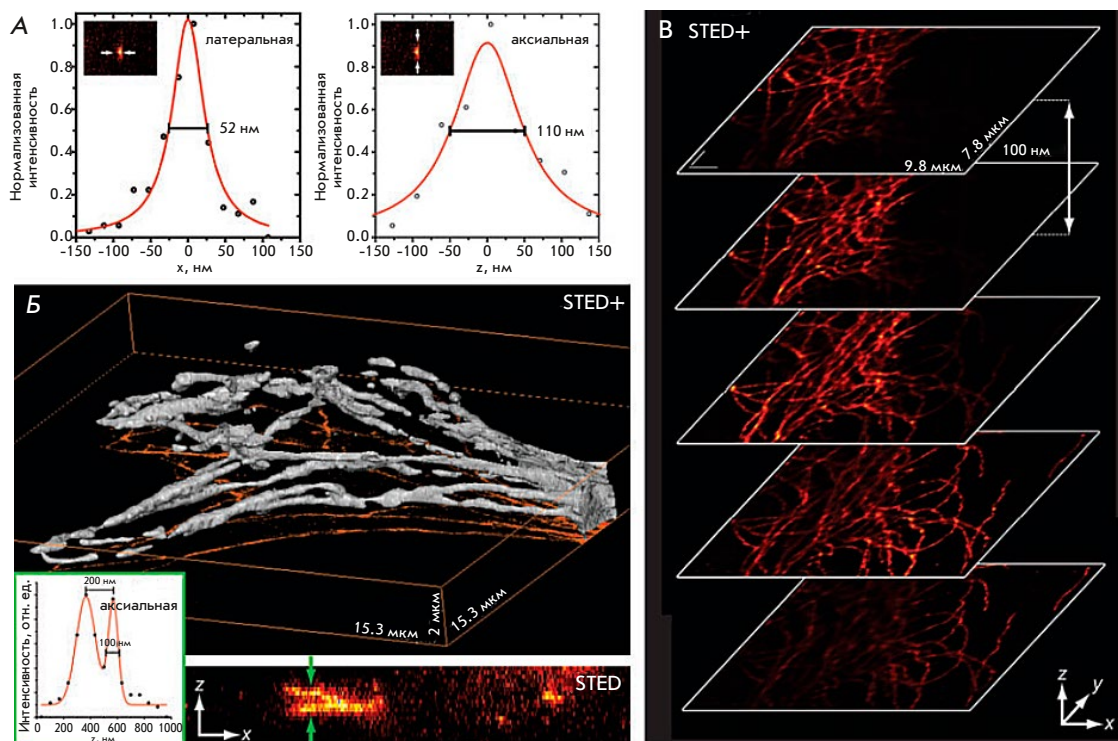


Рис. 10. Результаты, получаемые с использованием методики 3D-STED. (А) Значения пространственных разрешений флуоресцентных наночастиц диаметром 44 нм: 52 нм в X-направлении и 110 нм в аксиальном (Z) направлении. (Б) 3D-изображение флуоресцентно меченных микротрубочек: визуализация изоповерхности (вверху) и проекция максимальной интенсивности вдоль оси Y (внизу) – 30 срезов. На вставке показан профиль интенсивности в указанном месте. (В) Срезы, полученные с шагом 100 нм в направлении z. Рисунок взят из работы [61]

МЕТОДЫ УЛЬТРАСТРУКТУРНОЙ 3D-МИКРОСКОПИИ НА ОСНОВЕ СЗМ

Подход к трехмерному анализу с использованием сканирующей зондовой микроскопии во многом аналогичен другому описанному ранее методу картирования поверхности – сканирующей электронной микроскопии, и требует удаления просканированного нанослоя с поверхности материала. Принцип трехмерной реконструкции при этом такой же, как в FIB-SEM – объединение двумерных СЗМ-изображений в трехмерное. Важнейшее существенное отличие СЗМ от методов ЭМ состоит в среднем в несколько меньшем латеральном (XY) пространственном разрешении, определяемом радиусом кривизны зонда. Стандартные СЗМ-зонды имеют заявляемый производителем радиус кривизны около 10 нм, однако существует достаточно много специализированных зондов, например, с наращенными алмазными вискерами (<https://tipsnano.ru/catalog/afm-special/super-sharp/nsg10-dlc/>), имеющими радиус кривизны около 1 нм. Впервые СЗМ была применена для 3D-исследования микродоменов 3-блок-сополимера типа «полистирол-блок-бутадиен-блок-стирен» [68]. При этом для удаления слоев использовали контролируемое плазменное

травление, что позволило удалять по 7.5 нм материала. В итоге удалось реконструировать область с размерами $200 \times 160 \times 45$ нм. Существенным недостатком при этом была необходимость извлекать образец после проведения каждого сканирования, что исправили в ходе дальнейшего усовершенствования методики [69, 70]. Важной особенностью данного метода является то, что для получения последовательности 2D-изображений для последующей 3D-реконструкции нельзя использовать традиционную топографию в качестве зависящего от X и Y сигналов, поскольку в действительности традиционное атомно-силовое изображение уже представляет собой трехмерный объект. Поэтому для получения набора 2D-данных используются такие сигналы, как фаза, проводимость, магнитный отклик и т.п.

Данную методику использовали для реконструкции структуры полимерных композитов [71, 72], а также участка кости человека [70] в режимах получения фазового контраста, что и представлено на рис. 11. Изображение полученное после 19 сканирований в режиме фазового контраста с последующим травлением в соляной кислоте.

Среди недостатков метода наибольшую проблему представляет используемый процесс удаления

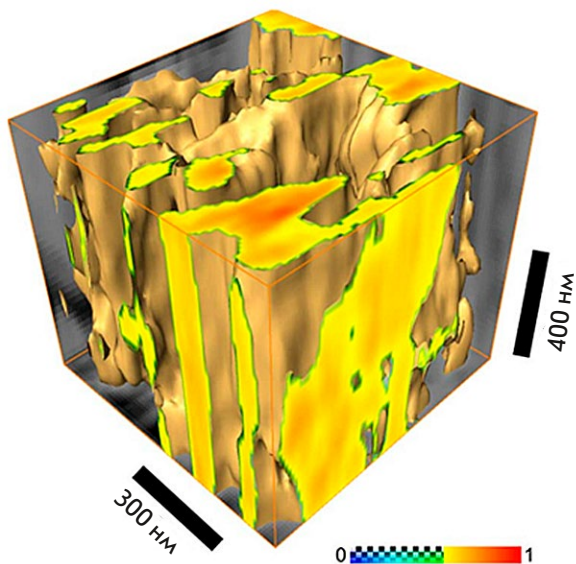


Рис. 11. Томографическая реконструкция участка человеческой кости, $256 \times 256 \times 19$ вокселей, пошаговое химическое травление 80 нм. Цветовая шкала является нормированной на единицу величины фазового сдвига колебаний СЗМ-зонда. Рисунок взят из работы [70]

материалов – травление, которое не позволяет исследовать пористые материалы, а также нанокомпозитов, различная скорость реакции компонентов которого приводит к искажениям при сканировании поверхности и, как следствие, к неправильной объемной реконструкции. Этот недостаток может

быть частично скомпенсирован применением специальных алгоритмов обработки данных [70], однако итоговое разрешение при этом будет отличаться для некоторых участков, что негативно сказывается на анализе результатов.

Иным подходом к 3D-СЗМ является использование ультрамикротомома [73, 74]. Минимальная толщина среза при этом зависит от возможностей используемого ультрамикротомома и для современных установок составляет 20 нм. При этом не играет роли, каким образом образец был иммобилизован – полимерной смолой или криозаморозкой.

Устройство для реализации СЗНТ продемонстрировано на рис. 12. Оно состоит из сканирующей головки СЗМ, прикрепленной специальными шарнирами к держателю ножа ультрамикротомома. Конструкция предусматривает два положения: для срезов (рис. 12, справа) и для измерений (рис. 12, слева). В первом сканирующая головка отведена от подвижной консоли ультрамикротомома, которая, в свою очередь, передвигается, производя срез. Во втором положении консоль возвращается в исходное состояние, подводится СЗМ и производится сканирование оставшейся части образца [73]. Подобный подход уже был описан ранее для СЭМ, он позволяет избежать таких механических нарушений сканируемого объекта, как сжатие, растяжение и деформация.

Полученные серии последовательных СЗМ-изображений используются для реконструкции и визуализации трехмерных наноструктур в объеме

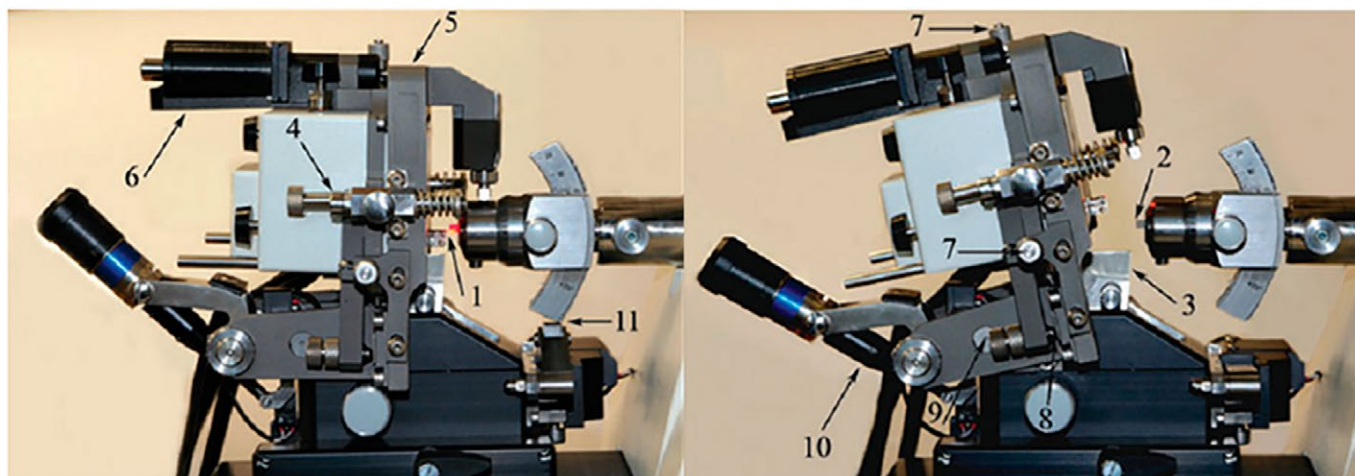


Рис. 12. Установка для реализации методики СЗНТ – Ntegra Tomo (НТ-МДТ, Россия). Левая панель – рабочее положение для проведения СЗМ-измерений. Правая панель – СЗМ-головка отведена для выполнения УМТ-среза. (1) держатель СЗМ-зонда; (2) исследуемый образец; (3) держатель УМТ-ножа; (4) опоры СЗМ-головки; (5) опорная платформа СЗМ-головки; (6) система моторизированного подвода СЗМ-головки; (7) микрометрические винты позиционера СЗМ-головки; (8) опорные пластины из поликорунда; (9) система шарнирного закрепления СЗМ-головки; (10) система моторизированного отвода СЗМ-головки для ее приведения в положение УМТ-среза; (11) ограничительная опора УМТ-консоли. Рисунок взят из работы [73]

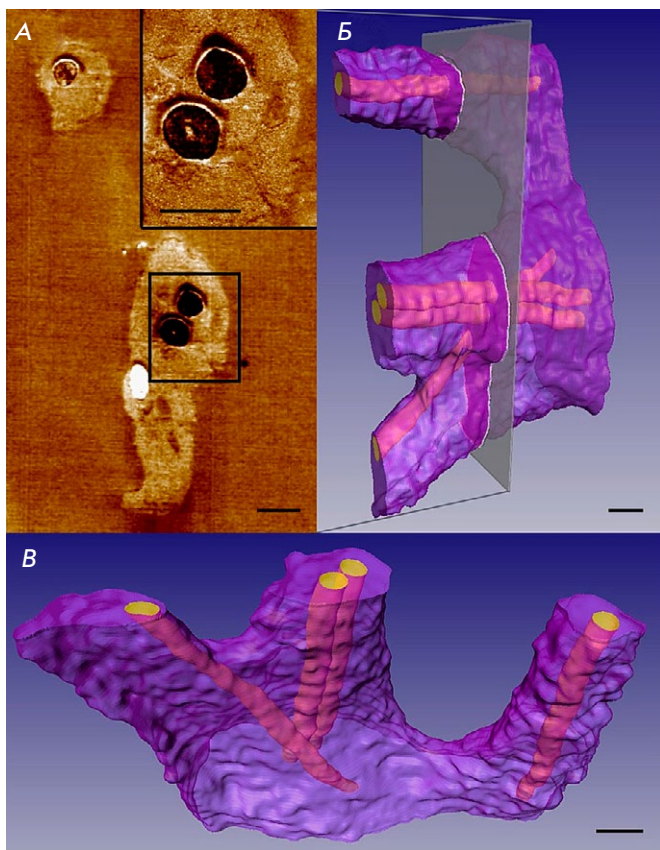


Рис. 13. Трехмерная СЗНТ-реконструкция кардиомиоцита, обволакивающего нановолокна. (А) Одно из топографических СЗМ-изображений (фазовый контраст), использованное для трехмерной реконструкции. На вставке увеличенная область, обозначенная прямоугольником, включающая в себя волокна и складку мембраны. (Б и В) Трехмерные модели кардиомиоцита (показан в двух ракурсах), обволакивающего нановолокна ($16.0 \times 16.0 \times 6.5$ мкм, 54 среза, толщина среза 120 нм). Выделенная плоскость на (Б) соответствует положению СЗМ-изображения на (А). Размерный отрезок 1 мкм. Измерения проведены в нормальных атмосферных условиях при комнатной температуре. Рисунок взят из работы [83]

исследуемых образцов. Использование различных измерительных методик СЗМ дает возможность получать информацию не только о морфологии, но и локальных электрических [75], механических [76] и многих других локальных свойствах. Методика позволяет выполнять реконструкцию трехмерного распределения наночастиц в объеме наноматериалов [75, 76] и трехмерной топологии нанопористых структур [77–80].

В частности, метод СЗНТ может эффективно применяться для трехмерной реконструкции микро- и нановолокнистых клеточных скаффолдов на основе биополимеров [81, 82] и определения их объемной

пористости, отношения площади поверхности к объему и других параметров трехмерной морфологии. Реконструкция трехмерных структур клеточно-инженерных конструкций позволяет исследовать топологию и численные морфологические параметры клеток и интерфейсов между клетками и скаффолдами, которые могут служить определяющими индикаторами состояния и биологической активности клеток [83, 84].

Так, например, при помощи метода СЗНТ выявлены характерные особенности взаимодействия неонатальных кардиомиоцитов крысы с полимерными нановолокнистыми матриксами: установлено, что кардиомиоциты, в отличие от фибробластов, в большинстве случаев полностью обволакивают нановолокна, что заметно увеличивает площадь зоны контакта клетки и волокон. На рис. 13 представлена полученная методом СЗНТ трехмерная реконструкция участка кардиомиоцита, обволакивающего подвешенные полилактидные нановолокна. Для получения данной трехмерной реконструкции было использовано 54 сегментированных СЗМ-изображения поверхности образца. Каждое изображение получено последовательно после очередного среза ультрамикротомом толщиной 120 нм [83].

Другим примером может служить изображенная на рис. 14 трехмерная структура фрагмента фибробласта (первичная культура фибробластов человека), контактирующего с несколькими волокнами микроволокнистого полиуретанового матрикса с образованием типичных выступов клеточной мембраны, частично обволакивающих волокна [84].

Исследование мягких биополимерных материалов и биологических объектов без заливки в эпоксидную среду требует их предварительной заморозки, для чего была разработана установка, объединяющая СЗМ и криокамеру ультрамикротомы [85]. Эта установка позволяет выполнять последовательные СЗМ-измерения на поверхности замороженных образцов непосредственно после выполнения среза алмазным ножом криоультрамикротомы в криокамере. В данном случае измерения выполняются в полуконтактном режиме с использованием кантиллеров, установленных на кварцевых резонаторах и не требующих использования оптического дефлектометра, что важно для работы в условиях криокамеры. Примером работы такой установки служит изображенная на рис. 15 трехмерная крио-СЗНТ-реконструкция единичной микрочастицы внеклеточного матрикса печени крысы на поверхности альгинатного микроносителя, выполненная при температуре -120°C , так как выполнение срезов при более высоких температурах нарушает структуру гидрогелевых микроносителей [86, 87].

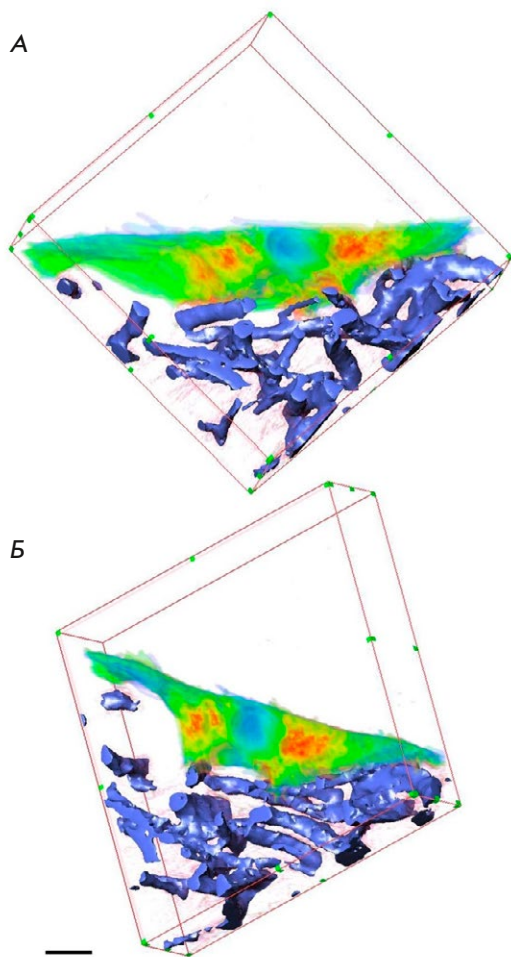


Рис. 14. Визуализация трехмерной СЗНТ-реконструкции фрагмента фибробласта (показан в зелено-красных цветах) и окружающих полиуретановых волокон (синий цвет), 23 среза толщиной 150 нм, реконструированный объем $32.0 \times 32.0 \times 3.3$ мкм, размерный отрезок 3 мкм. Показан реконструированный фрагмент фибробласта в двух ракурсах (А и Б). Измерения проводили в режиме получения фазового контраста в нормальных атмосферных условиях при комнатной температуре. Рисунок взят из работы [84]

Подробный протокол получения образцов микро-частиц внеклеточного матрикса печени крысы приведен в [86]. Его использование обеспечило полное удаление клеток из внеклеточного матрикса, фрагменты которого измельчили в жидком азоте, что позволило получить микро-частицы внеклеточного матрикса с размерами в диапазоне 1–5 мкм. Далее полученные микро-частицы были ковалентно пришиты к альгинатным микросферам с размерами в диапазоне 200–300 мкм (рис. 15А).

Возможности анализа трехмерных наноструктур биологических объектов могут быть значительно расширены за счет объединения методик СЗНТ

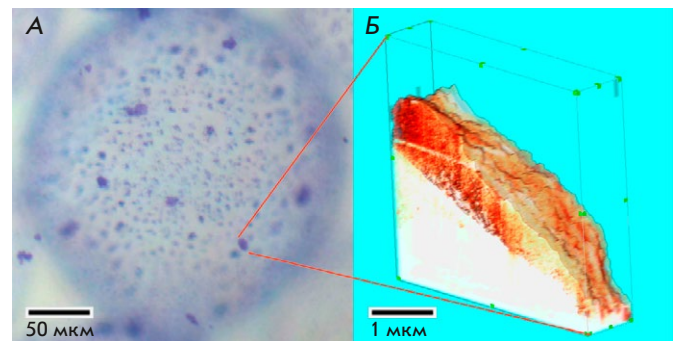


Рис. 15. Крио-СЗНТ-реконструкция единичной микро-частицы внеклеточного матрикса печени крысы на поверхности альгинатного микроносителя, выполненная при температуре -120°C : (А) Оптическая микроскопия, окраска Coomassie Brilliant Blue R-250; (Б) Трехмерная крио-СЗНТ-реконструкция единичной микро-частицы внеклеточного матрикса печени крысы, полученная из 13 последовательных крио-СЗМ-изображений поверхности микро-частицы на сферическом альгинатном микроносителе после последовательных крио-срезов толщиной 80 нм. Реконструированный объем $5.0 \times 5.0 \times 1.1$ мкм. Разрешение каждого 2D-СЗМ-скана 400×400 пикселей. Палитра псевдоцвета соответствует нормированной на единицу величине фазового сдвига колебаний СЗМ-зонда. Рисунок взят из работы [87]

и оптической микроскопии высокого разрешения, в частности флуоресцентной, в одну коррелятивную технологию оптическо-зондовой нанотомографии (ОЗНТ) [88–91], которая может быть реализована с использованием уникальной научной установки (<http://ckp-rf.ru/usu/486825/>).

На рис. 16 показаны пример коррелятивных флуоресцентных и СЗМ-изображений клетки MCF-7 и визуализация трехмерной реконструкции распределения доxorубина в клетке на основе полученных данных. На трехмерной реконструкции выделяется связанная структура распределения, что может служить критерием успешности использованного 3D-метода. Разрешение полученной реконструкции по координате Z (аксиальному направлению) в данном случае соответствует толщине среза (120 нм) [92].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Среди рассмотренных в данном обзоре методов трехмерной реконструкции структуры невозможно выделить наилучший, так как каждый из них обладает своими существенными достоинствами и недостатками.

Основным преимуществом методов, основанных на электронной микроскопии, являются высочайшее

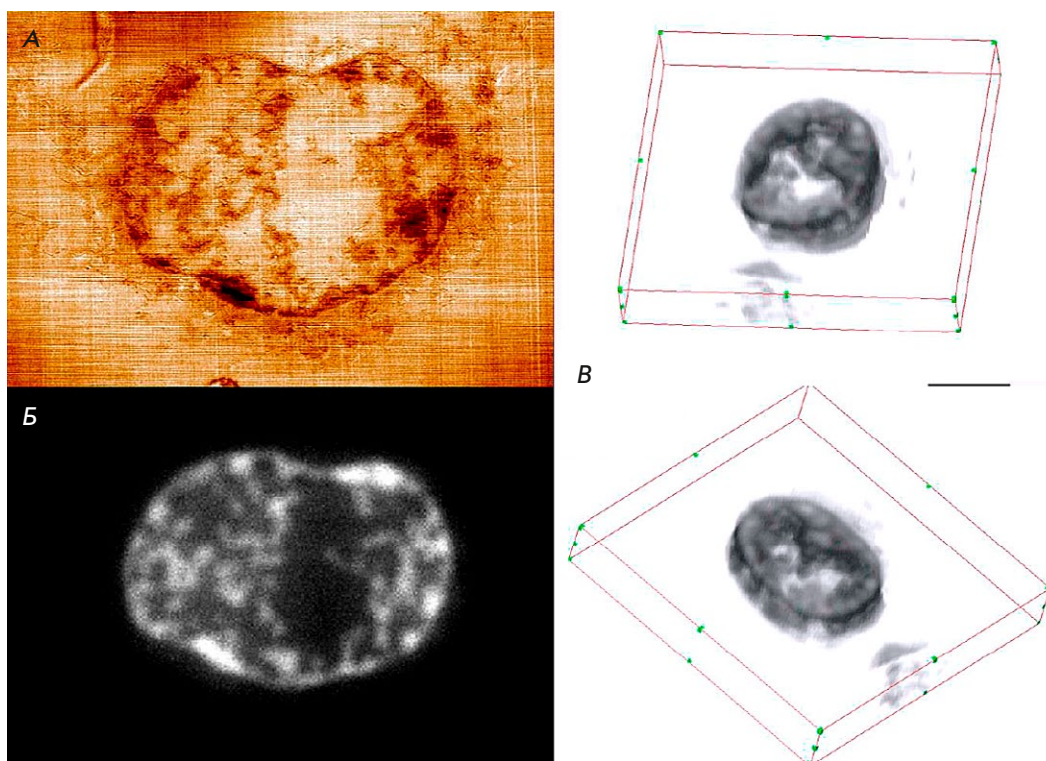


Рис. 16. Анализ образцов клеток аденокарциномы молочной железы человека MCF-7 с доксорубицином. (А) СЗМ-изображение топографии поверхности среза клетки MCF-7, размер скана 13.8×9.5 мкм, диапазон вариации высоты 33.5 нм; (Б) Флуоресцентное изображение среза той же области клетки MCF-7; (В) Трехмерная реконструкция распределения доксорубицина в объеме образца клетки MCF-7, $22.5 \times 18.7 \times 2.4$ мкм, толщина среза 120 нм, размерный отрезок 5 мкм, представлена визуализация в двух ракурсах. Рисунок взят из работы [92]

пространственное разрешение (менее 1 нм) и возможность получения изображений с большой глубиной за счет послойного сканирования, но применение в них вакуума, электронных и ионных пучков может повредить образец и изменить нативные структуры полимеров и белковых соединений. Более того, данные методы не дают никакой информации, кроме морфологии образца.

Оптические методы STORM и STED обладают меньшим пространственным разрешением в несколько нанометров, но дают возможность не только ультраструктурного анализа образца, но и проведения реконструкции пространственного распределения целевых объектов исследования за счет высокоспецифичного флуоресцентного иммуоокрашивания. При этом накладываются существенные ограничения на размеры исследуемой области. Стоит также отметить, что для получения качественных изображений требуется устранить aberrации, для чего необходимо применять сложные оптические системы.

Применение сканирующих зондовых микроскопов для трехмерной реконструкции позволяет подобно

ЭМ восстанавливать изображения образцов с большой протяженностью по глубине за счет удаления части материала, а также получать информацию о химическом строении, электрических и магнитных свойствах с помощью метода фазового контраста и специальных проводящих, магнитных или функционализированных зондов. При этом данная методика уступает электронной и оптической микроскопии в латеральном разрешении.

Использование коррелятивных измерительных методик СЗМ и флуоресцентной микроскопии высокого разрешения для трехмерной реконструкции ультраструктуры биологических объектов является перспективным направлением для повышения информативности получаемых трехмерных данных, в частности, трехмерных распределений флуоресцентных маркеров и наноразмерных морфологических особенностей. ●

*Исследование выполнено за счет гранта
Российского научного фонда (№ 22-14-00168),
<https://rscf.ru/project/22-14-00168/>*

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Franken L.E., Grünewald K., Boekema E.J., Stuart M.C.A. // *Small*. 2020. V. 16. № 14. P. e1906198.
2. Northover A.S., Keatley S., Elliot A.D., Hobbs R.P., Yang R., Lymbery A.J., Godfrey S.S., Wayne A.F., Thompson R.C.A. // *Syst. Parasitol.* 2019. V. 96. № 7. P. 553–563.
3. Bian K., Gerber C., Heinrich A., Müller D., Scheuring S., Jiang Y. // *Nat. Rev. Meth. Primers*. 2021. V. 1. № 1. P. 1–36. <https://doi.org/10.1038/s43586-021-00033-2>
4. Rust M.J., Bates M., Zhuang X. // *Nat. Meth.* 2006. V. 3. № 10. P. 793–795.
5. Hell S.W., Wichmann J. // *Opt. Lett.* 1994. V. 19. № 11. P. 780–782.
6. Schneider J.P., Hegermann J., Wrede C. // *Histochem. Cell Biol.* 2021. V. 155. № 2. P. 241–260.
7. Müller-Reichert T., Mancuso J., Lich B., McDonald K. // *Meth. Cell Biol.* 2010. V. 96. P. 331–361.
8. Borrett S., Hughes L. // *J. Microscopy*. 2016. V. 263. № 1. P. 3–9.
9. Bogers J., Nibbeling H., Deelder A., van Marck E. // *J. Histochem. Cytochem.* 1996. V. 44. № 1. P. 43–48.
10. Tokuyasu K.L. // *J. Cell Biol.* 1973. V. 57. P. 551–565.
11. Gay H., Anderson T.F. // *Science*. 1954. V. 120. № 3130. P. 1071–1073.
12. Miranda K., Girard-Dias W., Attias M., de Souza W., Ramos I. // *Mol. Reprod. Dev.* 2015. V. 82. P. 530–547.
13. Hegermann J., Wrede C., Fassbender S., Schliep R., Ochs M., Knudsen L., Mühlfeld C. // *Am. J. Physiol. Lung Cell Mol. Physiol.* 2019. V. 317. P. 778–784.
14. Kremer A., Lippens S., Bartunkova S., Asselbergh B., Blanpain C., Fendrych M., Goossens A., Holt M., Janssens S., Krols M. // *J. Microscopy*. 2015. V. 259. № 2. P. 80–96.
15. Harris K.M., Perry E., Bourne J., Feinberg M., Ostroff L., Hurlburt J. // *J. Neurosci.* 2006. V. 26. № 47. P. 12101–12103.
16. Peter G., Lee D. // *J. Biophys. Biochem.* 1958. V. 4. № 3. P. 345–349.
17. Aescht E., Büchl-Zimmermann S., Burmester A. *Romeis Mikroskopische Technik*. Berlin Heidelberg: Spektrum Akademischer Verlag, 2010. 551 p.
18. Saalfeld S., Fetter R., Cardona A., Tomancak P. // *Nat. Meth.* 2012. V. 9. № 7. P. 717–720.
19. Young S.L., Fram E.K., Craig B.L. // *Am. J. Anatomy*. 1985. P. 174–175.
20. Baena V., Schalek R.L., Lichtman J.W., Terasaki M. // *Meth. Cell Biol.* 2019. V. 152. P. 41–67.
21. Beike L., Wrede C., Hegermann J., Lopez-Rodriguez E., Kloth C., Gaudie J., Kolb M., Maus U.A., Ochs M., Knudsen L. // *Lab. Invest.* 2019. V. 99. № 6. P. 830–852.
22. Schalek R., Hayworth K., Kasthuri N., Morgan J.L., Berger D., Wilson A.M., Anger P., Aderhold D., Seung H.S., Lichtman J.W. // *Microscopy Microanalysis*. 2012. V. 18. P. 572–573.
23. Kasthuri N., Hayworth K., Berger D., Schalek R., Conchello J., Knowles-Barley S., Lee D., Vázquez-Reina A., Kaynig V., Jones T. // *Cell. Cell Press*. 2015. V. 162. № 3. P. 648–661.
24. Smith D., Starborg T. // *Tissue Cell*. 2019. V. 57. P. 111–122.
25. Titze B., Genoud C. // *Biol. Cell*. 2016. V. 108. № 11. P. 307–323.
26. Knott G., Rosset S., Cantoni M. // *J. Visual. Exp.* 2011. V. 53. e2588.
27. Schneider J.P., Wrede C., Mühlfeld C. // *Int. J. Mol. Sci.* 2020. V. 21. № 3. 1089.
28. Mühlfeld C., Wrede C., Molnár V., Rajces A., Brandenberger C. // *Histochem. Cell Biol.* 2021. V. 155. № 2. P. 261–269.
29. McIntosh R., Nicastro D., Mastronarde D. // *Trends Cell Biol.* 2005. V. 15. № 1. P. 43–51.
30. Ni T., Frosio T., Mendonça L., Sheng Y., Clare D., Himes B.A., Zhang P. // *Nat. Protoc.* 2022. V. 17. P. 421–444.
31. Al-Amoudi A., Chang J., Leforestier A., McDowall A., Salamin L., Norlén L., Richter K., Blanc N., Studer D., Dubochet J. // *EMBO J.* 2004. V. 23. № 18. P. 3583–3588.
32. Dubochet J., McDowall A.W.V. // *J. Microsc.* 1981. V. 124. № 3. P. 3–4.
33. Saghi Z., Midgley P.A. // *Ann. Rev. Materials Res.* 2012. V. 42. P. 59–79.
34. Neumüller J. // *Wien Med. Wochenschr.* 2018. V. 168. № 11–12. P. 322–329.
35. Ercius P., Alaidi O., Rames M.J., Ren G. // *Adv. Materials*. 2015. V. 27. № 38. P. 5638–5663.
36. Vanhecke D., Asano S., Kochovski Z., Fernandez-Busnadiego R., Schrod N., Baumeister W., Lučić V. // *J. Microsc.* 2011. V. 242. № 3. P. 221–227.
37. West J.B., Fu Z., Deerinck T.J., Mackey M.R., Obayashi J.T., Ellisman M.H. // *Respir. Physiol. Neurobiol.* 2010. V. 170. № 2. P. 202–209.
38. Höög J.L., Schwartz C., Noon A.T., O’Toole E.T., Mastromarde D.N., McIntosh J.R., Antony C. // *Dev. Cell*. 2007. V. 12. № 3. P. 349–361.
39. Lučić V., Förster F., Baumeister W. // *Annu. Rev. Biochem.* 2005. V. 74. P. 833–865.
40. Gan L., Jensen G.J. // *Quarterly Rev. Biophys.* 2012. V. 45. № 1. P. 27–56.
41. Frey T.G., Perkins G.A., Ellisman M.H. // *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* 2006. V. 35. № 1. P. 199–224.
42. Zipfel W.R., Williams R.M., Webb W.W. // *Nat. Biotechnol.* 2003. V. 21. № 11. P. 1369–1377.
43. Gugel H., Bewersdorf J., Jakobs S., Engelhardt J., Storz R., Hell S.W. // *Biophys. J.* 2004. V. 87. № 6. P. 4146–4152.
44. Min Gu. *Principles of Three-Dimensional Imaging in Confocal Microscopes*. Singapore: World Scientific Publishing Co Pte Ltd, 1996. 352 p.
45. Huang B., Wenqin W., Bates M., Zhuang X. // *Science*. 2008. V. 319. № 5864. P. 807–810.
46. Скворцов А.В. *Триангуляция Делоне и ее применение*. Томск: Изд-во Томского университета, 2002. 128 с.
47. Yildiz A., Forkey J.N., McKinney S.A., Ha T., Goldman Y.E., Selvin P.R. // *Science*. 2003. V. 300. № 5628. P. 2061–2065.
48. Rust M.J., Bates M., Zhuang X. // *Nat. Meth.* 2006. V. 3. № 10. P. 793–795.
49. Betzig E., Patterson G., Sougrat R., Lindwasser W., Olenych S., Bonifacino J., Davidson M., Lippincott-Schwartz J., Hess H. // *Science*. 2006. V. 313. № 5793. P. 1642–1645.
50. Heilemann M., van de Linde S., Schüttelpelz M., Kasper R., Seefeldt B., Mukherjee A., Tinnefeld P., Sauer M. // *Angewandte Chemie*. 2008. V. 47. № 33. P. 6172–6176.
51. Vogelsang J., Cordes T., Forthmann C., Steinhauer C., Tinnefeld P. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2009. V. 106. № 20. P. 8107–8112.
52. Cordes T., Strackharn M., Stahl S.W., Summerer W., Steinhauer C., Forthmann C., Puchner E.M., Vogelsang J., Gaub H.E., Tinnefeld P. // *Nano Lett.* 2010. V. 10. № 2. P. 645–651.
53. Jungmann R., Avendaño M., Woehrstein J., Dai M., Shih W., Yin P. // *Nat. Meth.* 2014. V. 11. № 3. P. 313–318.
54. Sharonov A., Hochstrasser R. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2006. V. 103. № 50. P. 18911–18916.
55. Holtzer L., Meckel T., Schmidt T. // *Appl. Phys. Lett.* 2007. V. 90. № 5. 053902.
56. Bates M., Huang B., Dempsey G.T., Zhuang X. // *Science*. 2007. V. 317. P. 1749–1753.

57. Bianchini P, Peres C, Oneto M, Galiani S, Vicidomini G, Diaspro A. // *Cell Tissue Res.* 2015. V. 360. № 1. P. 143–150.
58. Galiani S, Harke B, Vicidomini G, Lignani G, Benfenati F, Diaspro A, Bianchini P, Vicidomini G, Moneron G, Han K. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2010. V. 143. № 7. P. 3361–3371.
59. Klar T, Jakobs S, Dyba M, Egner A, Hell S. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2000. V. 97. № 15. P. 8206–8210.
60. Willig K, Keller J, Bossi M, Hell S. // *New J. Phys.* 2006. V. 8. № 6. 106.
61. Wildanger D, Medda R, Kastrup L, Hell S. // *J. Microsc.* 2009. V. 236. № 1. P. 35–43.
62. Harke B, Ullal C, Keller J, Hell S. // *Nano Lett.* 2008. V. 8. № 5. P. 1309–1313.
63. Willig K, Harke B, Medda R, Hell S. // *Nat. Meth.* 2007. V. 4. № 11. P. 915–918.
64. Finzel L, Reuss M. // *Microsc. Today.* 2022. V. 30. № 4. P. 26–33.
65. Heine J, Wurm C.A., Keller-Findeisen J, Schönle A, Harke B, Reuss M, Winter F.R., Donnert G. // *Rev. Sci. Instr.* 2018. V. 89. № 5. P. 053701.
66. Gwosch C.C., Pape J.K., Balzarotti F, Hoess P, Ellenberg J, Ries J, Hell S.W. // *Nat. Meth.* 2020. V. 17. № 2. P. 217–224.
67. Schmidt R, Weihs T, Wurm C.A., Jansen I, Rehman J, Sahl S.J., Hell S.W. // *Nat. Commun.* 2021. V. 12. № 1. P. 1478.
68. Magerle R. // *Phys. Rev. Lett.* 2000. V. 85. № 13. P. 2749.
69. Hund M, Herold H. // *Rev. Sci. Instr.* 2007. V. 78. № 6. 063703.
70. Dietz C, Röper S, Scherdel S, Bernstein A, Rehse N, Magerle R. // *Rev. Sci. Instr.* 2007. V. 78. № 5. 053703.
71. Rehse N, Marr S, Scherdel S, Magerle R. // *Adv. Materials.* 2005. V. 17. № 18. P. 2203–2206.
72. Liedel C, Hund M, Olszowka V, Böker A. // *Soft Matter.* 2012. V. 8. № 4. P. 995–1002.
73. Efimov A, Tonevitsky A, Dittrich M, Matsko N. // *J. Microsc.* 2007. V. 226. № 3. P. 207–216.
74. Efimov A, Agapov I, Agapova O, Oleinikov V, Mezin A, Molinari M, Nabiev I, Mochalov K. // *Rev. Sci. Instr.* 2017. V. 88. № 2. P. 023701.
75. Alekseev A, Efimov A, Lu K, Loos J. // *Adv. Materials.* 2009. V. 21. № 48. P. 4915–4919.
76. Alekseev A, Efimov A, Loos J, Matsko N, Syurik J. // *Eur. Polymer J.* 2014. V. 52. № 1. P. 154–165.
77. Mochalov K, Efimov A, Bobrovsky A, Agapov I, Chistyakov A, Oleinikov V, Sukhanova A, Nabiev I. // *ACS Nano.* 2013. V. 7. P. 8953–8962.
78. Efimov A, Agapova O, Mochalov K, Agapov I. // *Physics Procedia.* 2015. V. 73. P. 173–176.
79. Efimov A, Moisenovich M, Bogush V, Agapov I. // *RSC Adv. Royal Soc. Chem.* 2014. V. 4. № 105. P. 60943–60947.
80. Ефимов А.Е., Агапов И.И. // *Вестник трансплантологии и искусственных органов.* 2014. В. 16. № 3. С. 109–116.
81. Safonova L, Bobrova M, Efimov A, Lyundup A, Agapova O, Agapov I. // *Pharmaceutics.* 2021. V. 13. P. 1561.
82. Safonova L, Bobrova M, Efimov A, Davydova L, Tenchurin T, Bogush V, Agapova O, Agapov I. // *Pharmaceutics.* 2021. V. 13. P. 1704.
83. Balashov V, Efimov A, Agapova O, Pogorelov A, Agapov I, Agladze K. // *Acta Biomater.* 2018. V. 68. P. 214–222.
84. Efimov A.E., Agapova O.I., Safonova L.A., Bobrova M.M., Parfenov V.A., Koudan E.V., Pereira F.D.A.S., Bulanova E.A., Mironov V.A., Agapov I.I. // *Express Polym. Lett.* 2019. V. 13. P. 632–641.
85. Efimov A.E., Gnaegi H, Schaller R, Grogger W, Hofer F, Matsko N. // *Soft Matter.* 2012. V. 8. № 38. P. 9756–9760.
86. Efimov A.E., Agapova O.I., Safonova L.A., Bobrova M.M., Volkov A.D., Khamkhash L, Agapov I.I. // *RSC Adv.* 2017. V. 7. P. 8808–8815.
87. Ефимов А, Агапова О, Сафонова Л, Боброва М, Агапов И. // *Вестник трансплантологии и искусственных органов.* 2018. В. 19. № 4. С. 78–87.
88. Efimov A.E., Agapov I.I., Agapova O.I., Oleinikov V.A., Mezin A.V., Molinari M, Nabiev I, Mochalov K.E. // *Rev. Sci. Instrum.* 2017. V. 88. P. 023701.
89. Mochalov K.E., Chistyakov A.A., Solovyeva D.O., Mezin A.V., Oleinikov V.A., Vaskan I.S., Molinari M, Agapov I.I., Nabiev I, Efimov A.E. // *Ultramicroscopy.* 2017. V. 182. P. 118–123.
90. Efimov A.E., Bobrovsky A.Y., Agapov I.I., Agapova O.I., Oleinikov V.A., Nabiev I.R., Mochalov K.E. // *Technical Physics Lett.* 2016. V. 42. № 2. P. 171–174.
91. Агапова О.И., Ефимов А.Е., Сафонова Л.А., Боброва М.М., Агапов И.И., Готье С.В. // *Доклады РАН. Науки о жизни.* 2021. Т. 500. № 1. С. 483–487.
92. Агапова О.И., Ефимов А.Е., Мочалов К.Е., Соловьева Д.О., Гилева А.М., Марквичева Е.А., Яковлев Д.В., Люндуп А.В., Олейников В.А., Агапов И.И., Готье С.В. // *Доклады РАН. Науки о жизни.* 2023. Т. 509. № 1. С. 119–123.

УДК 579

Streptomyces phaeochromogenes БВ-204 – штамм-продуцент антрахинона К-1115А, нового ингибитора биосинтеза белка

А. Р. Белик¹, Ю. В. Закалюкина^{1,2}, В. А. Алферова³, Ю. А. Буюклян¹, И. А. Остерман^{1,4},
М. В. Бирюков^{1,2*}

¹Научно-технологический университет «Сириус», Сочи, 354340 Россия

²Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, Москва, 119234 Россия

³Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова
РАН, Москва, 117997 Россия

⁴Сколковский институт науки и технологий, Москва, 121205 Россия

*E-mail: metrim@gmail.com

Поступила в редакцию 02.11.2023

Принята к печати 16.01.2024

DOI: 10.32607/actanaturae.27315

РЕФЕРАТ Важной проблемой при поиске новых антибиотиков является «переоткрытие», то есть обнаружение уже известных молекул и тот факт, что на их фоне могут теряться новые молекулы с перспективными механизмами действия. Возможным решением этой проблемы может быть так называемый мишень-ориентированный поиск с использованием специальных репортерных микроорганизмов, сочетающих повышенную антибиотикочувствительность со способностью демонстрировать характер повреждающего действия изучаемых молекул. Использование подобных тест-организмов позволяет обнаружить новые интересные свойства даже у известных метаболитов. В данном исследовании использован метод высокопроизводительного скрининга на основе двойной репортерной системы pDualrep2, высокая чувствительность которой, обусловленная использованием модифицированных штаммов тест-организмов, сочетается с возможностью легко и точно выявлять механизмы взаимодействия вещества с бактериальной клеткой на первичных этапах скрининга. Эта репортерная система не имеет аналогов в России и существенно превосходит мировые аналоги. Ингибирование трансляции индуцирует экспрессию флуоресцентного белка *Katushka2s*, а повреждение ДНК – TurboRFP. При помощи pDualrep2 нами выделен и описан штамм *Streptomyces phaeochromogenes* БВ-204, продуцент описанного ранее биологически активного вещества К-1115А, антибиотическая активность которого и способность ингибировать бактериальную трансляцию впервые были продемонстрированы в нашей работе. Этот эффект подтвержден нами в *in vitro* системе бесклеточной трансляции мРНК FLuc. Антибактериальная активность вещества К-1115А проверена и подтверждена на клетках *S. aureus* (MRSA) и *B. subtilis*, а также сопоставлена с цитотоксичностью на клеточной линии НЕК293. Определен терапевтический индекс данного соединения, составивший 2 и 8 соответственно. Полученные результаты и описанные нами новые свойства К-1115А открывают перспективы его дальнейшего изучения и позволяют рассматривать данное соединение как основу для получения полусинтетических производных с улучшенными терапевтическими свойствами и разработки в дальнейшем лекарственных форм.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА актиномицеты, К-1115А, антибиотики, репортерная система pDualrep2, ингибирование биосинтеза белка, *in vitro* трансляция, «гражданская наука».

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ БГК – биосинтетический генный кластер; КЖ – культуральная жидкость; ТФЭ – твердофазная экстракция; МПК – минимальная подавляющая концентрация; ХМСА – хромато-масс-спектрометрический анализ; ЛПС – липополисахарид; мРНК FLuc – матричная РНК, кодирующая светлячковую люциферазу.

ВВЕДЕНИЕ

Распространение антибиотикорезистентности среди патогенов представляет одну из острейших проблем современной медицины. Потенциал ранее найденных и введенных в медицинскую практику молекул практически исчерпан, а темпы открытия новых значительно снизились по сравнению с «Золотой эрой антибиотиков», которая приходилась на середину XX века. Большинство обнаруживаемых в ходе широкомасштабного скрининга [1–3] антибиотиков оказываются «переоткрытием» ранее уже обнаруженных молекул, однако новый инструментарий исследования механизмов действия позволяет взглянуть на эти вещества под новым углом и обнаружить новый потенциал их применения [4–6].

Таковыми инструментами могут быть мишень-ориентированный скрининг и методы определения механизма действия молекул на начальных стадиях исследования. Это позволяет сосредоточить поиск антибактериальных веществ, специфичных к наиболее перспективным мишеням, и даже может ускорить идентификацию молекул. В настоящее время нами успешно используется репортерная система, в которой соединения, ингибирующие биосинтез белка или ДНК, детектируются при помощи экспрессии репортерных генов флуоресцентных белков в ответ на это воздействие. Актуальность поиска ингибиторов трансляции заключается в том, что рибосома является ключевым элементом функционирования живой клетки, при этом в структурах рибосом про- и эукариот имеются значительные различия, что позволяет рассчитывать на возможность высокоспецифичного воздействия именно на бактериальные рибосомы и значительно повышает шансы разработки лекарственных препаратов с хорошими терапевтическими свойствами.

Актиномицеты рода *Streptomyces* – богатейший источник биологически активных веществ, они продуцируют примерно 50% используемых в медицинской практике антибактериальных субстанций [7–9]. Актиномицеты являются одними из обладателей самых больших геномов среди прокариот и, соответственно, имеют большой кодирующий потенциал, что приводит к структурному разнообразию продуцируемых ими вторичных метаболитов. К настоящему времени описаны десятки тысяч молекул, продуцируемых стрептомицетами, однако даже «переоткрываемые молекулы» часто демонстрируют новые, уникальные свойства.

Ранее благодаря использованию репортерной системы нам удалось установить механизм действия тетраценомина X [10]. Эта молекула и ее антибактериальные свойства были описаны еще в 60-х

годах. Тетраценомин X обладает структурным сходством с доксорубицином, поэтому считалось, что его эффект также основан на интеркаляции в двухцепочечную структуру ДНК, однако использование репортерной системы позволило предположить, а в дальнейшем и подтвердить, что эта молекула ингибирует биосинтез белка путем взаимодействия с рибосомой в новом, ранее не исследованном центре связывания, что дает надежды на разработку перспективных полусинтетических производных на ее основе.

В данном исследовании нами обнаружен штамм-продуцент вещества K-1115A, механизм антибактериального действия которого основан на подавлении биосинтеза белка, что подтверждено с помощью теста в бесклеточной системе трансляции. Полученные результаты позволяют нам утверждать, что вещество K-1115A является ингибитором биосинтеза белка.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ**Отбор образцов, выделение и культивирование микроорганизмов**

Штамм БВ-204 *S. phaeochromogenes* был выделен из образцов почв, отобранных на Федеральной территории Сириус. Образцы почвы отбирали весной 2021 года в парковой зоне на побережье Черного моря (43°23'53.7"N 39°57'48.2"E). Пробоотбор проводили согласно методике, описанной ранее [11, 12]. Верхний слой почвы (0–5 см) снимали стерильным шпателем и помещали в стерильную емкость для сбора образцов. Актинобактерии выделяли путем поверхностного посева на агаризованные питательные среды из серийных разведений почвенных суспензий согласно [13]. В качестве питательной среды использовали ISP3 [13] с добавлением нистатина (250 мкг/мл) и налидиксовой кислоты (10 мкг/мл) для подавления развития микромицетов и грамотрицательных бактерий соответственно. Посев инкубировали в течение 14 суток при температуре 28°C.

Штамм БВ-204 был отобран на основе морфологических признаков, выделен в чистую культуру из первичного посева на минеральный агар Гаузе 1 для микроморфологических исследований [14]. Для поддержания в лабораторных условиях штамм культивировали на среде ISP3, для длительного хранения – растили на жидкой среде ISP3 в течение 14 суток с постоянным перемешиванием (200 об/мин при 28°C), а затем полученную суспензию смешивали с равным объемом 50% раствора глицерина и замораживали в жидком азоте; образцы хранили при -80°C.

Полифазная идентификация штамма

Культуральные признаки штамма БВ-204 (наличие и окраска воздушного мицелия, выделение растворимых пигментов) оценивали на плотных средах, рекомендованных International Streptomyces Project (ISP), после 14 суток культивирования при 28°C [15]. Морфологические признаки (наличие и форма цепочек репродуктивных спор, характер поверхности спор) оценивали с помощью светового Zeiss Axiolab A1 (Carl Zeiss Microscopy GmbH, Германия) и сканирующего электронного микроскопа JSM-6380LA (JEOL Ltd., Япония) спустя 14 дней роста при 28°C на среде ISP3. Подготовку образцов для электронной микроскопии осуществляли в соответствии с методикой, описанной ранее [16]. Утилизацию источников углерода (моно- и полисахаридов, спиртов) оценивали на минеральном агаре ISP9 с добавлением бромкрезолового пурпурного при 28°C в течение 14 дней [15]. Способность разлагать крахмал, целлюлозу и казеин оценивали по размеру зон гидролиза полимеров согласно [17, 18]. Чувствительность к различным антибиотикам определяли с помощью бумажных дисков, пропитанных антибиотиками (HiMedia Laboratories Pvt. Ltd, Индия).

Полногеномное секвенирование, филогенетический анализ и анализ БГК

ДНК из штамма-продуцента выделяли согласно [19]. Геном штамма БВ-204 был секвенирован *de novo* с использованием платформы Illumina HiSeq 4000 (Illumina, США). Сборка генома осуществлена с помощью SPAdes v3.13.0 [20]. Геном был аннотирован с использованием конвейерной технологии RASTtk на основании веб-сервиса PATRIC [21]. Целостность и качество генома, а также средние значения идентичности нуклеотидов (ANI) оценивали с помощью веб-сервиса MiGA (<http://microbial-genomes.org>). Филогенетическую принадлежность исследовали с использованием полногеномной последовательности и сервиса Type (Strain) Genome Server (TYGS) (<https://tygs.dsmz.de/>). Геном штамма БВ-204 автоматически сопоставляли со всеми геномами, представленными в базе данных TYGS, с помощью алгоритма MASH [22]. Филогенетическое дерево получено с помощью FastME 2.1.6.1 на основании расстояний GBDP, рассчитанных исходя из нуклеотидных последовательностей генома. Длины ветвей были масштабированы по формуле расстояния GBDP d5 [23].

БГК биологически активных соединений были идентифицированы с помощью бактериальной версии браузера antiSMASH 6.1.0 (<https://antismash.secondarymetabolites.org>). Гомологичные области в каждом геноме идентифицировали с помощью NCBI Blastn (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov>).

Скрининг антимикробного действия

Первичное определение антибактериальной активности проводили на штамме *E. coli* BW25113, у которого делитированны кодоны 330–352 гена *lptD*, обозначаемый нами в дальнейшем *E. coli* SS_lptd. Данная мутация приводит к нарушению нормального синтеза липополисахаридной оболочки грамотрицательных бактерий, что делает ее более проницаемой для низкомолекулярных соединений [11]. Данный штамм содержит плазмиду pDualrep2 [10]. В присутствии ингибиторов репликации ДНК или ингибиторов биосинтеза белка штамм экспрессирует флуоресцентные белки TurboRFP или Katushka2s соответственно (Приложения, *рис. S7*). Скрининг проводили методом диффузии в агаре, описанном ранее [16]. Штамм БВ-204, наряду с другими штаммами, выращивали на ISP3, тестирование проводили на 3, 6 и 9 сутки; для этого из участка газона с отчетливым ростом вырезали агаровый блок диаметром 5 мм и помещали его на чашки, содержащие агаризованную среду LB, предварительно засеянные культурами тест-организмов. Флуоресцентный сигнал детектировали на следующий день после посева с помощью ChemiDoc MP (Bio-Rad) в каналах Cy-3 и Cy-5. Для изучения спектра действия штамм БВ-204 тестировали на других тест-организмах, таких, как *S. aureus* ATCC 29213, *S. aureus* ATCC 25923, *S. aureus* SS01, *S. aureus* (MRSA) INA00761, *B. subtilis* ATCC 6633, *C. albicans* CBS 8836, *M. smegmatis* Ac-1171. Антибактериальную активность оценивали с помощью методики агаровой диффузии, описанной выше. Для формирования газона бактерий использовали агаризованную среду LB, для дрожжей – глюкозо-пептонно-дрожжевой агар [24], инкубировали при 37°C в течение 24 ч, после чего оценивали размер зон подавления роста.

Выделение и идентификация активных компонентов

В ходе первичного скрининга была установлена способность штамма БВ-204 проявлять антагонистическую активность при росте на среде ISP3. Для получения культуральной жидкости (КЖ), содержащей активное вещество, штамм культивировали в жидкой питательной среде ISP3 (7 суток, 28°C на шейкере New Brunswick Innova (Eppendorf), 200 об/мин). КЖ отделяли от биомассы путем центрифугирования при 4000 *g*, концентрировали и очищали с помощью твердофазной экстракции (ТФЭ). С этой целью КЖ наносили на хроматографическую колонку Poly-Prep Econo-Pac (Bio-Rad), содержащую 1 мл сорбента LPS-500H («Техносорбент», Россия), после чего элюировали ступенчатым градиентом вода-ацетонитрил (v/v) с фракционным сбором элюата. Исследовали антагонистическую активность со-

бренных фракций, активные фракции использовали для дальнейшей очистки методом ВЭЖХ.

ВЭЖХ-анализ и фракционирование выполняли с помощью системы Vanquish Flex с использованием детектора с диодной матрицей (Thermo Fisher Scientific, США), оснащенного колонкой Luna 5 мкм C18(2) 100 Å, 250 × 4.6 мм (Phenomenex), скорость потока 1 мл/мин, инъекционный объем 20 мкл. В качестве элюента А использовали 0.1% водный раствор ТФУ, а в качестве элюента В – ацетонитрил с добавлением 0.1% ТФУ. Элюирование осуществляли путем увеличения концентрации элюента В с 25 до 95% в течение 10 мин, затем поддерживали концентрацию элюента В 95% в течение 2 мин. Собирали фракции объемом 1 мл и анализировали их антибактериальную активность (Приложения, рис. S8).

Активные фракции анализировали с использованием хромато-масс-спектрометрической системы – хроматограф UltiMate 3000 (Thermo Fisher Scientific, США), оснащенный колонкой Acclaim RSLC 120 C18 2.2 мкм 2.1 × 100 мм (Thermo Fisher Scientific), и qToF-масс-спектрометр amaXis II 4G ETD (Bruker Daltonics). Измерения проводили в режиме регистрации спектра 100–1500 м/з и с выделением трех наиболее интенсивных ионов для фрагментации CID 10–40 эВ, газ столкновений – азот. Масс-спектры анализировали с помощью OpenChrom Lablicate Edition (1.4.0.202201211106), TOPPView v.2.6.0 [25]. Химические структуры идентифицировали с использованием баз данных GNPS [26], NPAtlas [27, 28] и Dictionary of Natural Products 31.1.

Активную ВЭЖХ-фракцию (1 мл) концентрировали с помощью вакуумного биоконцентратора CentriVar (Labconco) и растворяли в 500 мкл 10% водного раствора ДМСО; полученный раствор именовали «рабочий раствор антибиотика».

Ингибирование трансляции *in vitro*

Подавление трансляции изучали в бесклеточной системе с использованием коммерческого набора *E. coli* T7 S30 Extract System for Circular DNA (Promega) согласно инструкции фирмы. В реакционную смесь (4 мкл) вносили рабочий раствор антибиотика (0.5 мкл), а затем 0.5 мкл 200 нг/мкл мРНК FLuc и инкубировали в течение 1 ч при 37°C.

Активность люциферазы определяли с использованием набора Luciferase Assay Reagent (Promega) по интенсивности хемилюминесценции на планшетном ридере ClarioStar (BMG Labtech) на длине волны 580(80) нм.

Исследование МПК и цитотоксичности

Ночные культуры штаммов *E. coli* SS_lptd, *S. aureus* INA00761 (MRSA), *S. aureus* SS01 и *B. subtilis* ATCC

6633 разбавляли свежей средой LB до OD₆₀₀ = 0.6, а затем полученный посевной материал разводили в 1000 раз для получения рабочей суспензии. В лунки стерильного 96-луночного планшета вносили по 100 мкл рабочей суспензии, кроме первого и последнего рядов. В первый ряд вносили по 180 мкл суспензии, последний ряд заполняли 100 мкл стерильной питательной среды и использовали в качестве отрицательного контроля. Далее в первый ряд планшета вносили 20 мкл рабочего раствора антибиотика и получали серию двукратных разведений, последовательно перенося 100 мкл из лунки одного ряда в лунку следующего. В качестве положительного контроля использовали предпоследний ряд, в который антибиотик не вносили. Затем планшет инкубировали при перемешивании (200 об/мин, 37°C). Рост клеток регистрировали через 24 ч на планшетном ридере ClarioStar на длине волны 590 нм. В качестве МПК принимали концентрацию вещества, при которой наблюдалось полное подавление роста бактерий.

Для определения цитотоксичности клеточные линии подготавливали согласно [29]. Культуру клеток HEK293 культивировали на питательной среде DMEM, содержащей 10% FBS, 4 mM L-глутамин, 4.5 г/л глюкозы. В ряд подготовленных микроцентрифужных пробирок вносили по 100 мкл питательной среды, затем в первую пробирку добавляли 80 мкл среды и 20 мкл рабочего раствора антибиотика, после чего производили двукратные последовательные разведения, перенося по 100 мкл из первой пробирки во вторую и далее по всему ряду. В качестве отрицательного контроля использовали двукратные разведения доксорубина в диапазоне от 75.9 до 0.16 мкМ; в качестве положительного контроля оставляли ряд лунок с клетками без антибиотиков. Содержимое пробирок переносили в соответствующие лунки заранее подготовленного планшета, содержащие клетки, и инкубировали в течение 3 суток в CO₂-инкубаторе при 37°C. По истечении времени инкубации в лунки, содержащие питательную среду, вносили 20 мкл раствора резазурина (0.15 мг/мл), перемешивали покачиванием для равномерного распределения красителя в лунках и выдерживали в CO₂-инкубаторе при 37°C в течение 3 ч. Далее интенсивность флуоресценции измеряли с помощью планшетного ридера ClarioStar (Ex = 545 нм, Em = 600 нм).

РЕЗУЛЬТАТЫ

Генетический и филогенетический анализ

По результатам полногеномного секвенирования и последующей сборки размер генома клеток штам-

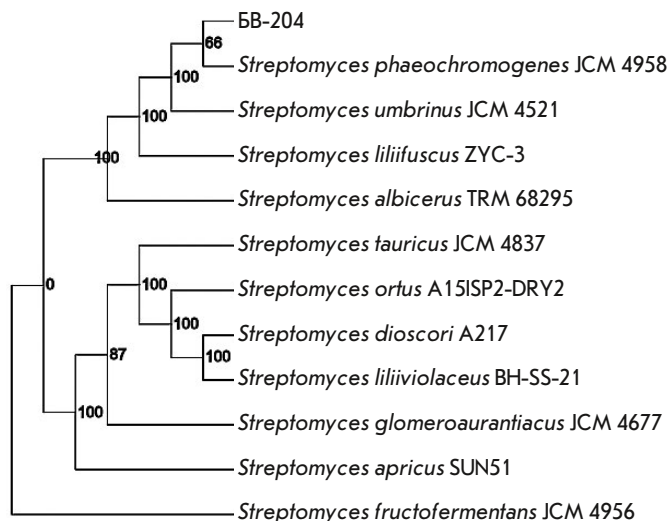


Рис. 1. Филогенетическое дерево, основанное на полном геноме штамма *S. phaeochromogenes* BB-204. Указаны значения бутстрэп-анализа выше 60%

ма BB-204 составляет 11 380 121 п.н., содержание G+C равно 70.2%, что характерно для представителей рода *Streptomyces* [30].

Филогенетический анализ, основанный на полногеномных последовательностях, показывает, что штамм BB-204 наиболее близко кластеризуется со штаммом *S. phaeochromogenes* JCM 4958 (ранее *S. ederensis* JCM 4958) и вместе с ним, а также со штаммами *S. umbrinus* JCM 4521, *S. liliifuscus* ZYC-3, *S. albicerus* TRM 68295 образует монофилетическую группу с максимальным значением поддержки ветвления 100% (рис. 1).

Фенотипические и морфологические свойства штамма BB-204

Штамм *S. phaeochromogenes* BB-204 является грамположительной аэробной бактерией с неподвижными клетками, активно растущими на питательных средах ISP2 и ISP3 и умеренно – на средах ISP5 и ISP6. Окраска субстратного мицелия варьируется от темно-бурой до бежевого, воздушный мицелий палевый с розовыми оттенками, на среде ISP6 воздушный мицелий не образуется. Кроме того, штамм BB-204, растущий на среде ISP3, выделяет темно-бурый растворимый пигмент (Приложения, табл. S1).

Клетки *S. phaeochromogenes* BB-204 имеют такой же спектр утилизации углеводов, как и штаммы *S. phaeochromogenes* JCM 4958(T) и *S. umbrinus* JCM 4521, описанные ранее: не выявлено отличий в способности BB-204 и близкородственных видов использовать моно-, дисахариды и спирты. У штамма *S. phaeochromogenes* BB-204 обнаружена способ-



Рис. 2. Электронная микрофотография штамма *S. phaeochromogenes* BB-204 на 14 сутки инкубации в среде ISP3 при 28°C. Размерный отрезок соответствует 2 мкм

ность гидролизовать карбоксиметилцеллюлозу, т.е. этот штамм обладает целлюлазной активностью, не описанной ранее у других представителей этого таксона (Приложения, табл. S2).

Штамм *S. phaeochromogenes* BB-204 образует прямые, длинные цепочки спор с гладкой поверхностью, что согласуется с описанием типовых штаммов [14] (рис. 2).

Таким образом, результаты филогенетического анализа, полученные с использованием полифазного таксономического подхода, и сравнение фенотипических признаков позволяют отнести штамм BB-204 к виду *S. phaeochromogenes*.

Антибактериальная активность

В ходе первичного скрининга была обнаружена антибактериальная активность *S. phaeochromogenes* BB-204 в отношении *E. coli* SS_lptd pDualrep2. Вещество, выделяемое продуцентом, индуцировало экспрессию *Katushka2s*, что позволяет предположить возможность ингибирования синтеза белка (рис. 3). В качестве положительного контроля использовали 0.05 мкг эритромицина (ингибитора биосинтеза белка), который вызывает экспрессию *Katushka2s*, и 1 нг норфлоксацина (ингибитора ДНК-гиразы), который вызывает экспрессию TurboRFP. Для удобства сигналы *Katushka2s* и TurboRFP визуализируются программным обеспечением ChemiDoc MP – красным и зеленым цветом соответственно. На штамме *E. coli* JW5503 ΔtolC pDualrep2 ингибирование и индукция репортерных флуоресцентных белков отсутствовали.

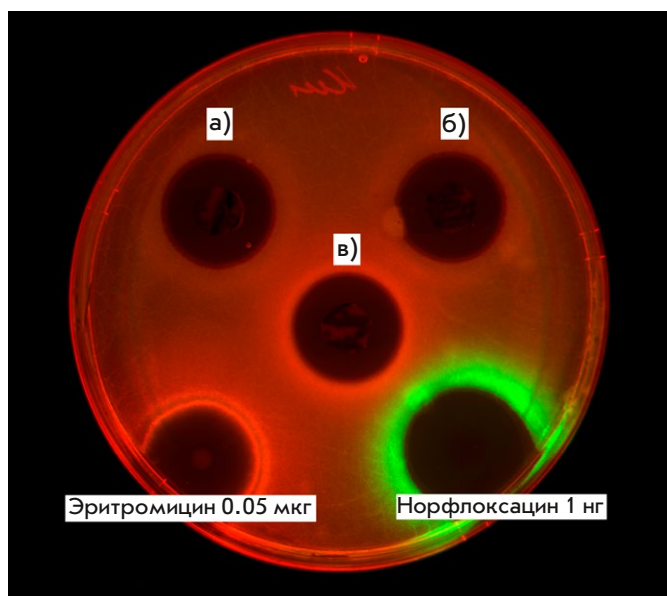


Рис. 3. Активность агаровых блоков с *S. phaeochromogenes* БВ-204 в отношении штамма *E. coli* SS_lptd pDualrep2 на 3-и (а), 6-е (б) и 9-е (в) сутки роста

Обнаружено, что штамм *S. phaeochromogenes* БВ-204 подавляет рост грамположительных бактерий *B. subtilis* ATCC 6633, *S. aureus* SS01, *S. aureus* INA00761 (MRSA); однако не ингибирует штаммы *S. aureus* ATCC 29213, *S. aureus* ATCC 25923, *C. albicans* CBS 8836, *M. smegmatis* Ac-1171. Оптимальной средой для синтеза активного метаболита штаммом БВ-204 была как агаризованная, так и жидкая среда ISP3.

Идентификация активного вещества

Активный метаболит получали в чистом виде с помощью твердофазной экстракции КЖ *S. phaeochromogenes* БВ-204, активный метаболит детектировался во фракциях, содержащих 30–40% ацетонитрила. Эти фракции были сконцентрированы и подвергнуты дальнейшему разделению и фракционированию с помощью ВЭЖХ. Обнаружено, что активность ассоциирована с компонентом, элюируемым на 9.47 мин (Приложения, рис. S10 и S11), имеющим максимумы поглощения при 276 и 407 нм. ХМСА этого вещества показал, что оно практически не ионизируется в режиме регистрации положительных ионов, однако дает интенсивный аддукт [M–H]⁺, соответствующий точной массе 326.0805 Да (Приложения, рис. S12). С учетом характерного спектра поглощения выделенного соединения в базах NPAtlas, Dictionary of Natural Products и PubChem выявлен кандидат с бруттоформулой C18H14O (точная масса 326.0790, откло-

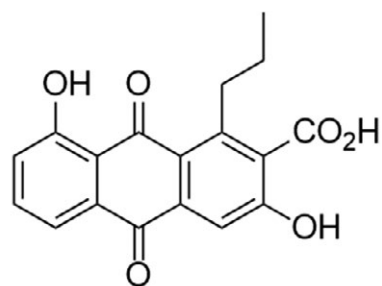


Рис. 4. Структура идентифицированного активного компонента К-1115А (3,8-дигидрокси-9,10-диоксо-1-пропилантрацен-2-карбоновая кислота)

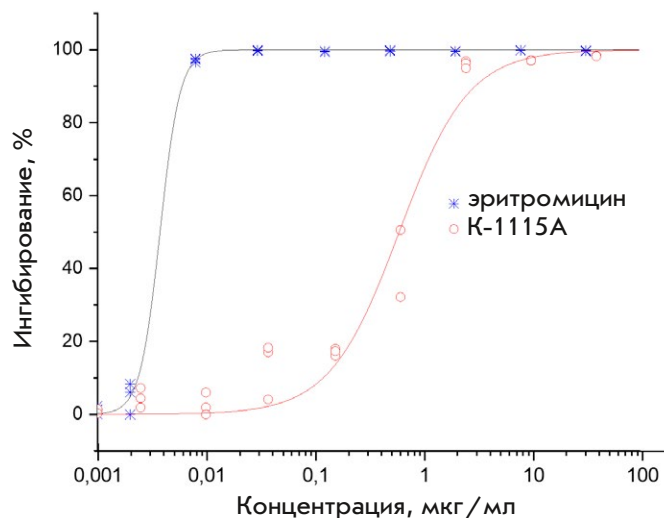


Рис. 5. Подавление *in vitro* трансляции гена люциферазы под действием К-1115А и эритромицина

нение 4.5 м.д.) и структурной формулой, представленной на рис. 4.

К-1115А, как и аллумицин, имеет биосинтетическое происхождение и продуцируется стрептомицетами [31]. В спектре фрагментации аддукта [M–H]⁺ с *m/z* 325.07 наблюдается основной фрагментный ион [M–44]⁺ с *m/z* 281.08, что согласуется с наличием в молекуле карбоксильной группы.

Исследование подавления биосинтеза белка соединением К-1115А *in vitro*

Изучена способность очищенной с помощью ВЭЖХ фракции К-1115А подавлять бесклеточную трансляцию. В качестве референсного ингибитора трансляции использовали эритромицин. Эксперименты проводили в трехкратной повторности. Результаты определения концентрационной зависимости доза–эффект представлены на рис. 5. Значения EC50 составили 0.004 и 0.606 мкг/мл для эритромицина и К-1115А соответственно.

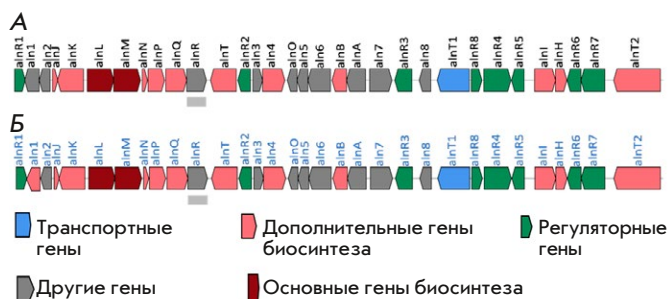


Рис. 6. БГК аллумицина и К-1115А в геноме штамма *Streptomyces* sp. SM020 (А); *S. phaeochromogenes* BV-204 (Б)

Анализ БГК

С помощью биоинформатических методов в геноме *S. phaeochromogenes* BV-204 найден БГК аллумицина с К-1115А в качестве шунтирующего продукта, гомологичный кластеру генов, ранее аннотированному у *Streptomyces* sp. SM020 (рис. 6) [32]. БГК содержит 32 открытые рамки считывания, которые могут участвовать в биосинтезе аллумицина и К-1115А. В него входит 22 предположительно структурных гена и 10 генов, несущих регуляторную и транспортную функцию. Общая длина кластера составляет 31030 п.н. Синтез антибиотика осуществляется поликетидсинтазой II типа.

ОБСУЖДЕНИЕ

Род *Streptomyces* является самым обширным среди актиномицетов, большинство известных клинически значимых антибиотиков, начиная со стрептомицина, были выделены именно из представителей этого таксона. Усилиями многочисленных научных коллективов к 1980 году опубликованы данные о десятках тысяч соединений, проявляющих антагонистическую активность. Большинство соединений, впрочем, не были полноценно охарактеризованы в силу ограниченности методологической базы того времени. Одним из подобных соединений оказалось вещество с индексом К-1115А, продуцируемое штаммом BV-204, обнаруженным нами в ходе широкомасштабного скрининга, осуществляемого с применением «гражданской науки», с использованием мишень-ориентированной репортерной системы pDualrep2.

Штамм-продуцент BV-204, атрибутированный на основе полифазного анализа как представитель вида *S. phaeochromogenes*, при росте на овсяной среде демонстрировал способность ингибировать модельные штаммы и вызывать индукцию репортерной системы, свидетельствующую о подавлении синтеза белка.

В результате последовательных стадий твердофазной экстракции КЖ *S. phaeochromogenes*

BV-204 с последующим ВЭЖХ-фракционированием удалось выделить активную субстанцию в чистом виде. Последующий ХМСА позволил предложить в качестве кандидата соединение К-1115А (3,8-дигидрокси-9,10-диоксо-1-пропилантрацен-2-карбоновая кислота), что подтверждается совпадением точной массы и характерным УФ-спектром, соответствующим опубликованным ранее данным [33]. Биоинформатический анализ выявил в геноме штамма *S. phaeochromogenes* BV-204 БГК, ответственный за продукцию аллумицина и других родственных веществ, включая К-1115А, что дополнительно подтверждает способность BV-204 синтезировать К-1115А. При этом ранее об антибактериальной активности К-1115А не сообщалось.

Известно, что некоторые продукты БГК аллумицина обладают антибактериальной активностью [31], однако механизм действия этих соединений не изучен. Анализ референсного генома (ГенБанк RefSeq:GCF_026343615.1) штамма *S. phaeochromogenes* NBC 00034 также выявил у него БГК аллумицина и сопряженных с ним соединений. Этот кластер был аннотирован ранее на основе штамма *Streptomyces* sp. SM020 [32], данные филогенетического атрибутирования которого не опубликованы, но на основе высокой гомологии БГК аллумицина *Streptomyces* sp. SM020, *S. phaeochromogenes* NBC 00034 и *S. phaeochromogenes* BV-204, а также сходства фенотипических признаков можно предположить, что *Streptomyces* sp. SM020 также относится к таксону *S. phaeochromogenes*.

Согласно опубликованным данным, *S. phaeochromogenes* NBC 00034 продуцирует различные изомеры фаэхромацетина (А, В, С, D, Е) [34–38], а также моэномицин и бамбермицин [38], однако ХМСА не выявил этих продуктов в спектре метаболитов *S. phaeochromogenes* BV-204. Стоит также отметить, что ХМСА не выявил аллумицина в спектре метаболитов. Нарушение функционирования генов *aln4* и *aln5* может влиять на биосинтез аллумицина [34] и приводить к переключению биосинтеза на образование К-1115А в качестве основного продукта [32]. Выравнивание генов выявило, что *aln4* у *Streptomyces* sp. SM020 и *S. phaeochromogenes* NBC 00034 полностью идентичны, тогда как нуклеотидная последовательность *aln4* *S. phaeochromogenes* BV-204 отличается от них несколькими заменами. Генетические последовательности гена *aln5* у проанализированных штаммов различаются значительно сильнее (Приложения, рис. S9). Вероятно, именно с этим связано, что наш штамм продуцирует только К-1115А.

Анализ генома штамма BV-204 выявил участки, ответственные за синтез многих вторичных

метаболитов, как например, сидерофор коелихелин, однако исследование способности штамма образовывать соединения, хелатирующие железо, с применением метода диффузии в агар [39] дало отрицательные результаты.

Впервые вещество 3,8-дигидрокси-9,10-диоксо-1-пропилантрацен-2-карбоновая кислота было выделено из штамма *S. griseorubiginosus* (Mer-K1115A), описано как соединение антрахинонового ряда и названо K-1115A [33]. Были изучены противовоспалительные свойства этого соединения, но данные о противомикробной активности K-1115A в литературе не представлены. Существуют публикации об антагонистической активности структурно близкой молекулы 3,8-дигидрокси-1-пропилантрахинон-2-карбоновой кислоты в отношении грамположительных бактерий [40]. Диски с нагрузкой 40 мкг активного вещества давали на газонах *S. aureus* и *S. viridochromogenes* зоны ингибирования диаметром 14 и 12 мм соответственно, активности в отношении дрожжей и микромицетов не было выявлено [40]. Необходимо отметить, что, вероятно по ошибке, авторы именовали исследуемую ими молекулу как «K-1115A», при том, что она имеет иную формулу. Еще одно близкородственное соединение, 3,8-дигидрокси-1-метилантрахинон-2-карбоновая кислота, подавляло образование биопленок, формируемых метициллин резистентным стафилококком с ЕС50 200 мкг/мл [41]. Считаем необходимым упомянуть, что на это исследование ссылались в недавней работе, в которой антибактериальная активность была ошибочно приписана «K-1115A». Впервые достоверно антибактериальная активность K-1115A показана в настоящей работе. Существуют данные, что аллумицин и некоторые другие продукты БГК, например, 6-дигидро-8-пропилантрахинон, активны против *E. coli* ΔtolC [42], однако в наших опытах K-1115A против *E. coli* ΔtolC активности не показал. K-1115A действовал на вариант штамма *E. coli* SS_lptd с нарушенным синтезом липополисахаридов оболочки с повышенной проницаемостью клеточной мембраны соответственно. Согласно опубликованным данным, соединения антрахинонового ряда действуют преимущественно на грамположительные микроорганизмы, в частности представителей *Staphylococcus*, *Bacillus*, *Streptomyces* и т.д., но не действуют на грамотрицательные микроорганизмы и грибы [40].

Для веществ антрахиноновой природы в целом характерно ингибирование процессов, вовлеченных в биосинтез ДНК, однако продукты и интермедиаты аллумицинового БГК, в частности сам аллумицин и 1,6-дигидро-8-пропилантрахинон, не связываются с двухцепочечной ДНК и не ингибируют ДНК-гиразу

[43]. Исследование K-1115A с помощью репортерной системы pDualrep2 также не обнаружило ингибирующего эффекта на синтез ДНК, однако выявило его способность ингибировать биосинтез белка.

Нами изучено влияние K-1115A на трансляцию в бесклеточной системе *in vitro* и показано, что данное соединение является ингибитором биосинтеза белка. Установлено, что ЕС50 K-1115A составляет 97% от его МПК, при этом ЕС50 эритромицина в этом исследовании составило 0.8%. Таким образом, для подавления роста клеток концентрация эритромицина должна быть в 125 раз больше, чем для ингибирования собственно трансляции, тогда как в случае K-1115A эти концентрации практически одинаковы. Такой эффект K-1115A несколько отличает его от распространенных ингибиторов трансляции, но не делает его уникальным. Например, аналогичный эффект оказывает известный ингибитор трансляции – хлорамфеникол, имеющий дополнительные механизмы действия, помимо связывания с рибосомой [44]. Это может говорить о том, что ингибирование бактериальной трансляции не единственный механизм противомикробного действия K-1115A либо, например, какие-то ферментные системы микробной клетки модифицируют K-1115A таким образом, что полученная молекула обладает существенно большим ингибирующим действием, чего мы не можем наблюдать в *in vitro* системе.

Можно также предположить, что нарушение синтеза клеточной мембраны бактерии не является альтернативным механизмом действия, так как в нашем случае вещество действует на штамм с уже нарушенным синтезом ЛПС, но не на штамм, у которого эта структура сохранена. Можно предположить, что дополнительная мишень не связана с взаимодействием с ДНК, несмотря на то, что это характерно для антрахиноновых производных, иначе мы наблюдали бы в эксперименте дополнительно индукцию TurboRFP, свидетельствующую о SOS-ответе.

Стоит отметить, что специфичность данного вещества в отношении грамположительных бактерий и рекомбинантного штамма *E. coli* SS_lptd с делецией в гене *lptD* свидетельствует о том, что активность K-1115A в отношении бактериальных клеток в значительной степени определяется проницаемостью клеточных барьеров для этой молекулы.

Для перспективности соединения в качестве агента антимикробной терапии огромную роль играет специфичность его воздействия на клетки патогенных микроорганизмов и безопасность для клеток животных, характеризуемая показателем «терапевтический индекс» (ТИ). Мы исследовали способность K-1115A ингибировать клеточную линию НЕК293, для которой ЕС50 составила 5 мкг/мл, и несколь-

Таблица 1. Способность К-1115А подавлять модельные патогенные штаммы микроорганизмов

Тест-объект	МПК, мкг/мл	ТИ
<i>E. coli</i> SS_lptd	0.625	8
<i>S. aureus</i> (MRSA) INA00761	2.5	2
<i>B. subtilis</i> ATCC 6633	1.25	4
<i>S. aureus</i> SS01	0.625	8
<i>S. aureus</i> 29213	нет*	-
<i>S. aureus</i> ATCC 25923	нет	-
<i>M. smegmatis</i> Ac-1171	нет	-
<i>C. albicans</i> CBS 8836	нет	-

*Подавление отсутствует в исследованном диапазоне.

ких модельных патогенов (табл. 1), рассчитали ТИ как отношение ЕС50 НЕК293 к МПК штаммов микроорганизмов.

ТИ разных исследованных штаммов, в которых наблюдалось подавляющее действие, находился в диапазоне от 2 до 8, это дает надежды на возможность разработки на основе К-1115А полусинтетических производных, обладающих хорошими клиническими перспективами.

Получены также данные о наличии у продуктов и интермедиатов аллумицинового БГК противоопухолевой активности за счет параптоза [45], аутофагии [45], предотвращения aberrантного клеточного метаболизма [46], повышения радиочувствительности раковых клеток [47], апоптоза и др. [48]. Показано также, что К-1115А обладает противовоспалительными свойствами, оно ингибирует прямое связывание транскрипционного фактора AP-1 с олигонуклеотидом AP-1 и выработку коллагеназы в стимулированных IL-1α синовиальных клетках крыс *in vitro*. Установлено также, что вещество ослабляет воспалительную реакцию, опосредованную AP-1, за счет снижения активности орнитиндекарбоксилазы у мышей, индуцированных форболмиристатацетатом [31]. Паттерсон и соавт. использовали вещество К-1115А для создания физиологически активных конъюгатов [49].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Использование современных механизм-ориентированных подходов к классическому скринингу позволяет найти не только новые биологически активные вещества, но и обнаружить новые перспективные свойства ранее открытых, но малоиз-

ученных молекул, что дает им шанс стать потенциальным лекарственным средством. Несмотря на то, что соединение К-1115А открыто более 25 лет назад и получены некоторые данные об антибактериальной активности его гомологов, активность данного вещества и механизм его действия до сих пор не были изучены. В этом исследовании нам удалось с помощью двойной репортерной системы pDualrep2 обнаружить продуцента К-1115А, установить, что это соединение ингибирует синтез белка, а также подтвердить этот эффект путем ингибирования трансляции *in vitro* с использованием мРНК FLuc.

Антрахиноновое производное К-1115А, продуцируемое штаммом *S. phaeochromogenes* БВ-204, показало активность штамма *E. coli* SS_lptd с ослабленной клеточной мембраной, а затем на ряде клинически релевантных изолятов *S. aureus*, в том числе MRSA, *B. subtilis*. Отсутствие активности в отношении *S. aureus* ATCC 29213, *S. aureus* ATCC 25923, *C. albicans* CBS 8836, *M. smegmatis* Ac-1171 дает надежды на специфичность действия в отношении бактериальных мишеней. К-1115А продемонстрировало новое для продуктов БГК аллумицина свойство – способность ингибировать биосинтез белка.

Терапевтический индекс для К-1115А относительно невелик (2–8 у разных штаммов), однако данное вещество может стать основой для разработки полусинтетических производных для антимикробной терапии. Ранее было показано, что К-1115А и его полусинтетические производные обладают противовоспалительной активностью, что вместе с антимикробными свойствами позволяет рассматривать их в качестве перспективных соединений для разработки препаратов комплексной противомикробной и противовоспалительной терапии (например, для обработки ран).

Высокопроизводительный скрининг с использованием системы pDualrep2 значительно повышает эффективность поиска новых ингибиторов синтеза белка даже среди известных соединений, открывая новые свойства и перспективы для целых классов молекул. ●

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

Приложения доступны на сайте <https://doi.org/10.32607/actanaturae.27315>.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Abdel-Razek A.S., El-Naggar M.E., Allam A., Morsy O.M., Othman S.I. // *Processes*. 2020. V. 8. № 4. P. 470.

2. Newman D.J., Cragg G.M. // *J. Nat. Prod.* 2020. V. 83. № 3. P. 770–803.
3. Dai J., Han R., Xu Y., Li N., Wang J., Dan W. // *Bioorganic*

- Chem. 2020. V. 101. P. 103922.
4. Wright G.D. // *Chem. Biol.* 2012. V. 19. № 1. P. 3–10.
 5. Zhu Y., Huang W.E., Yang Q. // *Infect. Drug Resist.* 2022. V. 15. P. 735–746.
 6. Alferova V.A., Maviza T.P., Biryukov M.V., Zakalyukina Y.V., Lukianov D.A., Skvortsov D.A., Vasilyeva L.A., Tashlitsky V.N., Polshakov V.I., Sergiev P.V., et al. // *Biochimie.* 2022. V. 192. P. 63–71.
 7. Mahajan G.B. // *Front. Biosci.* 2012. V. E4. № 1. P. 240–253.
 8. Sousa J.A.D.J., Olivares F.L. // *Chem. Biol. Technol. Agric.* 2016. V. 3. № 1. P. 24.
 9. Tian X., Zhang Z., Yang T., Chen M., Li J., Chen F., Yang J., Li W., Zhang B., Zhang Z., et al. // *Front. Microbiol.* 2016. V. 7. № 5. P. 17–18.
 10. Osterman I.A., Komarova E.S., Shiryaev D.I., Korniltsev I.A., Khven I.M., Lukyanov D.A., Tashlitsky V.N., Serebryakova M.V., Efremenkova O.V., Ivanenkov Y.A., et al. // *Antimicrob. Agents Chemother.* 2016. V. 60. № 12. P. 7481–7489.
 11. Volynkina I.A., Zakalyukina Y.V., Alferova V.A., Belik A.R., Yagoda D.K., Nikandrova A.A., Buyuklyan Y.A., Udalov A.V., Golovin E.V., Kryakvin M.A., et al. // *Antibiotics.* 2022. V. 11. № 9. P. 1198.
 12. ISO. <https://www.iso.org/standard/65223.html>. (Accessed November 1, 2023)
 13. Baranova A.A., Chistov A.A., Tyurin A.P., Prokhorenko I.A., Korshun V.A., Biryukov M.V., Alferova V.A., Zakalyukina Y.V. // *Microorganisms.* 2020. V. 8. № 12. P. 1948.
 14. Gause G.F., Preobrazhenskaya T.P., Terekhova L.P., Maksimova T.S. *Guide for Determination of Actinomycetes: Genera Streptomyces, Streptoverticillium, and Chainia.* 1st ed. M.: Nauka, 1983. P. 84–89.
 15. Shirling E.B., Gottlieb D. // *Int. J. Syst. Bacteriol.* 1966. V. 16. № 3. P. 313–340.
 16. Zakalyukina Y.V., Osterman I.A., Wolf J., Neumann-Schaal M., Nouioui I., Biryukov M.V. // *Antonie Van Leeuwenhoek.* 2023. V. 116. № 6. P. 597–598.
 17. Williams S.T., Goodfellow M., Alderson G., Wellington E.M.H., Sneath P.H.A., Sackin M.J. // *Microbiology.* 1983. V. 129. № 6. P. 1743–1813.
 18. Zakalyukina Y.V., Biryukov M.V., Lukianov D.A., Shiryaev D.I., Komarova E.S., Skvortsov D.A., Kostyukevich Y., Tashlitsky V.N., Polshakov V.I., Nikolaev E., et al. // *Biochimie.* 2019. V. 160. P. 93–99.
 19. Zakalyukina Yu.V., Biryukov M.V., Golichenkov M.V., Netrusov A.I. // *Mosc. Univ. Biol. Sci. Bull.* 2017. V. 72. № 1. P. 13–19.
 20. Prijbelski A., Antipov D., Meleshko D., Lapidus A., Kobobeynikov A. // *Curr. Protoc. Bioinforma.* 2020. V. 70. № 1. P. e102.
 21. Brettin T., Davis J.J., Disz T., Edwards R.A., Gerdes S., Olsen G.J., Olson R., Overbeek R., Parrello B., Pusch G.D., et al. // *Sci. Rep.* 2015. V. 5. № 1. P. 8365.
 22. Ondov B.D., Treangen T.J., Melsted P., Mallonee A.B., Bergman N.H., Koren S., Phillippy A.M. // *Genome Biol.* 2016. V. 17. № 1. P. 132.
 23. Lefort V., Desper R., Gascuel O. // *Mol. Biol. Evol.* 2015. V. 32. № 10. P. 2798–2800.
 24. Zakalyukina Y.V., Pavlov N.A., Lukianov D.A., Marina V.I., Belozerova O.A., Tashlitsky V.N., Guglya E.B., Osterman I.A., Biryukov M.V. // *Insects.* 2022. V. 13. № 11. P. 1042.
 25. Kohlbacher O., Reinert K., Gröpl C., Lange E., Pfeifer N., Schulz-Trieglaff O., Sturm M. // *Bioinformatics.* 2007. V. 23. № 2. P. e191–e197.
 26. Wang M., Carver J.J., Phelan V.V., Sanchez L.M., Garg N., Peng Y., Nguyen D.D., Watrous J., Kapono C.A., Luzatto-Knaan T., et al. // *Nat. Biotechnol.* 2016. V. 34. № 8. P. 828–837.
 27. van Santen J.A., Poynton E.F., Iskakova D., McMann E., Alsup T.A., Clark T.N., Fergusson C.H., Fewer D.P., Hughes A.H., McCadden C.A., et al. // *Nucleic Acids Res.* 2022. V. 50. № D1. P. D1317–D1323.
 28. Van Santen J.A., Jacob G., Singh A.L., Aniebok V., Balunas M.J., Bunsko D., Neto F.C., Castaño-Espriu L., Chang C., Clark T.N., et al. // *ACS Cent. Sci.* 2019. V. 5. № 11. P. 1824–1833.
 29. Segeritz C.-P., Vallier L. // *Basic Science Methods for Clinical Researchers.* Elsevier. Academic Press, 2017. P. 151–172.
 30. Nouioui I., Carro L., García-López M., Meier-Kolthoff J.P., Woyke T., Kyripides N.C., Pukall R., Klenk H.-P., Goodfellow M., Göker M. // *Front. Microbiol.* 2018. V. 9. P. 2007.
 31. Goto M., Masegi M.-A., Yamauchi T., Chiba K.-I., Kuboi Y., Harada K., Naruse N. // *J. Antibiot. (Tokyo).* 1998. V. 51. № 6. P. 539–544.
 32. Oja T., Palmu K., Lehmußola H., Leppäranta O., Hännikäinen K., Niemi J., Mäntsälä P., Metsä-Ketelä M. // *Chem. Biol.* 2008. V. 15. № 10. P. 1046–1057.
 33. Naruse N., Goto M., Watanabe Y., Terasawa T., Dobashi K. // *J. Antibiot. (Tokyo).* 1998. V. 51. № 6. P. 545–552.
 34. Ritacco F.V., Eveleigh D.E. // *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* 2008. V. 35. № 9. P. 931–945.
 35. Graziani E.I., Ritacco F.V., Bernan V.S., Telliez J.-B. // *J. Nat. Prod.* 2005. V. 68. № 8. P. 1262–1265.
 36. Bycroft B.W., Higton A.A., Roberts A.D. *Dictionary of antibiotics and related substances.* London; New York. 1988. P. 944.
 37. van Pée K.-H., Lingens F. // *FEBS Lett.* 1984. V. 173. № 1. P. 5–8.
 38. Söhngen C., Podstawka A., Bunk B., Gleim D., Vetcinova A., Reimer L.C., Ebeling C., Pendarovski C., Overmann J. // *Nucleic Acids Res.* 2016. V. 44. № D1. P. D581–D585.
 39. Schwyn B., Neilands J.B. // *Anal. Biochem.* 1987. V. 160. № 1. P. 47–56.
 40. Poumale H.M.P., Ngadjui B.T., Helmke E., Laatscha H. // *Z. Für Naturforschung B.* 2006. V. 61. № 11. P. 1450–1454.
 41. Song Z.-M., Zhang J.-L., Zhou K., Yue L.-M., Zhang Y., Wang C.-Y., Wang K.-L., Xu Y. // *Front. Microbiol.* 2021. V. 12. P. 709826.
 42. Saguna L., Heinrich S., Kaufmann L.-S., Rückert-Reed C., Busche T., Wolf A., Eickhoff J., Klebl B., Kalinowski J., Bandow J.E. // *Antibiot. Basel Switz.* 2023. V. 12. № 7. P. 1116.
 43. Tian W., Wang C., Li D., Hou H. // *Future Med. Chem.* 2020. P. fmc-2019-0322.
 44. Pavlova J.A., Khairullina Z.Z., Tereshchenkov A.G., Nazarov P.A., Lukianov D.A., Volynkina I.A., Skvortsov D.A., Makarov G.I., Abad E., Murayama S.Y., et al. // *Antibiotics.* 2021. V. 10. № 5. P. 489.
 45. Liu Y., Zhong Y., Tian W., Lan F., Kang J., Pang H., Hou H., Li D. // *Anticancer. Drugs.* 2019. V. 30. № 10. P. 1038–1047.
 46. Hitosugi T., Zhou L., Elf S., Fan J., Kang H.-B., Seo J.H., Shan C., Dai Q., Zhang L., Xie J., et al. // *Cancer Cell.* 2012. V. 22. № 5. P. 585–600.
 47. Wang D., Wang S., Liu Q., Wang M., Wang C., Yang H. // *Oncol. Rep.* 2013. V. 29. № 6. P. 2341–2347.
 48. Stanojković T., Marković V., Matic I.Z., Mladenović M.P., Petrović N., Krivokuća A., Petković M., Joksović M.D. // *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 2018. V. 28. № 15. P. 2593–2598.
 49. Ijaz T., Tran P., Ruparelia K.C., Teesdale-Spittle P.H., Orr S., Patterson L.H. // *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 2001. V. 11. № 3. P. 351–353.

УДК 577.352.465

Влияние ионов кальция на электрофизиологические свойства одиночных каналов ANO6

Д. О. Колесников, Е. Р. Григорьева, М. А. Номеровская, Д. С. Решетин, А. В. Шалыгин*, Е. В. Казначеева**

Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург, 194064 Россия

*E-mail: shalygin.alexey@gmail.com

**E-mail: evkazn@incras.ru

Поступила в редакцию 05.12.2023

Принята к печати 12.12.2023

DOI: 10.32607/actanaturae.27338

РЕФЕРАТ Белки семейства аноктаминов (ANO) формируют кальций-зависимые хлорные каналы (CaCC). Наиболее необычный представитель этого семейства – ANO6 (TMEM16F) – совмещает в себе функции кальций-зависимой скрамблазы и ионного канала. ANO6 влияет на динамику плазматической мембраны, перенос фосфатидилсерина и участвует в программируемой клеточной гибели. Свойства каналов ANO6 остаются предметом дискуссии. В настоящей работе, регистрируя одиночные каналы ANO6, мы изучили влияние изменений внутриклеточной и наружной концентрации ионов кальция на электрофизиологические свойства эндогенных каналов ANO6. Показано, что (1) высокая концентрация ионов кальция во внеклеточном растворе увеличивает активность эндогенных каналов ANO6; (2) проницаемость эндогенных каналов ANO6 по отношению к хлорид-ионам не зависит от внеклеточной концентрации ионов кальция; (3) увеличение внутриклеточной концентрации кальция приводит к активации эндогенных каналов ANO6 с двойной амплитудой; (4) кинетика работы канала зависит от потенциала плазматической мембраны, но не от внутриклеточной концентрации ионов кальция. Полученные нами данные дают возможность предложить новые механизмы регуляции активности каналов ANO6 ионами кальция как с внутренней, так и с наружной стороны мембраны.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА ANO6, TMEM16F, кальций-зависимые хлорные каналы, метод локальной фиксации потенциала, регистрация токов через одиночные каналы.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ CaCC – кальций-зависимые хлорные каналы; ANO – аноктамины; $[Ca^{2+}]_i$ – расчетная внутриклеточная концентрация свободных ионов кальция.

ВВЕДЕНИЕ

Кальций-зависимые хлорные каналы участвуют в регуляции критических внутриклеточных процессов, связанных с транспортом хлорид-ионов и динамикой плазматической мембраны.

Одна из изоформ аноктаминов – ANO6 (TMEM16F), совмещает функции скрамблазы и ионного канала. Нарушения функции ANO6 приводят к патологиям формирования скелета, плаценты и невынашиваемости беременности, онкологическим заболеваниям, кровотечениям [1–4]. Снижение активности ANO6 является эффективным подходом к лечению воспалительных заболеваний дыхательных путей [5, 6].

Большинство исследований функций канала выполнено при сверхэкспрессии ANO6, которая приводит к значительному изменению состояния

мембраны клетки, что влияет на свойства канала. Кроме того, такие электрофизиологические свойства, как время жизни открытого состояния канала, его одиночная амплитуда и проводимость, можно корректно оценить, только регистрируя ток через одиночные ионные каналы. Отсутствие этих данных мешает пониманию принципов функционирования ионного канала.

Канал ANO6, являясь кальций-зависимым ($EC_{50} = 10$ мкМ при +40 мВ), не только регулируется внутриклеточными ионами кальция, но и сам способен проводить ионы Ca^{2+} [4]. Так, в одних исследованиях выявлена анионная проводимость, тогда как в других показана катионная проводимость канала [4, 7]. Данных о влиянии наружного кальция на электрофизиологические свойства эндогенных каналов ANO6 крайне мало. Так же не ясно, как из-

менение внутриклеточной концентрации свободных ионов кальция ($[Ca^{2+}]_i$) или потенциала влияет на кинетику и подсостояния одиночных эндогенных каналов ANO6.

Данная работа направлена на определение зависимости электрофизиологических свойств одиночных эндогенных каналов ANO6 от двух основных модуляторов активности: концентрации кальция и потенциала.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Клеточная культура

Работа выполнена на клетках линии НЕК293Т из коллекции Института цитологии РАН (Санкт-Петербург, Россия). Клетки культивировали на жидкой модифицированной Иглос среде Дульбекко (DMEM) («ПанЭко», Россия) с добавлением 10% эмбриональной сыворотки крупного рогатого скота, 1% пенициллина, 1% стрептомицина и 1% L-глутамина. Клетки пересеивали на фрагменты покровных стекол за 16–48 ч до проведения опытов.

Реактивы

Используемые в электрофизиологических экспериментах реактивы были получены от фирмы Sigma Aldrich (США).

Электрофизиологические измерения токов

Токи через одиночные каналы регистрировали методом локальной фиксации потенциала в конфигурации inside-out с использованием усилителя Axopatch 200B (Axon Instruments, США). Оцифровку данных осуществляли АЦП-ЦАП Digidata 1322A (Axon Instruments) с частотой дискретизации 5 кГц. Сигнал пропускали через встроенный в усилитель низкочастотный фильтр Бесселя 2 кГц. Для анализа амплитуды, вероятности открытого состояния и презентации данных записи дополнительно фильтровали при 110 Гц. При анализе времени открытого состояния каналов дополнительную фильтрацию не применяли, события короче 0.5 мс не учитывали.

Состав внеклеточного раствора (раствор регистрирующей пипетки):

- 1) 105 мМ $CaCl_2$, 10 мМ Tris-HCl, pH 7.4;
- 2) 1.5 мМ $CaCl_2$, 126 мМ NaCl, 10 мМ TeacCl, 10 мМ глюкозы, 10 мМ Tris-HCl, pH 7.4;
- 3) 140 мМ NaCl, 5 мМ EGTA-Na, 10 мМ Tris-HCl, pH 7.4.

Расчет свободной концентрации кальция $[Ca^{2+}]_i$ проводили в программе Max Chelator (Stanford University, США). Внутриклеточный раствор с расчетным содержанием свободных ио-

нов кальция 100 нМ $[Ca^{2+}]_i$ содержал: 130 мМ CsGlutamate, 3.3 мМ $CaCl_2$, 5 мМ $MgCl_2$, 1 мМ MgATP, 10 мМ EGTA, 10 мМ HEPES. pH 7.2.

Для получения растворов с расчетным содержанием свободных ионов кальция 0.2, 1, 10 мкМ к исходному раствору был добавлен $CaCl_2$ в концентрациях 5, 8.5, 9.82 мМ соответственно. Эксперименты проводили при комнатной температуре. Сопrotивление стеклянных микропипеток составляло 7–15 МОм.

Для количественной оценки активности каналов использовали величину (NP_o), где N – число каналов, а P_o – вероятность открытого состояния канала. $NP_o = (I)/i$, где (I) – среднее значение тока через фрагмент мембраны, i – амплитуда тока открытого канала. Поскольку активность каналов значительно менялась во времени, для анализа использовали среднее значение $NP_{o\max_{30}}$, т.е. среднее NP_o , измеренное в течение 30-секундного интервала, когда активность каналов была максимальна.

Статистическая обработка данных

Данные обрабатывали в программе OriginPro2018 (Originlab, США) и Clampfit 10.3 (Molecular Devices, США). Данные проверяли на нормальность с использованием теста Шапиро–Уилка, на равенство дисперсий – теста Левена. Выбросы, при их наличии, были убраны тестом Граббса. Для сравнения встречаемости использовали точный критерий Фишера. Для сравнения вероятности открытого состояния для независимых данных использовали тест Стьюдента, для связанных данных – парный тест Стьюдента. Для множественного сравнения использовали дисперсионный анализ с поправкой Бонферрони. Данные представлены как среднее \pm ошибка среднего. Различия считали значимыми при $p < 0.05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Увеличение активности эндогенных CaCC ANO6 при повышении внеклеточной концентрации кальция

Ранее мы зарегистрировали и описали одиночные каналы CaCC, которые образованы белками ANO6 [8, 9]. Для изучения влияния внеклеточной концентрации кальция на ANO6 использовали внешний раствор, содержащий 105 мМ Ca^{2+} или 1.5 мМ Ca^{2+} . Опыты проводили в конфигурации inside-out, при фиксированном потенциале на мембране +40 мВ. Активацию эндогенных CaCC ANO6 вызывали добавлением раствора 10 мкМ $[Ca^{2+}]_i$ к внутриклеточной стороне мембраны (рис. 1А,Б). В присутствии физиологической концентрации 1.5 мМ

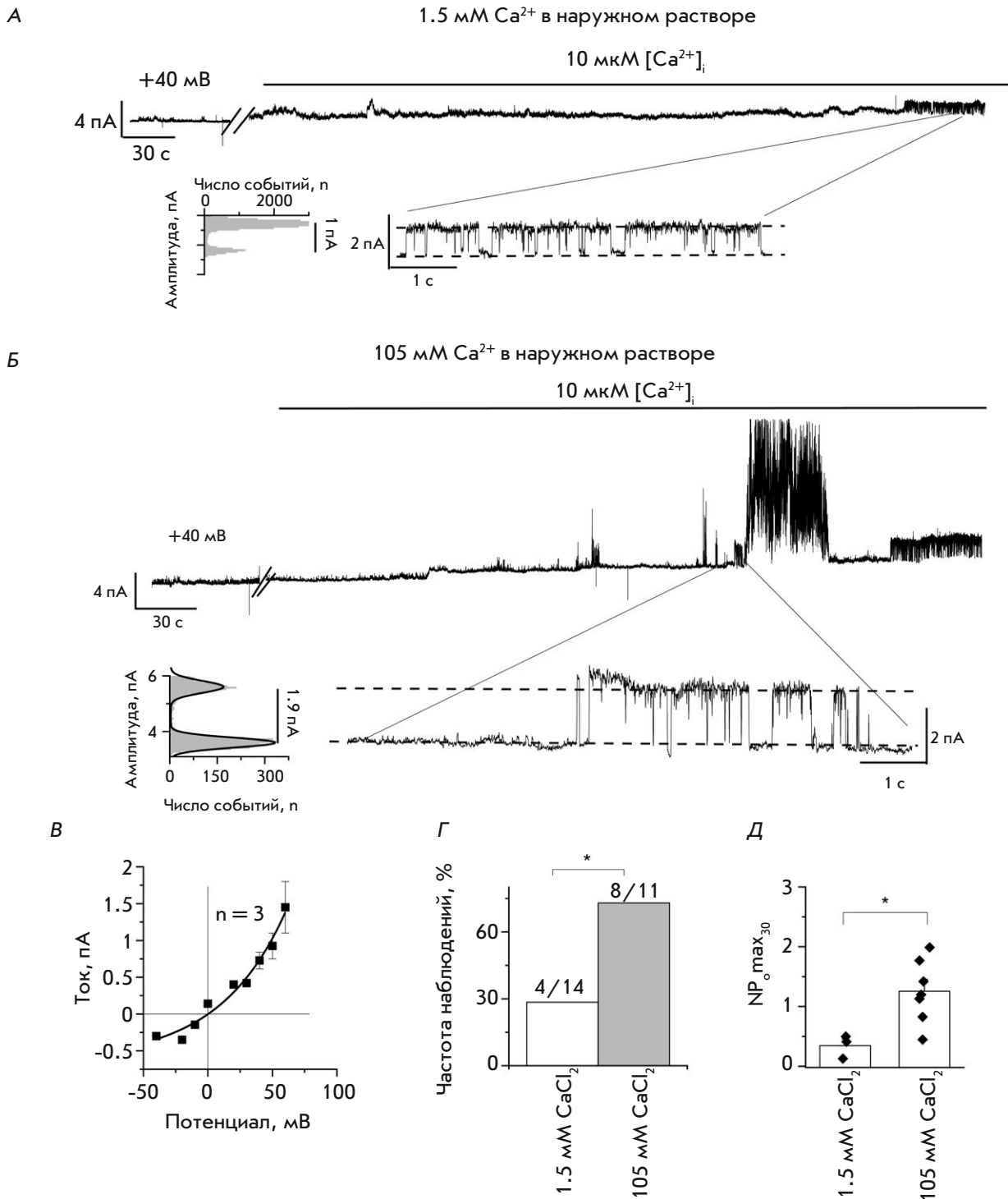


Рис. 1. Активность эндогенных CaCC ANO6, вызванная приложением 10 мкМ [Ca²⁺]_i к внутриклеточной стороне плазматической мембраны, в конфигурации inside-out в присутствии 1.5 или 105 мМ Ca²⁺ во внеклеточном растворе. Расширенные фрагменты выписок и амплитудные гистограммы указаны под выписками тока. **А** – фрагмент выписки тока через эндогенные CaCC ANO6, активированные приложением 10 мкМ [Ca²⁺]_i при 1.5 мМ Ca²⁺ снаружи. **Б** – фрагмент выписки тока через эндогенные CaCC ANO6, активированные приложением 10 мкМ [Ca²⁺]_i при 105 мМ Ca²⁺ снаружи. **В** – вольт-амперные характеристики эндогенных CaCC ANO6 в присутствии 1.5 мМ Ca²⁺ во внешнем растворе. **Г** – частота наблюдений опытов с эндогенными CaCC ANO6, активированных приложением 10 мкМ [Ca²⁺]_i при 1.5 или 105 мМ Ca²⁺ снаружи ($p < 0.05$). **Д** – NP_o max₃₀ эндогенных CaCC ANO6, активированных приложением 10 мкМ [Ca²⁺]_i при наружных растворах 1.5 и 105 мМ Ca²⁺ ($p < 0.05$)

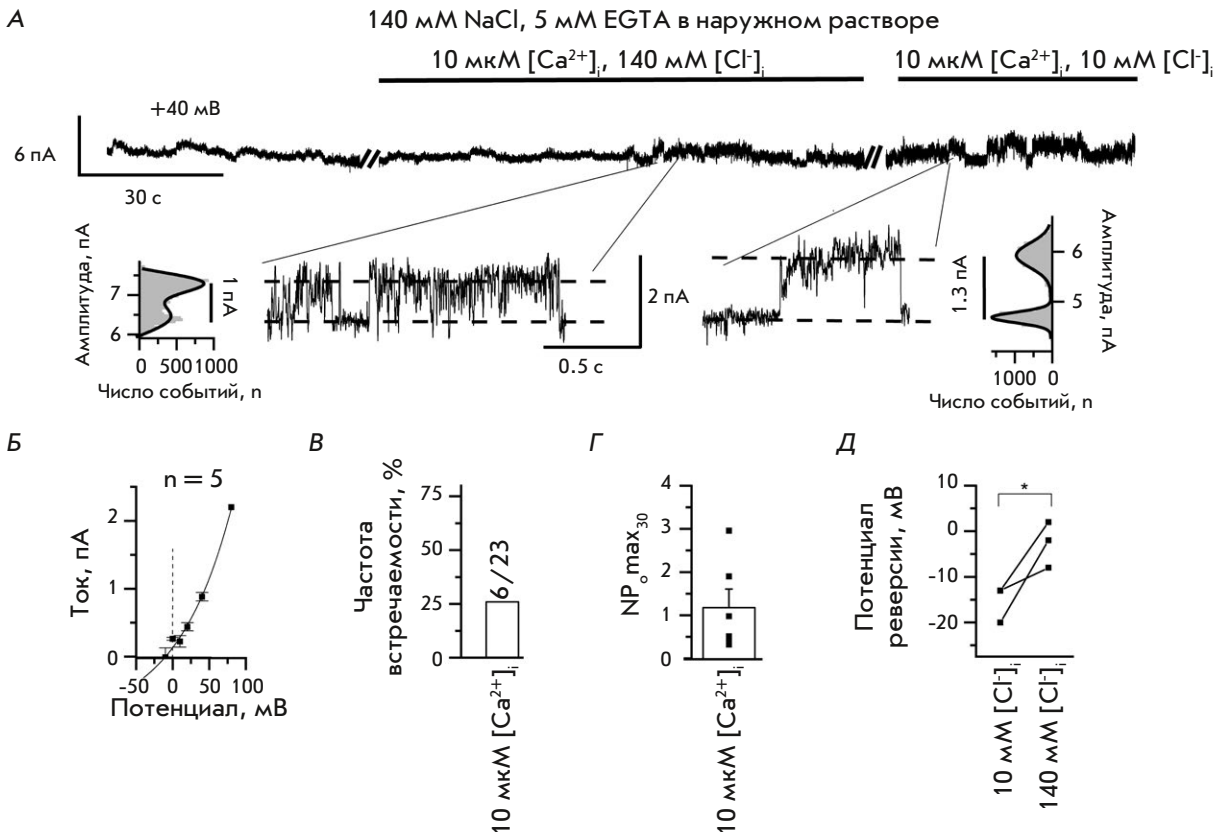


Рис. 2. Активность эндогенных CaCC ANO6 при отсутствии двухвалентных ионов в наружном растворе. А – фрагмент выписки тока через эндогенные CaCC ANO6 в наружном растворе, содержащем 140 мМ NaCl, 5 мМ EGTA. Расширенные фрагменты выписки и амплитудные гистограммы указаны под выпиской тока. Б – вольт-амперная характеристика эндогенных CaCC в наружном растворе, содержащем 140 мМ NaCl, 5 мМ EGTA и внутриклеточном растворе на основе CsGlutamate. В – встречаемость эндогенных CaCC ANO6 при 140 мМ NaCl, 5 мМ EGTA в наружном растворе. Г – вероятность открытого состояния эндогенных CaCC ANO6 при 140 мМ NaCl, 5 мМ EGTA в наружном растворе. Д – сдвиг потенциала реверсии эндогенных CaCC при замене внутриклеточного раствора CsGlutamate на CsCl при 140 мМ NaCl, 5 мМ EGTA в наружном растворе

CaCl₂ в наружном растворе активацию каналов наблюдали в 28.5% экспериментов (4/14) со средним значением NP_omax₃₀, равным 0.35 ± 0.11 (n = 3) (рис. 1А,В,Г,Д). В то же время в присутствии высокой концентрации кальция в наружном растворе – 105 мМ CaCl₂ – активацию каналов наблюдали достоверно чаще – в 73% экспериментов при NP_omax₃₀, равной 1.26 ± 0.2 (n = 7) (p < 0.05) (рис. 1Г,Д). Ранее нами было показано, что высокая концентрация ионов кальция в растворе пипетки не вызывает активацию эндогенных каналов ANO6 без дополнительной стимуляции внутриклеточными ионами Ca²⁺ [8]. Таким образом, увеличение активности каналов коррелирует с увеличением концентрации внеклеточного Ca²⁺.

Известно, что эндогенные каналы ANO6 не только активируются ионами кальция, но и проводят их [4]. Можно предположить, что при повышенной вну-

триклеточной концентрации кальция ионы кальция проникают через пору эндогенного канала ANO6, что может приводить к режиму самоподдержания активности и дальнейшему потенцированию работы каналов.

Таким образом, нами показано, что повышение концентрации ионов кальция в наружном растворе увеличивает как вероятность открытого состояния, так и встречаемость эндогенных CaCC ANO6 в клетках HEK293Т.

Внеклеточная концентрация кальция не влияет на анионную проводимость каналов

Данные об анионной проводимости каналов ANO6 противоречивы. В одних работах этот канал описан как анион-проводящий [7], в других – как катион-проводящий [4]. Проницаемость канала к хлорид-ионам зависит от [Ca²⁺]_i [10]. Показано, что при низ-

кой $[Ca^{2+}]_i$ канал будет проводить преимущественно катионы вместо анионов. Влияние наружного кальция на анионную проницаемость остается малопроявленным.

Для изучения этого вопроса мы убрали все свободные ионы кальция из внеклеточного раствора, используя хелатор EGTA. Активацию CaCC вызывали добавлением 10 мкМ $[Ca^{2+}]_i$ с внутренней стороны мембраны (рис. 2А). В экспериментах мы наблюдали активацию эндогенных CaCC ANO6 (рис. 2Б).

В присутствии 140 мМ NaCl, 5 мМ EGTA во внеклеточном растворе эндогенные CaCC ANO6 встречались в 26% опытов (6/23), с вероятностью открытого состояния 1.17 ± 0.43 ($n = 6$). Активность каналов в наружном растворе 140 мМ NaCl, 5 мМ EGTA статистически не отличалась от активности каналов при физиологичной концентрации кальция (1.5 мМ Ca^{2+}) (рис. 1Д, рис. 2Г) ($p > 0.05$). Полученные данные свидетельствуют о том, что физиологическая концентрация кальция в наружном растворе сама по себе не потенцирует активность эндогенных CaCC ANO6 в клетках HEK293Т.

Оценить изменение проницаемости канала по отношению к хлорид-ионам можно по изменению потенциала реверсии при изменении концентрации Cl^- во внутриклеточном растворе. Для этого в опытах с бескальциевым внешним раствором мы меняли внутриклеточный раствор с 130 CsGlutamate (10 мМ $[Cl^-]$) на раствор с 130 CsCl (140 мМ $[Cl^-]$). Потенциал реверсии при замене внутриклеточного раствора с 10 мМ $[Cl^-]$ на 140 мМ $[Cl^-]$ смещался вправо на 12.7 ± 3.9 мВ ($n = 3$) (рис. 2Д). Ранее нами было показано, что в присутствии 105 мМ $CaCl_2$ во внеклеточном растворе потенциал реверсии сдвигается на 16 ± 2 мВ вправо при аналогичной смене внутриклеточного раствора [8]. Таким образом, сдвиг потенциала реверсии был статистически неразличим при использовании наружных растворов, содержащих и не содержащих ионы кальция (рис. 2Д) [8].

Таким образом, ионы Ca^{2+} в наружном растворе не влияют на проницаемость эндогенных каналов ANO6 для хлорид-ионов.

Увеличение $[Ca^{2+}]_i$ ведет к преимущественной активации эндогенных каналов ANO6 с двойной амплитудой

Известно, что каналы семейства аноктаминов являются гомодимерами. В состав каждой субъединицы входит проводящая пора. Внутри каждой поры есть два сайта связывания ионов кальция, которые отличаются по своей аффинности [11].

Показано, что при низкой $[Ca^{2+}]_i$, когда занят только один сайт связывания $[Ca^{2+}]_i$, две поры каналов ANO1 работают независимо друг от друга

[12]. При увеличении $[Ca^{2+}]_i$ оба сайта связывания ионов Ca^{2+} в поре оказываются заняты, что приводит к синхронной работе проводящих пор канала [12]. Тем не менее на настоящий момент неизвестно, обладает ли ANO6 таким же свойством.

Чтобы ответить на этот вопрос, мы регистрировали активность эндогенных каналов ANO6 во внутриклеточных растворах с низкой (1 мкМ) и высокой (10 мкМ) $[Ca^{2+}]_i$ в конфигурации inside-out при потенциале на мембране +40 мВ. Для увеличения частоты встречаемости CaCC ANO6 использовали раствор в пипетке с 105 мМ $CaCl_2$.

Мы обнаружили, что в присутствии 1 мкМ $[Ca^{2+}]_i$, как правило, активируются каналы с амплитудой 0.95 ± 0.06 пА ($n = 10/11$) (рис. 3А). При аппликации раствора с 10 мкМ $[Ca^{2+}]_i$ мы наблюдали не только активацию каналов с похожей амплитудой – 1 ± 0.12 пА ($n = 3/7$), но и в 57% опытов активацию каналов с двойной амплитудой – 1.79 ± 0.14 пА ($n = 4/7$) (рис. 3Б). В растворе с 1 мкМ $[Ca^{2+}]_i$ активацию каналов с двойной амплитудой мы наблюдали только в 9% экспериментов ($n = 1/11$) ($p < 0.05$) (рис. 3В,Г).

Таким образом, наши данные позволяют предположить, что при увеличении $[Ca^{2+}]_i$ две проводящие поры эндогенных CaCC ANO6 начинают проводить ток синхронно. Следовательно, мы можем предположить, что механизмы регуляции внутриклеточными ионами кальция CaCC ANO1 и ANO6 схожи.

Время жизни открытого состояния эндогенных CaCC ANO6 определяется потенциалом на мембране, но не $[Ca^{2+}]_i$

Известно, что ток через эндогенные CaCC ANO6 увеличивается с повышением внутриклеточной концентрации кальция и деполяризации мембраны [10]. Ранее мы показали, что это связано с увеличением вероятности открытого состояния каналов, их амплитуды и проводимости [8]. Однако увеличение тока может быть в том числе связано и с изменением времени открытого состояния канала.

Для изучения этого вопроса мы проанализировали зависимость времени жизни открытого состояния эндогенных каналов ANO6 от концентрации $[Ca^{2+}]_i$ с внутренней стороны мембраны при фиксированном потенциале на мембране +40 мВ.

При 0.2 мкМ $[Ca^{2+}]_i$ время открытого состояния каналов составляло 1.07 ± 0.21 мс ($n = 5$), для 1 мкМ $[Ca^{2+}]_i$ – 0.77 ± 0.14 мс ($n = 4$), для 10 мкМ $[Ca^{2+}]_i$ – 1.18 ± 0.31 мс ($n = 4$), для 100 мкМ $[Ca^{2+}]_i$ – 1.07 ± 0.15 мс ($n = 4$) ($p > 0.05$) (рис. 4А). Таким образом, время открытого состояния каналов не зависело от изменения $[Ca^{2+}]_i$. Анализ зависимости времени открытого состояния эндогенных каналов

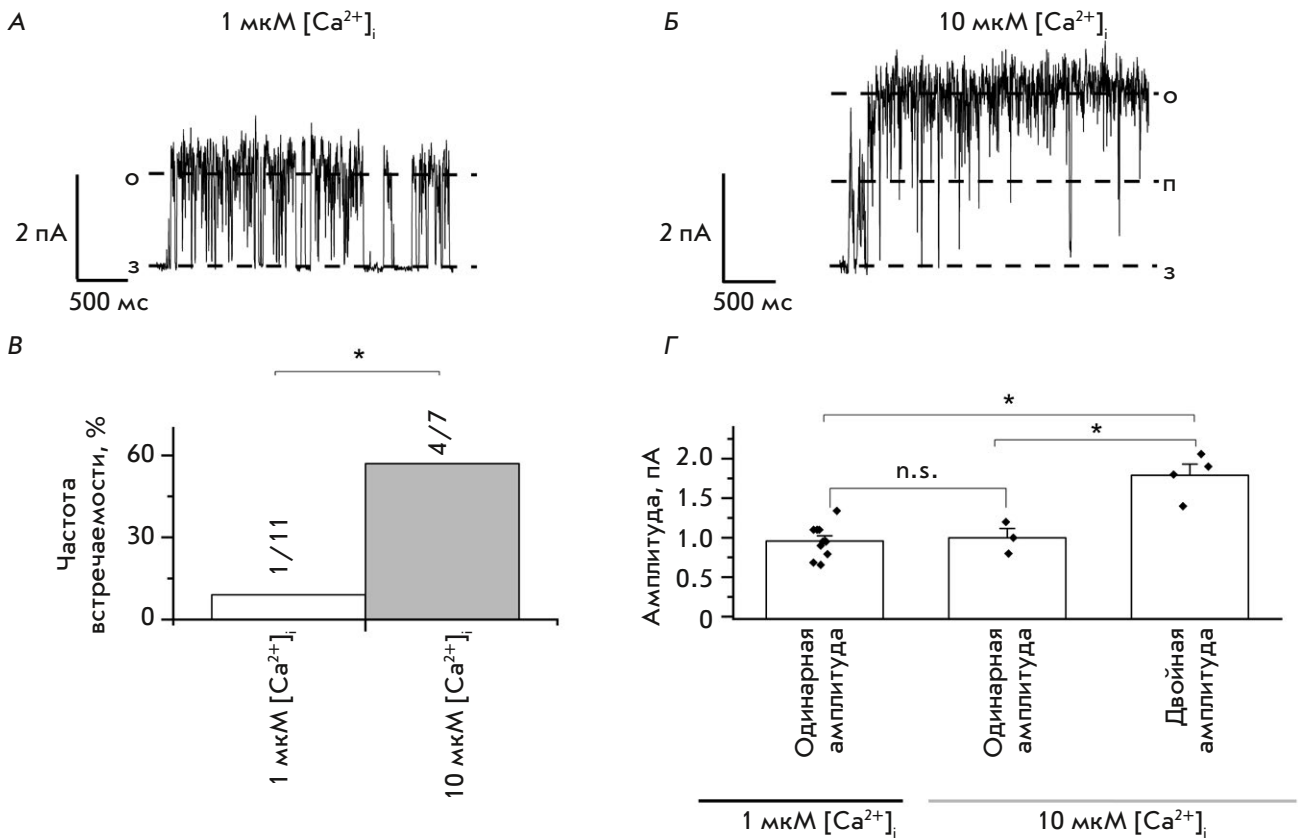


Рис. 3. Амплитуда эндогенных CaCC при 1 и 10 мкМ [Ca²⁺]_i. Внеклеточный раствор 105 мМ CaCl₂. Каналы активированы приложением растворов с 1 или 10 мкМ [Ca²⁺]_i. А – фрагмент выписки тока через эндогенные CaCC с одинарной амплитудой, активированные приложением 1 мкМ [Ca²⁺]_i; з – закрытое состояние канала, о – открытое состояние канала. Б – фрагмент выписки тока через эндогенные CaCC с двойной амплитудой, активированные приложением 10 мкМ [Ca²⁺]_i; з – закрытое состояние канала, о – открытое состояние канала, п – подсостояние. В – встречаемость эндогенных CaCC ANO6 с двойной амплитудой при их активации 1 мкМ [Ca²⁺]_i (белый) или 10 мкМ [Ca²⁺]_i (серый), *p* < 0.05. Г – амплитуда эндогенных каналов ANO6, активированных 1 или 10 мкМ [Ca²⁺]_i (*p* < 0.05)

ANO6 от потенциала на мембране при фиксированной внутриклеточной концентрации 100 мкМ [Ca²⁺]_i показал, что при деполяризации мембраны время открытого состояния CaCC увеличивается линейно с ростом потенциала (рис. 4Б).

Таким образом, увеличение тока через эндогенные CaCC при деполяризации мембраны связано не только с увеличением проводимости и вероятности открытого состояния каналов (описано нами ранее), но и с увеличением времени жизни открытого состояния эндогенных каналов ANO6. В то же время изменение [Ca²⁺]_i не приводит к изменению времени открытого состояния каналов.

Активность каналов ANO6 увеличивается после временной смены потенциала мембраны на отрицательный и обратно

Нами обнаружен эффект увеличения активности каналов ANO6 при потенциале +40 мВ после

кратковременного цикла изменения потенциала мембраны на отрицательный и обратно на +40 мВ. Ниже приведена схема опыта: каналы активировали добавлением 1 мкМ [Ca²⁺]_i к внутриклеточной стороне мембраны при потенциале +40 мВ, затем поддерживали отрицательный потенциал в течение 30 с и повторно подавали напряжение +40 мВ. Обратное переключение потенциала на +40 мВ приводило к увеличению активности, в среднем с 0.23 ± 0.06 до 0.81 ± 0.26 (*n* = 7, *p* < 0.05, рис. 5). При более высоких концентрациях кальция (10 или 100 мкМ) данный эффект не наблюдался, по-видимому, каналы были уже максимально индуцированы и поэтому дальнейшее увеличение активности не происходило.

Известно, что существует синергизм между увеличением внутриклеточной концентрации кальция и деполяризацией плазматической мембраны клеток в активации каналов ANO6. Так для сверхэкспрессированных каналов ANO6 деполяризация

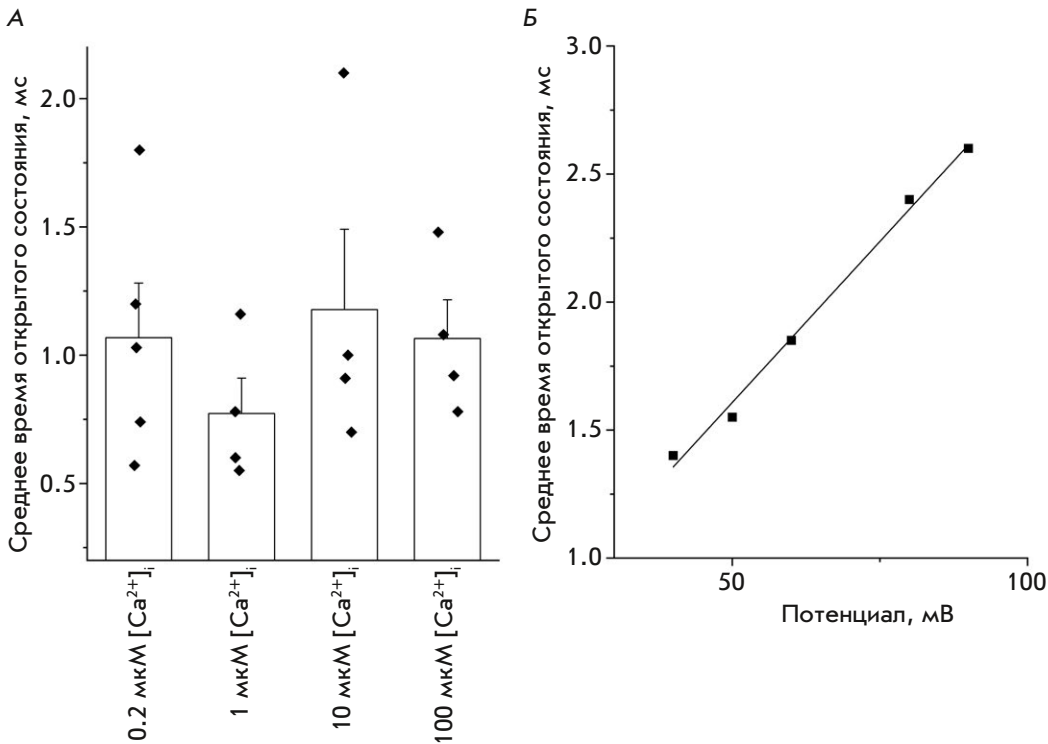


Рис. 4. Влияние $[Ca^{2+}]_i$ и потенциала на время жизни открытого состояния эндогенных каналов ANO6 в клетках HEK293T. Эксперименты проводили в конфигурации inside-out с 105 мМ $CaCl_2$ в наружном растворе. А – среднее время жизни открытого состояния эндогенных CaCC при +40 мВ при различных внутриклеточных концентрациях кальция ($p > 0.05$). Б – зависимость времени жизни открытого состояния эндогенных CaCC от потенциала на мембране при внутриклеточной концентрации кальция 100 мкМ (представлены данные репрезентативного эксперимента)

облегчает взаимодействие ионов кальция с внутриклеточными сайтами связывания, что приводит к увеличению активности каналов [10]. Здесь мы впервые показали, что переключение потенциалов само по себе увеличивает активность ANO6. Можно полагать, что изменение электрического поля в момент переключения потенциала мембраны с отрицательного на +40 мВ способствует конформационным изменениям эндогенных каналов ANO6, которые позволяют эффективно связать ионы кальция в вестибуле поры канала. Возможно, такая регуляция будет особенно ярко проявляться в физиологических условиях при флуктуациях потенциала мембраны (гиперполяризация, затем деполяризация), поскольку теоретически это снижает концентрацию кальция, необходимую для повышения активности канала. В дальнейшем интересно исследовать, зависит ли этот эффект от скорости изменения потенциала с отрицательного к положительному.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Анализ кинетики работы одиночных CaCC впервые выявил увеличение времени жизни открытого состояния канала, индуцированное повышением потенциала на мембране. Это свойство, наряду с описанными нами ранее увеличением проводимости и вероятности открытого состояния каналов, по-

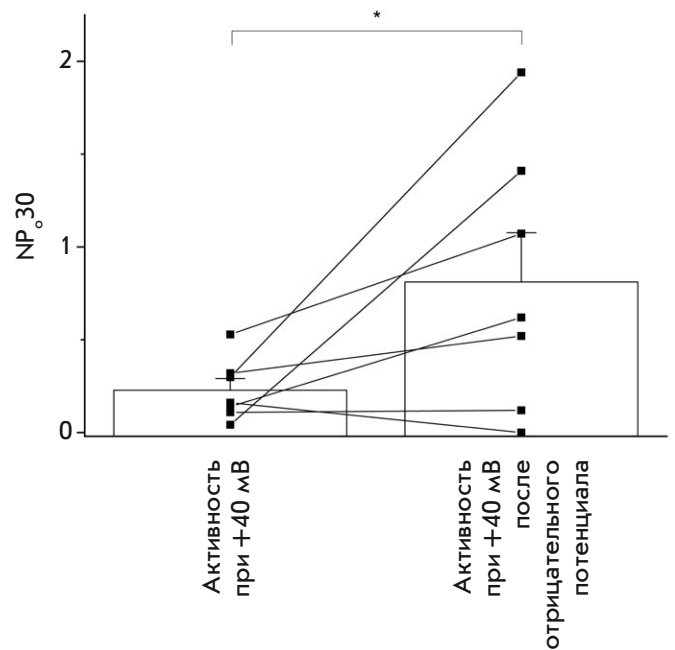


Рис. 5. Активность каналов ANO6 при потенциале +40 мВ до и после временного переключения потенциала мембраны на отрицательный. Каналы предварительно активировали, добавляя 1 мкМ кальция к внутренней стороне мембраны. После развития активности при +40 мВ переходили на отрицательный потенциал и возвращались на +40 мВ

видимому, объясняет характерное выходящее выпрямление CaCC. Внутриклеточная концентрация кальция не влияла на время жизни канала, однако анализ амплитуды канала показал, что увеличение концентрации кальция приводит к синхронной работе пор димера аноктамина, что увеличивает ток в 2 раза.

В экспериментальных условиях каналы ANO6 активируются при большой концентрации внутриклеточного кальция (порядка десятков микромоляр), тогда как в цитоплазме физиологическая концентрация кальция на два порядка ниже. Мы обнаружили, что цикл изменения потенциала мембраны (гиперполяризация, затем деполяризация) увеличивает активность каналов уже при 1 мкМ кальция. Возможно, такая регуляция может проявляться и в физиологических условиях при локальных флуктуациях потенциала мембраны.

Высокая концентрация внеклеточного кальция увеличивала активность каналов, возможно, за счет неселективного входа ионов кальция и автоподдержания активности канала. Поскольку этот эффект наблюдался только в присутствии избыточной концентрации кальция (почти на два порядка выше физиологической), физиологическая роль этого процесса не ясна. Проницаемость канала к хлорид-ионам не зависела от внеклеточной концентрации кальция.

Выявленные нами механизмы регуляции активности каналов ANO6 демонстрируют возможные пути тонкой настройки функционирования канала в нормальных физиологических и в патологических условиях. ●

*Работа поддержана грантом
РНФ № 22-24-00761.*

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Ehlen H.W.A., Chinenkova M., Moser M., Munter H.M., Krause Y., Gross S., Brachvogel B., Wuelling M., Kornak U., Vortkamp A. // *J. Bone Mineral Res.* 2013. V. 28. № 2. P. 246–259.
- Zhang Y., Le T., Grabau R., Mohseni Z., Kim H., Natale D.R., Feng L., Pan H., Yang H. // *Sci. Advanc.* 2020. V. 6. P. eaba0310.
- Ousingsawat J., Wanitchakool P., Schreiber R., Wuelling M., Vortkamp A., Kunzelmann K. // *J. Biol. Chem.* 2015. V. 290. № 10. P. 6270–6280.
- Yang H., Kim A., David T., Palmer D., Jin T., Tien J., Huang F., Cheng T., Coughlin S.R., Jan Y.N., et al. // *Cell.* 2012. V. 151. № 1. P. 111–122.
- Cabrita I., Benedetto R., Schreiber R., Kunzelmann K. // *JCI Insight.* 2019. V. 4. № 15. P. e128414.
- Braga L., Ali H., Secco I., Chiavacci E., Neves G., Goldhill D., Penn R., Jimenez-Guardeño J.M., Ortega-Prieto A.M., Busani R., et al. // *Nature.* 2021. V. 594. № 7861. P. 88–93.
- Martins J.R., Faria D., Kongsuphol P., Reisch B., Schreiber R., Kunzelmann K. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2011. V. 108. № 44. P. 18168–18172.
- Kolesnikov D., Perevoznikova A., Gusev K., Glushankova L., Kaznacheeva E., Shalygin A. // *Int. J. Mol. Sci.* 2021. V. 22. № 9. P. 4767.
- Kolesnikov D.O., Nomerovskaya M.A., Grigorieva E.R., Reshetin D.S., Skobeleva K.V., Gusev K.O., Shalygin A.V., Kaznacheeva E.V. // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2024. V. 693. P. 149378.
- Ye W., Han T.W., He M., Nung Jan Y., Yeh Jan L. // *eLife.* 2019. V. 8. P. e45187.
- Kalienkova V., Clerico Mosina V., Paulino C. // *J. Mol. Biol.* 2021. V. 433. № 16. P. 166941.
- Lim N.K., Lam A.K.M., Dutzler R. // *J. Gen. Physiol.* 2016. V. 148. № 5. P. 375–392.

УДК 576.32/.36

Исследование активации сигнальных путей в TRAIL-резистентных макрофагоподобных клетках острого миелоидного лейкоза

Я. В. Ломовская^{1*}, К. С. Краснов¹, М. И. Кобякова^{1,2}, А. А. Колотова¹, А. М. Ермаков¹, А. С. Сенотов¹, И. С. Фадеева¹, Е. И. Фетисова¹, А. И. Ломовский¹, А. И. Звягина¹, В. С. Акатов¹, Р. С. Фадеев¹

¹Институт теоретической и экспериментальной биофизики РАН, Пущино, Московская обл., 142290 Россия

²Институт клинической и экспериментальной лимфологии – филиал Института цитологии и генетики СО РАН, Новосибирск, 630060 Россия

*E-mail: yannalomovskaya@gmail.com

Поступила в редакцию 01.11.2023

Принята к печати 31.01.2024

DOI: 10.32607/actanaturae.27317

РЕФЕРАТ Острый миелоидный лейкоз (ОМЛ) – злокачественное новообразование, которое характеризуется крайне низкой излечиваемостью и выживаемостью. Воспалительное микроокружение и индуцированное им созревание (дифференцировка) клеток ОМЛ способствует уклонению этих клеток от эффекторов противоопухолевого иммунитета. Один из ключевых молекулярных эффекторов иммунного надзора – цитокин TRAIL – рассматривается в качестве перспективной платформы для создания селективных противоопухолевых препаратов. Ранее в *in vitro* условиях воспалительного микроокружения – в трехмерной высокоплотной культуре клеток ОМЛ ТНФ-1, нами было показано появление дифференцированных макрофагоподобных клонов ТНФ-1ad, устойчивых к TRAIL-индуцированной гибели. В представленной работе в устойчивых к действию TRAIL макрофагоподобных клетках ОМЛ ТНФ-1ad обнаружены конститутивная активация провоспалительных сигнальных путей, ассоциированных с ними транскрипционных факторов, и повышение экспрессии антиапоптотического гена *BIRC3*. Впервые с помощью биоинформатического анализа транскриптома выявлен основной регулятор – ген *IL1B*, связывающий провоспалительную активацию и формирование устойчивости к TRAIL у макрофагоподобных клеток ТНФ-1ad.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА острый миелоидный лейкоз, TRAIL-индуцированный апоптоз, транскриптом, воспаление.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ ОМЛ – острый миелоидный лейкоз; TRAIL – цитокин семейства факторов некроза опухоли, лиганд, вызывающий апоптоз; ТФ – транскрипционный фактор; ИНФ – интерферон; ИЛ – интерлейкин; FDR – частота ложноположительных результатов; ДЭГ – дифференциально экспрессируемый ген; ББВ – белок-белковые взаимодействия.

ВВЕДЕНИЕ

Острый миелоидный лейкоз (ОМЛ) – злокачественное заболевание крови, которое характеризуется крайне низкой излечиваемостью и выживаемостью [1]. Несмотря на достигнутый за последнее десятилетие прогресс в терапевтических стратегиях, общая пятилетняя выживаемость наблюдается только у 30% пациентов с диагнозом ОМЛ [2]. Для ОМЛ характерна неконтролируемая клональная экспансия и накопление (гиперклеточность) злокачественно трансформированных гемопоэтических

клеток-предшественников в костном мозге и периферической крови. Хорошо известно, что при остром миелоидном лейкозе костный мозг приобретает характеристики поврежденной ткани с признаками хронического воспаления [3, 4]. Воспалительный процесс в костном мозге способствует уклонению опухолевых клеток от гибели, индуцированной как противоопухолевыми препаратами, так и компонентами противоопухолевого иммунитета, и, следовательно, является маркером неблагоприятного прогноза течения заболевания [5–7]. Известно так-

же, что в условиях воспаления активация провоспалительных внутриклеточных сигнальных путей может приводить к миелоидной дифференцировке здоровых гемопоэтических клеток-предшественников [8–10]. В последнее время появляются данные о том, что клетки ОМЛ с дифференцированным (зрелым) миелоидным фенотипом могут подавлять активность противоопухолевого иммунитета, а также они более устойчивы к действию ряда противоопухолевых препаратов [11–13].

Одним из ключевых молекулярных компонентов противоопухолевого иммунитета является индуцирующий апоптоз лиганд (TRAIL), родственный фактору некроза опухоли (ФНО). Цитокин TRAIL связывается с четырьмя мембраносвязанными рецепторами: проапоптотическими DR4 и DR5 и антиапоптотическими DcR1 и DcR2, а также с растворимым антиапоптотическим «рецептором» остеопротегерином [14]. Уникальность цитокина TRAIL заключается в его способности к селективной индукции гибели опухолевых и трансформированных клеток при отсутствии цитотоксического действия на здоровые клетки организма. Данное свойство весьма привлекательно и перспективно для разработки высокоактивных агонистов проапоптотических TRAIL-рецепторов, что, в свою очередь, крайне важно для снижения серьезных неспецифических побочных эффектов иммунобиологических противоопухолевых препаратов [15, 16].

Ранее нами было показано, что в клетках ОМЛ ТНР-1 в условиях *in vitro*, в трехмерной высокоплотной культуре, имитирующей гомотипическую межклеточную коммуникацию при гиперплазии лейкозных бластов в костном мозге, происходят повышение продукции провоспалительных цитокинов, хемокинов и ростовых факторов, активация провоспалительных NF- κ B-зависимых сигнальных путей и обратимое повышение устойчивости как к TRAIL-индуцированной гибели, так и к действию химиотерапевтических препаратов [17, 18]. Кроме того, нами показано, что в трехмерной высокоплотной культуре этих клеток появляются макрофагоподобные клоны ТНР-1ad, обладающие конститутивной устойчивостью к TRAIL-индуцированной гибели [19]. Известно также, что дифференцировка клеток ОМЛ способствует повышению их устойчивости к TRAIL-индуцированной гибели [20, 21].

Таким образом, исходя из опубликованных данных и собственных результатов, мы предполагаем, что провоспалительное микроокружение клеток ОМЛ, сымитированное в условиях трехмерной высокоплотной клеточной культуры *in vitro*, может индуцировать созревание клеток и приводить к появлению новых клеточных клонов, устойчивых

к цитотоксическому действию противоопухолевого цитокина TRAIL. В данной работе с использованием биоинформатического анализа транскриптомов макрофагоподобных клеток ТНР-1ad, образовавшихся в условиях провоспалительного микроокружения и устойчивых к TRAIL-индуцированной гибели, выявлены основные сигнальные пути и ключевые молекулярные участники, ассоциированные с активацией путей выживания.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Клеточные культуры

Клетки острого миелоидного лейкоза человека ТНР-1 (TIB-202) получены из АТСС (США). Пролиферирующие макрофагоподобные клоны ТНР-1ad получены как указано ранее [19]. Клетки культивировали в среде RPMI 1640/F12 (Sigma, США) с добавлением 10% эмбриональной телячьей сыворотки (FBS) (Gibco, США), 40 мкг/мл гентамицина сульфата (Sigma) при 37°C и 5% CO₂ в воздухе. Непролиферирующие макрофагоподобные клетки ТНР-1PMA получали путем инкубации клеток ТНР-1 с 200 нМ форболового эфира (Sigma) в течение 96 ч. Для провоспалительной активации клеток ТНР-1 культивировали в присутствии 10 мкг/мл ЛПС из *Escherichia coli* O111:B4 (Sigma) в течение 24 ч.

Секвенирование транскриптомов клеток

Секвенирование РНК для последующей оценки транскриптомов клеток проводили в ООО «Геноаналитика» с использованием секвенатора HiSeq 1500 (Illumina, США). Секвенирование РНК каждой из двух исследованных групп клеток выполняли в трех биологических повторностях.

Анализ дифференциальной экспрессии генов

Для идентификации различий в экспрессии генов между макрофагоподобными клонами ТНР-1ad и родительскими клетками ТНР-1 проведены кластерный анализ и анализ методом главных компонент с использованием языка программирования Python (в. 3.10.5) и пакета Scikit-learn (в. 1.3.2) (рис. 1).

Для исследования активации сигнальных путей в макрофагоподобных клонах ТНР-1ad в сравнении с родительскими клетками ТНР-1 использовали анализ обогащения по функциональной принадлежности (GSEA), так как в данном методе анализируются все изменяющиеся гены, а не только гены, кратность изменений которых превышает определенный порог [22]. В работе анализировали наборы генов из коллекций H (Hallmark) и C3 (наборы генов

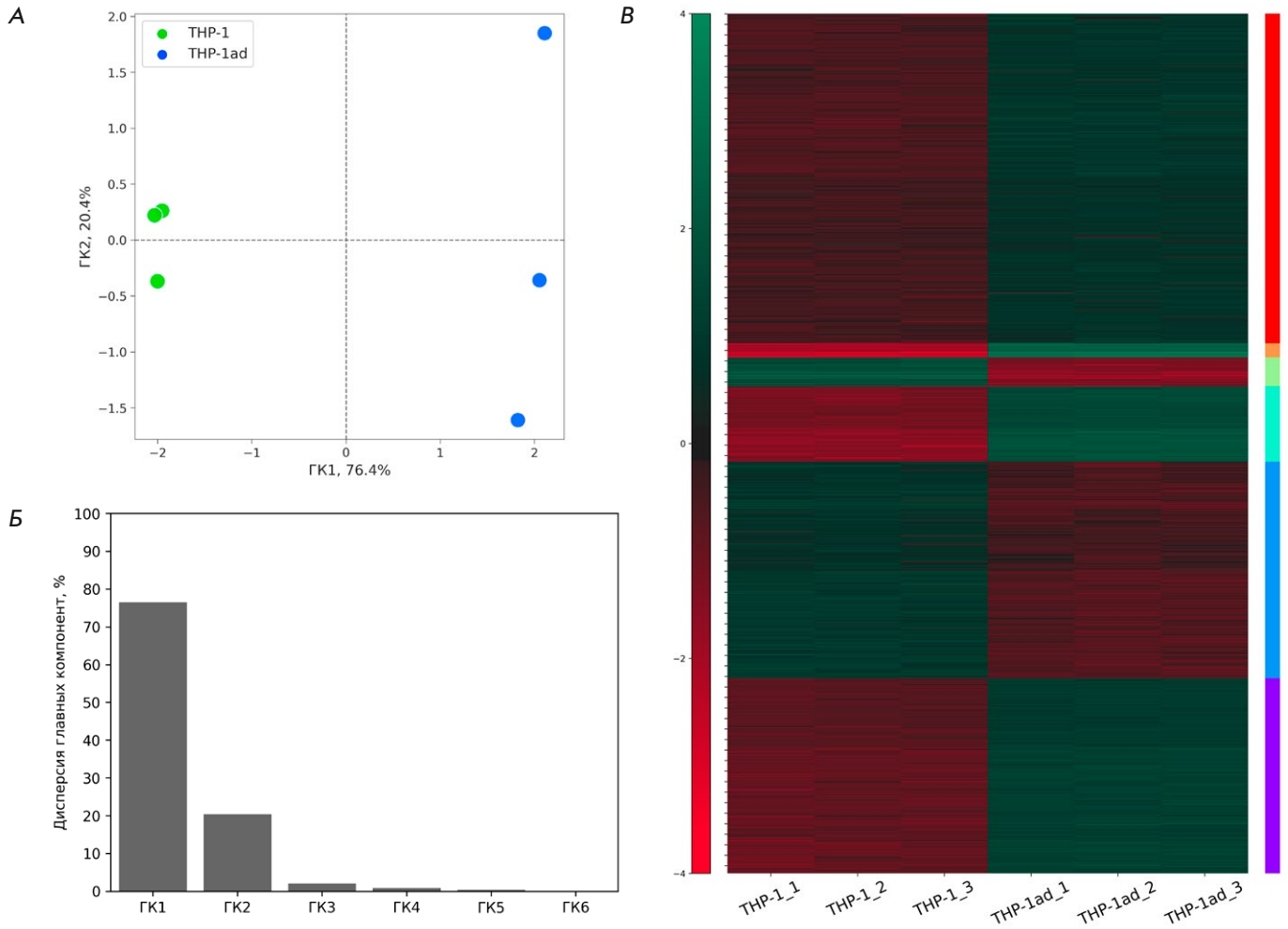


Рис. 1. Оценка различий в экспрессии генов в клетках THP-1ad и THP-1. Метод главных компонент на основе данных экспрессии генов, показывающий различия в экспрессии в двух экспериментальных группах (А). Распределение дисперсии между главными компонентами (Б). Кластеризация ДЭГ с достоверными изменениями экспрессии (В)

Transcription Factor Targets) базы данных молекулярных сигнатур MSigDB (<https://www.gsea-msigdb.org/gsea/msigdb/human/collections.jsp>) с использованием пакета программ для языка программирования Python (вер. 3.10) GSEApy (вер. 1.0.5). В качестве критерия активации сигнальных путей и транскрипционных факторов (ТФ) использовали значение показателя обогащения. Дополнительно применяли нормализованный показатель обогащения (НПО), который позволяет сопоставлять наборы генов, содержащих различное количество генов. Чем больше значение НПО или показателя обогащения, тем выше вероятность активации сигнального пути или ТФ.

С целью определения дифференциально экспрессируемых генов (ДЭГ), продукты которых могут принимать участие в регуляции исследуемых

сигнальных путей, построены сети белок-белковых взаимодействий (ББВ) и проанализировано их функциональное взаимодействие для идентификации центральных регулирующих элементов. Использовали базу данных STRINGdb (<https://string-db.org/>), программное обеспечение Cytoscape (вер. 3.10.0) и подключаемый модуль CytoHubba [23].

Количественная ПЦР с обратной транскрипцией

Тотальную РНК выделяли с использованием набора innuPREP RNA Mini Kit 2.0 (Analytik Jena, Германия). кДНК синтезировали и амплифицировали с использованием набора OneTube RT-PCR SYBR («Евроген», Россия) на приборе QuantStudio 5 Real-Time PCR (Thermo Scientific, США) согласно инструкции производителя. Олигонуклеотидные праймеры, используемые в исследовании, были

Таблица 1. Олигонуклеотидные праймеры, использованные в работе

Олигонуклеотид	Нуклеотидная последовательность 5'→3'
NAIP-F	GGGGACTTCGTCTGGGATTC
NAIP-R	CTGGCCAGTGGAAGGAAAGT
CIAP1-F	CTGATTCCTCGGCTCTGCG
CIAP1-R	AGCACGAGCAAGACTCCTTT
CIAP2-F	TCCATGGGTTCACATGCCA
CIAP2-R	CTCCTGGGCTGTCTGATGTG
XIAP-F	TGGCGCTCATCGAGGGA
XIAP-R	TGTCTGCAGGTACACAAGTTTATG
Survivin-F	TTC AAGGAGCTGGAAGGCTG
Survivin-R	GCAACCGGACGAATGCTTTT
BRUCE-F	AGAAAGGGATGATGCAAGTACG
BRUCE-R	CTACCTGGGCTGCTGAACTC
Livin-F	GGCTCCTTCTATGACTGGC
Livin-R	GCAGAAGAAGCACCTCACCT
ILP-2-F	GGAGAGGAAAAGCGTTGTGC
ILP-2-R	TCTTCACTATGCATGGCGGG
BCL2-F	CAACATCGCCCTGTGGATGA
BCL2-R	CCGTACAGTCCACAAAGGC
BCL2L1-F	GGCTTGTTCGGGAGAGACG
BCL2L1-R	CACTGAGTCTCGTCTCTGGTT
MCL1-F	TGGAGACCTTACGACGGGTT
MCL1-R	AGCACATTCCTGATGCCACC
BCL2L2-F	CGACTGTGACTCTGCTGCAA
BCL2L2-R;	TCTCCCTGACTCGAGCTTTG
BCL2A1-F	GGATAAGGCAAAACGGAGGC
BCL2A1-R	TCTTCTTGTGGGCCACTGAC

синтезированы в ЗАО «Евроген» и представлены в табл. 1.

Статистический анализ

Результаты представляли в виде среднего \pm стандартное отклонение ($M \pm SD$). Опыты проводили не менее чем в пяти повторах ($n \geq 5$). Статистическую значимость различий определяли с помощью одностороннего ANOVA с последующим множественным сравнением Холма–Сидака, $p < 0.05$. Статистическую значимость изменений экспрессии генов оценивали с применением теста Вальда с поправкой на множественное сравнение Беньямини–Хохберга ($FDR \leq 0.05$ [24]).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Выявление наиболее активированных сигнальных путей в макрофагоподобных клонах THP-1ad

Ранее нами было показано формирование в условиях трехмерных высокоплотных культур клеток ОМЛ THP-1 *in vitro* макрофагоподобных клонов THP-1ad, обладающих повышенной устойчивостью к TRAIL-индуцированной гибели [19]. Для определения основных сигнальных путей и потенциальных механизмов TRAIL-резистентности макрофагоподобных клонов THP-1ad проведено секвенирование транскриптомов данных клеток с последующим анализом дифференциальной экспрессии генов в сравнении с родительскими клетками THP-1.

Для идентификации активности внутриклеточных сигнальных путей проведен анализ обогащения по функциональной принадлежности (GSEA) базы данных MSigDB [25] на всем наборе данных секвенирования транскриптомов, который позволяет оценить активацию/деактивацию исследуемого сигнального пути или всех исследуемых генов-мишеней за счет учета даже незначительных изменений транскрипционной активности [22].

Анализ обогащения по функциональной принадлежности, проведенный с использованием коллекции H, показал, что в макрофагоподобных клонах THP-1ad наибольший положительный нормализованный показатель обогащения (НПО) имели наборы генов сигнальных путей Interferon alfa response (НПО 2.13), IL6 JAK STAT3 signaling (НПО 2.06), Inflammatory response (НПО 2.01), Interferon gamma response (НПО 1.98) и TNFA signaling via NF-KB (НПО 1.96) (рис. 2А), что указывает на активацию данных сигнальных путей. Хорошо известно, что активность идентифицированных сигнальных путей характерна для провоспалительной активации клеток [26–28]. Также мы обнаружили, что в макрофагоподобных клонах THP-1ad происходило подавление активности сигнальных путей MYC targets V1 (НПО -2.86), MYC targets V2 (НПО -2.83) и Oxidative phosphorylation (НПО -2.03), о чем свидетельствует наибольшее отрицательное значение НПО. Подавление данных сигнальных путей также характерно для провоспалительной активации клеток и повышения устойчивости к TRAIL-индуцированной гибели [29–31].

Для идентификации наиболее вероятных ТФ, контролирующей экспрессию генов из наборов с наибольшим положительным НПО, то есть непосредственно принимающих участие в активации вышепредставленных сигнальных путей в макрофагоподобных клонах THP-1ad, проведен анализ

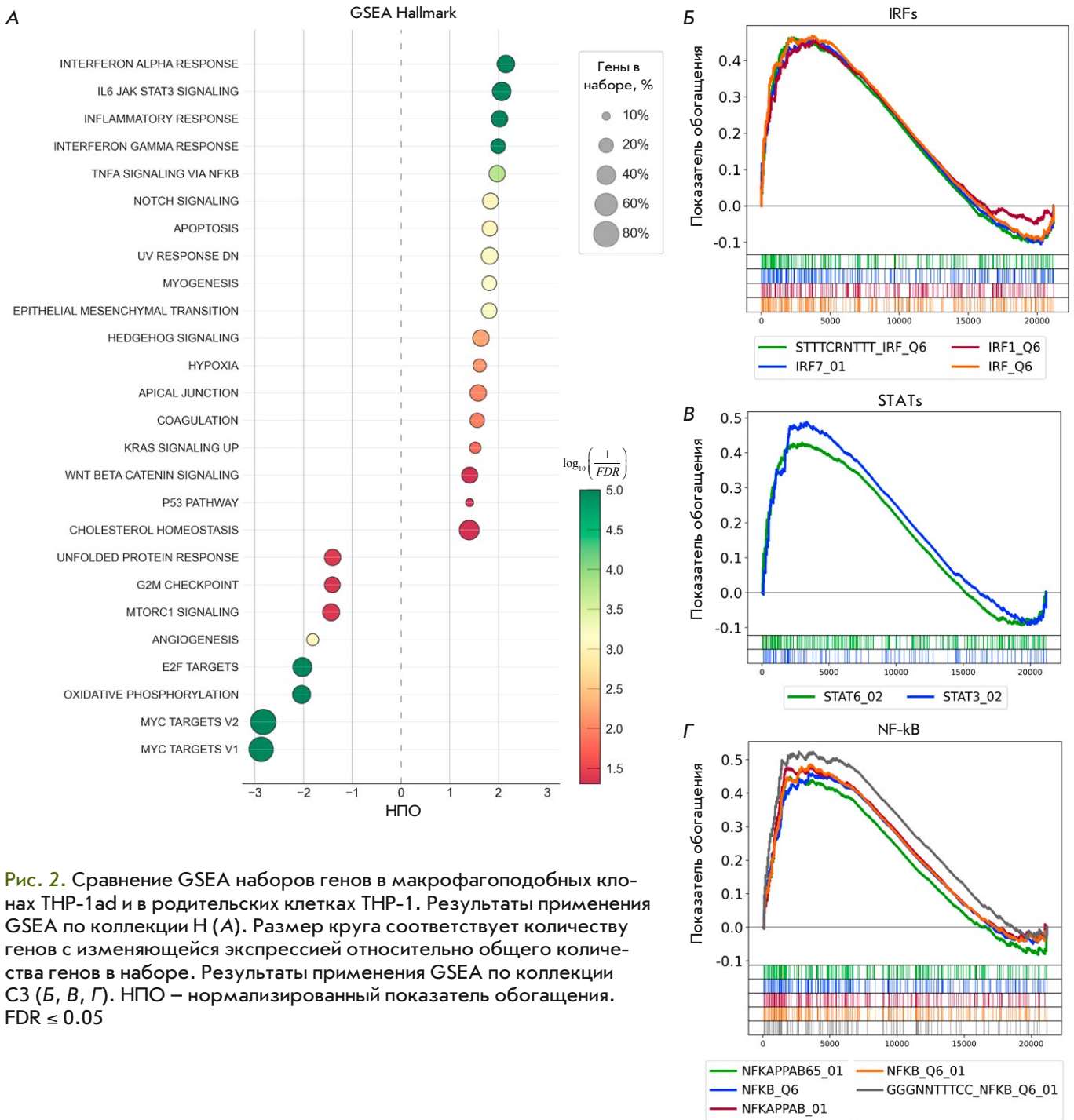


Рис. 2. Сравнение GSEA наборов генов в макрофагоподобных кло-нах THP-1ad и в родительских клетках THP-1. Результаты применения GSEA по коллекции Н (А). Размер круга соответствует количеству генов с изменяющейся экспрессией относительно общего количества генов в наборе. Результаты применения GSEA по коллекции С3 (Б, Б', Б''). НПО – нормализованный показатель обогащения. $FDR \leq 0.05$

обогащения по функциональной принадлежности с использованием коллекции С3 и наборов генов, содержащих последовательности для связывания с ТФ семейства IRF, STAT и NF-kB. Показано, что из всех наборов коллекции С3 (субколлекции TFT:TFT_LEGACY), содержащих гены, связывающие ТФ семейства IRF, были достоверно ($FDR \leq 0.05$) обогащены и имели положительные показатели обогащения (ПО) наборы генов

IRF_Q6 (ПО 0.46), STTTCRNTTT_IRF_Q6 (ПО 0.46), IRF1_Q6 (ПО 0.45) и IRF7_01 (ПО 0.45), что указывает на транскрипционную активность факторов IRF1 и IRF7. При исследовании наборов, содержащих гены с последовательностями для связывания ТФ семейства STAT, было обнаружено, что наборы генов STAT3_02 (ПО 0.48) и STAT6_02 (ПО 0.42) были достоверно ($FDR \leq 0.05$) обогащены и имели положительные ПО, что указывает на транскрипционную

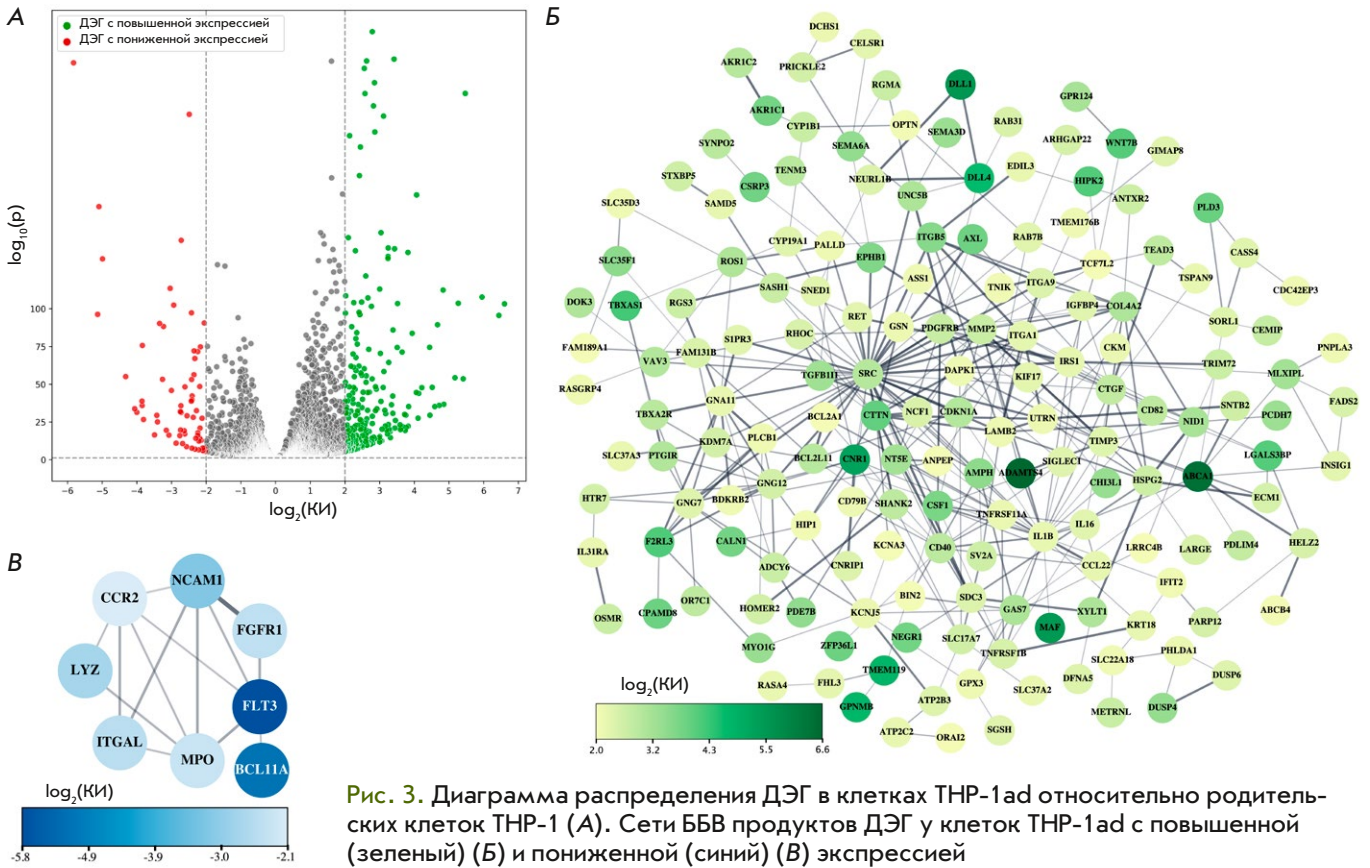


Рис. 3. Диаграмма распределения ДЭГ в клетках THP-1ad относительно родительских клеток THP-1 (A). Сети ББВ продуктов ДЭГ у клеток THP-1ad с повышенной (зеленый) (Б) и пониженной (синий) (В) экспрессией

активность факторов STAT3 и STAT6. Исследование наборов, содержащих гены с последовательностями, связывающими ТФ NF- κ B, показало, что наборы GGGNNTTTCC_NFKB_Q6_01, NFKB_Q6_01, NFKARPAВ_01, NFKB_Q6 и NFKARPAВ65_01 были достоверно ($FDR \leq 0.05$) обогащены и имели положительные показатели обогащения 0.524001, 0.485919, 0.477002, 0.458895 и 0.44804, соответственно, что указывает на выраженную NF- κ B-зависимую транскрипционную активность (рис. 2A–Г).

Известно, что регуляторные факторы интерферона IRF1 и IRF7 регулируют экспрессию интерферонов первого (α и β) и второго (γ) типов, выступающих в качестве индукторов воспаления при развитии опухолевых заболеваний [32–34]. Также известно, что ТФ STAT3 и STAT6 активируются при воспалении в опухолевом микроокружении, с активностью которых может быть связано усиление воспалительного ответа при прогрессии лейкозов [35–37]. Описана роль ТФ NF- κ B в формировании лейкозного микроокружения при стимуляции хронического воспаления в нише КМ под воздействием цитокина фактора некроза опухоли- α (ФНО α), что поддерживает благоприятную среду для выживания и продукции лейкозных клеток [38–40].

Таким образом, можно предположить, что в макрофагоподобных клонах THP-1ad конститутивно активны провоспалительные сигнальные пути, ассоциированные с ИФН α и ИФН γ , IL-6 и ФНО α . Также, полученные данные указывают на участие в реализации данных процессов ТФ IRF1, IRF7, STAT3, STAT6 и NF- κ B, известных модуляторов устойчивости опухолевых клеток.

Идентификация потенциальных генов-регуляторов TRAIL-резистентности макрофагоподобных клонов THP-1ad

С целью определения ДЭГ, продукты которых с наибольшей вероятностью могут выступать как регулирующие элементы идентифицируемых сигнальных путей в макрофагоподобных клонах THP-1ad из 21511 транскрибируемых генов, были отобраны 355 ДЭГ, соответствующих параметру $2 \leq \log_2(KI) \leq -2$. Идентификация отобранных ДЭГ показала повышенную экспрессию 286 генов и пониженную экспрессию 69 генов по сравнению с родительскими клетками THP-1 (рис. 3A).

Для идентификации взаимодействий между продуктами ДЭГ с помощью базы данных STRINGdb [41] были построены сети ББВ для ДЭГ с повышенной и пониженной экспрессией. Показано, что 167

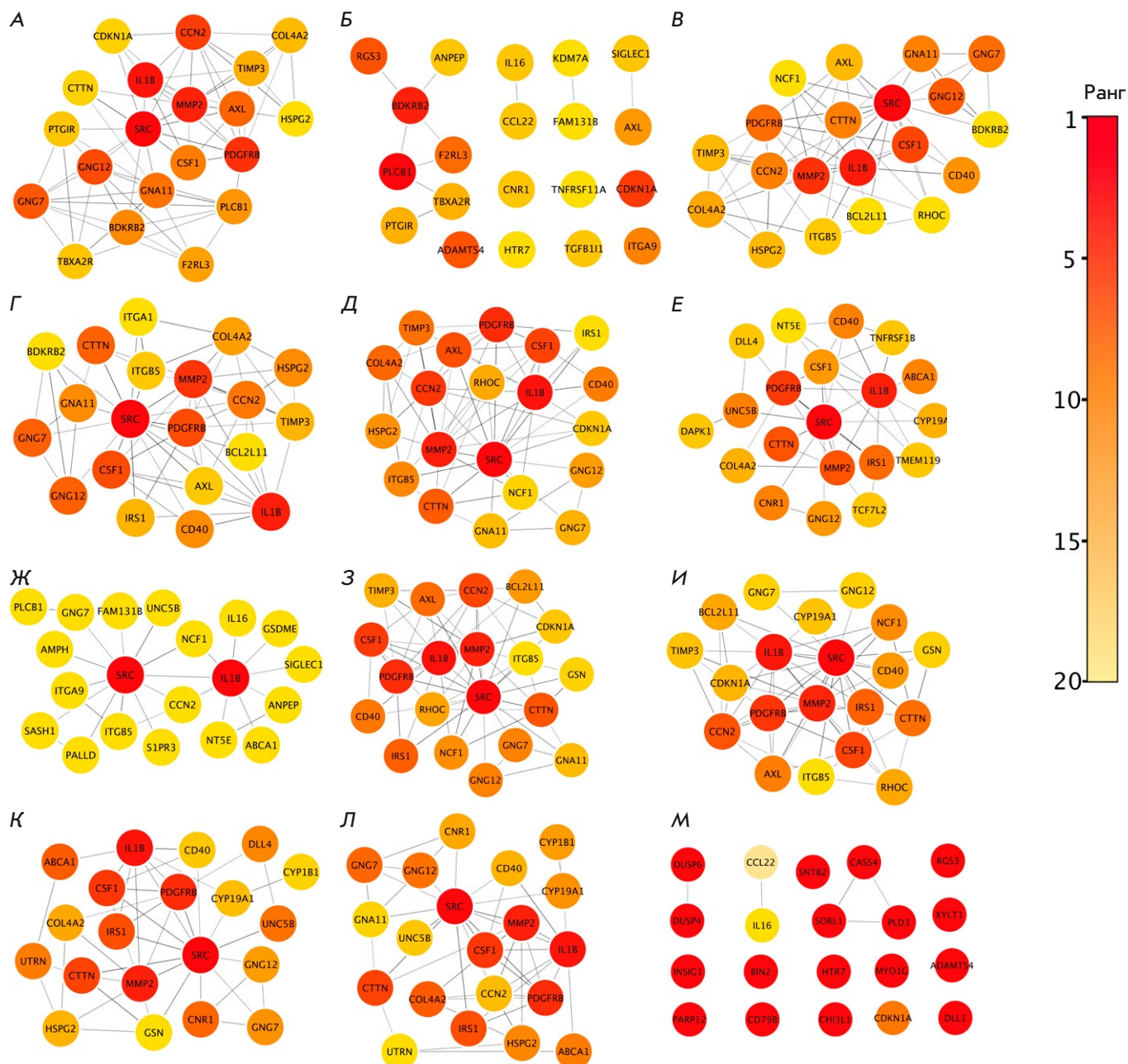


Рис. 4. Кластеризация сети БВВ генов с повышенной экспрессией с использованием алгоритмов модуля cytoHubba: MCC (А), DMNC (Б), MNC (В), Degree (Г), EPC (Д), BottleNeck (Е), EcCentricity (Ж), Closeness (З), Radiality (И), Betweenness (К), Stress (Л), ClusteringCoefficient (М)

из 286 генов с повышенной экспрессией образуют взаимосвязанную сеть (рис. 3В), тогда как только 8 из 69 генов с пониженной экспрессией образуют взаимосвязанную сеть (рис. 3В).

Далее мы проводили анализ сети БВВ только для ДЭГ с повышенной экспрессией ввиду того, что она содержала больше взаимосвязанных участников, чем сеть ДЭГ с пониженной экспрессией, что потенциально может вносить более выражен-

ный вклад в формирование TRAIL-резистентности у макрофагоподобных клонов ТНР-1ad. Затем мы анализировали сеть БВВ для ДЭГ с повышенной экспрессией. Среди генов с повышенной экспрессией в сети БВВ была произведена кластеризация с использованием подключаемого к программному обеспечению Cytoscape модуля cytoHubba [23]. Кластеризация производилась с использованием 12 доступных алгоритмов cytoHubba для иденти-

фикации наиболее вероятных генов-концентраторов, которые потенциально могут вносить наибольший вклад в формирование сети БВВ и тем самым являться вероятными мишенями для снижения TRAIL-резистентности у макрофагоподобных клонов THP-1ad. С помощью алгоритмов cytoHubba были выделены 20 генов, которые имеют наибольшее значение ранга в анализируемой сети БВВ. Ранг в сети БВВ показывает степень «важности» данного гена, и чем выше ранг (чем ближе к нулю), тем более значимым для формирования сети считается данный ген (рис. 4).

В представленных на рис. 4 кластерах сети БВВ были выбраны пять наиболее повторяющихся генов с наибольшим значением ранга, такие, как: *CSF1*, который кодирует макрофагальный колониестимулирующий фактор (М-КСФ), *PDGFRB*, кодирующий рецептор тромбоцитарного фактора роста (ТФР), *MMP2*, кодирующий матриксную металлопротеиназу 2, *SRC*, кодирующий нерецепторную тирозинкиназу SRC, и *IL1B*, кодирующий интерлейкин 1β (IL-1β). Роль продуктов идентифицируемых генов-концентраторов хорошо известна как при миелоидном созревании и провоспалительной активации клеток, так и в прогрессии ОМЛ. Известно, что М-КСФ является не только основным регулятором дифференцировки макрофагов, но и перспективной мишенью для терапии ОМЛ [42, 43]. Показано участие рецептора ТФР в миелоидном созревании лейкозных клеток и в активации протоонкогенных тирозинкиназ семейства SRC, а также в поддержании жизнеспособности и пролиферации опухолевых клеток [44–46]. Тирозинкиназы SRC являются своеобразными сигнальными интеграторами, необходимыми как для нормального гемопоэза, так и для прогрессии острых лейкозов [47, 48]. Роль IL-1β как в развитии воспалительных процессов, так и при развитии злокачественных новообразований достаточно хорошо известна. Например, хроническое воспаление, опосредованное IL-1β, часто ассоциировано с возникновением и прогрессией злокачественных опухолей, а также с непосредственной регуляцией дифференцировки миелоидных клеток и сигнальных путей, опосредующих выживание лейкозных клеток [49–51]. В свою очередь, матриксные металлопротеиназы участвуют в миграции миелоидных клеток, индуцированной воспалением, а их подавление существенно снижает жизнеспособность и пролиферацию клеток ОМЛ [52, 53].

Таким образом, идентифицированы наиболее вероятные гены-регуляторы сигнальных путей, активированных в макрофагоподобных клонах THP-1ad, такие, как *CSF1*, *PDGFRB*, *MMP2*, *SRC* и *IL1B*. Продукты идентифицированных генов могут слу-

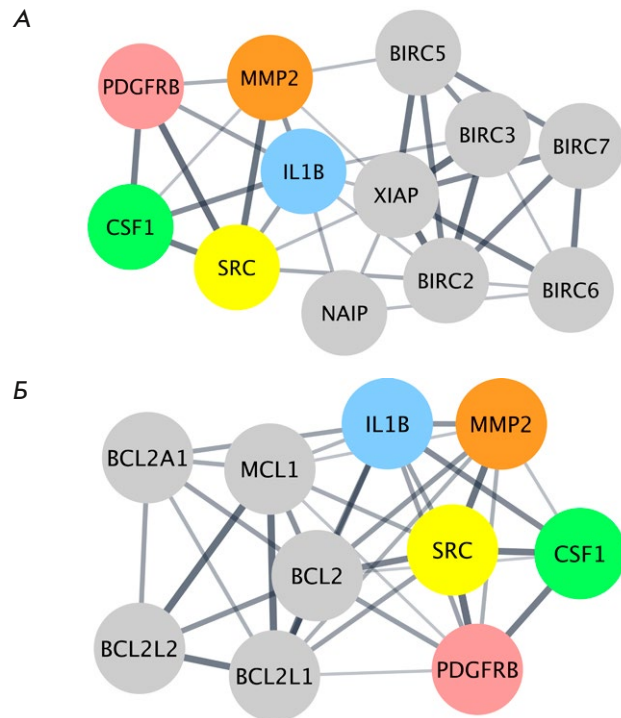


Рис. 5. Сети БВВ продуктов идентифицированных генов-концентраторов *IL1B*, *SRC*, *PDGFRB*, *MMP2* и *CSF1* с антиапоптотическими представителями семейств IAP (А) и BCL-2 (Б)

жить перспективными мишенями для подавления TRAIL-резистентности у макрофагоподобных клонов THP-1ad.

Исследование взаимодействия генов-концентраторов с представителями семейств IAP и BCL-2

Хорошо известно, что основными внутриклеточными позитивными регуляторами устойчивости клеток ОМЛ к TRAIL-индуцированному апоптозу являются представители семейств BCL-2 и IAP, блокирующие апоптоз как на уровне митохондрий, так и эффекторных каспаз [18, 54, 55]. Для определения потенциального взаимодействия идентифицированных генов-концентраторов с антиапоптотическими представителями семейств IAP и BCL-2 были построены сети БВВ.

Обнаружено, что среди пяти идентифицированных генов-концентраторов с представителями семейства IAP взаимодействуют только гены *MMP2* (партнеры *BIRC5* и *XIAP*), *IL1B* (партнеры *BIRC2*, *BIRC3*, *NAIP* и *XIAP*) и *SRC* (партнеры *BIRC2* и *XIAP*) (рис. 5А). В то же время с представителями семейства BCL-2 взаимодействуют все идентифицированные гены-концентраторы. Партнерами гена *IL1B* являются *BCL2*, *BCL2A1* и *MCL1*, партнера-

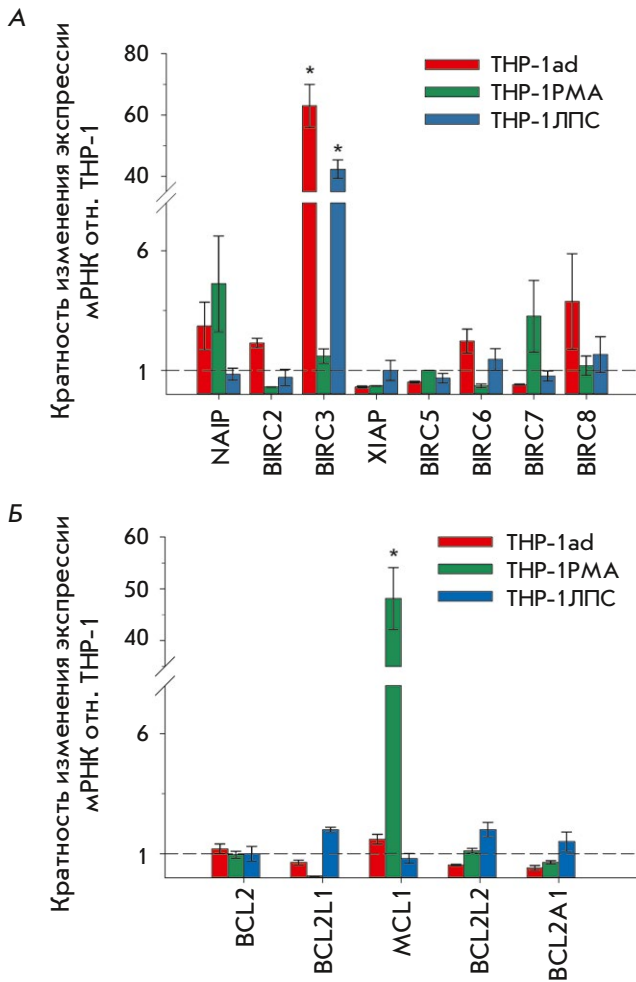


Рис. 6. Экспрессия генов семейства IAP (А) и BCL-2 (Б) в макрофагоподобных клонах THP-1ad, клетках THP-1PMA и THP-1ЛПС. Данные приведены в виде среднего значения \pm SD ($n \geq 5$). * $p \leq 0.05$ в сравнении с родительскими клетками THP-1

ми генов *SRC*, *PDGFRB* и *MMP2* выступают *BCL2*, *BCL2L1* и *MCL1*, а гена *CSF1* – *BCL2* (рис. 5Б). Таким образом, все идентифицированные гены-концентраторы могут взаимодействовать с антиапоптотическими представителями семейств IAP и BCL-2, что, в свою очередь, указывает на потенциальную возможность участия представителей данных семейств в механизме устойчивости макрофагоподобных клеток THP-1ad к TRAIL-индуцированной гибели.

Далее методом количественной ПЦР с обратной транскрипцией соотнесли экспрессию всех антиапоптотических членов семейства IAP и BCL-2 в макрофагоподобных клонах THP-1ad и в родительских клетках THP-1. Дополнительно экспрессию тех же генов оценили в клетках THP-1, обработанных фор-

боловым эфиром (THP-1PMA) и ЛПС (THP-1ЛПС), известными индукторами макрофагальной дифференцировки и активации провоспалительных сигнальных путей, соответственно [56, 57].

Показано, что в клетках THP-1ad достоверно ($p \leq 0.05$) увеличена (в 63 ± 7 раза) экспрессия только гена *BIRC3*, кодирующего белок cIAP2, – известный ингибитор каспаз 3, 7, 8 и 10 [58]. Схожие результаты получены для клеток THP-1ЛПС, где также достоверно ($p \leq 0.05$) увеличивалась (в 42 ± 3 раза) экспрессия только гена *BIRC3*. В клетках THP-1PMA достоверного увеличения экспрессии представителей семейства IAP не обнаружено (рис. 6А). Анализ экспрессии генов антиапоптотических белков семейства BCL-2 выявил достоверное ($p \leq 0.05$) увеличение (в 48 ± 6 раза) экспрессии гена *MCL1*, ингибитора проапоптотических белков Bax и Bak, только в клетках THP-1PMA (рис. 6Б) [59].

Таким образом, в макрофагоподобных клонах THP-1ad обнаружено характерное для провоспалительной активации увеличение экспрессии гена *BIRC3*, являющегося партнером гена-концентратора *IL1B*, что с наибольшей вероятностью указывает на ключевое участие данного гена-концентратора в повышении резистентности к TRAIL-индуцированной гибели.

Опубликованы данные об активации процессов воспаления в микроокружении костного мозга при ОМЛ [5, 6, 60] и о роли цитокина *IL1β* в прогрессии миелоидных лейкозов [51, 61, 62]. Кроме того, известно, что макрофагальная дифференцировка может сопровождаться повышением экспрессии белка cIAP2 [63]. Однако данные о возможном участии *IL-1β*-опосредованной провоспалительной активации в формировании устойчивости макрофагоподобных клеток ОМЛ к цитотоксическому TRAIL, потенциально реализуемой через повышение экспрессии *BIRC3*, получены нами впервые.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

С помощью транскриптомного анализа макрофагоподобных TRAIL-резистентных клонов клеток ОМЛ THP-1ad, которые были получены в модельных условиях провоспалительного микроокружения лейкозных клеток, показана высокая конститутивная активность внутриклеточных провоспалительных сигнальных путей, ассоциированных с ИФН α и ИФН γ , *IL-6* и ФНО α . Также определены наиболее вероятные ТФ, такие, как *IRF1*, *IRF7*, *STAT3*, *STAT6* и *NF-kB*, потенциально определяющие активацию данных сигнальных путей. При поиске потенциальных регуляторов выявленных провоспалительных сигнальных путей были идентифицированы наиболее вероятные участники этих путей, такие,

как *CSF1*, *PDGFRB*, *MMP2*, *SRC* и *IL1B*. Также выявлено, что в клетках ТНР-1аd на фоне провоспалительной активации повышается экспрессия гена *BIRC3*, кодирующего *cIAP2* – ингибитор эффекторных каспаз, что может опосредовать повышение устойчивости к цитотоксическому лиганду TRAIL. Важным результатом является обнаружение ключевого молекулярного участника – гена *IL1B*, потенциально связывающего процессы провоспалительной активации и формирования устойчивости к TRAIL

у макрофагоподобных клонов ТНР-1аd. Таким образом, мы полагаем, что механизм индукции формирования TRAIL-резистентности на фоне активации воспаления в макрофагоподобных клетках ОМЛ может заключаться в IL-1 β -ассоциированном, через NF-kB, повышении экспрессии ингибитора апоптоза *cIAP2*. ●

*Исследование выполнено в рамках
Государственного задания № 075-00224-24-01.*

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Short N.J., Rytting M.E., Cortes J.E. // *The Lancet*. 2018. V. 392. № 10147. P. 593–606.
- Kantarjian H., Kadia T., DiNardo C., Daver N., Borthakur G., Jabbour E., Garcia-Manero G., Konopleva M., Ravandi F. // *Blood Cancer J*. 2021. V. 11. № 2. P. 41.
- Récher C. // *Front. Oncol*. 2021. V. 11. P. 623952.
- Cook E.K., Luo M., Rauh M.J. // *Exp. Hematol*. 2020. V. 83. P. 85–94.
- Zhong F.-M., Yao F.-Y., Liu J., Zhang H.-B., Li M.-Y., Jiang J.-Y., Xu Y.-M., Yang W.-M., Li S.-Q., Zhang J., et al. // *Biosci. Rep*. 2022. V. 42. № 5. P. BSR20220647.
- Ellegast J.M., Alexe G., Hamze A., Lin S., Uckelmann H.J., Rauch P.J., Pimkin M., Ross L.S., Dharia N.V., Robichaud A.L., et al. // *Cancer Discov*. 2022. V. 12. № 7. P. 1760–1781.
- Lasry A., Nadorp B., Fornerod M., Nicolet D., Wu H., Walker C.J., Sun Z., Witkowski M.T., Tikhonova A.N., Guillaumot-Ruano M., et al. // *Nat. Cancer*. 2022. V. 4. № 1. P. 27–42.
- Mysore V., Tahir S., Furuhashi K., Arora J., Rosetti F., Cullere X., Yazbeck P., Sekulic M., Lemieux M.E., Raychaudhuri S., et al. // *J. Exp. Med*. 2022. V. 219. № 5. P. e20210562.
- Hernandez G., Mills T.S., Rabe J.L., Chavez J.S., Kuldaneck S., Kirkpatrick G., Noetzi L., Jubair W.K., Zanche M., Myers J.R., et al. // *Haematologica*. 2020. V. 105. № 3. P. 585–597.
- Maltby S., Hansbro N.G., Tay H.L., Stewart J., Plank M., Donges B., Rosenberg H.F., Foster P.S. // *J. Immunol*. 2014. V. 193. № 8. P. 4072–4082.
- Yoyen-Ermis D., Tunali G., Tavukcuoglu E., Horzum U., Ozkazanc D., Sutlu T., Buyukasik Y., Esendagli G. // *Sci. Rep*. 2019. V. 9. № 1. P. 11697.
- Van Galen P., Hovestadt V., Wadsworth Ii M.H., Hughes T.K., Griffin G.K., Battaglia S., Verga J.A., Stephansky J., Pastika T.J., Lombardi Story J., et al. // *Cell*. 2019. V. 176. № 6. P. 1265–1281.e24.
- Bottomly D., Long N., Schultz A.R., Kurtz S.E., Tognon C.E., Johnson K., Abel M., Agarwal A., Avaylon S., Benton E., et al. // *Cancer Cell*. 2022. V. 40. № 8. P. 850–864.e9.
- Montinaro A., Walczak H. // *Cell Death Differ*. 2023. V. 30. № 2. P. 237–249.
- Artykov A.A., Yagolovich A.V., Dolgikh D.A., Kirpichnikov M.P., Trushina D.B., Gasparian M.E. // *Front. Cell Dev. Biol*. 2021. V. 9. P. 733688.
- Di Cristofano F., George A., Tajiknia V., Ghandali M., Wu L., Zhang Y., Srinivasan P., Strandberg J., Hahn M., Sanchez Sevilla Uruchurtu A., et al. // *Biochem. Soc. Trans*. 2023. V. 51. № 1. P. 57–70.
- Кобякова М.И., Евстратова Я.В., Сенотов А.С., Ломовский А.И., Минайчев В.В., Звягина А.И., Соловьева М.Е., Фадеева И.С., Акатов В.С., Фадеев Р.С. // *Биол. мембраны*. 2021. V. 38. № 1. P. 61–70.
- Kobyakova M., Lomovskaya Y., Senotov A., Lomovsky A., Minaychev V., Fadeeva I., Shtatnova D., Krasnov K., Zvyagina A., Odinokova I., et al. // *Int. J. Mol. Sci*. 2022. V. 23. № 14. P. 7881.
- Lomovskaya Y.V., Kobyakova M.I., Senotov A.S., Lomovsky A.I., Minaychev V.V., Fadeeva I.S., Shtatnova D.Y., Krasnov K.S., Zvyagina A.I., Akatov V.S., et al. // *Biomolecules*. 2022. V. 12. № 2. P. 150.
- Ломовская Я.В., Кобякова М.И., Сенотов А.С., Фадеева И.С., Ломовский А.И., Краснов К.С., Штатнова Д.Ю., Акатов В.С., Фадеев Р.С. // *Биол. мембраны*. 2022. V. 39. № 6. P. 457–473.
- Dijk M.V., Murphy E., Morrell R., Knapper S., O'Dwyer M., Samali A., Szegedzi E. // *Cancers*. 2011. V. 3. № 1. P. 1329–1350.
- Subramanian A., Tamayo P., Mootha V.K., Mukherjee S., Ebert B.L., Gillette M.A., Paulovich A., Pomeroy S.L., Golub T.R., Lander E.S., et al. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2005. V. 102. № 43. P. 15545–15550.
- Chin C.-H., Chen S.-H., Wu H.-H., Ho C.-W., Ko M.-T., Lin C.-Y. // *BMC Syst. Biol*. 2014. V. 8. № S4. P. S11.
- Benjamini Y., Hochberg Y. // *J. R. Stat. Soc. Ser. B Methodol*. 1995. V. 57. № 1. P. 289–300.
- Liberzon A., Subramanian A., Pinchback R., Thorvaldsdóttir H., Tamayo P., Mesirov J.P. // *Bioinformatics*. 2011. V. 27. № 12. P. 1739–1740.
- Kopitar-Jerala N. // *Front. Immunol*. 2017. V. 8. P. 873.
- Hirano T. // *Int. Immunol*. 2021. V. 33. № 3. P. 127–148.
- Zelová H., Hošek J. // *Inflamm. Res*. 2013. V. 62. № 7. P. 641–651.
- Bae S., Park P.S.U., Lee Y., Mun S.H., Giannopoulou E., Fujii T., Lee K.P., Violante S.N., Cross J.R., Park-Min K.-H. // *Cell Rep*. 2021. V. 35. № 11. P. 109264.
- Liu L., Lu Y., Martinez J., Bi Y., Lian G., Wang T., Milasta S., Wang J., Yang M., Liu G., et al. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2016. V. 113. № 6. P. 1564–1569.
- Lee H.Y., Cha J., Kim S.K., Park J.H., Song K.H., Kim P., Kim M.-Y. // *Mol. Cancer Res*. 2019. V. 17. № 2. P. 544–554.
- Qing F., Liu Z. // *Front. Immunol*. 2023. V. 14. P. 1190841.
- Holicek P., Truxova I., Rakova J., Salek C., Hensler M., Kovar M., Reinis M., Mikyskova R., Pasulka J., Vosahlikova S., et al. // *Cell Death Dis*. 2023. V. 14. № 3. P. 209.
- Provance O.K., Lewis-Wambi J. // *Breast Cancer Res*. 2019. V. 21. № 1. P. 59.
- Huang B., Lang X., Li X. // *Front. Oncol*. 2022. V. 12. P. 1023177.
- Delgado-Ramirez Y., Ocaña-Soriano A., Ledesma-Soto Y., Olguín J.E., Hernandez-Ruiz J., Terrazas L.I., Leon-Cabrera S. // *Int. J. Mol. Sci*. 2021. V. 22. № 8. P. 4049.

37. Karpathiou G., Papoudou-Bai A., Ferrand E., Dumollard J.M., Peoc'h M. // *Pathol. - Res. Pract.* 2021. V. 223. P. 153477.
38. Di Francesco B., Verzella D., Capece D., Vecchiotti D., Di Vito Nolfi M., Flati I., Cornice J., Di Padova M., Angelucci A., Alesse E., et al. // *Cancers.* 2022. V. 14. № 14. P. 3557.
39. Zhang T., Ma C., Zhang Z., Zhang H., Hu H. // *MedComm.* 2021. V. 2. № 4. P. 618–653.
40. Zhang S., Yang X., Wang L., Zhang C. // *Oncol. Lett.* 2018. V. 16. № 1. P. 679–686.
41. Szklarczyk D., Gable A.L., Lyon D., Junge A., Wyder S., Huerta-Cepas J., Simonovic M., Doncheva N.T., Morris J.H., Bork P., et al. // *Nucleic Acids Res.* 2019. V. 47. № D1. P. D607–D613.
42. Jones C.V., Ricardo S.D. // *Organogenesis.* 2013. V. 9. № 4. P. 249–260.
43. Sletta K.Y., Castells O., Gjertsen B.T. // *Front. Oncol.* 2021. V. 11. P. 654817.
44. Shah K., Vincent F. // *Mol. Biol. Cell.* 2005. V. 16. № 11. P. 5418–5432.
45. Reiterer G., Yen A. // *Cancer Res.* 2007. V. 67. № 16. P. 7765–7772.
46. Pandey P., Khan F., Upadhyay T.K., Seungjoon M., Park M.N., Kim B. // *Biomed. Pharmacother.* 2023. V. 161. P. 114491.
47. Voisset E., Brenet F., Lopez S., De Sepulveda P. // *Cancers.* 2020. V. 12. № 7. P. 1996.
48. Patel R.K., Weir M.C., Shen K., Snyder D., Cooper V.S., Smithgall T.E. // *PloS One.* 2019. V. 14. № 12. P. e0225887.
49. Mon N.N., Senga T., Ito S. // *Oncol. Lett.* 2017. V. 13. № 2. P. 955–960.
50. Liu S.T., Pham H., Pandol S.J., Ptaszniak A. // *Front. Physiol.* 2014. V. 4. P. 416.
51. Arranz L., Arriero M.D.M., Villatoro A. // *Blood Rev.* 2017. V. 31. № 5. P. 306–317.
52. Chou J., Chan M.F., Werb Z. // *Microbiol. Spectr.* 2016. V. 4. № 2. P. 4.2.18.
53. Pirillo C., Birch F., Tissot F.S., Anton S.G., Haltalli M., Tini V., Kong I., Piot C., Partridge B., Pospori C., et al. // *Blood Adv.* 2022. V. 6. № 10. P. 3126–3141.
54. Saraei R., Soleimani M., Movassaghpour Akbari A.A., Farshdousti Hagh M., Hassanzadeh A., Solali S. // *Biomed. Pharmacother.* 2018. V. 107. P. 1010–1019.
55. Hao X.-S., Hao J.-H., Liu F.-T., Newland A.C., Jia L. // *Apoptosis.* 2003. V. 8. № 6. P. 601–607.
56. Chanput W., Mes J.J., Wichers H.J. // *Int. Immunopharmacol.* 2014. V. 23. № 1. P. 37–45.
57. Page M.J., Kell D.B., Pretorius E. // *Chronic Stress.* 2022. V. 6. P. 247054702210763.
58. Mohamed M.S., Bishr M.K., Almutairi F.M., Ali A.G. // *Apoptosis.* 2017. V. 22. № 12. P. 1487–1509.
59. Sancho M., Leiva D., Lucendo E., Orzáez M. // *FEBS J.* 2022. V. 289. № 20. P. 6209–6234.
60. Lasry A., Nadorp B., Fornerod M., Nicolet D., Wu H., Walker C.J., Sun Z., Witkowski M.T., Tikhonova A.N., Guillaumot-Ruano M., et al. // *Nat. Cancer.* 2023. V. 4. № 1. P. 27–42.
61. Wang Y., Sun X., Yuan S., Hou S., Guo T., Chu Y., Pang T., Luo H.R., Yuan W., Wang X. // *Cytotherapy.* 2020. V. 22. № 3. P. 127–134.
62. Carey A., Edwards D.K., Eide C.A., Newell L., Traer E., Medeiros B.C., Pollyea D.A., Deininger M.W., Collins R.H., Tyner J.W., et al. // *Cell Rep.* 2017. V. 18. № 13. P. 3204–3218.
63. Morón-Calvente V., Romero-Pinedo S., Toribio-Castelló S., Plaza-Díaz J., Abadía-Molina A.C., Rojas-Barros D.I., Beug S.T., LaCasse E.C., MacKenzie A., Korneluk R., et al. // *PLoS One.* 2018. V. 13. № 3. P. e0193643.

УДК 577.21

Метод получения рекомбинантных VSV с подтверждением биологической активности

В. Д. Мороз^{1#*}, Н. Б. Гасанов^{1#*}, А. Д. Егоров¹, А. С. Малоголовкин^{1,2}, М. О. Нагорных¹, Е. Н. Субчева¹, Е. С. Колосова¹, А. Ю. Физикова¹, Р. А. Иванов¹, А. В. Карабельский¹

¹Научно-технологический университет «Сириус», Краснодарский край, пгт Сириус, 354340 Россия

²Первый Московский государственный медицинский университет им. И.М. Сеченова Минздрава России, Сеченовский университет, Москва, 119435 Россия

Авторы внесли равный вклад в работу.

*E-mail: moroz.vd@talantiuspeh.ru; gasanov.nb@talantiuspeh.ru

Поступила в редакцию 01.11.2023

Принята к печати 30.01.2024

DOI: 10.32607/actanaturae.27314

РЕФЕРАТ Создание новых эффективных средств лечения опухолей является перспективным и актуальным направлением трансляционной медицины. Онколитические вирусы способны индуцировать иммуногенную клеточную смерть, активируя иммунную систему организма для распознавания злокачественной опухоли. В данной работе представлены результаты оптимизации метода получения рекомбинантных вирусов везикулярного стоматита. Для сборки вирусных частиц получена клеточная линия НЕК293ТН-Т7, стабильно экспрессирующая ДНК-зависимую РНК-полимеразу Т7 для экспрессии вирусного генома, а также получены хелперные плазмиды, кодирующие вирусные гены под контролем СAG-промоторов. Онколитическую активность очищенного препарата модельного вируса определяли на клетках меланомы мыши В16F10Red, экспрессирующих красный флуоресцентный белок. Предложенный метод позволяет получать очищенный вирусный препарат с высоким титром и с онколитической активностью; благодаря амплификации вирусных частиц в суспензионной культуре клеток НЕК293, легко масштабируется и может в дальнейшем использоваться для получения других рекомбинантных онколитических вирусов на основе вируса везикулярного стоматита для иммунотерапии злокачественных опухолей.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА VSV, онколитические вирусы, онкологические заболевания, меланома, рекомбинантный вирус везикулярного стоматита.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ VSV – вирус везикулярного стоматита; rVSV – рекомбинантный вирус везикулярного стоматита; GFP – зеленый флуоресцентный белок; ЦПД – цитопатическое действие; MOI (англ. multiplicity of infection) – множественность заражения; ЦФ – центрифугирование; УЦФ – ультрацентрифугирование; TCID₅₀/мл – тканевая инфицирующая доза вируса; RFP – красный флуоресцентный белок.

ВВЕДЕНИЕ

Онколитические вирусы уже долгое время рассматриваются как возможные противоопухолевые средства. В настоящее время разработка новых онколитических вирусов является одним из приоритетных направлений иммунотерапии опухолей. По последним данным ведется более 200 клинических исследований безопасности и эффективности препаратов на основе онколитических вирусов [1, 2]. РНК-содержащий вирус везикулярного стоматита (VSV) эффективно инфицирует разные типы клеток животных и человека, не будучи патогенным для человека. Низкая вирулентность, быстрый

цикл репликации в цитоплазме (без интеграции в геном), возможность получения высокого титра при наработке VSV в культурах клеток млекопитающих (ВНК-21, НЕК293), возможность генетической модификации и отсутствие в человеческой популяции нейтрализующих антител сделали VSV идеальным кандидатом для получения вирусных вакцин, векторов доставки трансгена и онколитических вирусов [3–5]. Сборка rVSV, например rVSV-dG-GFP, включает этап трансфекции клеток ВНК-21 пятью плазмидами и коинфекцию клеток вирусом осповакцины (VV) или иным вирусом, экспрессирующим ДНК-зависимую РНК-полимеразу

T7 (T7-РНК-полимераза) [6]. При этом при получении биотехнологических продуктов, которые предполагается использовать в качестве лекарственных препаратов, необходимо минимизировать число вспомогательных вирусов, в частности репликативно-активных, поскольку они могут быть источниками вирусной контаминации. Кроме того, готовая лекарственная форма не должна содержать остатков VV или иных вирусов [7]. В современной литературе крайне мало источников с полным и подробным описанием всех этапов получения, очистки, концентрирования и проверки функциональной активности онколитических вирусов на основе VSV для дальнейшего проведения научных исследований. В настоящей работе разработан метод получения очищенного препарата репликативно-активного модельного rVSV, кодирующего зеленый флуоресцентный белок (rVSV-dM51-GFP), без использования вспомогательного вируса.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Плазмиды и генетическая инженерия

Для клонирования использовали коммерческие плазмиды: pBS-N-ФТ-Kan (cat# EH1013, Kerafast, США), pBS-P-ФТ-Amp (cat# EH1014, Kerafast), pBS-L-ФТ-Amp (cat# EH1015, Kerafast), pBS-G-ОТ-Kan (cat# EH1016, Kerafast), pCAGGS-G-Kan (cat# EH1017, Kerafast), pVSV-dG-GFP 2.6 (cat# EH1026, Kerafast), а также плазмиду: pCAG-T7pol (cat# 59926, Addgene). Для амплификации плазмид использовали штаммы *Escherichia coli* (DH5-alpha, NEB® Stable (cat# C3040H, NEB, Англия)). Генетическую трансформацию, гидролиз эндонуклеазами рестрикции, лигирование, гель-электрофорез и выделение ДНК проводили согласно стандартным протоколам и рекомендациям производителей ферментов [8]. Для выделения ДНК использовали коммерческие наборы (кат. # BC021L, кат. # BC124, ЗАО «Евроген» (Россия)). Направленный мутагенез гена *VSVN*, кодирующего белок *VSVN*, проводили с использованием инвертированной ПЦР на матрице pVSV-dG-GFP 2.6 (cat# EH1026, Kerafast) и специфичными праймерами: прямой GACACCTATGATCCGAATCAATTAAGAT-ATGAGA; обратный CTCGTCAACTCCAAAATAGGATTTGTC-AATTGGA.

В полученную после мутагенеза плазмиду pVSV-dG-dM51-GFP по сайтам узнавания эндонуклеаз рестрикции *NheI/XbaI* клонировали ген *VSVG* из плазмиды pCAGGS-G-Kan и получали плазмиду pVSV-dM51-GFP, необходимую для сборки ре-

пликативно-активного rVSV-dM51-GFP. Для получения хелперных плазмид с CAG-промотором (pCAG-VSVL, pCAG-VSVN, pCAG-VSVP) в плазмиду pCAG-T7pol по *XbaI/NotI*-сайтам рестрикции клонировали последовательности гена *L*, гены *N* и *P* клонировали по *EcoRI/NotI*-сайтам. Амплификацию генов проводили с использованием специфичных праймеров, а в качестве матрицы для амплификации генов *VSVN*, *VSVP* и *VSVL* использовали плазмиды pBS-N-ФТ-Kan, pBS-P-ФТ-Amp, pBS-L-ФТ-Amp соответственно. Правильность сборки векторов проверяли секвенированием по Сэнгеру на ABI 3500 Genetic Analyzer (Applied Biosystems, США) при стандартных условиях и с использованием реагентов, рекомендованных производителем.

Получение клеточных линий HEK293TN-T7 и ВНК-21-T7

Ген T7-RNApol, кодирующий T7-РНК-полимеразу, клонировали в ретровирусный вектор pBabe-bleo (Plasmid #176) по *BamHI/SalI*-сайтам рестрикции, корректность сборки вектора pBabe-bleo подтверждали рестрикционным анализом и секвенированием по Сэнгеру.

Для получения ретровируса полученной плазмидой трансфицировали клетки Phoenix-AMPHO (CRL-3213 – ATCC) с использованием Lipofectamine® 3000 (cat# L3000015, Thermo Fisher Scientific) согласно рекомендациям производителя. Клетки HEK293TN и ВНК-21 заражали культуральной жидкостью с полученным ретровирусом (3 раза каждые 12 ч). Селекцию проводили в течение недели на зеоцине 100 мкг/мл (cat# R25005, Invitrogen by Thermo Fisher Scientific). Выжившие клетки пересевали, через 2 недели после начала селекции проводили скрининг отдельных колоний по наличию встройки гена T7-RNApol в геноме клеток с использованием ПЦР и специфичных праймеров. Для дальнейшей работы отбирали по одному клону клеток HEK293TN-T7 и ВНК-21-T7, активность T7-РНК-полимеразы в которых подтверждали, определяя уровень люминесценции с использованием набора Luciferase Assay System (Promega, США). Для этого проводили трансфекцию клеток следующими векторами экспрессии: плазмидами pEGFPN3 (cat# 632515, Clontech), плазмидой pSmart_5'-Mod-FFLuc-3'-Mod [9], плазмидами pCAG-T7pol и pSmart_5'-Mod-FFLuc-3'-Mod (положительный контроль).

Получение и амплификация rVSV-dM51-GFP

Для сборки rVSV-dM51-GFP клетки HEK293TN-T7 в лунках 12-луночного планшета при достижении 80–85% конфлюентности трансфицировали плазмидами pCAG-VSVN, pCAG-VSVP, pCAG-VSVL,

pCAGGS-G и pVSV-dM51-GFP в соотношении 3:5:1:4:8, соответственно, с использованием PEI (соотношение 5:1) и суммарным количеством ДНК (10.5 мкг). Культуральную жидкость, полученную через 72 ч после трансфекции, использовали для последующей амплификации вируса в адгезионных клетках ВНК-21 (cat# 85011433, ECACC General Collection) и в суспензионных клетках НЕК293, растущих на бессывороточной среде (BalanCD НЕК293, Irvine Scientific). Добавляли вирусосодержащие супернатанты ($MOI = 10^{-4}$), полученные после ЦФ (3000 *g*) культуральной жидкости, полученной на предыдущих этапах наработки препарата rVSV-dM51-GFP, и инкубировали клетки в течение 72 ч. Отбирали культуральную жидкость на всех этапах наработки вируса, ЦФ (3000 *g*) и хранили при -80°C , или использовали сразу для повторной трансдукции или выделения, очистки, исследования вируса и пр. После амплификации вирусов в клетках НЕК293 вирусосодержащие супернатанты фильтровали через 0.45-мкм фильтры и концентрировали (300 кДа, Vivaspin 6, VS0651, Sartorius) в 100–200 раз с переводом в стандартный фосфатно-солевой буфер (PBS) с рН 7.4 для хранения, очистки или анализа.

Очистка rVSV-dM51-GFP методом ультрацентрифугирования

Для очистки и концентрирования препарата rVSV-dM51-GFP методом УЦФ на первом этапе проводили первичную очистку, осаждение вирусных частиц через «сахарозную подушку», представляющую собой раствор 20% сахарозы в буфере HEN (10 mM HEPES рН 7.4, 1 mM EDTA, 100 mM NaCl). В пробирки для УЦФ (cat# 344061, Beckman Coulter) перенесли супернатант с вирусом и вносили под слой супернатанта 4 мл раствора 20% сахарозы. Проводили УЦФ при 120 000 *g* в течение 1 ч при 4°C , удаляли надосадочную жидкость, осадок ресуспендировали в 500 мкл буфера ET (1 mM Tris-HCl, рН 7.5, 1 mM EDTA, 10% ДМСО) и инкубировали в течение 2 ч при 4°C . Далее проводили 2 этап УЦФ в ступенчатом градиенте плотности сахарозы в буфере HEN с тремя различными плотностями (25, 45, 60%), ЦФ при 130 000 *g* и 4°C в течение 16 ч. Отбирали полосу на границе 25 и 45% растворов. На 3 этапе полученный образец разводили в стандартном PBS (рН 7.4) в 12 раз, ЦФ при 120 000 *g* и 4°C в течение 1 ч. Осадок, содержащий очищенную фракцию препарата, растворяли в необходимом объеме PBS (рН 7.4).

Анализ образцов препарата rVSV-dM51-GFP методом электронной микроскопии

Использовали сканирующий электронный микроскоп Crossbeam 550 (Carl Zeiss, Германия) в режиме

просвечивающей электронной микроскопии (STEM). Образец наносили на предварительно обработанные плазмой воздуха в течение 10 с медные сетки (formvar/carbon (200 mesh), cat#BZ31022a, EMCN, Китай) с помощью установки плазменной очистки Zepto (Diener Electronic), инкубировали в течение 2 мин, далее сетку промывали бидистиллированной водой и контрастировали 1% водным раствором уранилацетата (cat#0379, Polysciences Inc.) 1 мин. Полученные сетки с образцом высушивали на воздухе при комнатной температуре. Съемку проводили при ускоряющем напряжении 30 кВ.

Анализ образцов препарата rVSV-dM51-GFP

Анализ белкового состава образцов проводили с помощью электрофореза в полиакриламидном геле (ПААГ) в денатурирующих условиях с использованием додецилсульфата натрия (ДСН-ПААГ) по стандартному протоколу [10]. Расчет титра ($TCID_{50}/\text{мл}$) препарата rVSV-dM51-GFP осуществляли по методу Рида–Менча [11].

Получение клеточной линии B16F10red

Клеточную линию B16F10Red получали на основе культуры клеток меланомы мыши B16F10 из коллекции опухолевых штаммов ФГБУ «РОИЦ им. Н.Н. Блохина» (3-й пассаж), полученную из мыши линии C57BL/6. Клетки B16F10 трансдуцировали вирусными частицами, которые содержатся в культуральной среде НЕК293TN, трансфицированных плазмидами pMD2.G (cat# 12259, Addgene), pMDLg/pRRE (cat# 12251, Addgene) pRSV-REV (cat# 12253, Addgene) и плазмидой, кодирующей слитый белок Н2В-Katushka2 под промотором EF1a. Выжившие в селективной среде клетки пересеивали в культуральный флакон площадью 25 cm^2 и отбирали колонии, имеющие наиболее яркую флуоресценцию репортера Н2В-Katushka2. Интенсивность флуоресценции в полученной сублинии B16F10Red детектировали с помощью микроскопа с флуоресцентным модулем (Carl Zeiss Axio Vert.A1).

Мониторинг количества B16F10Red-клеток с помощью IncuCyte S3

Для изучения динамики изменения количества флуоресцирующих клеток B16F10Red после заражения вирусными частицами с разными разведениями препарата rVSV-dM51-GFP клетки инкубировали в течение 84 ч согласно рекомендациям производителя с использованием системы прижизненного клеточного анализа IncuCyte S3, измеряющего количества флуоресцирующих клеток каждые 2 ч.

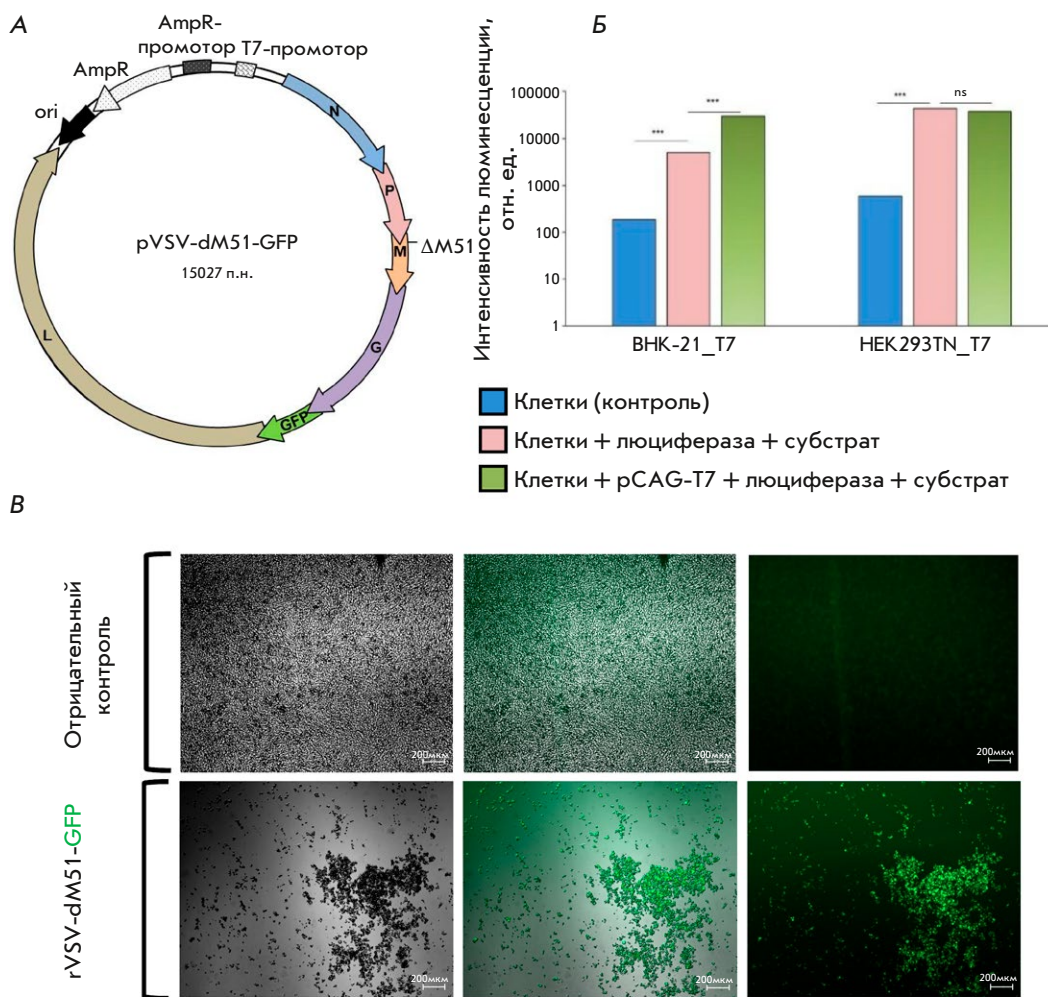


Рис. 1. Сборка вирусных частиц rVSV-dM51-GFP. **А** – карта плазмиды с геном вируса для сборки rVSV-dM51-GFP. Отмечены мутация dM51 и гены, кодирующие белки rVSV-dM51-GFP, включая встроенный ген VSVG; **Б** – уровень люминесценции в клетках HEK293TN-T7 и БНК-21-T7; **В** – микрофотографии клеток HEK293TN-T7 через 72 ч после трансфекции (верхняя строка – отрицательный контроль трансфекции со всеми плазмидами для сборки rVSV-dM51-GFP без коровой плазмиды, кодирующей геном вируса (pCAG-VSVL, pCAG-VSVN и pCAG-VSVP), нижняя строка – трансфекция со всеми плазмидами (pCAG-VSVL, pCAG-VSVN, pCAG-VSVP и pVSV-dM51-GFP), необходимыми для сборки rVSV-dM51-GFP

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Классический метод сборки rVSV включает трансфекцию клеток БНК-21 пятью плазмидами, экспрессирующими отдельные гены и полный геном VSV, и коинфекцию клеток вирусом осповакцины или иным вирусом, экспрессирующим Т7-РНК-полимеразу, необходимую для сборки rVSV [6]. Использование отдельных вирусов, экспрессирующих Т7-РНК-полимеразу для сборки rVSV, имеет ряд недостатков, которые были упомянуты выше. Котрансфекция клеток плазмидами для сборки rVSV и плазмидой, кодирующей ген Т7-РНК-полимеразы, позволяет обойтись без нежелательного использования желперного вируса на этапе сборки rVSV. Использование дополнительной плазмиды в трансфекции увеличивает ДНК-нагрузку на клетки, что может иметь токсический эффект и негативно отразиться на сборке вируса. Поэтому нами были получены клеточные линии HEK293TN-T7 и БНК-21-T7, экспрессирующие Т7-РНК-полимеразу. Для проверки эффективности экс-

прессии полимеразы измеряли интенсивность люминесценции клеток после трансфекции с плазмидой с геном люциферазы светлячка под промотором Т7-РНК-полимеразы. Показано, что уровень экспрессии люциферазы под промотором Т7-РНК-полимеразы в клетках HEK293TN-T7 достигает уровня в положительном контроле (клетки после трансфекции плазмидой с геном Т7-РНК-полимеразы), но при этом превышает уровень в клетках БНК-21-T7 (рис. 1Б). Поэтому в дальнейшей работе для сборки вирусных частиц модельного rVSV использовали клеточную линию HEK293TN-T7. В качестве модельного вируса для отработки оптимизированной методики получения очищенных препаратов rVSV мы использовали rVSV-dM51-GFP с делецией метионина в 51 позиции белка М VSV (dM51). Известно, что rVSV с данной делецией при попадании в здоровые клетки не подавляет экспрессию интерферонов, что делает такую модификацию полезной с точки зрения безопасности терапевтических препаратов на основе rVSV [12].

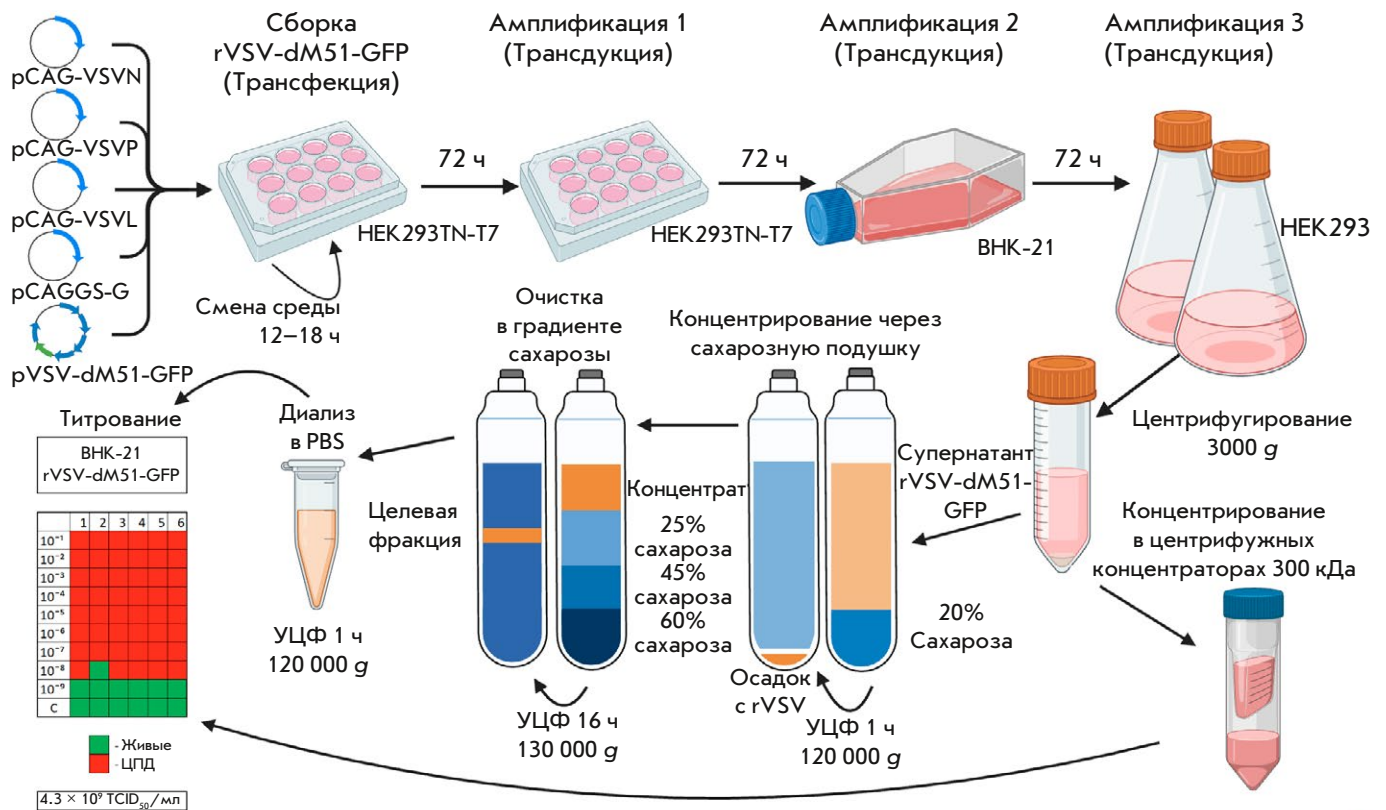


Рис. 2. Схема наработки очищенного препарата rVSV-dM51-GFP в адгезионных и суспензионных культурах клеток

Также геном модельного вируса содержит ген VSVG, кодирующий гликопротеин оболочки, необходимый для проникновения вируса в клетки, что делает его репликативно-активным, а также избавляет от необходимости предварительной трансфекции клеточных культур плазмидой с геном VSVG при наработке вирусных препаратов [6, 13]. Для внесения модификаций в геном модельного вируса мы получили плазмиду pVSV-dM51-GFP с делецией dM51 и геном VSVG (рис. 1А). Эту плазмиду использовали для трансфекции на этапе сборки вируса вместе с хелперными плазмидами (pCAG-VSVL, pCAG-VSVN, pCAG-VSVP). Для повышения эффективности этапа сборки модельного rVSV-dM51-GFP мы также сконструировали хелперные плазмиды с CAG-промотором, ориентируясь на данные об использовании этого промотора для сборки rVSV [14], а также на данные, согласно которым CAG-промотор усиливает синтез белка в клетках HEK293F [15]. Чаще всего rVSV нарабатывают в клетках BHK-21 или Vero [16], однако rVSV-dM51-GFP эффективно собирался только в клетках HEK293TN-T7 (рис. 1В). Однако в клетках BHK-21-T7, а также в BHK-21 и Vero-76, трансфицированных с использованием дополнительной плазмиды pCAG-T7pol, мы не наблюдали ни GFP-сигнала, ни ЦПД.

В эффективном варианте сборки rVSV-dM51-GFP соотношение плазмид для трансфекции клеток HEK293TN-T7 отличалось от опубликованных ранее протоколов [6, 14], когда как при соотношениях плазмид, использованных, например, в статье Витта [6], GFP-сигнал и ЦПД были на уровне отрицательного контроля (данные не приведены, так как совпадали с отрицательным контролем как на рис. 1В). Можно предположить, что соотношения плазмид, оптимальные для сборки вирусных частиц модельного вируса rVSV-dM51-GFP, в разных условиях могут отличаться, поэтому, когда rVSV не собирается, можно изменить соотношение плазмид и выбрать оптимальное в данных условиях. В связи с отсутствием полных протоколов цикла наработки rVSV, в этой работе мы приводим метод, подробно описывающий все этапы наработки очищенного препарата модельного вируса rVSV с этапами определения титра и оценки онколитической активности (рис. 2–4).

Наробка препарата в суспензионной культуре значительно облегчает процесс масштабирования технологического процесса и упрощает процесс масштабирования лабораторной технологии до объемов промышленных биореакторов и, соответственно, процедуру наработки промышленных серий rVSV

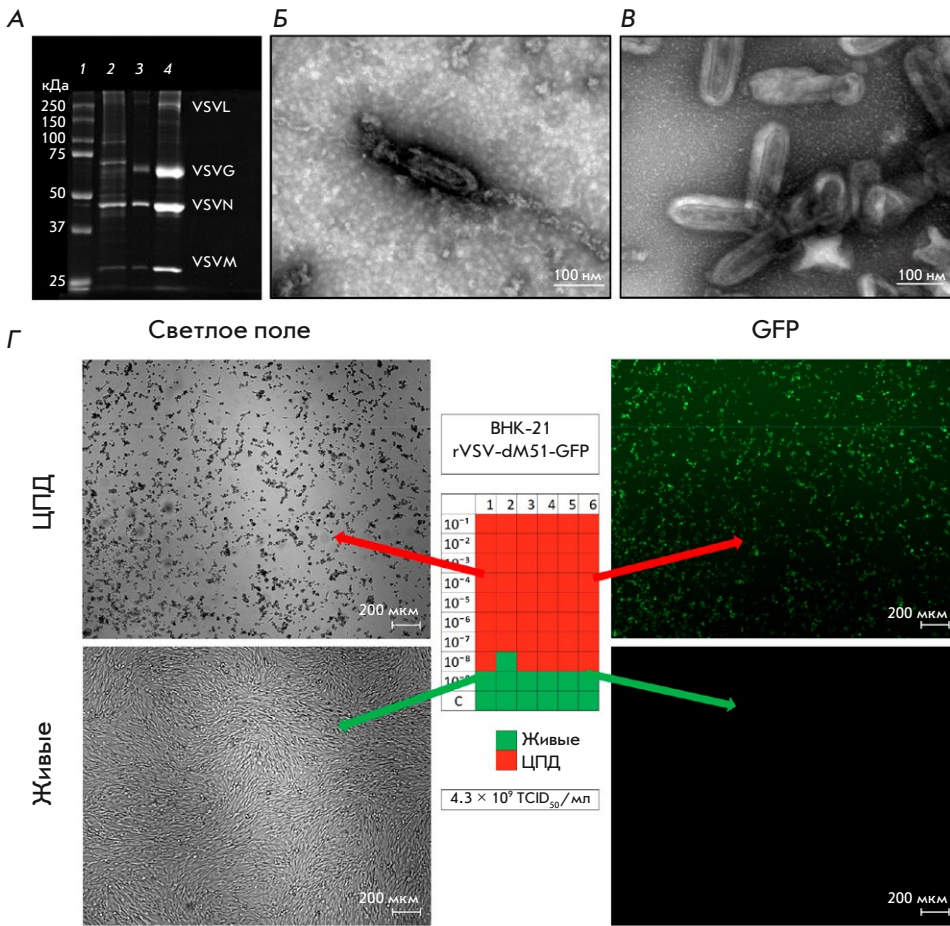


Рис. 3. Анализ препарата rVSV-dM51-GFP. А – электрофорез в ПААГ (слева направо): 1 – маркер молекулярной массы белков (10–250 кДа), 2 – супернатант после ЦФ (3000 g) культуральной жидкости с rVSV-dM51-GFP, 3 – образец фракции с rVSV-dM51-GFP после 2 этапа УЦФ, 4 – образец очищенного препарата rVSV-dM51-GFP после 3 этапа УЦФ; Б – STEM-микротография образца препарата rVSV-dM51-GFP до очистки методом УЦФ, увеличение 130 000; В – STEM-микротография образца препарата rVSV-dM51-GFP после очистки путем УЦФ, увеличение 130 000; Г – расчет TCID₅₀ на клетках BHK-21 с фотографиями клеток при наличии (сверху) и отсутствии (снизу) ЦПД

[17]. Использование на этапе культивирования бесывороточной среды, как в случае суспензионной культуры HEK293, делает необязательной проверку препарата на содержание компонентов животного происхождения [18]. Оптимизация процесса культивирования HEK293, например, использование культуральных подпиток может значительно увеличить титр вируса [17]. Для очистки препарата rVSV-dM51-GFP от примесей, ингибирующих частиц и концентрирования мы проводили трехступенчатую очистку образцов с использованием УЦФ в градиенте плотности сахарозы (рис. 2). Процесс очистки состоял из этапов концентрирования вирусных частиц, очистки в градиенте плотности сахарозы с последующим выделением и диализом целевой фракции вирусов в PBS (pH 7.4). В аналогичных вариантах очистки VSV порядок этапов варьирует, например, этап концентрирования через так называемую «сахарозную подушку» может быть завершающим [19] или отсутствовать [20]. В данной работе мы центрифугировали культуральную жидкость, содержащую rVSV-dM51-GFP, через 20% сахарозу, чтобы не только сконцентрировать образец, но и предварительно очистить его от части

примесей и тем самым увеличить эффективность следующего 2 этапа очистки в градиенте плотности сахарозы. На 2 этапе УЦФ мы использовали следующие концентрации сахарозы: 25%, 45% и 60% [21]. Завершающим этапом очистки был диализ в PBS (pH 7.4) посредством переосаждения с помощью УЦФ (рис. 2). Проведение УЦФ может привести к потере и повреждению вирусных частиц и, соответственно, к снижению титра препарата. Чтобы проверить титр и чистоту препаратов rVSV-dM51-GFP, полученных по предложенной нами схеме (рис. 2), образцы анализировали с помощью ДСН-ПААГ, TCID₅₀ и STEM (рис. 3). Изменение яркости полос, соответствующих пяти белкам rVSV, в ДСН-ПААГ [22, 23] и исчезновение полос неспецифических примесей указывают на повышение концентрации препарата на каждом этапе очистки (рис. 3А).

Анализ образцов препаратов методом STEM также показал, что после УЦФ препарата rVSV-dM51-GFP количество вирусных частиц в поле видимости возрастает, а количество примесей снижается (рис. 3Б,В). Чтобы проверить, насколько вирусные частицы сохраняют при этом жизнеспособность, мы определили титры препа-

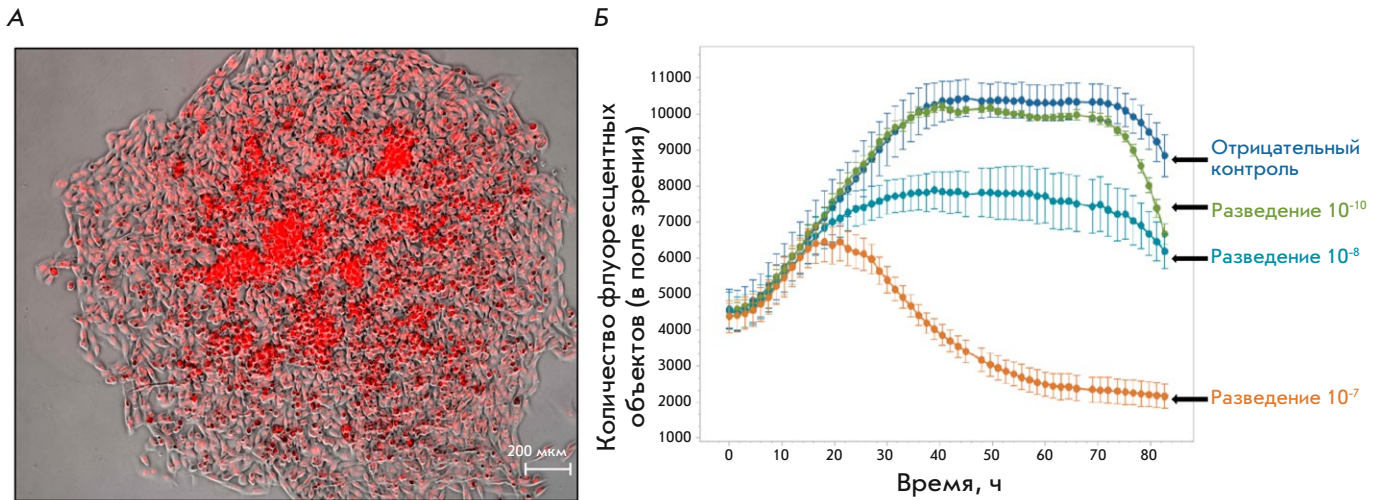


Рис. 4. Зависимость доза–эффект препарата rVSV-dM51-GFP на клетках линии B16F10Red. А – микрофотографии клеток полученной линии B16F10Red; Б – динамика изменения ЦПД на клетках линии B16F10Red после добавления препарата rVSV-dM51-GFP в разных разведениях

ратов rVSV-dM51-GFP до и после УЦФ, используя определение TCID₅₀ как метод, определяющий именно количество инфекционных вирусных частиц, обладающих цитопатическим действием [11]. В подтверждение данным, полученных методами ДСН-ПААГ-электрофореза и STEM, титр rVSV-dM51-GFP в супернатантах до концентрирования (2×10^8 TCID₅₀/мл) был ниже, чем после очистки и концентрирования препарата с помощью УЦФ (4.3×10^9 TCID₅₀/мл) (рис. 3Г). Кроме проведения качественного и количественного анализа нами были также проверены онколитические свойства и зависимость доза–эффект полученного данным методом препарата модельного rVSV на клеточной линии меланомы мыши B16F10 (рис. 4Б), которая часто используется для оценки терапевтических свойств различных препаратов, включая онколитические вирусы, в том числе и для проведения исследований *in vivo* [24–26]. Визуализация живых клеток при помощи флуоресцентных белков позволяет контролировать рост раковых клеток как в *in vitro*, так и в *in vivo*, что в свою очередь дает возможность оценивать терапевтический эффект противоопухолевых препаратов. Для оценки зависимости доза–эффект *in vitro* мы получили клеточную линию B16F10, экспрессирующую RFP (B16F10Red) (рис. 4А), и использовали метод прижизненного мониторинга количества клеток с помощью IncuCyte S3 (рис. 4Б). В вариантах без добавления препарата и в вариантах с добавлением препарата в больших разведениях (10^8 и 10^{10}) наблюдали схожую динамику роста: фаза роста (~0–40 ч), фаза плато (~40–75 ч) и фаза гибели клеток (~75 ч и более). А в варианте с меньшим разведением

препарата (10^7) динамика роста клеток сильно отличалась – примерно через 25 ч после фазы роста начиналась фаза гибели клеток. Строили кривые зависимости количества флуоресцентных объектов от степени разведения добавляемого препарата и наблюдали зависимость доза–эффект количества препарата и количества живых клеток (рис. 4Б). Исходя из этого можно сделать вывод, что после предложенных нами этапов сборки, амплификации и очистки вирусные частицы модельного вируса не теряют жизнеспособность и онколитические свойства, сохраняют способность лизировать раковые клетки при больших разведениях (10^7 – 10^8) препарата.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Нами разработана масштабируемая методика получения очищенного препарата модельного rVSV-dM51-GFP без использования хелперного вируса, включающая этапы наработки, очистки, проверки титра и онколитической активности вируса. Полученный с помощью предложенной нами методики препарат модельного вируса может быть использован для оценки его терапевтических свойств в сингенных *in vivo* моделях мышей с B16F10-клетками, в том числе, в сравнении с армированными вариантами rVSV, обладающими иммуностимулирующими свойствами [12, 26, 27]. ●

Финансирование проекта осуществлялось Министерством науки и высшего образования Российской Федерации (Соглашение № 075-10-2021-093; Проект GTH-RND-2113).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Pearl T., Markert J., Cassady K., Ghonime M. // *Mol. Ther. Oncolytics*. 2019. V. 13. P. 14–21.
2. Malogolovkin A., Gasanov N., Egorov A., Weener M., Ivanov R., Karabelsky A. // *Viruses*. 2021. V. 13. № 7. P. 1271.
3. Geisbert T., Feldmann H. // *J. Infectious Dis.* 2011. V. 204. № suppl_3. P. 1075–1081.
4. Zemp F., Rajwani J., Mahoney D. // *Biotechnol. Genet. Engin. Rev.* 2018. V. 34. № 1. P. 122–138.
5. Velazquez-Salinas L., Naik S., Pauszek S., Peng K., Russell S., Rodriguez L. // *Hum. Gene Ther. Clin. Dev.* 2017. V. 28. № 2. P. 108–115.
6. Whitt M. // *J. Virol. Methods*. 2010. V. 169. № 2. P. 365–374.
7. Решение Совета Евразийской экономической комиссии от 3 ноября 2016 г. № 89 «Об утверждении Правил проведения исследований биологических лекарственных средств Евразийского экономического союза» (в ред. решений Совета Евразийской экономической комиссии от 15.07.2022 № 110, от 04.07.2023 № 77).
8. Green M., Sambrook J. *Mol. Cloning: A Laboratory Manual*. 4th Edition. New York, 2012. V. 2.
9. Kirshina A., Vasileva O., Kunyk D., Seregina K., Muslimov A., Ivanov R., Reshetnikov V. // *Biomolecules*. 2023. V. 13. № 11. P. 1677. doi: 10.3390/biom13111677.
10. Laemmli U. // *Nature*. 1970. V. 227. № 5259. P. 680–685.
11. Lei C., Yang J., Hu J., Sun X. // *Virologica Sinica*. 2021. V. 36. № 1. P. 141–144.
12. Felt S., Grdzlishvili V. // *J. Gen. Virol.* 2017. V. 98. № 12. P. 2895–2911.
13. Finkelshtein D., Werman A., Novick D., Barak S., Rubinstein M. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2013. V. 110. № 18. P. 7306–7311.
14. Takahashi K., Yokobayashi Y. // *ACS Synth. Biol.* 2019. V. 8. № 9. P. 1976–1982.
15. Dou Y., Lin Y., Wang T., Wang X., Jia Y., Zhao C. // *FEBS Open Bio*. 2021. V. 11. № 1. P. 95–104.
16. Abdelmageed A., Ferran M. // *Curr. Protoc. Microbiol.* 2020. V. 58. № 1. e110.
17. Elahi S., Shen C., Gilbert R. // *J. Biotechnol.* 2019. V. 289. P. 144–149.
18. Van der Valk J., Bieback K., Buta C., Cochrane B., Dirks W., Fu J., Hickman J., Hohensee C., Kolar R., Liebsch M. // *ALTEX*. 2018. V. 35. № 1. P. 99–118.
19. Kim I., Jenni S., Stanifer M., Roth E., Whelan S., van Oijen A., Harrison S. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2017. V. 114. P. 28–36.
20. Sakata M., Tani H., Anraku M., Kataoka M., Nagata N., Seki F., Tahara M., Otsuki N., Okamoto K., Takeda M. // *Sci. Rep.* 2017. V. 7. № 1. P. 11607.
21. Moerdyk-Schauwecker M., Hwang S., Grdzlishvili V. // *Virol. J.* 2009. V. 6. P. 166.
22. Thomas D., Newcomb W., Brown J., Wall J., Hainfeld J., Trus B., Steven A. // *J. Virol.* 1985. V. 54. № 2. P. 598–607.
23. Buonocore L., Blight K., Rice C., Rose J. // *J. Virol.* 2002. V. 76. № 14. P. 6865–6872.
24. Durham N., Mulgrew K., McGlinchey K., Monks N., Ji H., Herbst R., Suzich J., Hammond S., Kelly E. // *Mol. Ther.* 2017. V. 25. № 8. P. 1917–1932.
25. Abdulal R., Malki J., Ghazal E., Alsaieedi A., Almahboub S., Khan M., Alsulaiman R., Ghaith M., Abujamel T., Ganash M. // *Front. Mol. Biosci.* 2023. V. 10. P. 1190669.
26. Isaeva A.S., Porozova N.O., Idota E., Volodina S.I., Lukashchev A.N., Malogolovkin A.S. // *Sechenov Med. J.* 2023. V. 14. № 4. P. 17–30.
27. Cristi F., Gutiérrez T., Hitt M., Shmulevitz M. // *Front. Mol. Biosci.* 2022. V. 9. P. 831091.

УДК 616.5-001.17:577.35

Влияние липосом различного состава на кожу и ее производные после термического ожога II–IIIА степени

Н. И. Пашкевич^{1*}, Д. В. Вильянен², А. Ф. Марцинкевич¹, М. М. Борисова-Мубаракшина², С. С. Осочук¹

¹Витебский государственный ордена Дружбы народов медицинский университет, Витебск, 210009 Республика Беларусь

²Институт фундаментальных проблем биологии РАН – Обособленное подразделение Федерального государственного бюджетного учреждения науки «Федеральный исследовательский центр «Пушкинский научный центр биологических исследований Российской академии наук», Пушкино, Московская обл., 142290 Россия

*E-mail: orekhova.ni93@gmail.com

Поступила в редакцию 17.11.2023

Принята к печати 15.01.2024

DOI: 10.32607/actanaturae.27329

РЕФЕРАТ Рассмотрены патологические процессы и состояния, которые возникают при экспериментальном моделировании на лабораторных животных термических ожогов II–IIIА степени и характеризуются нарушением структуры кожных покровов, снижением их функции, в частности барьерной, а также повреждением таких производных кожи, как волосяные фолликулы и сальные железы. Сравнили действие липосом, изготовленных из соевого лецитина, содержащего 90% фосфатидилхолина, и липосом из лецитина, содержащего 26% фосфатидилхолина, на состояние эпидермиса, дермы и ее капилляров, волосяных фолликулов и сальных желез у лабораторных животных через 24 ч после экспериментального моделирования термических ожогов кожи II–IIIА степени. Обсуждаются особенности влияния липосом на кожу и ее производные в зависимости от содержания жирных кислот в лецитине, который используется для приготовления липосом обоих составов, в частности, от содержания в нем фосфатидилинозита, фосфатидных кислот, олеиновой и линолевой кислот.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА ожог, кожа, фосфатидилхолин, полиненасыщенная жирная кислота, липосома.

СОКРАЩЕНИЯ ПНЖК – полиненасыщенные жирные кислоты.

ВВЕДЕНИЕ

Известно, что кожа является самым большим органом тела человека и животных, играющим важную роль в метаболизме. Повреждение кожных покровов способно повлечь за собой значительные нарушения в функционировании и состоянии всех слоев кожи и ее производных, приводя к существенным изменениям в метаболических процессах в клетках и тканях, вплоть до летального исхода.

В кожных покровах человека находится 3–4 млн потовых желез [1], вес которых суммарно составляет около 100 г [2], что практически равно среднему весу одной почки. Потовые железы участвуют в выведении ксенобиотиков, экзогенных и эндогенных токсических/биоактивных веществ, таких, как металлы [3], лекарственные средства [4, 5], цитокины [6], стероиды [7], липиды, в том числе и холестерин [3, 5, 8–10]. Кожные покровы располагают мощной антиоксидантной системой [2], а также являются эндокринным органом [11].

Клетки сальных желез кожи могут действовать как иммунокомпетентные, поскольку способны распознавать патогены, синтезировать и высвобождать про- и противовоспалительные цитокины и хемокины, а также противомикробные пептиды и липиды [12]. Известно, что изомер пальмитолеиновой кислоты (C16:1D6) – сапиеновая кислота кожного сала – проявляет антимикробную активность [13]. Сальные железы являются основными транспортерами жирорастворимых антиоксидантов [14]; кроме того, сальные железы могут реагировать на лептин, что говорит об их связи с механизмами регуляции чувства голода и механизмами развития ожирения [15], а также участвуют в высвобождении феромонов [16].

Таким образом, в настоящее время сальная железа считается «мозгом кожи» и важнейшей кожной эндокринной железой. Функциональная активность сальных желез тесно связана с функционированием волосяных фолликулов.

Волосной фолликул действует как сенсор и иммунологический «стражник» кожи. Волосы обнаруживают раздражители над поверхностью кожи, при этом малейший изгиб волоса активирует нейрорецепторы в фолликуле, передавая сенсорную информацию в нервную систему. В свою очередь, клетки Лангерганса волосных фолликулов, выполняющие роль макрофагов, обнаруживают поверхностные патогены и активируют иммунную систему [17]. Клетки волосного фолликула, расположенные рядом с местом прикрепления мышцы, выпрямляющей ворсинки, обладают свойствами эпителиальных стволовых клеток и могут служить своего рода резервуаром для клеток эпидермиса и сальных желез [18]. Таким образом, повреждение или сохранность клеток волосных фолликулов является важным показателем регенеративного потенциала кожи.

Одним из наиболее часто возникающих повреждений кожных покровов является ожоговая травма. По данным Федеральной службы государственной статистики Российской Федерации, количество пострадавших от ожогов в 2021 году превысило 220000 человек [19]. При этом в 70% случаев лечение ожогов целесообразно проводить в амбулаторных условиях [20]. В связи с этим особую актуальность приобретает разработка новых лекарственных средств для терапии ожогов.

В процессе заживления поврежденных кожных покровов выделяют четыре основные стадии – гемостаз, воспаление, пролиферация и ремоделирование, каждая из которых управляется каскадом молекулярно-биологических процессов [21]. Стадия воспаления и ее разрешение считаются решающими для заживления ран. В этом отношении важны простагландины, лейкотриены, гидроксид- и кетозидкозатетраеновые кислоты [22], для синтеза которых необходимы полиненасыщенные жирные кислоты (ПНЖК), преимущественно омега-3 и омега-6 жирные кислоты (ω -3 и ω -6). Именно ПНЖК являются предпочтительными мишенями для свободнорадикального окисления, усиление которого приводит к разрушительным последствиям ожоговой травмы [23]. Учитывая меньшее количество эссенциальных ПНЖК в фосфатидилхолине сальных желез по сравнению с фосфатидилхолином других органов [24], увеличение свободнорадикального окисления при ожогах кожных покровов может вызвать существенный дефицит эссенциальных ω -3 и ω -6 ПНЖК. В этих условиях возможен частичный или значительный переход на продукцию простаноидов из синтезируемых эндогенно ПНЖК ω -9-ряда, способных, однако, при дефиците эссенциальных жирных кислот ω -3- и ω -6-ряда усиливать про-

дукцию провоспалительных цитокинов макрофагами [25]. Таким образом, целесообразным представляется использование в терапии ожоговых травм накожных препаратов, содержащих эссенциальные ω -3 и ω -6 ПНЖК, например, препаратов липосом, построенных из фосфатидилхолина.

История открытия и использования липосом началась в 60-е годы XX столетия с работ Алека Бенгхема и его коллег, которые экспериментировали с фосфолипидами в водных средах и обнаружили их способность образовывать мембраноподобные структуры [26]. В настоящее время липосомы широко используются в качестве биологических наноконтейнеров для транспорта лекарственных средств в онкологии [27, 28], офтальмологии [29], дерматологии [30], генной терапии [31] и других областях медицины. К неоспоримым достоинствам липосом относятся их способность к биодegradации, низкая иммуногенность, способность взаимодействовать с клеточной мембраной, обеспечивая внутриклеточную доставку их содержимого [32]. Однако, несмотря на очевидность высокой метаболической активности эссенциальных ПНЖК, включенных в состав фосфолипидов, используемых для производства липосом, недостаточное внимание уделяется метаболическим эффектам таких липосом в зависимости от спектра жирных кислот, входящих в их состав. В научной литературе представлены лишь несколько работ, имевших целью сравнение активности липосом с различным составом жирных кислот. Так, L.J. Janski и соавт. [33, 34] указали на способность липосом с α -линоленовой и докозагексаеновой кислотами увеличивать выживаемость мышей с экспериментальным раком. Эффект объяснялся цитотоксичностью докозагексаеновой кислоты в отношении опухолевых клеток. Отмечена способность липосом, построенных на основе фосфатидилхолина, имеющего в своем составе линоленовую кислоту, угнетать рост *Helicobacter pylori* [35]. Однако системных работ, посвященных влиянию липосом с различным содержанием и спектром жирных кислот в их составе на производные кожи, не проводилось.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Исследования проведены в рамках договора о сотрудничестве между учреждением образования «Витебский государственный ордена Дружбы народов медицинский университет» (ВГМУ) и Федеральным государственным бюджетным учреждением «Федеральный исследовательский центр «Пушкинский научный центр биологических исследований Российской академии наук», на базе научно-исследовательской лаборатории ВГМУ.

Приготовление липосом

Липосомы двух составов готовили из соевого лецитина (фосфатидилхолина) и холестерина (Sigma, США) в соотношении 5 : 1 согласно методике, описанной в статье [36]. Лецитин (7.78%) и холестерин (1.5%) растворяли в 15 мл хлороформа и 5 мл метанола. Тонкий пленочный слой липосом формировали вакуумной сушкой раствора на роторном испарителе. Пленку медленно ресуспендировали в растворе 0.01 М фосфатного буфера (pH 6), встряхивали, конечный раствор липосом экстрадировали через фильтр 400-нм на лабораторном мини-экструдере Avanty (Avanti Polar Lipids, США). Для изготовления липосом первого состава использовали аптечный «Лецитин» (Ricel and Foods, Inc., США), содержащий 26% фосфатидилхолина, 12–15% фосфатидилинозита, 4–8% фосфатидных кислот, 40–50% свободных жирных кислот, а также на 100 г продукта: P – 3000 мг, K⁺ – 1250 мг, Ca²⁺ – 150 мг, Fe – 4 мг, Mg²⁺ – 150 мг, Na⁺ – 30 мг, витамин E – 5 мг. Липосомы второго состава готовили на основе лецитина, содержащего 90% фосфатидилхолина (PanReac AppliChem, Испания).

Размер липосом определяли на приборе Zetasizer Nano ZS (Malvern Instruments Ltd, Великобритания) (рис. 1А, Б). Средний размер липосом на основе 26% фосфатидилхолина составляет 486.7 нм, липосом с 90% фосфатидилхолина – 523.2 нм.

Метилирование жирных кислот лецитиновых оболочек составов проводили с использованием метилата натрия (Sigma-Aldrich). Спектр жирных кислот исследовали методом газожидкостной хроматографии на хроматографе Thermo Focus GC (США) с использованием капиллярной колонки SGEBPX70 (60 м × 0.25 мм) в программе: *t*^о испарителя 200°C, *t*^о пламенно-ионизационного детектора 280°C, *t*^о термостата колонок – начальная 120°C при скорости 3°C/мин до *t*^о 245°C, изотерма при 245°C – 5 мин (полное время анализа составило 46.66 мин). Скорость газа-носителя (He) – 1.3 мл/мин. Жирные кислоты идентифицировали по времени удерживания стандартных метиловых эфиров (Sigma-Aldrich). Количество оценивали в процентах от суммы площадей всех идентифицированных пиков.

Лабораторные животные

Эксперименты проводили в два этапа, на 92 белых неинбредных крысах – самцах массой 180–250 г, разделенных на четыре группы: 1 – интактные животные (*n* = 7 для первого состава липосом и *n* = 12 для второго); 2 – стресс-контроль, так называемый ложный стресс (*n* = 7 для первого состава липосом и *n* = 12 для второго) (манипуляции с животными без ожога и нанесения испытуемого состава); 3 –

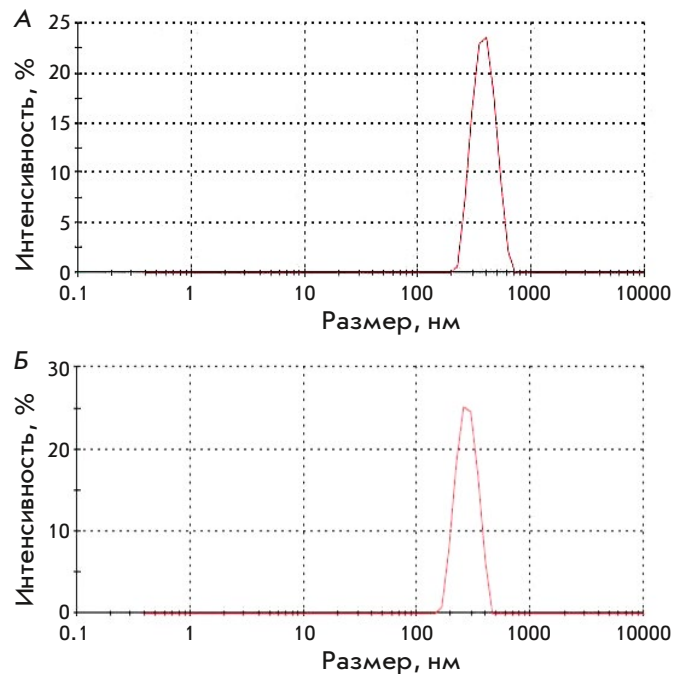


Рис. 1. Распределение липосом по размеру. А – липосомы с 26% фосфатидилхолина. Б – липосомы с 90% фосфатидилхолина

термический ожог (*n* = 15 для первого состава липосом и *n* = 12 для второго); 4 – термический ожог + липосомы первого состава (*n* = 15) и липосомы второго состава (*n* = 12).

Моделирование термических ожогов кожных покровов

Прибор для моделирования термических ожогов был изготовлен ОАО КБ «Дисплей» (Витебск, Республика Беларусь) в рамках договора о сотрудничестве с учреждением образования «Витебский государственный ордена Дружбы народов медицинский университет».

Для моделирования ожогов крыс наркотизировали кетаминном в дозе 150 мкл/крыса [37–39], выбривали шерсть на спине и к коже на 4 мин прикладывали прибор, разогретый до 150°C. Нанесенные повреждения морфологически соответствовали ожогу II–IIIА степени (рис. 2). Площадь ожога составила 8–9% от площади тела. Для расчета площади ожога использовали формулу, предложенную Meeh: $S = k \times W^{2/3}$, где *S* – площадь поверхности тела, см²; *W* – масса тела животного, кг; *k* – константа Meeh, равная 9.46 [40]. Непосредственно после нанесения ожога животным четвертой экспериментальной группы на поврежденные кожные покровы наносили по 0.45 мл липосомного раствора состава 1 или состава 2.

Гистологическое исследование кожных покровов

Животных декапитировали под эфирным наркозом через 24 ч после нанесения ожоговой травмы с последующим отбором кожных покровов для гистологического исследования. Образцы кожи до обработки фиксировали в 10% растворе нейтрального формалина. Гистологические срезы окрашивали гематоксилином-эозином и исследовали на микроскопе Leica DM 2500 (Германия, окуляр $\times 10$, объективы $\times 20$ и $\times 40$), оснащенном цифровой камерой Leica DFC 320. Количество поврежденных элементов подсчитывали в 10-ти полях зрения и рассчитывали средний показатель исследуемых элементов кожи.

Статистический анализ данных выполнен при помощи пакета прикладных программ R version 4.0.5 (2021-03-31). Распределение исследуемых признаков оценивали согласно критерию Шапиро–Уилка, при условии наличия Гауссовского распределения для сравнения использовали методы параметрической статистики, в обратном случае – непараметрические методы. Парное сравнение осуществляли на основании критерия Стьюдента или критерия Вилкоксона–Манна–Уитни. Множественное сравнение выполняли при помощи ANOVA (в случае гетерогенности дисперсий исследуемых признаков применяли поправку Уэлча) или H-критерия Краскела–Уоллиса. Анализ post hoc выполняли согласно критерию Тьюки или H-критерия Краскела–Уоллиса в модификации Данна с поправкой на множественные сравнения по методу Бенджамини–Иекутиели. Отличия считали статистически значимыми при $p < 0.05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ

В состав аптечного лецитина (26% фосфатидилхолина) входили жирные кислоты (от общего содержания жирных кислот, %): C16:0 – 18.87, C18:0 – 3.86, C18:1n9c – 8.8, C18:2n6c – 56.95, C18:3n3 – 6.81.

В состав лецитина, содержащего 90% фосфатидилхолина, входили жирные кислоты (от общего содержания жирных кислот, %): C16:0 – 13.63, C18:0 – 3.68, C18:1n9c – 11.36, C18:2n6c – 62.88, C18:3n3 – 6.12. Таким образом, в составе лецитина, содержащего 90% фосфатидилхолина, выявлено более высокое содержание линолевой кислоты (C18:2n6c – 62.88% по сравнению с 56.95% в аптечном лецитине) и олеиновой кислоты (C18:1n9c 11.36% по сравнению с 8.8% в аптечном лецитине).

Оценка влияния так называемого ложного стресса (см. «Экспериментальную часть») на исследуемые показатели не выявила статистически значимых отклонений исследуемых показателей от значений, характерных для интактных животных (табл. 1).

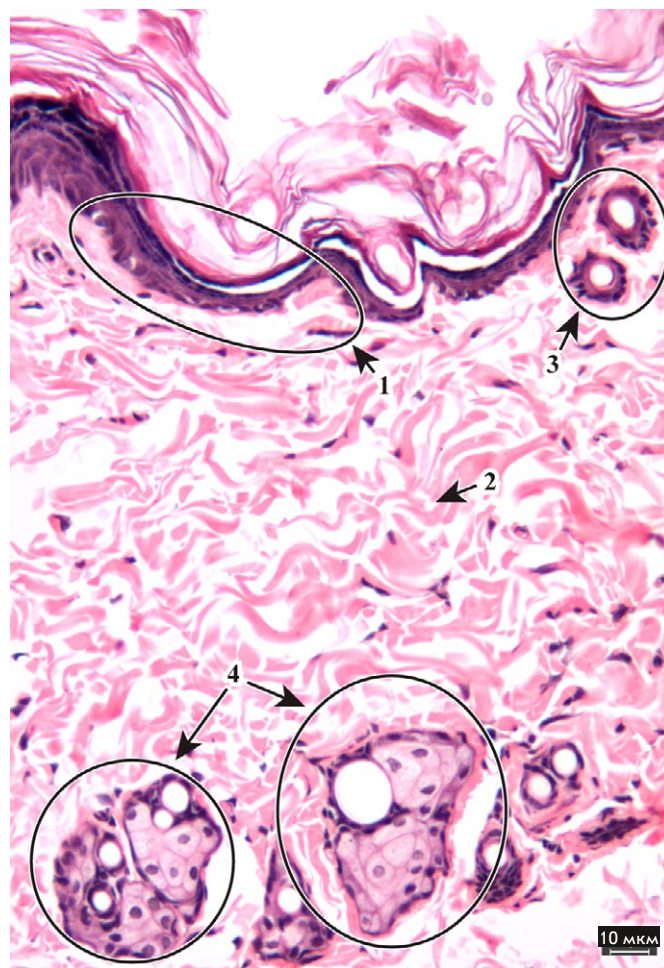
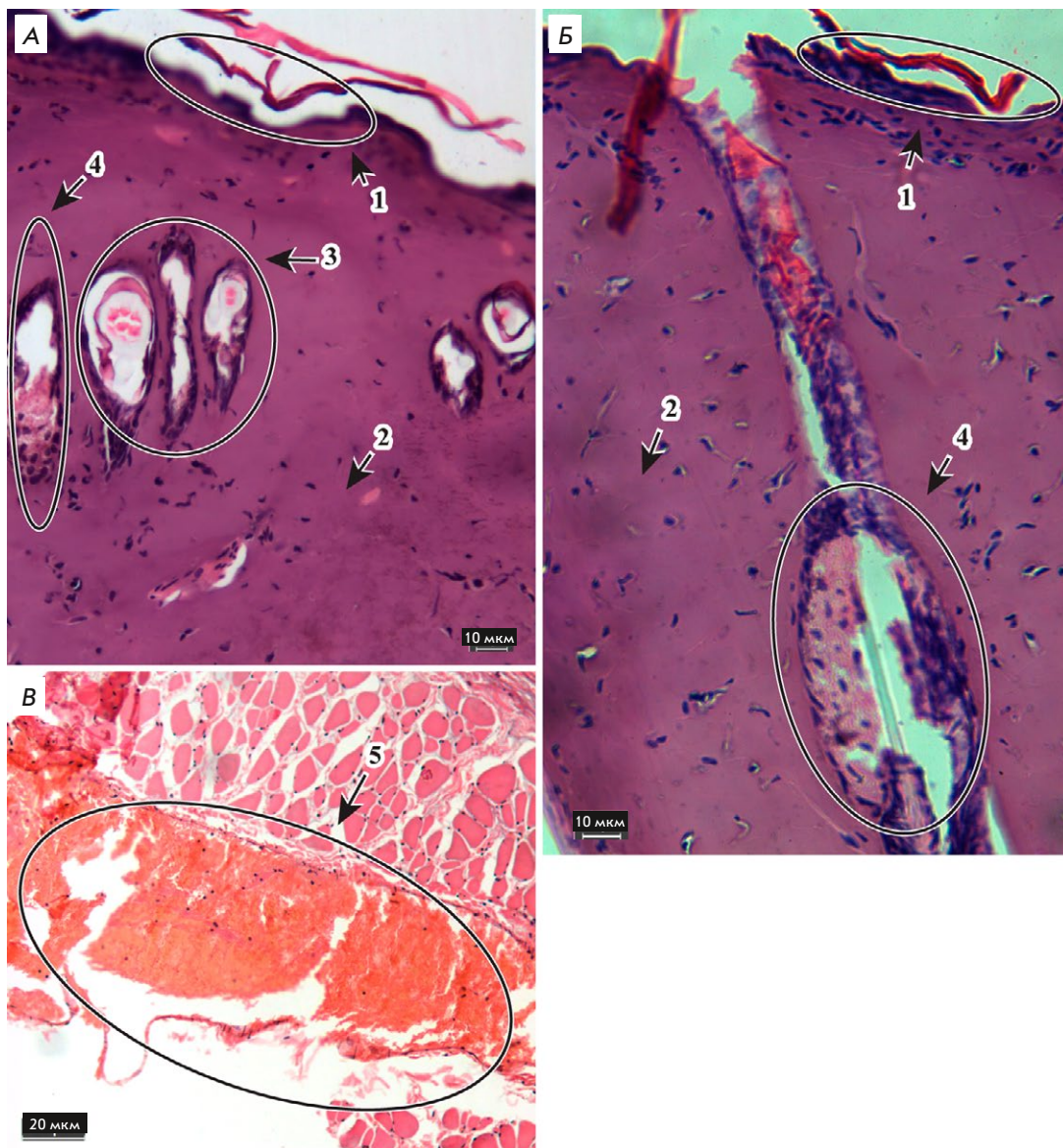


Рис. 2. Микропрепарат кожи интактных животных. Окраска гематоксилином и эозином. Об. $\times 20$. 1 – эпидермис, 2 – дерма, 3 – волосяные фолликулы, 4 – сальные железы

Эпидермис интактных животных и животных группы ложного стресса имеет послойное строение: роговой слой, базальный, шиповатый и зернистый слои сохранены (рис. 2). Просматривается волокнистое строение дермы, извитой характер коллагеновых волокон, ткань четко структурирована. Сохранена целостность волос и волосяных фолликулов, четко структурировано корневое наружное и внутреннее эпидермальное волосяное влагалище, мозговое вещество не расширено. Сохранена целостность сальных желез, везикулы с секретом плотно прилегают друг к другу, многослойный эпителий желез сохранен. Сосуды микроциркуляторного русла дермы и капилляры сосочкового слоя дермы не гиперемированы, поэтому плохо визуализируются.

На рис. 3 представлены изменения кожи через 24 ч после термического ожога II–IIIА степени.

Рис. 3. Морфологические изменения кожи через 24 ч после термического ожога. Окраска гематоксилином и эозином. Об. $\times 20$ (А, Б) и об. $\times 40$ (В).
 1 – эпидермис,
 2 – дерма,
 3 – волосяные фолликулы,
 4 – сальные железы,
 5 – кровеносные сосуды



Наблюдается изменение структуры всех слоев эпидермиса, что проявляется в виде разрушения рогового слоя, некроза высокопролиферирующих клеток шиповатого и базального слоев, зернистый слой сохранен лишь в отдельных участках, эпидермально-дермальная граница сглажена. Отсутствуют дермальные сосочки и пучково-волокнистое строение дермы, ткань представлена однородной бесструктурной массой в результате денатурации коллагена. Деструкция корня волоса, корневого влагалища и соединительнотканная дермальная сумка не визуализируются, мозговое вещество корня волоса значительно расширено, изменена форма корня волоса, вокруг корня – однослойный контур клеток. Сальные железы деформированы, секреторные везикулы разрушены, клетки эпителия повреждены.

Сосуды гиподермы гиперемированы, стенка разрушена.

Математическая оценка влияния ожога на оцениваемые параметры показала статистически значимое снижение толщины эпидермиса, рогового слоя эпидермиса и толщины эпидермиса без учета рогового слоя как по сравнению с интактными животными, так и по сравнению с группой ложного стресса (табл. 1). Кроме того, количество гиперемированных сосудов, волосяных фолликулов и сальных желез увеличивалось в группе животных с ожогом по сравнению с интактными животными и по сравнению с группой животных ложного стресса; соответственно, ожог вызвал негативные статистически значимые изменения всех исследуемых показателей (табл. 1).

Таблица 1. Влияние разного состава липосом на показатели кожи и ее производных через 24 ч после ожоговой травмы

Интактные	Ложный стресс	Ожог	Ожог+липосомы с 26% ФХ	Ожог+липосомы с 90% ФХ
Толщина эпидермиса, мкм				
28.89±3.63	25.95±5.97	13.00±3.87* [#]	11.93±2.69* [#]	12.25±4.03* [#]
Толщина рогового слоя эпидермиса, мкм				
13.05±2.04	13.42±3.91	5.70±2.20*	4.73±1.49* [#]	5.00±2.95* [#]
Толщина эпидермиса (без рогового слоя), мкм				
15.84±2.73	12.53±2.46	7.30±2.32*	7.20±2.14* [#]	7.25±1.71* [#]
Количество гиперемированных сосудов				
0.00±0.00	0.00±0.00	14.48±4.73* [#]	12.00±3.74* [#]	7.75±1.22* ^{#,v}
Количество поврежденных волосяных фолликулов				
0.00±0.00	0.00±0.00	2.93±3.47* [#]	0.00±0.00 ^v	3.42±0.90* ^{#,a}
Количество поврежденных сальных желез				
0.00±0.00	0.00±0.00	6.78±1.19* [#]	6.13±1.13* [#]	0.00±0.00 ^{v,a}

Примечание. ФХ – фосфатидилхолин. Статистически значимо: * – по сравнению с интактными; [#] – по сравнению со стрессом; ^v – по сравнению с ожогом, ^a – по сравнению 26% ФХ.

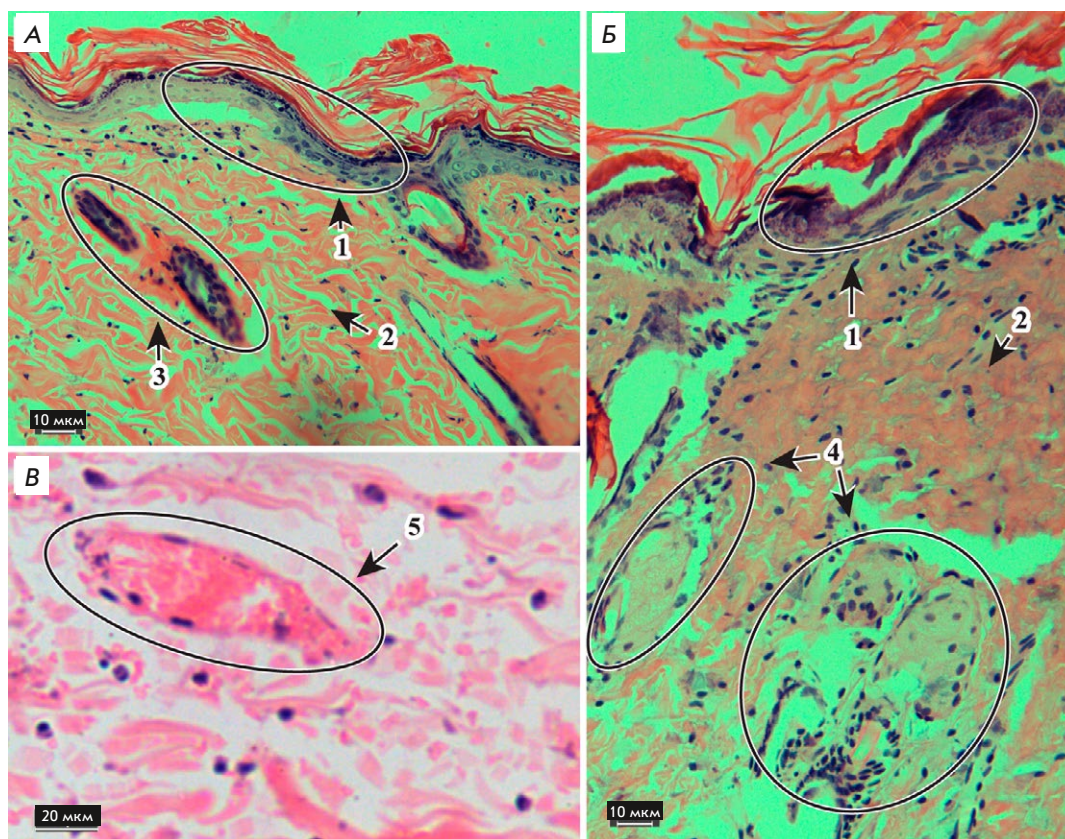
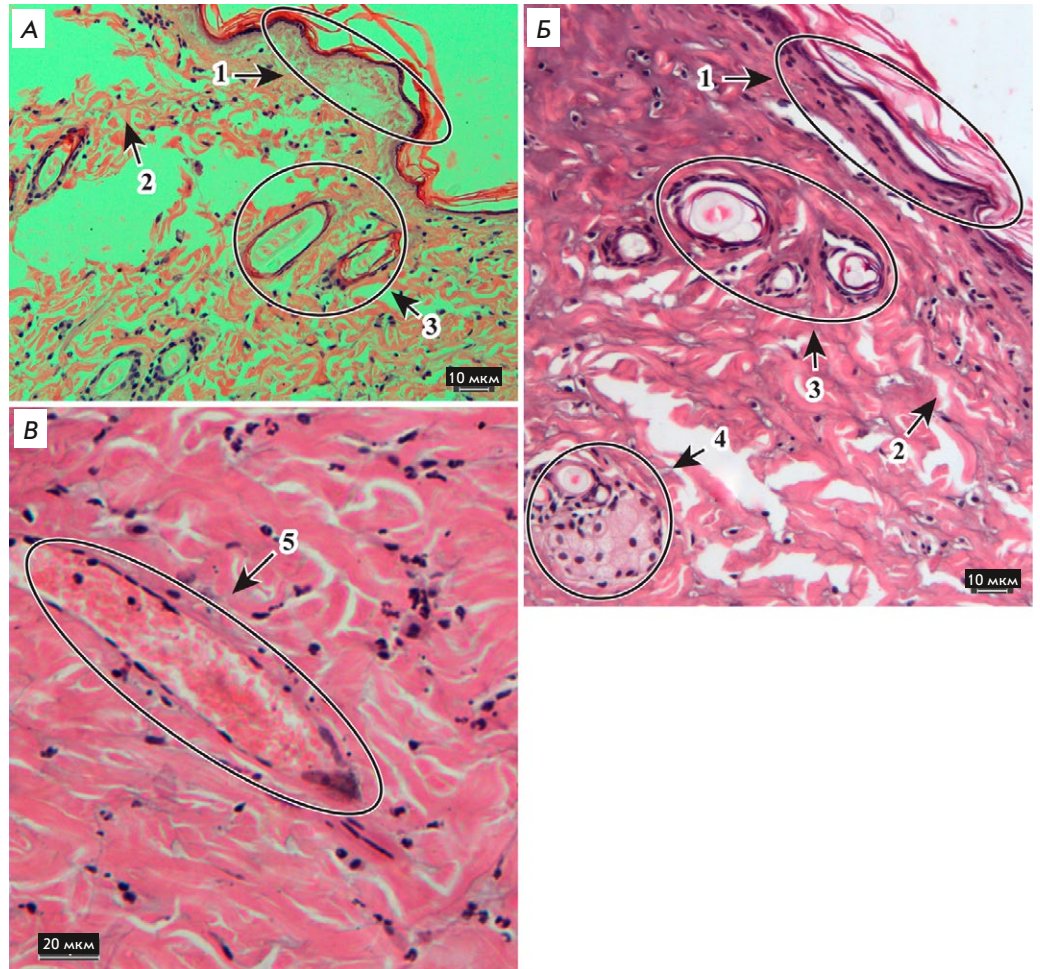


Рис. 4. Морфологические изменения кожи при ожоговой травме через 24 ч после нанесения раствора липосом из 26% фосфатидилхолина. Окраска гематоксилином и эозином. Об. ×20 (А, Б) и об. ×40 (В). 1 – эпидермис, 2 – дерма, 3 – волосяные фолликулы, 4 – сальные железы, 5 – кровеносные сосуды

Через 24 ч после ожога и нанесения на ожоговую поверхность кожи раствора липосом из лецитина, содержащего 26% фосфатидилхолина, отмечается частичное восстановление послойного строения эпидермиса (рис. 4). Наблюдается частичное фор-

мирование пучков дермы, извитая структура волокон, повышение количества микрососудов, а также по сравнению с кожей интактных животных большее количество аморфного вещества. Сохранена целостность волос и волосяных фолликулов, корневое

Рис. 5. Морфологические изменения кожи после нанесения раствора липосом из 90% фосфатидилхолина при ожоговой травме. Окраска гематоксилином и эозином. Об. $\times 20$ (А, Б) и об. $\times 40$ (В).
1 – эпидермис,
2 – дерма,
3 – волосяные фолликулы,
4 – сальные железы,
5 – кровеносные сосуды



эпидермальное волосяное влагалище структурировано, мозговое вещество не расширено. Секреторные везикулы сальных желез повреждены, клетки эпителия расположены рыхло, межклеточные контакты потеряны. Крупные сосуды гиподермы гиперемированы, стенка их частично разрушена.

После нанесения раствора липосом из лецитина, содержащего 90% фосфатидилхолина, отмечается частичное восстановление послойного строения эпидермиса, повышение количества клеток базального слоя и снижение количества клеток шиповатого слоя, поврежден зернистый слой (рис. 5). Наблюдается частичное формирование пучков дермы, извитая структура волокон, повышение количества микрососудов, а также по сравнению с кожей интактных животных большое количество аморфного вещества. Отмечается разрушение корня волоса, деструкция наружного и внутреннего корневого влагалища, мозговое вещество корня волоса расширено, изменена форма корня волоса, вокруг корня однослойный контур клеток. Сохранена

целостность сальных желез, везикулы с секретом плотно прилегают друг к другу, многослойный эпителий желез сохранен. Крупные сосуды гиподермы гиперемированы, стенка их частично истончена.

Согласно проведенной математической оценке, липосомы разного жирнокислотного состава не повлияли статистически значимо на толщину эпидермиса, толщину рогового слоя эпидермиса и толщину эпидермиса без рогового слоя, но наблюдалась тенденция к частичному восстановлению эпидермальных слоев при использовании лецитина, содержащего как 26%, так и 90% фосфатидилхолина (табл. 1). Однако после нанесения липосом, изготовленных из лецитина с 26% фосфатидилхолина, поврежденные волосяные фолликулы не определялись (табл. 1).

Использование липосом, изготовленных из лецитина с 90% фосфатидилхолина, не оказало влияния на количество поврежденных волосяных фолликулов, однако снизило количество гиперемированных сосудов на 47% по сравнению с группой живот-

ных с ожогом и нивелировало негативное действие ожога на сальные железы, снизив их количество до значений, регистрируемых у здоровых животных (табл. 1).

Таким образом, ожог вызывал негативные изменения всех исследуемых показателей. Липосомы, изготовленные из лецитина, содержащего 26% фосфатидилхолина, предотвращали появление поврежденных волосяных фолликулов, что может быть связано с дополнительными компонентами, входящими в состав аптечного лецитина.

Липосомы, изготовленные из лецитина, содержащего 90% фосфатидилхолина, снижали количество гиперемизированных сосудов и предотвращали повреждение сальных желез. Кроме того, наблюдалось значимое восстановление структуры дермы при использовании для приготовления липосом лецитина, содержащего как 26, так и 90% фосфатидилхолина.

ОБСУЖДЕНИЕ

Известно, что барьерная функция является основной функцией кожных покровов. Эта функция обеспечивается: препятствием физическому проникновению чужеродных компонентов кератиноцитами за счет единства их монослоев; липидно-защитной частью за счет наличия в составе кожи керамидов, холестерина и свободных жирных кислот, содержащихся в межклеточном пространстве корнеоцитов; липолитическими, протеолитическими ферментами и противомикробными пептидами, синтезирующимися клетками кожи; обновлением липидных и ферментативных компонентов за счет их секреции клетками кожи [41, 42].

На основе полученных результатов можно заключить, что ожог значительно снижает барьерную функцию кожных покровов, в том числе за счет липидно-защитного компонента межклеточного пространства корнеоцитов. Логично предположить, что добавление липидных компонентов в состав противоожоговых средств может снижать активность термического повреждения кожных покровов. Вместе с тем, известно, что фосфатидилинозит-3-киназа/протеинкиназа В участвует в формировании постожогового септического процесса [43]. Учитывая присутствие в составе 26% лецитина 12–15% фосфатидилинозита (субстрата фосфатидилинозит-3-киназы/протеинкиназы В), можно предположить возможность потенцирования негативного действия ожоговой травмы. Однако в проведенном эксперименте не выявлено негативного действия липосом первого состава на исследуемые показатели, что свидетельствует об отсутствии негативного влияния фосфатидилинозита на течение ожогового

процесса. Вместе с тем, выявленное нами позитивное действие липосом, изготовленных из 26% фосфатидилхолина, на предотвращение повреждения волосяных фолликулов может быть обусловлено фосфатидными кислотами, входящими в состав субстанции (4–8%), из которой они изготовлены. В связи с этим, описанное нами отсутствие положительного действия на волосяные фолликулы липосом, изготовленных из лецитина с 90% фосфатидилхолина, может быть обусловлено отсутствием в их составе фосфатидных кислот. Однако подтверждение данного предположения требует дополнительных исследований.

Выявленное в нашем исследовании уменьшение количества гиперемизированных сосудов расценено как позитивное, поскольку интенсивность наполнения сосудов кожи клетками крови связана с активностью воспалительного процесса [44]. Таким образом, липосомы, изготовленные из лецитина с 90% фосфатидилхолина, вероятно, обладают способностью снижать активность воспалительного процесса. Данный эффект может определяться более высоким содержанием γ -линоленовой кислоты (C18:3n6c) в составе лецитина с 90% фосфатидилхолина, что согласуется с ее положительными эффектами, описанными при экспериментальном ожоге у крыс [45].

Известно, что сальные железы выделяют свой секрет в волосяные фолликулы [46, 47], синтезируют смесь липидов, создающих барьер проницаемости и обеспечивающих ряд антимикробных свойств кожных покровов [48, 49]. По этой причине выявленный эффект сохранения сальных желез под влиянием липосом из лецитина, содержащего 90% фосфатидилхолина, расценивается как положительный. Данный эффект, вероятнее всего, обусловлен более высоким, чем в аптечном лецитине, содержанием фосфатидилхолина, а также более высоким содержанием в его составе линолевой кислоты (C18:2n6c – 62.88% против 56.95%) и олеиновой кислоты (C18:1n9c 11.36% против 8.8%). Такое предположение представляется обоснованным, поскольку имеются сведения о способности олеиновой (C18:1n9) и линолевой (C18:2n6) кислот ускорять заживление ран кожных покровов и снижать активность воспалительного процесса в них за счет ингибирования продукции провоспалительных цитокинов [50, 51]. Регенерация вспомогательных органов кожных покровов, таких, как волосяные фолликулы и сальные железы, не только ускоряет заживление ран, но и улучшает функциональность регенерированной кожи. Более того, регенерация сальных желез косвенно свидетельствует о регенерации волосяного фолликула [52].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Исходя из представленного материала можно заключить, что липосомы, сделанные из лецитина, содержащего 90% фосфатидилхолина, с большей эффективностью снижают гиперемии сосудов поврежденной ожогом кожи и предотвращают повреждение сальных желез, чем липосомы, сделанные из лецитина, содержащего 26% фосфатидилхолина. Вместе с тем липосомы, сделанные из лецитина с 26% фосфатидилхолина, предотвращают повреждение волосяных фолликулов, что может быть связано с наличием в их составе фосфатидных кислот, а также, возможно, дополнительными компонентами, входящими в его состав. Для выяснения более детальных молекулярных механизмов действия липосом различного состава необходимо проведение дополнительных исследований. ●

Источники финансирования

Исследование поддержано Министерством науки и высшего образования Российской Федерации (государственная научная программа, тема № 122041100186-2)

и Фондом содействия инновациям, грант УМНИК, договор 16398ГУ/2021.

Соблюдение этических стандартов
Все процедуры, выполненные в исследованиях с участием животных, соответствовали этическим стандартам учреждения, в котором проводились исследования, и утвержденным правовыми актами Республики Беларусь, Российской Федерации, принципам Базельской декларации и рекомендациям (Разрешение комиссии по биоэтике и гуманному обращению с лабораторными животными для проведения научно-исследовательских работ и педагогическом процессе Учреждения образования «Витебский государственный медицинский университет» от 15.01.2021).

Благодарности

Авторы выражают благодарность ОАО Конструкторскому бюро «Дисплей» (г. Витебск, Республика Беларусь) за создание прибора для экспериментального моделирования термических ожогов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Kreyden O.P., Scheidegger E.P. // J. Invest. Dermatol. 2004. V. 22. P. 40–44.
- Zhou S.-S., Li D., Zhou Yi.-M., Cao J.-M. // Diabetol. Metab. Syndr. 2012. V. 4. P. 15.
- Smallridge R.C., Gamblin G.T., Eil C. // Metabolism. 1986. V. 35. P. 899–904.
- Johnson H.L., Maibach H.I. // J. Invest. Dermatol. 1971. V. 56. P. 182–188.
- Sato K. // Rev. Physiol. Biochem. Pharmacol. 1977. V. 79. P. 51–131.
- Cizza G., Marques A.H., Eskandari F., Christie I.C., Torvik S., Silverman M.N., Phillips T.M., Sternberg E.M. // Biol. Psychiatry. 2008. V. 64. P. 907–911.
- Takemura T., Wertz P.W., Sato K.Br. // J. Dermatol. 1989. V. 120. P. 43–47.
- Smith K.R., Thiboutot D.M. // J. Lipid Res. 2008. V. 49. P. 271–281.
- Arck P.C., Slominski A., Theoharides T.C., Peters E.M., Paus R. // J. Invest. Dermatol. 2006. V. 126. P. 1697–1704.
- Oesch F., Fabian E., Oesch-Bartlomowicz B., Werner C., Landsiedel R. // Drug Metab. Rev. 2007. V. 39. P. 659–698.
- Slominski A.T., Manna P.R., Tuckey R.C. // Steroids. 2015. V. 103. P. 72–88.
- Picardo M., Mastrofrancesco A., Tamás B. // Exp. Dermatol. 2015. V. 24. P. 485–486.
- Wille J.J., Kydonieus A. // Skin Pharmacol. Appl. Skin Physiol. 2003. V. 16. P. 176–187.
- Thiele J.J., Weber S.U., Packer L. // J. Invest. Dermatol. 1999. V. 113. P. 1006–1010.
- Zouboulis C.C., Picardo M., Ju Q., Kurokawa I., Torocsik D., Biro T., Schneider M.R. // Rev. Endocr. Metab. Disord. 2016. V. 17. P. 319–334.
- Paus R., Cotsarelis G. // N. Engl. J. Med. 1999. V. 341. P. 491–497.
- Cotsarelis G., Sun T.T., Lavker R.M. // Cell. 1990. V. 61. P. 1329–1337.
- Rochat A., Kobayashi K., Barrandon Y. // Cell. 1994. V. 76. P. 1063–1073.
- Здравоохранение в России. Стат. сб. Росстат. М., 2021. 171 с.
- van Lieshout E.M., van Yperen D.T., van Baar M.E., Polinder S., Boersma D., Cardon A.Y., De Rijke P.A., Guijt M., Klem T.M., Lansink K.W., et al. // BMJ Open. 2018. V. 8. № 11. P. e023709.
- Kotronoulas A., Karvelsson S.T., Heijink M. // Prostaglandins Leukot. Essent. Fatty Acids. 2021. V. 175. P. 102358.
- Silva J.R., Burger B., Kuhl C.M.C., Candreva T., Dos Anjos M.B.P., Rodrigues H.G. // Mediators Inflamm. 2018. V. 2018. P. 2503950.
- Ancuta E.P. // Acta Sci. Pol. Technol. Aliment. 2016. V. 15. P. 121–129.
- Stewart M.E., Downing D.T., Pochi P.E., Strauss J.S. // Biochim. Biophys. Acta. 1978. V. 529. P. 380–386.
- Okuno T., Gijon M.A., Zarini S., Martin S.A., Barkley R.M., Johnson C.A., Ohba M., Yokomizo T., Murphy R.C. // J. Lipid Res. 2018. V. 59. P. 542–549.
- Савельева М.И., Сычев Д.А. // Флебология. 2018. Т. 12. С. 40–49.
- Марчио С., Буссолино Ф. // Вест. Рос. гос. мед. ун-в. 2018. Т. 6. С. 4–14.
- Барышников А.Ю. // Вестник РАМН. 2012. Т. 67. С. 23–31.
- Аляутдин Р.Н., Иежица И.Н., Агарвал Р. // Вест. офтальмологии. 2014. Т. 130. С. 117–122.
- Молочков А.В., Хлебникова А.Н. // Альманах клинической медицины. 2014. Т. 34. С. 85–90.
- Дениева З.Г., Буданова У.А., Себякин Ю.Л. // Биол. мембраны. 2021. Т. 15. С. 21–35.
- Тазина Е.В., Игнатьева Е.В., Полозкова А.П., Орлова О.Л.,

- Оборогова Н.А. // Хим.-фарм. журн. 2008. Т. 42. С. 30–35.
33. Jensi L.J., Zerouga M., Stillwell W. // Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 1995. V. 210. P. 227–233.
34. Kafrawy O., Zerouga M., Stillwell W., Jensi L.J. // Cancer Lett. 1998. V. 132. P. 23–29.
35. Li X.-X., Shi S., Rong L., Feng M.-Q., Zhong L. // Int. J. Nanomedicine. 2018. V. 13. P. 1399–1409.
36. Khoshneviszadeh R.B., Bazzaz S.F., Housaindokht M.R., Ebrahim-Habibi A., Rajabi O. // Iranian J. Pharm. Res. 2015. V. 149. P. 473–478.
37. Гиммельфарб Г.Н. Анестезия у экспериментальных животных. Ташкент: Изд-во «Фан» УзССР, 1984. 144 с.
38. Бергхоф П.К. Мелкие домашние животные. Болезни и лечение: Пер. с нем. М.: Аквариум, 1999. 224 с.
39. Бунатян А.А. Руководство по анестезиологии / под ред. А.А. Бунатяна. М.: Медицина, 1994. 665 с.
40. Gilpin D.A. // Burns. 1996. V. 22. P. 607–611.
41. Menon G.K., Cleary G.W., Lane M.E. // Int. J. Pharm. 2012. V. 435. P. 3–9.
42. Fujiwara A., Morifuji M., Kitade M., Fujiwara A., Morifuji M., Kitade M., Kawahata K., Fukasawa T., Yamaji T., Itoh H. // Arch. Dermatol. Res. 2018. V. 310. P. 729–735.
43. Luo K., Long H., Xu B., Luo Y. // Int. J. Surg. 2015. V. 21. P. 22–27.
44. Choi S.H., Moon J.S., Jeon B.S., Jeon Y.J., Yoon B.I., Lim C.J. // Biomol. Ther. (Seoul). 2015. V. 23. P. 174–179.
45. Allison F.Jr., Smith M.R., Wood Wb.Jr. // J. Exp. Med. 1955. V. 102. P. 655–668.
46. Karlstad M.D., De Michele S.J., Leathem W.D., Peterson M.B. // Crit. Care Med. 1993. V. 21. P. 1740–1749.
47. Valiveti S., Lu G.W. // Int. J. Pharm. 2007. V. 345. P. 88–94.
48. Li X., Becker K.A., Zhang Y. // Cell Physiol. Biochem. 2010. V. 26. P. 41–48.
49. Wertz Ph.W. // J. Lipids. 2018. V. 2018. P. 5954034.
50. Guidoni M., de Christo Scherer M.M., Figueira M.M., Schmitt E.F.P., de Almeida L.C., Scherer R., Bogusz S., Fronza M. // Braz. J. Med. Biol. Res. 2019. V. 52. P. e8209.
51. Barros Cardoso C.R., Souza M.A., Vieira Ferro E.A., Favoreto S.Jr., Pena J.D.O. // Wound Repair Regen. 2004. V. 12. P. 235–243.
52. Xia Y., You X.-E., Hong C., Chen H., Yan Y.-J., He Y.-C., Ding S.-Z. // Int. J. Clin. Exp. Pathol. 2017. V. 10. P. 7390–7400.

УДК 577.213.7

Современные подходы к *de novo* синтезу протяженных фрагментов ДНК: сборка широкого репертуара последовательностей

Т. А. Семашко^{1,2*}, Г. Ю. Фисунов^{1,2}, Е. А. Цой^{1,2}, Д. Р. Харрасов¹, И. К. Чудинов¹,
Д. В. Евсютина^{1,2}, Г. Ю. Шевелёв³, В. М. Говорун¹

¹Научно-исследовательский институт системной биологии и медицины Роспотребнадзора, Москва, 117246 Россия

²Федеральный научно-клинический центр физико-химической медицины имени академика Ю.М. Лопухина ФМБА России, Москва, 119435 Россия

³Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН, Новосибирск, 630090 Россия

*E-mail: t.semashko@gmail.com

Поступила в редакцию 27.12.2023

Принята к печати 28.02.2024

DOI: 10.32607/actanaturae.27362

РЕФЕРАТ Для решения многих задач синтетической биологии, в том числе для синтеза более широкого репертуара последовательностей, а также для дальнейшей автоматизации и миниатюризации таких реакций необходимо иметь стандартизированные методы сборки фрагментов ДНК. В представленной работе предложены условия сборки фрагментов ДНК из химически синтезированных олигонуклеотидов и определены возможные ошибки, возникающие в данных условиях. Предложены также условия дальнейшего объединения синтетических фрагментов в более крупные последовательности ДНК. Показано, что оптимизированные условия подходят для сборки широкого спектра последовательностей. **КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА** синтез ДНК, искусственный синтез ДНК, синтез генов, сборка генов, сборка методом ПЦР, полимеразная циклическая сборка, спермидин.

ВВЕДЕНИЕ

Получать синтетические фрагменты ДНК из химически синтезированных коротких олигонуклеотидов пытались еще в середине 60-х годов XX века. Однако лишь в 1970 году была успешно завершена сборка гена аланиновой тРНК дрожжей длиной 77 п.н. [1]. Развитие методов химического синтеза олигонуклеотидов, а также сборки и клонирования протяженных фрагментов ДНК позволяет в настоящее время создавать целые геномы вирусов [2], прокариот [3, 4] и эукариот [5], в том числе, спроектированные исследователями, – с перекодированием кодонов [6], четырехбуквенным генетическим кодом [7]. Синтетическая биология является быстро развивающейся областью. Для достижения ее амбициозных целей по созданию организмов с заданными свойствами во многих случаях необходим синтез протяженных последовательностей ДНК. Сборка целых геномов рассматривается как достижение современных технологий и не является рутинной практикой. В биотехнологии, медицине,

а также в фундаментальных исследованиях синтез фрагментов ДНК *de novo* (содержащих, как правило, последовательности одного или нескольких генов длиной несколько т.п.н.) с высокой точностью и низкой стоимостью имеет основное значение [8], в частности, для гетерологичной экспрессии генов [9] и их модификации [10]. В настоящее время синтез ДНК *in vitro* производится иерархически: сначала проводят химический синтез олигонуклеотидов, а затем из них собирают фрагменты ДНК размерами от 0.5 до нескольких т.п.н. При необходимости эти фрагменты объединяют между собой для получения ДНК длиной 2–10 т.п.н. с помощью рестрикции и лигирования, сборки перекрывающихся фрагментов или сайт-специфичной рекомбинации [11].

Химический синтез олигонуклеотидов – автоматизированный, хорошо налаженный процесс. Основными задачами являются получение более длинных последовательностей (более 100 п.н.), увеличение выхода реакции на всех этапах синтетического цикла, снижение количества ошибок за счет улучше-

ния качества химических реагентов [12]. Разработаны три основных стратегии сборки олигонуклеотидов в дцДНК-фрагменты – сборка *in vitro* с помощью ферментов – лигазная циклическая сборка (ЛЦР) [13, 14], полимеразная циклическая сборка (ПЦР), а также *in vivo* сборка в клетках дрожжей [15]. Основными преимуществами сборки с помощью ПЦР являются меньшее количество олигонуклеотидов, необходимое для проведения реакции, отсутствие стадии фосфорилирования олигонуклеотидов и меньшая трудоемкость [16, 17]. Предложены различные модификации ПЦР для сборки длинных фрагментов и увеличения точности синтезируемой последовательности [18–20]. При этом, учитывая широкое разнообразие целевых дцДНК, актуальным остается определение оптимальных условий проведения ПЦР, в число которых входят компоненты реакционной смеси (буферная система, концентрации солей, ионов магния, dNTP, олигонуклеотидов, тип ДНК-полимеразы, наличие добавок), а также температура и время на каждом из этапов ПЦР. В качестве присадок используют амиды [21], диметилсульфоксид [22], бетаин [23], глицерин [24], полиэтиленгликоли, полиамины [25], в частности спермидин [26]. Независимо от типа сборки для успешного синтеза требуется рациональный дизайн олигонуклеотидов, учитывающий термодинамические характеристики последовательности, наличие повторяющихся элементов и мотивов, способных образовывать вторичные структуры. Целью данной работы было подобрать универсальные условия сборки фрагментов ДНК, подходящие для большинства подобных задач.

В настоящей работе оптимизирована сборка методом ПЦР фрагментов ДНК из олигонуклеотидов, подобраны условия, в которых эффективно собираются фрагменты ДНК размером до 1.5 т.п.н. с разнообразным репертуаром последовательностей, с учетом выхода продукта и возможных ошибок в последовательности ДНК. Оптимизированы условия объединения нескольких ампликонов во фрагмент до 7.5 т.п.н.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Дизайн и синтез олигонуклеотидов для сборки фрагментов ДНК

Дизайн олигонуклеотидов разработан программой SynthBac [27, 28] с использованием термодинамически оптимизированного метода. Синтез олигонуклеотидов для модельного фрагмента 1000 п.н. и гена *BseRI* проводили на синтезаторе АСМ-800 («Биоссет», Россия), синтез гена транспозазы и фрагментов фага N4 – на синтезаторе Dr. Oligo 768XLc (Biolytic, США).

ПЦР-сборка фрагментов ДНК из олигонуклеотидов

Сборку проводили в две стадии. На первой стадии 2 мкл смеси олигонуклеотидов (концентрация 1000, 100, 10 или 1 нМ каждого) добавляли к реакционной смеси, содержащей 0.5 мкл полимеразы, буфера, соответствующего используемой полимеразе, 0.2 мМ dNTP («Евроген», Россия). Дополнительно в реакцию добавляли MgSO₄ (Fermentas, США) до конечных концентраций 5 или 10 мМ, формамид до конечной концентрации 2%, ПЭГ 4000 (50%) (Fermentas) до конечной концентрации 7.5% или спермидин до конечной концентрации 0.5 или 2.5 мМ. Использовали полимеразы Taq (5 ед./мкл, «Литех», Россия), Tersus (50X, «Евроген») с коммерческими буферами или полученную в лаборатории Phusion с 1× реакционным буфером (10 мМ Tris-HCl, pH 8.8, 50 мМ KCl, 2.5 мМ MgSO₄, 0.1% Triton X-100, 0.2 мг/мл БСА). Активность полученной Phusion ДНК-полимеразы соответствовала активности коммерческой Phusion Hot Start II DNA Polymerase (2 ед./мкл, Thermo Fisher Scientific). Основная программа для сборки: 95°C 3 мин, затем 20 циклов – 95°C 30 с, 58°C 30 с и 72°C 1 мин, финальная достройка – 72°C 5 мин. Использовали и другие варианты программы, в которых использовали градиент температуры на стадии отжига (55, 55.9, 57.6, 60.1, 63.2, 65.8, 67.3 либо 68°C), 2 мин элонгации либо 30 циклов реакции.

На второй стадии нарабатывали достроенный фрагмент ДНК. После первой стадии ПЦР 2 мкл реакционной смеси переносили в реакционную смесь, содержащую 20 мМ Tris pH 8.8, 10 мМ KCl, 2 мМ MgSO₄, 6 мМ (NH₄)₂SO₄, 0.1% Triton X-100, 0.1 мг/мл БСА, ДНК-полимеразу Phusion, 250 нМ каждого праймера, 0.2 мМ dNTP. Программа наработки: 95°C 3 мин, затем 25 циклов – 95°C 30 с, 58°C 30 с и 72°C 1 мин, финальная достройка – 72°C 5 мин.

Сборка гена транспозазы

Сборку гена проводили в две стадии. На первой стадии 2 мкл смеси олигонуклеотидов (500, 100, 10 или 1 нМ каждого) добавляли в реакционную смесь с 0.5 мкл полимеразы, буфером, соответствующим используемой полимеразе, 0.2 мМ dNTP. Дополнительно в реакции присутствовали 10 мМ MgSO₄ либо 2.5 мМ спермидина. Использовали полимеразы Taq (5 ед./мкл, «Литех») или полученную в лаборатории Phusion с 1× реакционным буфером (10 мМ Tris-HCl, pH 8.8, 50 мМ KCl, 0.1% Triton X-100, 0.2 мг/мл БСА). Активность полученной Phusion ДНК-полимеразы соответствовала активности коммерческой Phusion Hot Start II DNA Polymerase (2 ед./мкл, Thermo Fisher Scientific). Основная программа для сборки: 98°C 3 мин, затем 20 циклов – 96°C 15 с, 57°C 20 с и 72°C 1 мин.

На второй стадии 2 мкл полученной реакционной смеси переносили в 25 мкл реакционной смеси с 50 mM Tris pH 8.8, 100 mM KCl, 2.5 mM MgSO₄, 0.1% Triton X-100, 0.2 мг/мл БСА, ДНК-полимеразой Phusion, 300 нМ каждого праймера, 0.2 mM dNTP. Программа для наработки: 96°C 1 мин, затем 25 циклов – 95°C 15 с, 57°C 20 с и 72°C 1 мин.

Определение ошибок, возникающих в результате сборки фрагментов, в последовательности ДНК

Для определения влияния используемой ДНК-полимеразы на частоту возникновения разных типов ошибок в собранном фрагменте ДНК проводили сборку гена транспозазы в описанных ниже условиях. В качестве ДНК-полимеразы использовали Taq (5 ед./мкл, «Литех») или полученную в лаборатории Phusion с 1× реакционным буфером (10 mM Tris-HCl, pH 8.8, 50 mM KCl, 0.1% Triton X-100, 0.2 мг/мл БСА). Активность полученной Phusion ДНК-полимеразы соответствовала активности коммерческой Phusion Hot Start II DNA Polymerase (2 ед./мкл, Thermo Fisher Scientific). Сборку гена проводили в две стадии. На первой стадии 2 мкл смеси олигонуклеотидов добавляли в реакционную смесь (0.5 мкл полимеразы, соответствующий используемой полимеразе буфер, 0.2 mM dNTP и 2.5 mM спермидин). Основная программа для сборки: 98°C 3 мин, затем 20 циклов – 96°C 15 с, 57°C 20 с и 72°C 1 мин.

На второй стадии 2 мкл полученной реакционной смеси переносили в 25 мкл реакционной смеси с 10 mM Tris pH 8.8, 100 mM KCl, 2.5 mM MgSO₄, 0.1% Triton X-100, 0.2 мг/мл БСА, ДНК-полимеразой Phusion, 300 нМ каждого праймера, 0.2 mM dNTP. Программа для наработки: 96°C 1 мин, затем 25 циклов – 95°C 15 с, 57°C 20 с и 72°C 1 мин.

Ген, собранный с помощью Taq-ДНК-полимеразы, был клонирован в вектор pET15 с помощью NEBuilder (NEB, США) и химически трансформирован в клетки *E. coli* Top10. Ген, собранный с помощью Phusion ДНК-полимеразы, был клонирован в вектор pTZ57RT с помощью гомологичной рекомбинации *in vivo* после химической трансформации в *E. coli* штамм Top10, несущий плазмиду pKM200 (Addgene) с рекомбинационной системой Lambda Red. По 18 клонов каждого варианта гена секвенировали методом Сенгера на генетическом анализаторе Honor 1616 (Nanjing Superyears Gene Technology Co., Ltd., КНР).

В дальнейшем для сборки фрагментов ДНК длиной до 1500 п.н. использовали условия, описанные выше, и полученной в лаборатории ДНК-полимеразы Phusion с 1× реакционным буфером.

Объединение фрагментов ДНК с помощью ПЦР

Фрагменты дцДНК длиной 1009 (фрагмент 1), 1152 (фрагмент 2) и 1254 (фрагмент 3) п.н., полученные после сборки из олигонуклеотидов, использовали для объединения в пары (2 и 3) и тройки (1, 2 и 3). Количество матрицы, добавляемой в реакцию, варьировали. При объединении пары фрагментов концентрация каждого из них в реакционной смеси составила 3 нМ, 300 пМ, 30 пМ и 3 пМ; тройки – 2 нМ, 200 пМ, 20 пМ, 2 пМ. Концентрацию фрагментов измеряли с помощью флуориметра Qubit (Thermo) и набора dsDNA BR Assay Kit (Thermo). При сборке трех фрагментов ампликоны вносили как без очистки (в виде реакционной смеси после сборки из олигонуклеотидов), так и очищенные на магнитных частицах NEBNext Sample Purification beads (NEB) по протоколу производителя. Каждый образец содержал 0.4 мкл полимеразы Taq (5 ед./мкл, «Литех») или Tersus (50X, «Евроген»), соответствующий коммерческий буфер, 0.2 mM dNTP и пару праймеров с конечной концентрацией в смеси 0.25 мкМ. Реакцию амплификации проводили при концентрациях спермидина 0, 0.5 либо 2.5 mM. Условия проведения амплификации: 95°C 3 мин, затем 20 циклов – 95°C 30 с, 62°C 30 с и 72°C 5 мин, в конце достройка 5 мин.

Визуализация сборки фрагментов

Визуализацию проводили с помощью электрофоретического разделения фрагментов ДНК в горизонтальном 1% агарозном геле в 0.1 M Tris-боратном буфере при 150 В в течение 20–40 мин.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Оптимизация условий сборки фрагментов ДНК из олигонуклеотидов

Для оптимизации условий мы использовали фрагмент оперона рибосомных белков *Mycoplasma gallisepticum* S6, состоящий из гена *rpsJ* и первой половины гена *rplC* (1016 п.н.). С помощью разработанной нашей группой программы SynthBac (манускрипт в редакции) фрагмент был разбит на 47 перекрывающихся термодинамически оптимизированных олигонуклеотидов со средней длиной 43 п.н. [27]. Сборку гена проводили в две стадии ПЦР: на первой стадии олигонуклеотиды достраивали до сборки фрагмента с полной последовательностью, на второй стадии при добавлении концевых праймеров происходила амплификация полученного фрагмента.

В данной работе были оптимизированы условия ПЦР первой стадии (рис. 1). Все условия реакции применяли к олигонуклеотидам, взятым в реакцию в четырех разных концентрациях (100, 10, 1 и 0.1 нМ каждого в реакционной смеси). В соответствии с по-

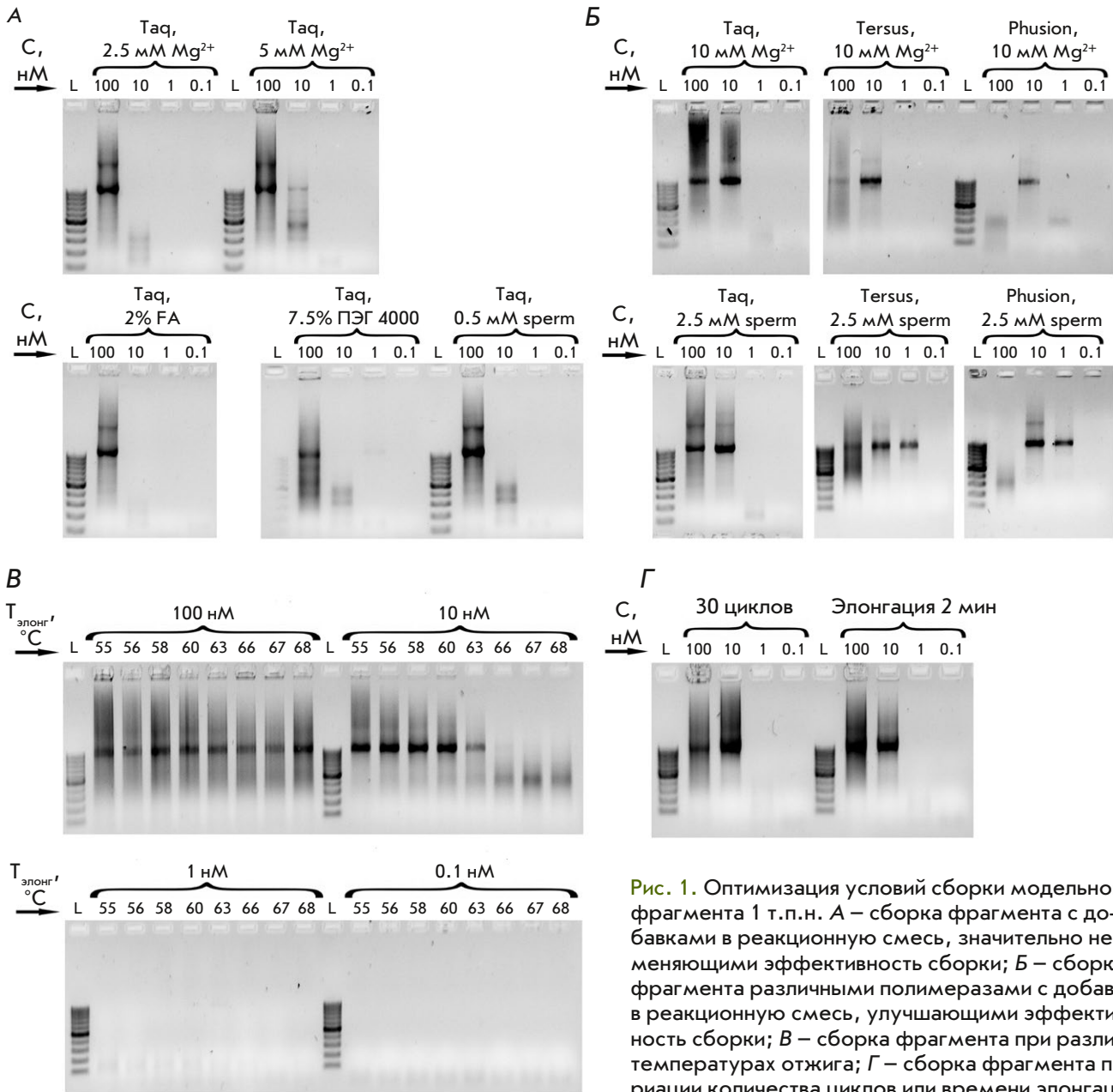


Рис. 1. Оптимизация условий сборки модельного фрагмента 1 т.п.н. А – сборка фрагмента с добавками в реакционную смесь, значительно не изменяющими эффективность сборки; Б – сборка фрагмента различными полимеразами с добавками в реакционную смесь, улучшающими эффективность сборки; В – сборка фрагмента при различных температурах отжига; Г – сборка фрагмента при вариации количества циклов или времени элонгации. L – маркер длин GeneRuler 100 bp (Thermo), sperm – спермидин, С – концентрация каждого олигонуклеотида в реакционной смеси

лученными результатами, оптимальный диапазон концентраций олигонуклеотидов для сборки фрагментов ДНК находится в районе десятков нМ и немного варьирует в зависимости от состава реакционной смеси. В реакционной смеси мы варьировали концентрацию ионов Mg^{2+} (2.5, 5 и 10 мМ) и выяснили, что она оказывает значимое влияние на получение финального продукта – фрагменты гораздо лучше собираются в присутствии 10 мМ Mg^{2+} , хотя такие большие концентрации уже не используются

для амплификации фрагментов (рис. 1А,Б). Изучено также влияние формамида и ПЭГ 4000 в реакционной смеси на сборку фрагментов. Показано, что добавление этих компонентов не оказывает значимого эффекта (рис. 1А). Интересно, что добавление в реакционную смесь 2.5 мМ спермидина существенно улучшало сборку фрагментов ДНК (рис. 1Б). Увеличение времени элонгации или количества циклов в программе сборки также способствовало лучшей сборке фрагментов (рис. 1Г). При больших

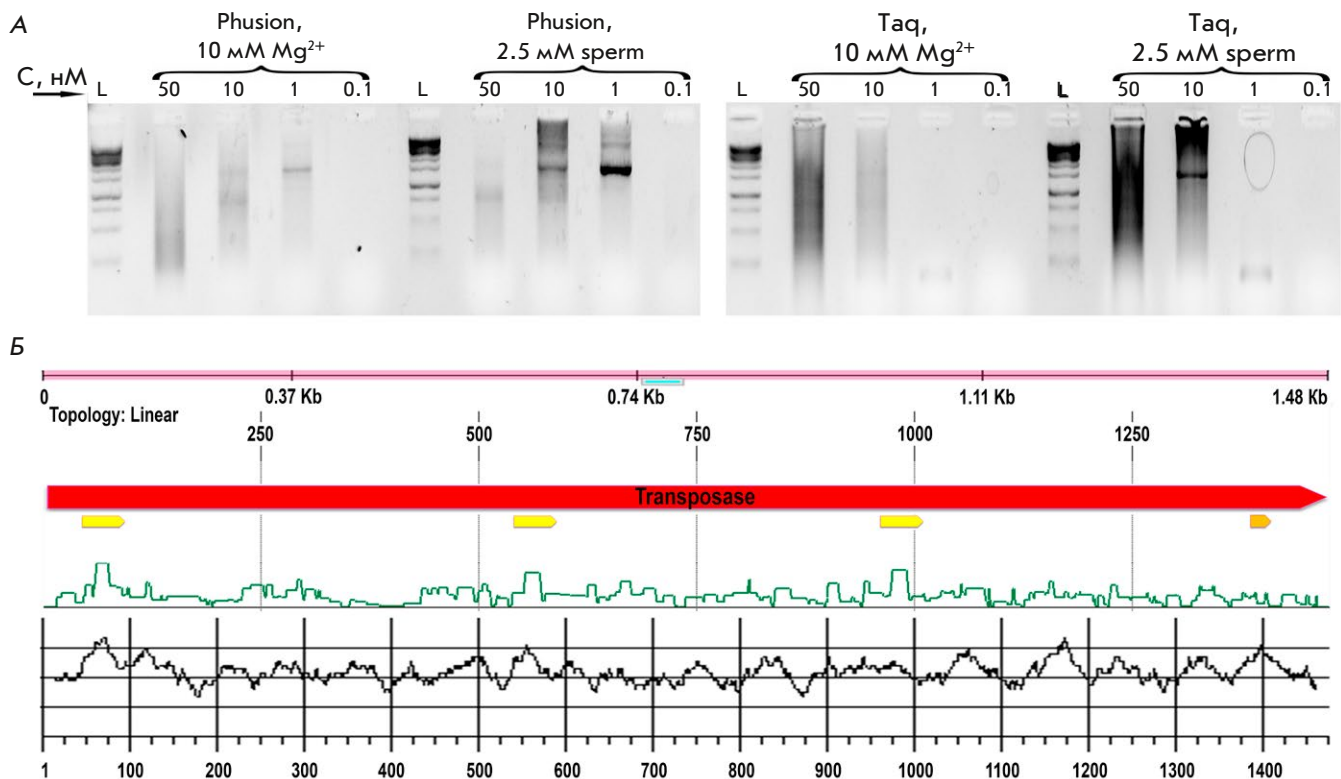


Рис. 2. А – оптимизация условий сборки гена транспозазы. L – маркер длин GeneRuler 1 kb (Thermo), sperm – спермидин, С – концентрация каждого олигонуклеотида в реакционной смеси; Б – аннотация последовательности транспозазы в окне программы SynthBac. Красной стрелкой обозначена кодирующая рамка транспозазы, желтыми – шпильки, темно-желтой – мотив с потенциальным G-квадруплексом, зеленой линией обозначена возможность образования вторичной структуры. Черная линия на отдельной панели – GC-состав, рассчитанный в окне 20 п.н.

концентрациях олигонуклеотидов реакция сборки эффективно протекает в широком диапазоне температур отжига, однако при уменьшении концентрации наблюдается обычное для ПЦР уменьшение гибридизации при повышении температуры отжига (рис. 1В). Исследована также эффективность ПЦР-сборки при использовании разных полимераз – Taq, Tersus и Phusion – в оптимальных для сборки условиях (с 10 mM Mg²⁺ либо 2.5 mM спермидина) (рис. 1В). Показано, что все исследуемые полимеразы эффективно собирают фрагменты ДНК из олигонуклеотидов, но имеют различный оптимальный диапазон концентраций используемых олигонуклеотидов.

Сборка фрагмента гена транспозазы

Ген транспозазы (1476 п.н.) был разбит на 64 олигонуклеотида со средней длиной 45 п.н. программой SynthBac [27] с помощью алгоритма для термодинамически оптимизированных олигонуклеотидов. Большинство генов успешно собиралось по оптимизированной нами методике, однако ген транспозазы имеет сложную для сборки последовательность. Экспериментально показано, что сложный

фрагмент находится ближе к 3'-концу гена (данные не приведены). Сложными для сборки являются области гена с неоднородным GC-составом, вторичные структуры, такие, как три идентифицированные потенциальные шпильки, либо мотив GGGTGCACCTGTGGGAGGGCTGGG, предсказанный [29] как потенциальный G-квадруплекс (рис. 2Б). Получить нужный фрагмент (полноразмерный (рис. 2А) или разбитый на две примерно равные части) удалось только при проведении реакции сборки в присутствии 2.5 mM спермидина. Таким образом, спермидин также увеличивает специфичность реакции.

Универсальность предложенных условий для сборки разнообразных последовательностей подтвердили, успешно собрав 11 различных фрагментов ДНК длиной около 1.5 т.п.н. при добавлении в реакционную смесь спермидина на первой стадии сборки (рис. 3).

Определение ошибок, возникающих в результате сборки фрагментов, в последовательности ДНК

Было исследовано влияние типа ДНК-полимеразы, используемой в первой стадии сборки фрагментов

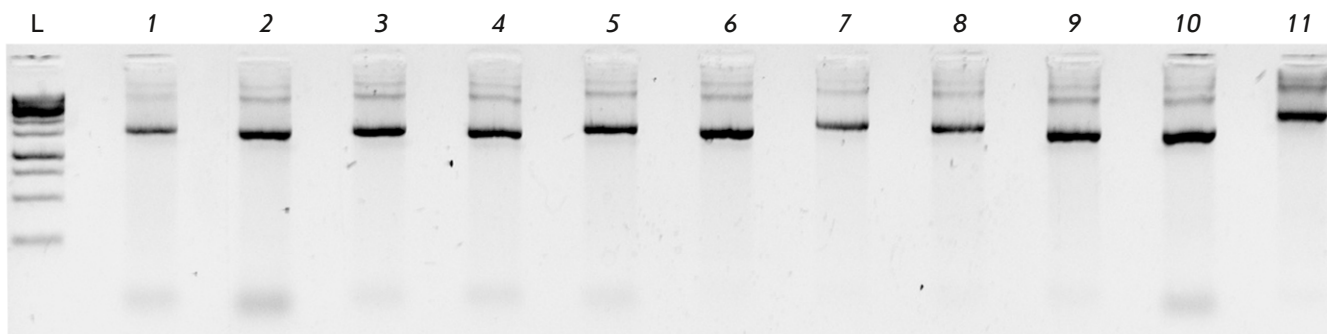


Рис. 3. Апробация предложенного метода и условий сборки ДНК из олигонуклеотидов на 11 различных последовательностях длиной около 1500 п.н.

ДНК, на количество ошибок разного типа в конечной сборке целевого фрагмента (табл. 1). Показано, что сборка Taq-полимеразой дает фрагменты с частотой ошибок 8 на 1 т.п.н., а сборка Phusion-полимеразой – три ошибки на 1 т.п.н. (суммарные ошибки в табл. 1). При этом частоты вставок и делеций, встречающиеся во фрагментах, совпадают, а основным отличием при использовании разных полимераз является количество замен, особенно транзиций G/C в A/T.

Объединение нескольких фрагментов ДНК с помощью ПЦР

Ген эндонуклеазы рестрикции BseRI длиной 3348 п.н. был разбит на три перекрывающихся фрагмента длиной 1009 (фрагмент 1), 1152 (фрагмент 2) и 1254 п.н. (фрагмент 3). Каждый из фрагментов был также разбит на олигонуклеотиды программой SynthBac [27] с помощью алгоритма для термодинамически оптимизированных олигонуклеотидов и собран по оптимизированной нами методике. Фрагменты объединяли по два (рис. 4А) и по три фрагмента в одной реакции (рис. 4Б,В). Проведена также реакция объединения фрагментов после предварительной очистки (рис. 4В). Во всех выбранных вариантах получен полноразмерный продукт с примерно одинаковой эффективностью. Были проанализированы различные условия реакции, такие, как сборка полимеразой Taq и Tersus, различные концентрации олигонуклеотидов, а также дополнительная добавка 0.5 или 2.5 mM спермидина в реакцию. В этом случае субстраты реакции имели оптимум концентраций от десятков пМ для Taq-полимеразы и сотен пМ для Tersus, а спермидин не оптимизировал реакцию.

ДНК вибриофага N4 длиной 38.5 т.п.н. была разбита на фрагменты длиной около 1.5 т.п.н. с помощью программы SynthBac [27]. Каждый такой фрагмент был предварительно собран из олигонуклеотидов по оптимизированной нами мето-

Таблица 1. Частоты ошибок на 1 т.п.н. при сборке гена транспозазы с помощью Taq либо Phusion ДНК-полимеразы*

Тип ошибки	Сборка Taq-полимеразой	Сборка Phusion-полимеразой
Замены	5.95±0.47	0.90±0.18
Транзиции		
G/C в A/T	3.58±0.48	0.26±0.10
A/T в G/C	0.98±0.16	0.08±0.05
Трансверсии		
G/C в C/G	0.30±0.13	0.19±0.07
G/C в T/A	0.30±0.13	0.19±0.07
A/T в C/G	0.30±0.11	0.11±0.06
A/T в T/A	0.49±0.11	0.08±0.05
Делеции		
Единичные	1.17±0.16	1.09±0.22
Множественные	0.41±0.15	0.30±0.11
Вставки		
Единичные	0.56±0.15	0.49±0.14
Множественные	0	0.19±0.07
Суммарные ошибки	8.09±0.66	2.97±0.30

*Данные представлены в виде среднего значения для 18 независимых образцов со стандартной ошибкой.

дике. Собрать более длинные фрагменты длиной до 7.5 т.п.н. из пяти фрагментов с использованием методики, оптимизированной для меньших фрагментов, не удалось, однако снижение температуры и увеличение времени элонгации позволили воспроизводимо собирать фрагменты ДНК длиной до 7.5 т.п.н. (рис. 5). Фрагменты подобной длины можно также собирать, амплифицируя матрицу после реакции Гибсона [30].

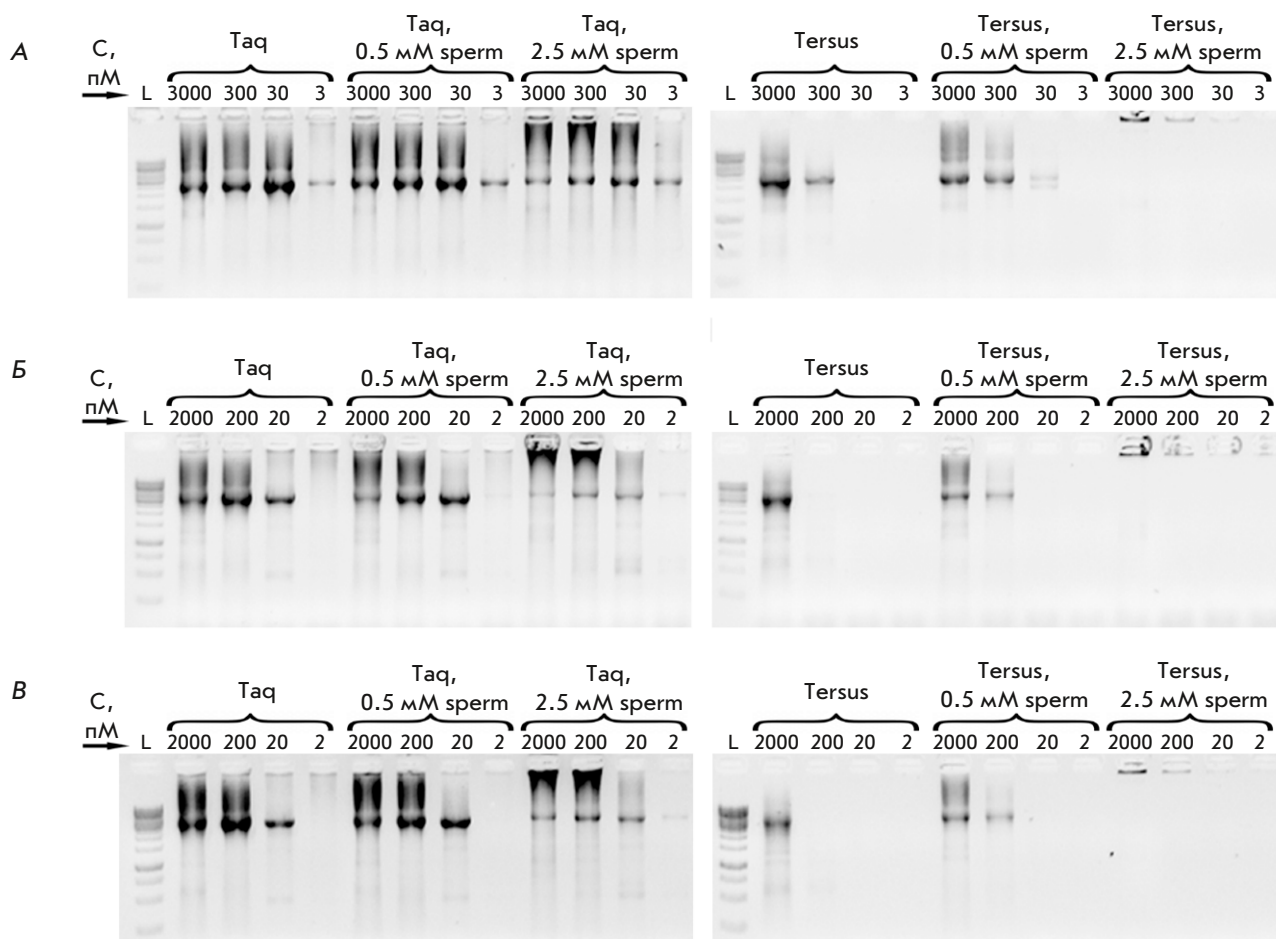


Рис. 4. Оптимизация условий объединения фрагментов гена *BseRI*. L – маркер длин GeneRuler 1 kb (Thermo), sperm – спермидин, С – концентрация каждого ампликона в реакционной смеси. А – объединение двух фрагментов 2 и 3; Б – объединение трех фрагментов 1, 2 и 3; В – объединение трех предварительно очищенных фрагментов 1, 2 и 3

ОБСУЖДЕНИЕ

Из наиболее часто используемых методов сборки ДНК из олигонуклеотидов нами выбран метод ПЦР-сборки. Преимуществами метода ПЦР-сборки в сравнении с лигазно-циклической сборкой (ЛЦР) являются меньшая концентрация олигонуклеотидов в реакции, меньшее количество стадий сборки и использование только ДНК-полимеразы.

Сборка фрагментов ДНК методом ПЦР состоит из двух стадий. На первой стадии олигонуклеотиды гибридизуются друг с другом и достраиваются, образуя требуемый фрагмент, на второй стадии осуществляется амплификация полноразмерного фрагмента. В данной работе оптимизирована первая стадия ПЦР-сборки – стадия достройки олигонуклеотидов до полноразмерного продукта.

Показано, что оптимальными для сборки ДНК являются концентрации олигонуклеотидов около 10 нМ, ионов Mg^{2+} 10 мМ либо 2.5 мМ спермидина.

Концентрации олигонуклеотидов для разных полимераз немного отличаются. Описан широкий диапазон концентраций олигонуклеотидов, используемых в реакции сборки: от 2.5 мкМ [16], 10–60 нМ [31] либо от 10 нМ [32], а также указывается на важность выбора полимеразы [32]. Интересным представляется влияние спермидина на результаты сборки ДНК. Добавление спермидина в реакционную смесь позволяет избежать увеличения концентрации ионов магния в реакции, а также повысить специфичность сборки. Существуют сообщения как об улучшении эффективности амплификации ДНК при использовании спермидина в реакции [26, 33], так и про отсутствие эффекта [34]. При этом спермидин способствует прохождению реакции амплификации в сложных образцах [35, 36]. Показано, что основной мишенью при взаимодействии поликатиона спермидина с ДНК в В-форме являются фосфаты [37]. По-видимому, спермидин дает возмож-

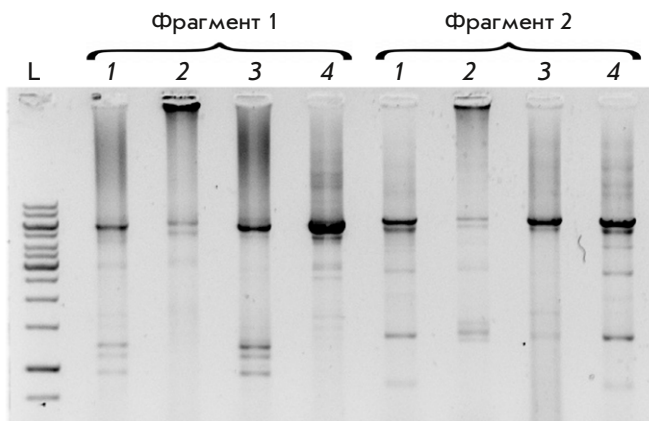


Рис. 5. Оптимизация условий объединения пяти фрагментов по 1.5 т.п.н. Фрагмент 1 и фрагмент 2 – разные фрагменты вибриофага N4, L – маркер длин GeneRuler 1 kb (Thermo), 1 – обычные условия объединения ПЦР, 2 – ПЦР с добавлением 2.5 мМ спермидина, 3 – ПЦР после реакции Гибсона, 4 – ПЦР с элонгацией на 65°C и увеличенным временем элонгации

ность гибридизоваться олигонуклеотидам в дцДНК, нейтрализуя отрицательный заряд фосфатного остова и стабилизируя дуплексы.

В настоящее время фактором, лимитирующим *de novo* сборку ДНК, являются ошибки в полученной матрице, что связано как с качеством олигонуклеотидов, так и с точностью полимераз [38–41]. Уменьшение количества ошибок позволит снизить трудоемкость работы и стоимость скрининга клонов и их секвенирования для нахождения безошибочных вариантов. В случае оптимизированной методики частота ошибок при сборке Phusion-полимеразой составила 3 на 1 т.п.н.

Были оптимизированы условия объединения нескольких фрагментов ДНК длиной 1–1.5 т.п.н. с комплементарными концами во фрагменты длиной до 7.5 т.п.н. с помощью ПЦР. Наиболее подходящими и широко используемыми методами объединения протяженных фрагментов ДНК являются реакция Гибсона [30] и ее варианты, а также гомологичная рекомбинация в дрожжах [42, 43]. Однако объединение нескольких ампликонов с помощью ПЦР представляет собой более простой и быстрый способ, использующий меньшее разнообразие ферментов. Показано, что полноразмерный продукт длиной 2–3 т.п.н. можно получить в широком диапазоне условий, обычных для ПЦР-амплификации, а спермидин не оказывает на реакции этого типа положительного влияния, в отличие от реакции сборки ДНК из олигонуклеотидов. При уменьшении температуры и времени элонгации методом амплификации можно объединять фрагменты длиной до 7.5 т.п.н.

Таким образом, в данной работе унифицированы условия сборки фрагментов ДНК из олигонуклеотидов методом полимеразной цепной сборки. Показано, что реакция сборки протекает эффективно при концентрациях олигонуклеотидов в районе 10 нМ с добавлением в реакционную смесь 10 мМ Mg²⁺ или 2.5 мМ спермидина. Выбор концентрации олигонуклеотидов зависит от полимеразы. Добавление в реакционную смесь 2.5 мМ спермидина позволяет повысить специфичность сборки. Использование для сборки более точной Phusion-полимеразы позволяет сократить количество ошибок в оптимизированных условиях до 3 на 1 т.п.н., в основном, за счет меньшего количества замен.

Для объединения полученных из синтетических олигонуклеотидов фрагментов ДНК нами были оптимизированы условия объединения нескольких фрагментов дцДНК размером около 1 т.п.н. с перекрывающимися областями на концах во фрагмент протяженностью до 7.5 т.п.н. ●

Вклад авторов.

Т.А. Семашко – написание первого варианта текста; Д.В. Евсютина – обзор во «Введении», биоинформатический анализ данных; Т.А. Семашко, Г.Ю. Фисунов, Е.А. Цой, Д.В. Евсютина, Г.Ю. Шевелёв – проведение экспериментов по сборке фрагментов ДНК; Д.Р. Харрасов, Г.Ю. Фисунов – получение рекомбинантной полимеразы Phusion; Г.Ю. Шевелёв – синтез части олигонуклеотидов; И.К. Чудинов – секвенирование по Сенгеру; В.М. Говорун – руководство работой; все авторы участвовали в обсуждении работы и редактировании текста статьи.

Финансирование.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (грант № 18-29-08043) в части оптимизации метода сборки фрагментов ДНК из олигонуклеотидов и Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека (грант 122030900107-3) в части определения количества ошибок в сборке и сборке протяжённых фрагментов размером до 10 т.п.н.

Конфликт интересов.

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Соблюдение этических норм.

Настоящая статья не содержит описания каких-либо исследований с участием людей или животных в качестве объектов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Agarwal K.L., Büchi H., Caruthers M.H., Gupta N., Khorana H.G., Kleppe K., Kumar A., Ohtsuka E., Rajbhandary U.L., van de Sande J.H., et al. // *Nature*. 1970. V. 227. № 5253. P. 27–34.
2. Smith H.O., Hutchison C.A., Pfannkoch C., Venter J.C. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2003. V. 100. № 26. P. 15440–15445.
3. Gibson D.G., Benders G.A., Andrews-Pfannkoch C., Denisova E.A., Baden-Tillson H., Zaveri J., Stockwell T.B., Brownley A., Thomas D.W., Algire M.A., et al. // *Science*. 2008. V. 319. № 5867. P. 1215–1220.
4. Venetz J.E., del Medico L., Wölfle A., Schächle P., Bucher Y., Appert D., Tschan F., Flores-Tinoco C.E., van Kooten M., Guennoun R., et al. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2019. V. 116. № 16. P. 8070–8079.
5. Annaluru N., Muller H., Mitchell L.A., Ramalingam S., Stracquadanio G., Richardson S.M., Dymond J.S., Kuang Z., Scheifele L.Z., Cooper E.M., et al. // *Science*. 2014. V. 344. № 6179. P. 55–58.
6. Lajoie M.J., Rovner A.J., Goodman D.B., Aerni H.R., Haimovich A.D., Kuznetsov G., Mercer J.A., Wang H.H., Carr P.A., Mosberg J.A., et al. // *Science*. 2013. V. 342. № 6156. P. 357–360.
7. Chatterjee A., Lajoie M.J., Xiao H., Church G.M., Schultz P.G. // *ChemBiochem*. 2014. V. 15. № 12. P. 1782–1786.
8. Jain K.K. // *Med. Princ. Pract.* 2013. V. 22. № 3. P. 209–219.
9. Peng R.H., Yao Q.H., Xiong A.S., Cheng Z.M., Li Y. // *Plant Cell Rep.* 2006. V. 25. № 2. P. 124–132.
10. Xiong A.S., Yao Q.H., Peng R.H., Zhang Z., Xu F., Liu J.G., Han P.L., Chen J.M. // *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 2006. V. 72. № 5. P. 1039–1047.
11. Casini A., Storch M., Baldwin G.S., Ellis T. // *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 2015. V. 16. № 9. P. 568–576.
12. Kosuri S., Church G.M. // *Nat. Methods*. 2014. V. 11. № 5. P. 499–507.
13. Shevelev G.Y., Pyshnyi D.V. // *Vavilov J. Genet. Breed.* 2018. V. 22. № 5. P. 498–506.
14. Dietrich R., Wirsching F., Opitz T., Schwienhorst A. // *Biotechnol. Techniques*. 1998. V. 12. № 1. P. 49–54.
15. Gibson D.G. // *Nucl. Acids Res.* 2009. V. 37. № 20. P. 6984–6990. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19745056>.
16. Stemmer W.P.C., Cramer A., Ha K.D., Brennan T.M., Heyneker H.L. // *Gene*. 1995. V. 164. № 1. P. 49–53.
17. Xiong A.S., Yao Q.H., Peng R.H., Li X., Fan H.Q., Cheng Z.M., Li Y. // *Nucl. Acids Res.* 2004. V. 32. № 12. P. e98.
18. Gao X., Yo P., Keith A., Ragan T.J., Harris T.K. // *Nucl. Acids Res.* 2003. V. 31. № 22. P. e143.
19. Sandhu G.S., Aleff R.A., Kline B.C. // *Biotechniques*. 1992. V. 12. № 1. P. 14–16.
20. Xiong A.S., Yao Q.H., Peng R.H., Duan H., Li X., Fan H.Q., Cheng Z.M., Li Y. // *Nat. Protoc.* 2006. V. 1. № 2. P. 791–797.
21. Chakrabarti R., Schutt C.E. // *Nucl. Acids Res.* 2001. V. 29. № 11. P. 2377–2381.
22. Jensen M.A., Fukushima M., Davis R.W. // *PLoS One*. 2010. V. 5. № 6. P. e11024.
23. Henke W., Herdel K., Jung K., Schnorr D., Loening S.A. // *Nucl. Acids Res.* 1997. V. 25. № 19. P. 3957.
24. Jurišić V., Obradović J., Tošić N., Pavlović S., Kulić M., Djordjević N. // *J. Pharm. Biomed. Anal.* 2016. V. 128. P. 275–279.
25. Karunanathie H., Kee P.S., Ng S.F., Kennedy M.A., Chua E.W. // *Biochimie*. 2022. V. 197. P. 130–143.
26. Wan C.Y., Wilkins T.A. // *PCR Methods Appl.* 1993. V. 3. № 3. P. 208–210.
27. <https://sysbiomed.ru/upload/SynthBac.zip>.
28. Garanina I.A., Fisunov G.Y., Govorun V.M. // *Front. Microbiol.* 2018. V. 9. P. 2827.
29. Kikin O., D'Antonio L., Bagga P.S. // *Nucl. Acids Res.* 2006. V. 34. № suppl_2. P. W676–W682. <https://doi.org/10.1093/nar/gkl253>.
30. Gibson D.G., Young L., Chuang R.-Y., Venter J.C., Hutchison C.A., Smith H.O. // *Nat. Methods*. 2009. V. 6. № 5. P. 343–345.
31. Ye H., Huang M.C., Li M.H., Ying J.Y. // *Nucl. Acids Res.* 2009. V. 37. № 7. P. e51.
32. Wu G., Wolf J.B., Ibrahim A.F., Vadasz S., Gunasinghe M., Freeland S.J. // *J. Biotechnol.* 2006. V. 124. № 3. P. 496–503.
33. Ahokas H., Erkkilä M.J. // *PCR Methods Appl.* 1993. V. 3. № 1. P. 65–68.
34. Blanchard M.M., Taillon-Miller P., Nowotny P., Nowotny V. // *PCR Methods Appl.* 1993. V. 2. № 3. P. 234–240.
35. Roperch J.P., Benzekri K., Mansour H., Incitti R. // *BMC Biotechnol.* 2015. V. 15. P. 41.
36. Kikuchi A., Sawamura T., Kawase N., Kitajima Y., Yoshida T., Daimaru O., Nakakita T., Itoh S. // *Biochem. Genet.* 2010. V. 48. № 5–6. P. 428–432.
37. Deng H., Bloomfield V.A., Benevides J.M., Thomas G.J. // *Nucl. Acids Res.* 2000. V. 28. № 17. P. 3379.
38. Smith H.O., Hutchison C.A., Pfannkoch C., Venter J.C. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2003. V. 100. № 26. P. 15440–15445.
39. Sequeira A.F., Brás J.L.A., Guerreiro C.I.P.D., Vincentelli R., Fontes C.M.G.A. // *BMC Biotechnol.* 2016. V. 16. № 1. P. 86.
40. Carr P.A., Park J.S., Lee Y.J., Yu T., Zhang S., Jacobson J.M. // *Nucl. Acids Res.* 2004. V. 32. № 20. P. e162–e162.
41. Ma S., Saaem I., Tian J. // *Trends Biotechnol.* 2012. V. 30. № 3. P. 147–154.
42. Ma H., Kunes S., Schatz P.J., Botstein D. // *Gene*. 1987. V. 58. № 2–3. P. 201–216.
43. Gibson D.G., Benders G.A., Axelrod K.C., Zaveri J., Algire M.A., Moodie M., Montague M.G., Venter J.C., Smith H.O., Hutchison C.A. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2008. V. 105. № 51. P. 20404–20409.

УДК 577.2

Димерные бисбензимидазолпирролы $DB_2Py(n)$ – АТ-сайт-специфичные лиганды: синтез, физико-химический анализ и исследования биологической активности

О. Ю. Сусова^{1*}, С. Ш. Каршиева¹, А. А. Костюков², Н. И. Моисеева¹, Е. А. Зайцева¹, К. В. Калабина¹, Е. Жусинайте⁴, К. Гильдеманн⁴, Н. М. Смирнов³, А. Ф. Арутюнян³, А. Л. Жузе³

¹НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина Минздрава России, Москва, 115522 Россия

²Институт биохимической физики им. Н.М. Эмануэля РАН, Москва, 119334 Россия

³Институт молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта РАН, Москва, 119991 Россия

⁴Тартуский университет, Институт технологии, Тарту, 50411 Эстония

*E-mail: o.susova@ronc.ru

Поступила в редакцию 16.11.2023

Принята к печати 29.01.2024

DOI: 10.32607/actanaturae.27327

РЕФЕРАТ Бензимидазол является фундаментальным фармакофором при создании лекарств из-за его широкого спектра биологической активности. Синтезированы новые АТ-специфичные флуоресцентные молекулы бисбензимидазола $DB_2Py(n)$, содержащие пирролкарбоксамидный фрагмент антибиотика нетропсина. С использованием спектров поглощения, флуоресценции и кругового дихроизма показана способность бисбензимидазолпирролов к комплексообразованию с ДНК. Новая серия $DB_2Py(n)$ оказалась более токсичной на линиях опухолевых клеток человека и менее токсичной для неопухолевых клеток. Бисбензимидазолпирролы проникали в ядро клетки, воздействовали на фазу S-клеточного цикла, а также в низких концентрациях ингибировали эукариотическую топоизомеразу I в бесклеточной модели. Анализ пролиферации опухолевых клеток в режиме реального времени подтвердил усиление токсических свойств при димеризации бисбензимидазолпиррола. Согласно предварительным данным определения цитотоксичности бисбензимидазолпирролов на клеточной модели с фенотипом множественной лекарственной устойчивости мономерные соединения преодолевают множественную лекарственную устойчивость, в то время как димеризация молекулы приводит к снижению этого свойства до средних величин по сравнению с доксорубицином. Таким образом, новые цитотоксичные бисбензимидазолпиррольные структуры представляют интерес для дальнейшего глубокого изучения их свойств и механизма действия в отношении опухолевых клеток человека, а также для дизайна новых АТ-специфичных лигандов.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА бисбензимидазолпиррол, узкобороздочный лиганд, цитотоксичность, комплексообразование с ДНК, топоизомераза I, клеточный цикл, множественная лекарственная устойчивость.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ ДМФА – диметилформамид; МЛУ – множественная лекарственная устойчивость; Топо-I – эукариотическая топоизомераза I; ХЖКД – холестерическая жидкокристаллическая дисперсия; IC_{50} – концентрация соединения, вызывающая гибель 50% клеток.

ВВЕДЕНИЕ

Соединения, способные связываться с высокой константой с узкой бороздкой ДНК за счет образования водородных связей, представляют интерес в качестве средств, способных регулировать биологическую активность. Применение бисбензимидазолов в качестве лекарственных препаратов открывает

новые возможности для терапии социально значимых заболеваний, в том числе злокачественных новообразований. Быстрый рост устойчивости опухолей к используемым протоколам лечения делает необходимым поиск новых эффективных ДНК-специфичных лигандов, что является важным направлением развития медицинской химии [1–4].

Мишенью ДНК-специфичных соединений на основе узкобороздочных лигандов служат АТ-пары нуклеотидов в структуре ДНК. Существует возможность подбора структуры лиганда под выбранный участок связывания на ДНК, а также исключение неспецифического связывания с ДНК благодаря комплементарным взаимодействиям между ДНК-специфичным лигандом и биомолекулой. В этом плане наиболее перспективны низкомолекулярные узкобороздочные лиганды. Такие соединения в значительной степени свободны от побочного мутагенного эффекта, характерного для низкомолекулярных соединений, интеркалирующих между парами оснований ДНК. Они способны модулировать экспрессию генов и ДНК-связывающих белков, проявляя таким образом противоопухолевые свойства.

Ранее мы получили на основе **Hoechst 33258** ряд флуоресцентных водорастворимых АТ-специфичных димерных бисбензимидазольных узкобороздочных лигандов серий **DB(n)**, **DBP(n)**, **DVA(n)** и **ДВРА(n)**, где **n** равно количеству метиленовых звеньев в линкере. Все вышеупомянутые соединения содержат в своей структуре два АТ-распознающих фрагмента, состоящих из двух бис-

бензимидазольных блоков [5–8]. При взаимодействии с ДНК каждый АТ-распознающий фрагмент образует бифуркационную (трехцентровую) водородную связь с O2-атомом тимина и/или N3-атомом аденина двух соседних АТ-пар, накрывая при этом участок размером примерно полторы пары оснований [9]. Все соединения (**DB(n)**, **DBP(n)**, **DVA(n)** и **ДВРА(n)**) проникали через клеточную и ядерную мембраны, окрашивали ДНК и демонстрировали значительную активность в качестве ингибиторов ДНК-зависимых ферментов.

В работе проведен синтез и изучена биологическая активность новых узкобороздочных лигандов, содержащих в своей структуре АТ-распознающий пирролкарбоксамидный фрагмент, аналогичный фрагменту природного антибиотика нетропсина [10], не нашедшего применения в практике из-за высокой цитотоксичности. Новые лиганды **MB₂Py** и **MB₂Py(Ac)** (рис. 1) состоят из трех АТ-распознающих блоков – двух бензимидазольных и одного пирролкарбоксамидного, ковалентно связанных друг с другом, и димерных производных **DB₂Py(n)** (рис. 1), являющихся продуктом димеризации **MB₂Py** олигометиленовыми α,ω-дикарбоновыми кислотами различной длины

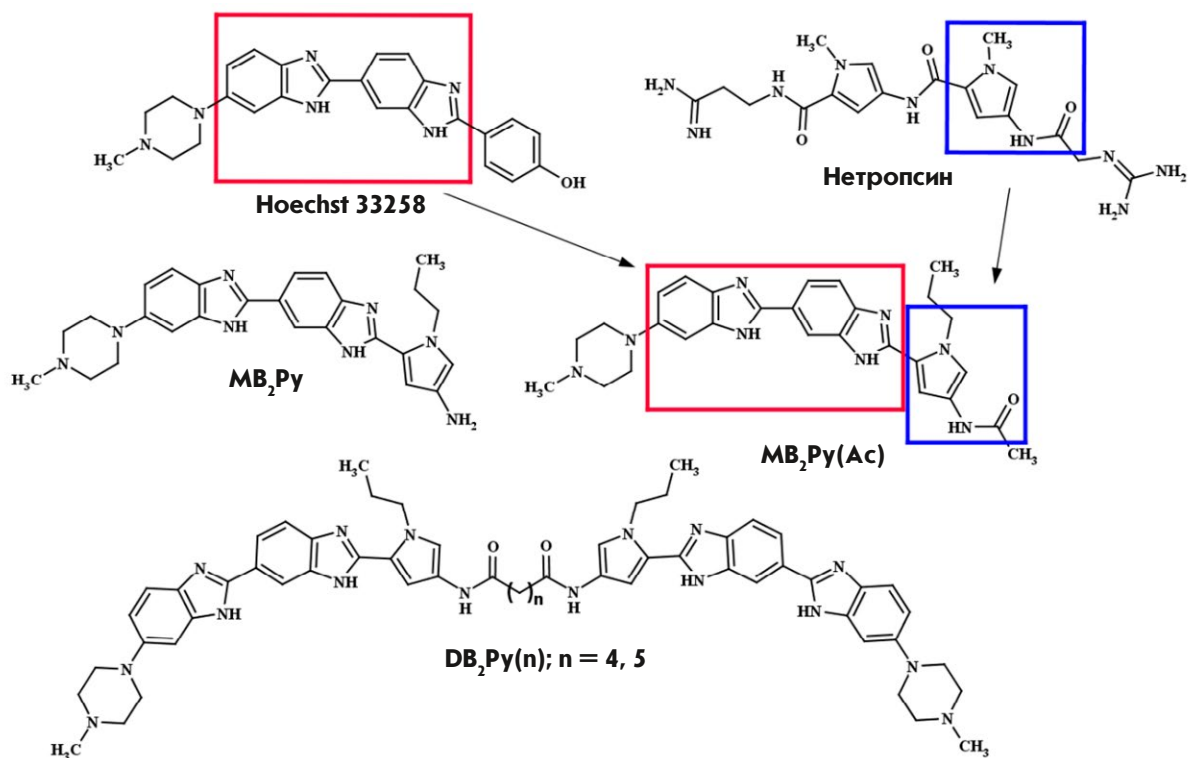


Рис. 1. Структурные формулы **Hoechst 33258**, нетропсина, мономерных **MB₂Py**, **MB₂Py(Ac)** и димерных соединений **DB₂Py(n)**. В **MB₂Py(Ac)** бисбензимидазольный фрагмент выделен красным, а пирролкарбоксамидный фрагмент синим цветом

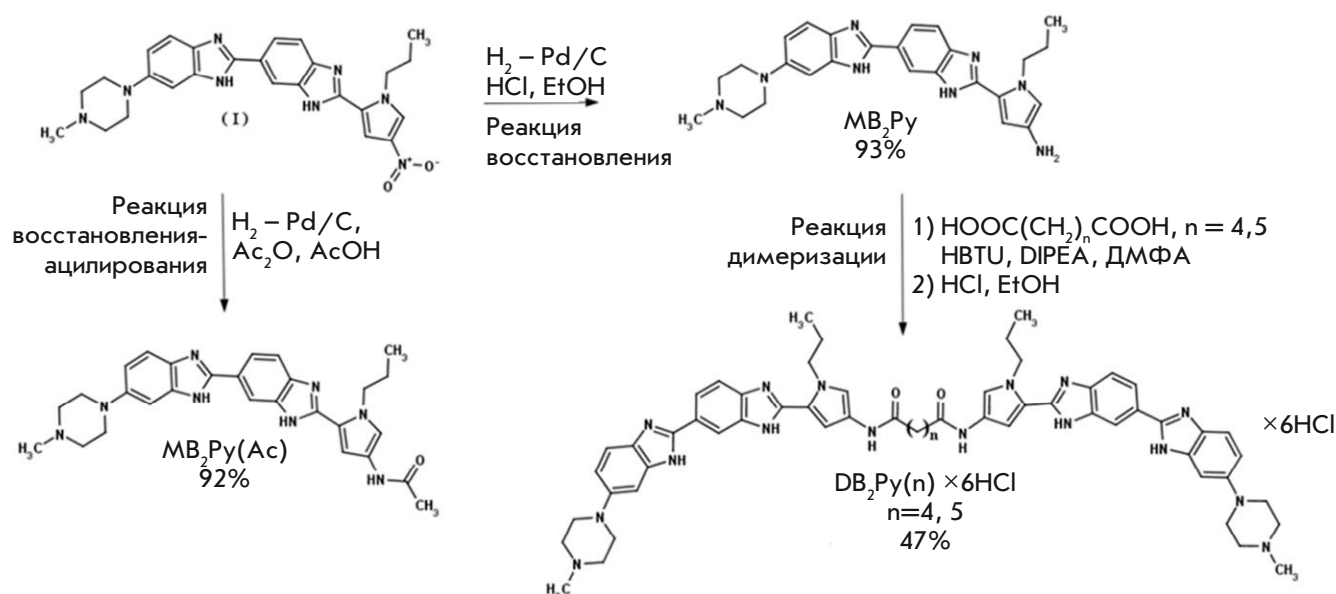


Рис. 2. Схема синтеза мономерных соединений MB_2Py , $MB_2Py(Ac)$ и димерных $DB_2Py(4, 5)$

(n – число метиленовых звеньев в линкере) с образованием симметричных соединений по типу «голова-к-голове». Использование гибкого линкера в димерных соединениях позволит молекуле связываться с двумя АТ-богатыми сайтами, находящимися на разных расстояниях друг от друга. Как показано нами ранее, димеризация мономерного лиганда серии $DB(n)$ привела к увеличению аффинности к ДНК новой структуры [11].

Увеличение количества АТ-распознающих фрагментов в мономерной субъединице ведет к увеличению константы комплексообразования лиганд–ДНК и должно снижать ингибирующую концентрацию в отношении ДНК-зависимых ферментов. В данной работе описываются синтез и изучение биологической активности двух мономерных соединений – MB_2Py и $MB_2Py(Ac)$, и димерных соединений $DB_2Py(n)$.

Синтез димерных бисбензимидазолпирролов $DB_2Py(4,5)$ осуществлен исходя из 6-[6-(4-метилпиперазин-1-ил)-1*H*-1,3-бензодиазол-2-ил]-2-(4-нитро-1-пропил-1*H*-пиррол-2-ил)-1*H*-1,3-бензодиазола (I) (рис. 2), полученного в лаборатории ДНК-белковых взаимодействий Института молекулярной биологии РАН. Соединение (I) использовали для получения мономерного лиганда $MB_2Py(Ac)$ путем восстановления исходного соединения в токе водорода в ледяной уксусной кислоте в присутствии уксусного ангидрида на 10% палладии на угле в качестве катализатора. Мономерное соединение MB_2Py получено аналогичным методом в присутствии соляной кислоты и этанола в качестве растворителя. Исходя из мономерного бис-

бензимидазолпиррольного блока MB_2Py получены два димерных соединения $DB_2Py(n)$ путем его димеризации рядом алифатических нормальных α,ω -дикарбоновых кислот в присутствии $NBTU$ в качестве конденсирующего агента и $DIPEA$ как оснований в $DMFA$, отличающихся количеством метиленовых звеньев в линкере, $n = 4, 5$ (рис. 2).

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

В работе использовали адипиновую и пимелиновую кислоты, $NBTU$, $DIPEA$ (Fluka, Швейцария), диоксан, $DMFA$, ледяную $AcOH$, Ac_2O , $iPrOH$, ацетон («Реахим», Россия). Растворы веществ в органических растворителях сушили над Na_2SO_4 . Растворители упаривали на ротаторном испарителе в вакууме водоструйного насоса, как правило, при 30–50°C. Вещества высушивали в вакууме над P_2O_5 и $NaOH$. Температуры плавления определяли на приборе Voethius (Германия). Гидрирование проводили над 10% Pd/C (Merck, Германия) при атмосферном давлении и комнатной температуре до прекращения поглощения водорода. Чистоту полученных соединений определяли с помощью ТСХ на пластинках Kieselgel 60 F_{254} (Merck). Вещества на хроматограммах обнаруживали в УФ-свете по поглощению при 254 нм и/или по флуоресценции при 365 нм.

Спектры 1H -ЯМР регистрировали на спектрометре Avance III 300 MHz (Bruker, Германия), оснащенным криогенным зондом тройного резонанса TCI (Bruker Biospin GmbH, Германия) в $DMSO-d_6$ при 30°C.

Масс-спектры снимали на времяпролетном приборе AB SCIEX 4800 (AB SCIEX, США) в режиме регистрации положительных ионов (если специально не оговорено); матрица – 2,5-дигидроксibenзойная кислота; N₂ – лазер, 337 нм.

Спектры поглощения регистрировали на спектрофотометре Cary100 (Varian, США).

Спектры флуоресценции растворов измерены на спектрофлуориметре PTI (Photo Technology Intern., Канада). Использовали двухцепочечную ДНК тимуса теленка (Sigma).

Спектры КД регистрировали при помощи портативного дихрометра СКД-2 (изготовлен в Институте спектроскопии РАН, г. Троицк). Использовали ДНК спермы лосося (Техномедсервис, Россия), кварцевые кюветы с длиной оптического пути 1 см.

Опухолевые клеточные линии человека

Использовали линии немелкоклеточного рака легкого A549, рака толстой кишки HCT-116, гепатокарциномы Huh7, карциномы поджелудочной железы PANC-1, рака молочной железы SKBR3, MCF7, рака яичников SKOV3, остеосаркомы U2OS человека, первичную культуру глиобластомы человека Gbl13n, иммортализованную эпителиальную клеточную линию HBL-100 и ее устойчивую к доксорубину сублинию HBL-100/DOX и линию клеток молочной железы MCF10A неопухолевого происхождения. В качестве контрольных лекарств использовали иринотекан, доксорубин (Sigma), этопозид, пуромидин (InvivoGen).

Для опухолевых клеточных линий человека использовали среду DMEM (Sigma), содержащую 10% эмбриональной телячьей сыворотки (HyClone, Южная Америка) и 2 мМ L-глутамин («ПанЭко», Россия). Клетки неопухолевого происхождения MCF10A культивировали в среде DMEM/F12 (Sigma), содержащей 5% лошадиной сыворотки (Biocera, Южная Америка), 100 мг/мл эпидермального фактора роста (EGF), 1 мг/мл гидрокортизона и 10 мг/мл инсулина («ПанЭко»). Обе среды содержали пенициллин и стрептомицин 100 Ед/мл («ПанЭко»), все клетки культивировали при 37°C, 5% CO₂.

Цитотоксический эффект оценивали с помощью стандартного МТТ-теста (Microculture Tetrazolium Test), основанного на способности дегидрогеназ живых клеток восстанавливать неокрашенные формы 3-(4,5-диметилтиазол-2-ил)-2,5-дифенил-

тетразолиум бромида (МТТ-реагента) до голубого кристаллического фармазана, растворимого в диметилсульфоксиде (DMSO). IC₅₀ – концентрация соединения, вызывающая 50% гибель клеток. Реагент МТТ был приобретен в «ПанЭко». Окраску регистрировали на спектрофотометре при длине волны 570 нм с помощью спектрофотометра (Multiskan FC, Thermo Fisher Scientific, США). Оптическую плотность в лунках, где клетки инкубировали без контроля, принимали за 100%. Показатели оптической плотности в лунках с каждой концентрацией контроля усредняли и вычисляли процент выживших клеток при той или иной концентрации препарата.

Измерение клеточного цикла с помощью проточной цитофлуориметрии

Клетки HCT-116 рассеивали по 500 × 10³ клеток на лунку в 6-луночной планшете и растили в среде DMEM (Gibco, США), содержащей 2 мМ L-глутамин («ПанЭко») и 1-кратный раствор антибиотика – антимикотика (Gibco) с добавлением 10% (v/v) фетальной бычьей сыворотки (Gibco) при 37°C и 5% CO₂. Через 24 ч меняли среду на свежую с добавлением препаратов в концентрации 1 мкМ, оставляя контрольные лунки без препарата. Клетки инкубировали в течение 24 и 48 ч. Для анализа клетки промывали на чашках раствором Версена («ПанЭко») и 0.25% раствором трипсина-EDTA (Gibco). Подсчитывали концентрацию клеток и отбирали равные количества для анализа. Центрифугировали в течение 5 мин при 1200 об/мин, удаляли супернатант, промывали в 1 мл холодного PBS. Клетки ресуспендировали в 1 мл холодного 96% этанола и инкубировали ночь при +4°C. Затем центрифугировали (15 мин, 1900 об/мин), промывали 1 раз раствором холодного PBS. К осадку добавляли 1 мл 3.8 мМ раствора цитрата натрия в PBS, содержащего 500 мкг/мл иодида пропидия и 1 мкл РНКазы А (10 мг/мл) и инкубировали в течение ночи при температуре +4°C. Флуоресценцию иодида пропидия измеряли в канале FL2 с помощью проточного цитофлуориметра CytoFlex. Данные анализировали с помощью программы ModFit LT 3.2 (Verity Software).

Пролиферацию клеток, подвергнутых воздействию исследуемых соединений, определяли с использованием анализатора клеток в реальном времени (RTCA) xCELLigence (ACEA Biosciences, США). По 5000 клеток остеосаркомы человека U2OS высевали в лунки 16-луночной планшеты с микроэлектронным биосенсором на дне каждой лунки (запатентованные E-планшеты) и инкубировали

в течение 24 ч в приборе Roche xCELLigence Real-Time Cell Analyser (RTCA) DP (Roche Diagnostics GmbH, Германия). При достижении клеточного индекса 1 среду удаляли с последующим добавлением либо одной среды (контроль), либо среды с различными концентрациями веществ (0.16, 0.8, 4, 20, 100, 500 мкМ соответственно).

Способность соединений проникать в клеточное ядро определяли с использованием флуоресцентного микроскопа в ультрафиолетовом диапазоне длин волн. Живые клетки глиобластомы Gbl13n выдерживали в культуральной среде с соединениями в концентрации 2 мкМ в течение 2 суток, хорошо промывали фосфатно-солевым буфером, фиксировали формальдегидом, фотографировали с помощью флуоресцентного микроскопа Zeiss Axioplan 2 (Carl Zeiss, Германия). Ядра клеток фотографировали с помощью конфокального микроскопа ZEISS LSM 710 (Carl Zeiss AG).

Ингибирование каталитической активности эукариотической топоизомеразы I в реакции релаксации суперскрученной ДНК (ссДНК). Способность модулировать активность топоизомеразы I (Топо-I) *in vitro* изучали с использованием набора Topoisomerase I Drug Screening kit (ТопоGen, Inc., cat. № 1018-1, www.topogen.com). 1 ед. очищенной Топо-I из тимуса теленка (Fermentas, США) и исследуемые соединения в концентрации 2.5 и 5 мкМ; 0.65 и 1.25 мкМ инкубировали с 0.12 мкг суперскрученной плазмидной ДНК рHOT1 (ТопоGen) в реакционном буфере ×1 (10 мМ Трис-НСl рН 7.9, 1 мМ EDTA, 0.15 М NaCl, 0.1% BSA, 0.1 мМ спермидин, 5% глицерин). Реакцию проводили в течение 30 мин при 37°C, останавливали внесением SDS до конечной концентрации 1%, обрабатывали протеиназой К с конечной концентрацией 50 мкг/мл в течение 30–60 мин при 37°C. Продукты реакции разделяли электрофоретически в 1% агарозном геле с ТАЕ-буфером (2 М Трис-основание, 0.05 М EDTA, 1.56 М уксусная кислота) при максимальной напряженности электрического поля 3–4 В/см и затем окрашивали водным раствором этидия бромида (0.5 мкг/мл). Визуализацию ДНК в геле регистрировали по флуоресценции в проходящем ультрафиолетовом свете с длиной волны от 240 до 360 нм. В отсутствие ингибитора Топо-I релаксировала ссДНК с образованием ряда топоизомеров. Эффект ингибирования Топо-I выявляли по способности исследуемых соединений задерживать реакцию релаксации ссДНК, т.е. по сохранению ссДНК. Исходная концентрация растворов бисбензимидазолпирролов в DMSO составляла 5×10^{-3} М.

Данные по выживаемости клеток обрабатывали с помощью программного обеспечения GraphPad Prism 8, кривые жизнеспособности сравнивали с использованием критерия Фишера (F-тест). Все эксперименты повторяли 3 раза, влияние на пролиферацию клеток в режиме реального времени тестировали дважды. Для представления данных выбирали наиболее удачный опыт, результаты которого не противоречили результатам таких же опытов.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Синтез мономерных бисбензимидазолпирролов MB_2Py , $MB_2Py(Ac)$ и димерных соединений $DB_2Py(4, 5)$

Синтез MB_2Py . Суспензию 0.1 г 10% Pd/C в 20 мл абсолютного этанола насыщали водородом до прекращения его поглощения. Затем добавили 0.3 мл концентрированной соляной кислоты и 0.20 г (0.41 ммоль) 6-[6-(4-метилпиперазин-1-ил)-1H-1,3-бензодиазол-2-ил]-2-(4-нитро-1-пропил-1H-пиррол-2-ил)-1H-1,3-бензодиазол (**I**). Реакционную массу перемешивали при комнатной температуре до прекращения поглощения водорода. Полученный раствор отфильтровывали от катализатора и образовавшегося осадка, твердый осадок целевого вещества смывали с фильтра водой 2×10 мл, воду упаривали при пониженном давлении. Выход MB_2Py – 0.173 г (93%) в виде зеленого аморфного порошка. По данным ТСХ в системе гексан–этил-ацетат (3:1) полученное вещество гомогенно. Масс-спектр: 455.26 [M+H]⁺, рассчитано: 454.57 (C₂₆H₃₀N₈).

Синтез $MB_2Py(Ac)$. Суспензию 0.15 г 10% Pd/C в 30 мл ледяной уксусной кислоты насыщали водородом до прекращения его поглощения. Затем добавляли 2 мл уксусного ангидрида и 0.35 г (0.72 ммоль) вещества (**XII**). Реакционную массу перемешивали в токе водорода комнатной температуры в течение 5 ч. Полученный раствор отфильтровывали от катализатора. Маточный раствор упаривали при пониженном давлении, образовавшееся масло трижды переупаривали с 30 мл изопропилового спирта. Выход $MB_2Py(Ac)$ 0.37 г (92.4%) в виде желтых кристаллов. По данным ТСХ в системе *i*-PrOH–NH₄OH (5:1) полученное вещество $MB_2Py(Ac)$ гомогенно, т. пл. 219°C. Масс-спектр: m/z: 496.15 [M]⁺, 454.13 [M–NHAc]⁺, рассчитано: 496.26 (C₂₈H₃₂N₈O).

Общий метод синтеза $DB_2Py(n)$. К раствору α,ω-алкилдикарбоновой кислоты (0.1 ммоль) в 2 мл абс.

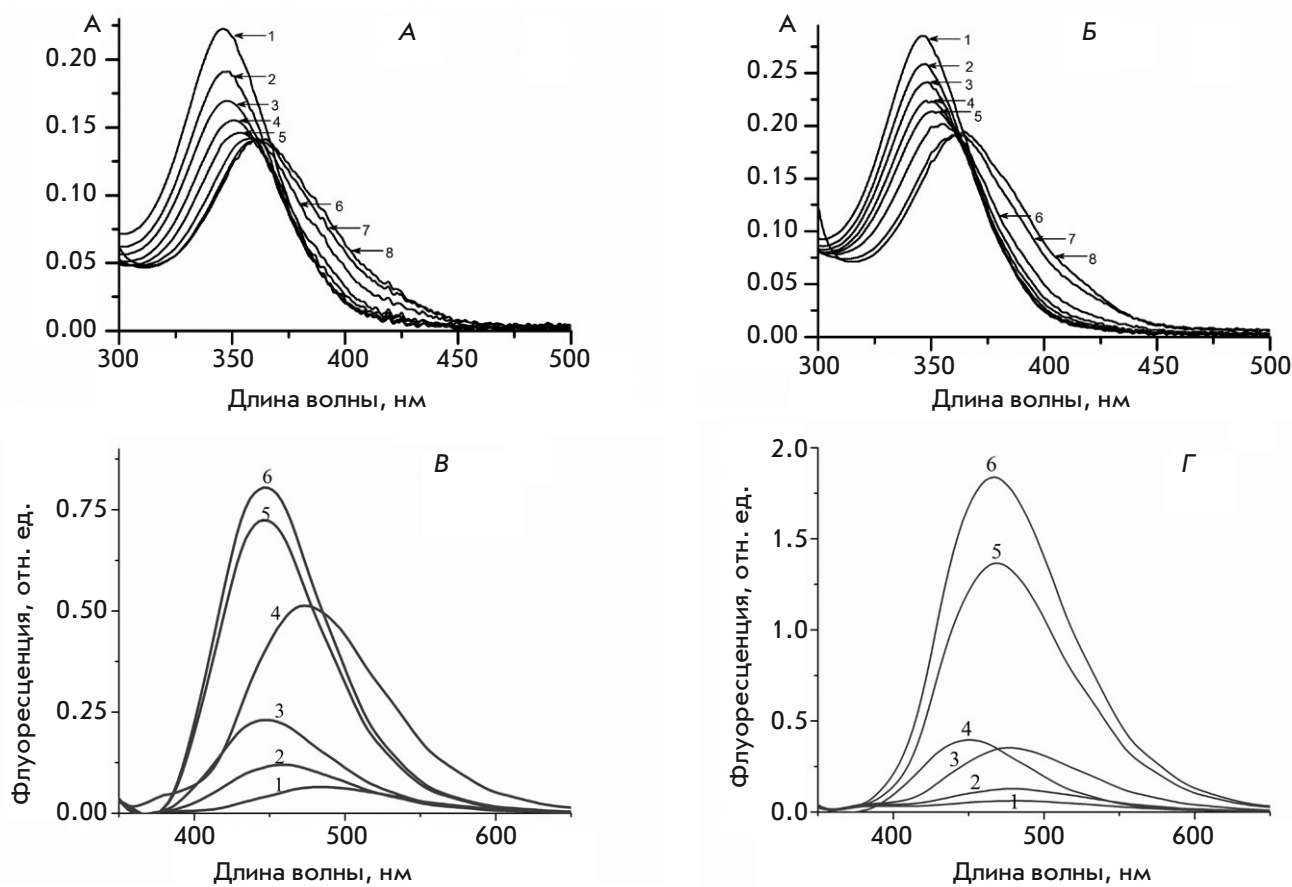


Рис. 3. Спектры поглощения и флуоресценции свободного **DB₂Py(n)** и комплекса с ДНК. **А** – спектры поглощения **DB₂Py(4)** в отсутствие (1) и в присутствии ДНК (2–8); **[DB₂Py(4)]** 4.06×10^{-6} М; 0.001 М какодилат натрия. **[ДНК]** 1 – 0; 2 – 0.25; 3 – 0.49; 4 – 0.98; 5 – 1.48; 6 – 2.45; 7 – 14.67; 8 – 121.9×10^{-6} М п.н. соответственно; длина оптического пути 1 см. **Б** – спектры поглощения **DB₂Py(5)** в отсутствие (1) и в присутствии ДНК (2–8); **[DB₂Py(5)]** 4.29×10^{-6} М; 0.001 М какодилат натрия. **[ДНК]** 1 – 0; 2 – 0.25; 3 – 0.49; 4 – 0.98; 5 – 1.48; 6 – 2.45; 7 – 14.67; 8 – 121.9×10^{-6} М п.н. соответственно; длина оптического пути 1 см. **В** – спектры флуоресценции **DB₂Py(4)** в отсутствие (1) и в присутствии ДНК (2–6). **[DB₂Py(4)]** 4.6×10^{-6} М; **[ДНК]** 1 – 0; 2 – 3; 3 – 6; 4 – 18; 5 – 30; 6 – 54 М п.н. соответственно. Буфер: 10 мМ PBS (рН 7.4). Длина волны возбуждения 320 нм, ширина щели 5 нм, кювета 10×10 мм, 22°C. **Г** – спектры флуоресценции **DB₂Py(5)** в отсутствие (1) и в присутствии ДНК (2–6). **[DB₂Py(5)]** 2.3×10^{-6} М; **[ДНК]** 1 – 0; 2 – 3; 3 – 6; 4 – 18; 5 – 54; 6 – 78×10^{-6} М п.н. соответственно. Буфер: 10 мМ PBS (рН 7.4). Длина волны возбуждения 320 нм, ширина щели 5 нм, кювета 10×10 мм, 22°C

ДМФА прибавили НВТУ (0.25 мМ), DIPEA (0.50 мМ) и перемешивали при комнатной температуре в течение 30 мин. К полученному раствору добавляли 0.10 г (0.2 ммоль) **MB₂Py**, перемешивали в течение еще 1 ч и оставляли реакционную массу на ночь. Растворитель упаривали при пониженном давлении, получившееся масло затирали с абс. *i*-PrOH. В образовавшуюся суспензию добавляли 0.5 мл 35% HCl в диоксане, выпавший осадок отфильтровывали, промывали 3 раза 80% водным ацетоном и 2 раза абс. *i*-PrOH. Твердый остаток в виде зеленого порошка высушивали в вакууме над NaOH/P₂O₅. По данным ТСХ в системе MeOH–TFA–H₂O (5:1:2) продукт реакции гомогенен.

DB₂Py(4)·6HCl. Выход 55 мг (48%), т. пл. >350°C. Масс-спектр, 1019.57 [M+H]⁺, рассчитано М 1018.55 (C₅₈H₆₆N₁₆O₂). ¹H-NMR (300 МГц, DMSO-*d*₆): δ 0.85 (6H, t, *J* = 7.4, 2(-CH₃)), 1.65 (4H, m, (-CH₂-CH₂-)), 1.75 (4H, q, *J* = 7.2, 2(-CH₂CH₂CH₃)), 2.31 (4H, m, 2(-COCH₂-)), 2.77 (4H, s, pip), 3.23 (4H, s, pip), 3.35 (6H, s, 2(N-CH₃)), 4.54 (4H, t, *J* = 7.0, 2(N-CH₂-)), 7.05–6.84 (4H, m, ArH), 7.10 (2H, s, ArH), 7.36–7.24 (2H, brs, ArH), 7.48 (2H, d, *J* = 8.6, ArH), 7.58 (2H, m, ArH), 7.97 (2H, m, ArH), 8.26 (2H, d, *J* = 36.2, ArH), 9.93 (2H, s, 2(-NHCO-)).

DB₂Py(5)·6HCl. Выход 61 мг (47%), т. пл. >350°C. Масс-спектр, *m/z*: 1033.42 [M+H]⁺, рассчитано М 1032.57 (C₅₉H₆₈N₁₆O₂). ¹H-NMR (300 МГц, DMSO-*d*₆):

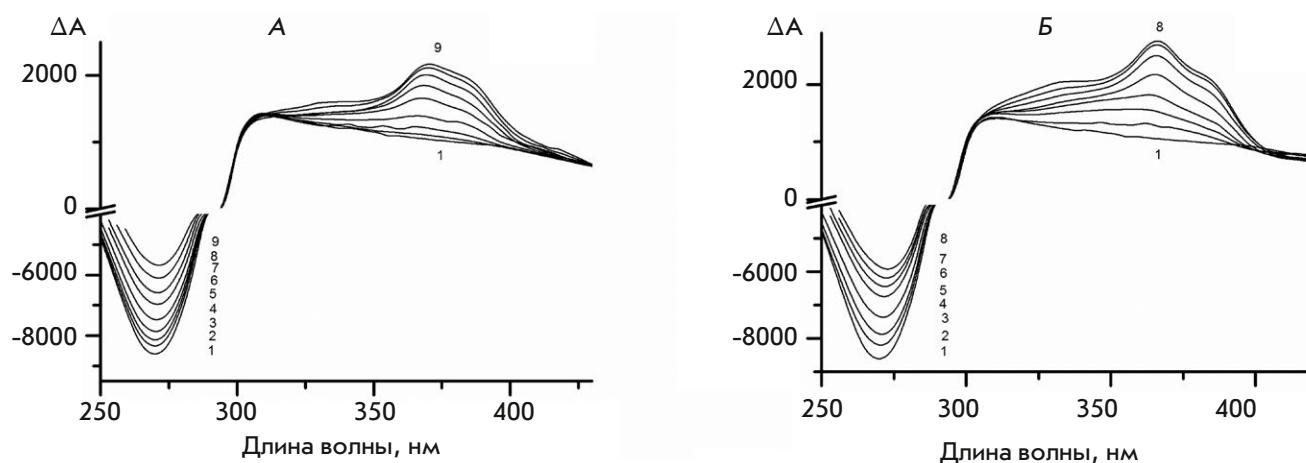


Рис. 4. А – спектры КД ХЖКД ДНК в отсутствие (1) и присутствии (2–9) **DB₂Py(4)**; 0.3 М NaCl; 170 мг/мл ПЭГ-4000; 0.002 М Na-фосфат, [ДНК] 4.545×10^{-5} М п.н.; [**DB₂Py(4)**] 1 – 0; 2 – 0.41; 3 – 0.82; 4 – 1.63; 5 – 3.25; 6 – 4.87; 7 – 6.48; 8 – 8.08; 9 – 10.07×10^{-6} М соответственно. Длина оптического пути 1 см. Б – спектры КД ХЖКД ДНК в отсутствие (1) и в присутствии (2–8) **DB₂Py(5)**; 0.3 М NaCl; 170 мг/мл ПЭГ-4000; 0.002 М Na-фосфат, [ДНК] 4.545×10^{-5} М п.н.; [**DB₂Py(5)**] 1 – 0; 2 – 0.43; 3 – 0.86; 4 – 1.72; 5 – 3.44; 6 – 5.15; 7 – 6.85; 8 – 8.54×10^{-6} М соответственно. Длина оптического пути 1 см

δ 0.87 (6H, t, $J = 7.4$, 2(-CH₃)), 1.34 (2H, m, -CH₂-), 1.63 (4H, m, -CH₂-CH₂-CH₂-), 1.77 (4H, q, $J = 7.2$, 2(-CH₂CH₂CH₃)), 2.30 (4H, m, 2(-COCH₂-)), 2.87 (8H, brs, pip), 3.35 (6H, s, (-NCH₃)), 4.55 (4H, t, $J = 7.2$, N-CH₂-), 7.05 (2H, brs, ArH), 7.24 (2H, m, ArH), 7.42–7.28 (4H, m, ArH), 7.75 (4H, dd, $J = 20.0$, 8.6, ArH), 8.04 (2H, d, $J = 8.7$, ArH), 8.45 (2H, brs, ArH), 9.93 (2H, s, 2(-NHCO-)).

ФИЗИКО-ХИМИЧЕСКИЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

Спектры поглощения и флуоресценции **DB₂Py(n)**

Измерения интенсивности и максимумов поглощения **DB₂Py(4)** и **DB₂Py(5)** в отсутствие и в присутствии ДНК в разных концентрациях и сопоставление полученных спектров позволяют косвенно подтвердить способность новых димерных узкобороздочных лигандов образовывать комплексы с ДНК (рис. 3А,Б). При увеличении концентрации ДНК происходит падение интенсивности поглощения, что свидетельствует об образовании комплекса новых бисбензимидазолпирролов с ДНК. При дальнейшем увеличении концентрации ДНК происходит изменение положения максимума поглощения, характеризующееся сдвигом в длинноволновую область спектра (батохромный сдвиг), а также увеличением амплитуды полосы поглощения. Все это свидетельствует об образовании нескольких типов комплексов с ДНК в зависимости от концентрации лиганда.

В спектрах флуоресценции соединений **DB₂Py(4)** и **DB₂Py(5)** в присутствии ДНК наблюдается раз-

горание интенсивности флуоресценции при увеличении концентрации ДНК (рис. 3В,Г). Это свидетельствует об образовании комплекса данных соединений с ДНК. Разгорание флуоресценции обуславливается стабилизацией сопряженной структуры лиганда в узкой бороздке ДНК.

Спектры кругового дихроизма **DB₂Py(4)** и **DB₂Py(5)** в комплексе с ХЖКД ДНК

Спектры кругового дихроизма **DB₂Py(n)** в холестерической жидкокристаллической дисперсии (ХЖКД) ДНК позволяют подтвердить образование комплексов полученных соединений с ДНК и их локализацию в одной из бороздок ДНК.

Сходная картина спектров КД в ХЖКД наблюдается для соединений **DB₂Py(4)** и **DB₂Py(5)** (рис. 4) – в области поглощения лигандов (300–400 нм) присутствует положительная интенсивная полоса, что свидетельствует об образовании комплексов, локализованных в одной из бороздок ДНК [12, 13]. Методом рентгеноструктурного анализа исходного соединения **Hoechst 33258** получены данные, подтверждающие его локализацию в узкой бороздке ДНК [9], поэтому мы полагаем, что наши соединения являются узкобороздочными лигандами.

БИОЛОГИЧЕСКАЯ АКТИВНОСТЬ

Цитотоксичность в отношении опухолевых клеток человека

Цитотоксическую активность соединений изучали МТТ-методом на шести клеточных линии-

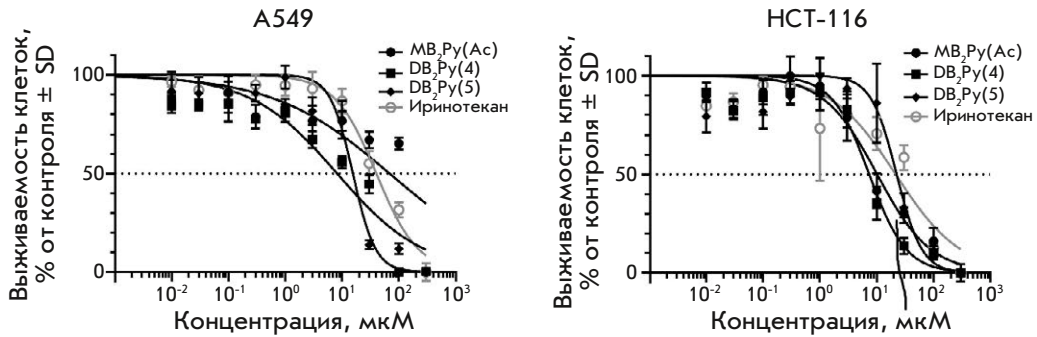
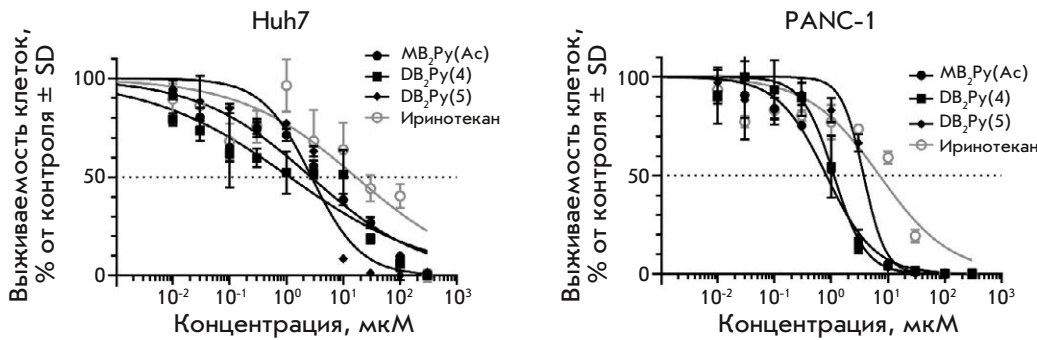
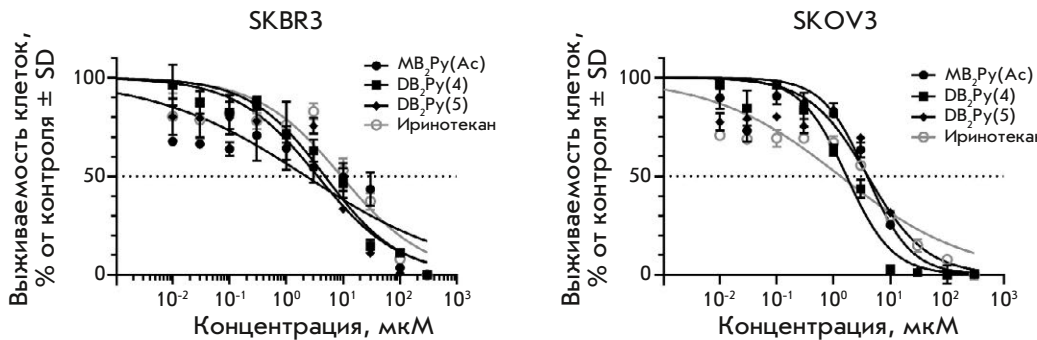


Рис. 5. Цитотоксичность (IC_{50}) мономерного и димерных бисбензимидазолпирролов в сравнении с иринотеканом на различных опухолевых клеточных линиях человека. SD – стандартное отклонение, SE – стандартная ошибка, R^2 – коэффициент детерминации

	A549				HCT-116			
Соединение	IC_{50} , мкМ	SD	SE	R^2	IC_{50} , мкМ	SD	SE	R^2
MB ₂ Py(Ac)	68.35	1.3E+11	6.5E+10	0.6736	10.13	3.546	1.773	0.9263
BD ₂ Py(4)	8.163	62.48	31.24	0.8911	7.343	1.4048	0.7024	0.9366
DB ₂ Py(5)	15.45	3.202	1.601	0.923	22.32	6.14	3.07	0.8363
Иринотекан	39.95	39.64	19.82	0.9488	21.44	102.08	51.04	0.8267



	Huh7				PANC-1			
Соединение	IC_{50} , мкМ	SD	SE	R^2	IC_{50} , мкМ	SD	SE	R^2
MB ₂ Py(Ac)	2.697	0.10548	0.05274	0.9061	0.8199	0.15072	0.07536	0.9802
BD ₂ Py(4)	1.133	0.09772	0.04886	0.8728	1.105	0.2964	0.1482	0.9421
DB ₂ Py(5)	2.745	0.11036	0.05518	0.9329	3.704	0.8638	0.4319	0.9407
Иринотекан	16.65	0.11536	0.05768	0.7239	7.064	4.46	2.23	0.8915



	SKBR3				SKOV3			
Соединение	IC_{50} , мкМ	SD	SE	R^2	IC_{50} , мкМ	SD	SE	R^2
MB ₂ Py(Ac)	2.22	9.002	4.50	0.8045	3.887	3.11	1.555	0.9313
BD ₂ Py(4)	4.754	6	3	0.947	1.694	1.0884	0.5442	0.9706
DB ₂ Py(5)	3.549	2.54	1.27	0.8604	3.991	2.836	1.418	0.8711
Иринотекан	9.259	12.298	6.149	0.8491	1.318	5.15	2.575	0.8844

Таблица 1. Цитотоксичность мономерного и димерных бисбензимидазолпирролов в сравнении с иринотеканом на первичной культуре клеток глиобластомы человека Gbl13n

Соединение	IC_{50} , мкМ
$MB_2Py(Ac)$	>100
$DB_2Py(4)$	12.67 ± 2.33
$DB_2Py(5)$	8.78 ± 6.64
Иринотекан	10.02 ± 0.7

ях и одной первичной культуре опухолей человека. Определена полуингибирующая концентрация (IC_{50}) на клетках немелкоклеточного рака легкого A549, рака толстой кишки HCT-116, гепатокарциномы Huh7, карциномы поджелудочной железы PANC-1, рака молочной железы SKBR3, рака яичников SKOV3 и на полученной нами ранее первичной культуре глиобластомы человека Gbl13n [14, 15]. Данные представлены на *рис. 5*. Показано, что линии Huh7, PANC-1 и SKBR3 обладают большей чувствительностью к воздействию новых соединений, чем к противоопухолевому средству иринотекан. Цитотоксичность димерных молекул $DB_2Py(4)$ и $DB_2Py(5)$ в отношении клеточной линии A549 была значительно выше (в 5–7 раз), чем у мономерной $MB_2Py(Ac)$ и иринотекана (в 2.8–3.8 раза). Однако не выявлено существенных различий в ци-

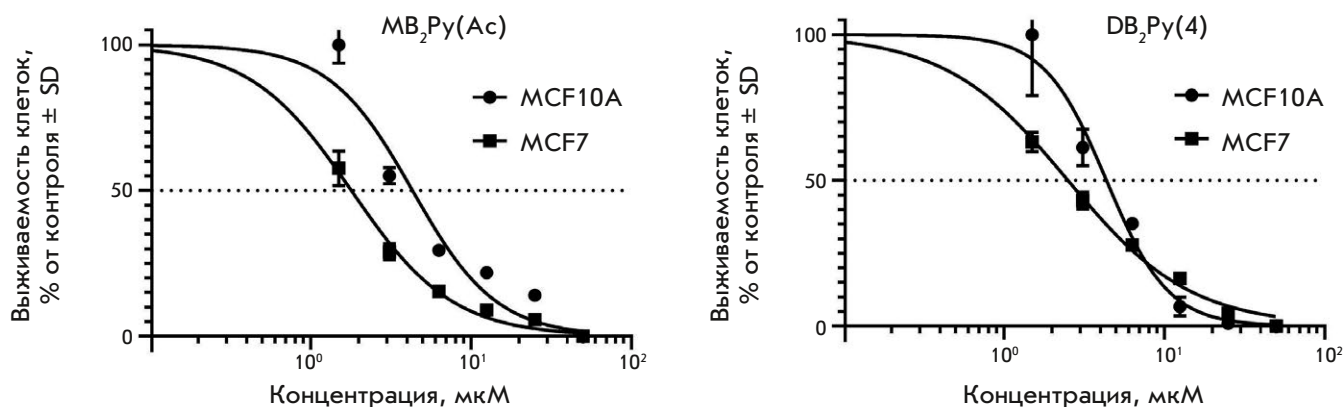
тотоксичности мономерных и димерных бисбензимидазолпирролов в отношении линий Huh7, PANC-1, SKBR3, SKOV3.

Существует мнение о необходимости тестировать новые лекарства не только на линейных, но и на первичных клеточных культурах. На первичной клеточной культуре глиобластомы человека Gbl13n цитотоксическая активность димеров $DB_2Py(4)$, $DB_2Py(5)$ приблизительно в 10 раз превысила активность мономера $MB_2Py(Ac)$ и была сопоставимой с иринотеканом (*табл. 1*).

Тестирование селективности в отношении опухолевых клеток

Возможную селективность новых соединений в отношении опухолевых клеток определяли по уровню их цитотоксичности на опухолевых и трансформированных клеточных линиях.

В качестве модели использовали клеточную линию MCF7 рака молочной железы и условно нормальную линию эпителиальных клеток молочной железы – MCF10A. Протестированные клеточные линии были чувствительны к токсическому действию новых бисбензимидазолпирролов. Наиболее восприимчивой оказалась опухолевая линия MCF7 (*рис. 6*). Таким образом, наблюдалась некоторая, приблизительно двукратная, селективность в цитотоксическом действии соединений на клетки опухолевого происхождения. Однако мономер $MB_2Py(Ac)$



Соединение	MCF10A				MCF7				F-тест
	IC_{50} , мкМ	SD	SE	R^2	IC_{50} , мкМ	SD	SE	R^2	
$MB_2Py(Ac)$	4.316	0.750099	0.5304	0.9225	1.793	0.228678	0.1617	0.9856	* $p < 0.0001$
$DB_2Py(4)$	4.355	0.932363	0.5383	0.9432	2.506	0.77388	0.4468	0.9702	* $p < 0.0001$

*Статистически значимые отличия.

Рис. 6. Сравнение цитотоксичности новых бисбензимидазолпирролов в отношении клеток MCF10A (эпителиальные клетки молочной железы человека, условно нормальная клеточная линия) и на MCF7 (рак молочной железы). SD – стандартное отклонение, SE – стандартная ошибка, R^2 – коэффициент детерминации, F-тест – статистический критерий

и димер **DB₂Py(4)** демонстрировали сходные значения IC_{50} для протестированных клеточных линий. Можно предположить, что удвоение молекулы не повлияло на уровень цитотоксичности в отношении исследуемой пары клеточных линий.

Влияние новых соединений на пролиферацию клеточной линии остеосаркомы

Влияние мономера **MB₂Py(Ac)** и димера **DB₂Py(5)** на пролиферацию культивируемых клеток остеосаркомы U2OS сравнивали в режиме реального времени с использованием прибора RTCA. После внесения веществ в концентрации 0.16–500 мкМ рост клеток фиксировался в течение 74 ч. В качестве контрольного соединения использовали пурамицин, который в концентрации 10 мг/мл (21 мМ) вызывал полную гибель клеток (рис. 7А). Более низкие дозы **MB₂Py(Ac)** (0.16, 0.8 и 4 мкМ) не влияли на пролиферацию U2OS (рис. 7Б). При концентрации 20 мкМ наблюдалось замедление пролиферации, в то время как 100–500 мкМ полностью останавливали деление клеток. Показано, что **DB₂Py(5)** ингибировал рост клеток остеосаркомы зависимым от концентрации и времени способом (рис. 7В). Таким образом, димер был очевидно токсичнее мономера.

Оценка возможности преодоления новыми соединениями множественной лекарственной устойчивости (МЛУ)

Важным свойством потенциального препарата является его способность преодолевать множественную лекарственную устойчивость клеток, опосредованную действием АВС-транспортера Р-гликопротеина (Р-гр). Новые мономерные и димерные бисбензимидазолпирролы тестировали МТТ-методом на иммортализованной, эпителиальной клеточной линии HBL-100 [16, 17] и на сублинии HBL-100/DOX, полученной из нее путем длительной инкубации с доксорубицином. Показано, что 95% клеток HBL-100/DOX сверхэкспрессируют белок Р-гр, отвечающий за установление резистентности клетки к лекарствам, в том числе обладают перекрестной устойчивостью к паклитакселу и винбластину. Таким образом, сублиния HBL-100/DOX обладает фенотипом МЛУ, т.е. резистентностью не только к доксорубицину, но и к другим субстратам Р-гр [18].

Сходное цитотоксическое действие мономеров на линию HBL-100 и ее устойчивую сублинию показано экспериментально – различия в величине IC_{50} не превышали 2 раз.

Представленные в табл. 2 данные показывают, что изучаемые нами бисбензимидазолпирролы не являются субстратами Р-гр. К димеру **DB₂Py(4)** устойчивость клеток HBL-100/DOX была выше в 9

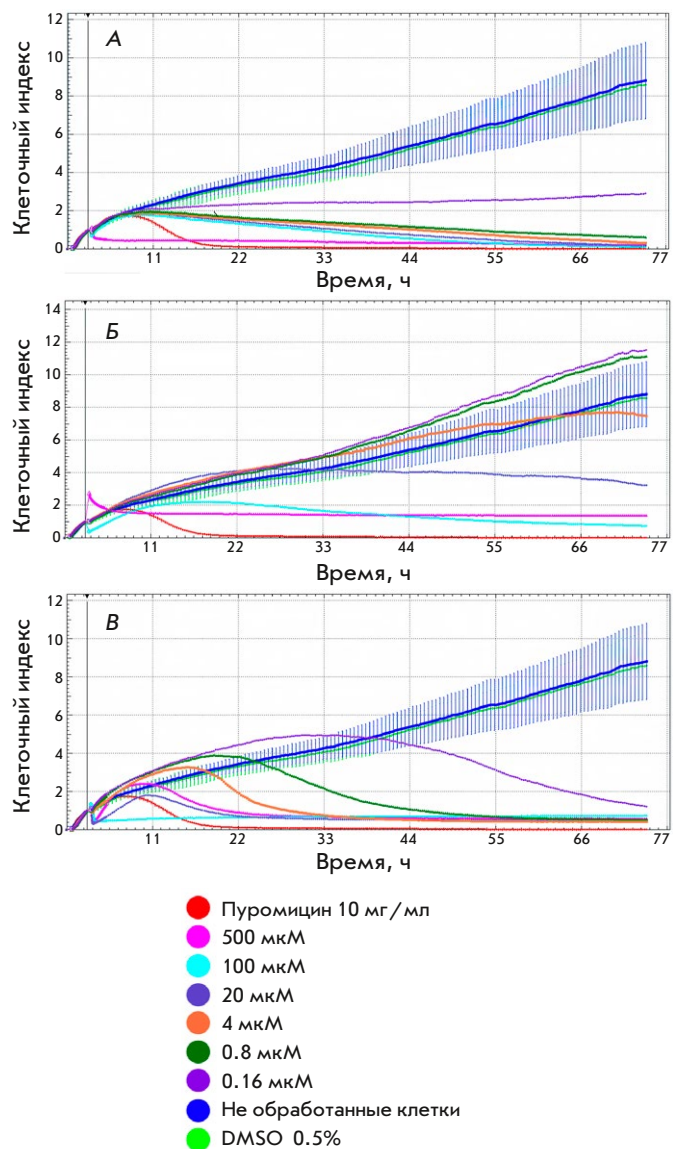


Рис. 7. Влияние бисбензимидазолов **MB₂Py(Ac)** и **DB₂Py(5)** на пролиферацию клеток остеосаркомы в режиме реального времени. Кривые роста представляют собой зависимость клеточного индекса от времени. А – контроль: красная линия – влияние пурамицина (10 мг/мл), синяя – рост клеточной линии U2OS без воздействия химических соединений, зеленая – влияние 0.5% DMSO, Б – воздействие на клетки мономера **MB₂Py**, В – воздействие димера **DB₂Py(5)**

раз по сравнению с HBL-100. Тогда как устойчивость клеток, сверхэкспрессирующих Р-гр, к таким классическим субстратам Р-гр, как доксорубицин и паклитаксел, возрастала в 50–100 и более раз. Можно заключить, что соединение **DB₂Py(4)** является слабым субстратом Р-гр. Таким образом, только мономерные бисбензимидазолпирролы **MB₂Py** и **MB₂Py(Ac)** способны полностью преодолевать МЛУ, ассоциированную со сверхэкспрессией Р-гр.

Таблица 2. Цитотоксичность новых бисбензимидазолпирролов на чувствительной линии HBL-100 и ее устойчивой сублинии HBL-100/DOX с фенотипом МЛУ

Соединение	HBL-100	HBL-100/DOX	Индекс устойчивости*
	$IC_{50} \pm SD$, мкМ		
Доксорубин	0.6 ± 0.3	34 ± 6	57
MB₂Py	58 ± 18	125 ± 21	2.1
MB₂Py(Ac)	18 ± 11	29 ± 11	1.5
DB₂Py(4)	4 ± 4.5	37 ± 11	8.9

*Индекс устойчивости – отношение значений IC_{50} в устойчивой сублинии HBL-100 к IC_{50} чувствительной линии HBL-100/DOX.

Проникновение в клетку

Способность новых соединений проникать в течение 2 суток в клеточное ядро, где они, связываясь с гетерохроматином, светятся яркими синими точками, подтверждена методом флуоресцентной микроскопии (рис. 8).

Таким образом, синтезированные соединения являются новыми перспективными флуоресцентными красителями, способными проникать через клеточную и ядерную мембраны и эффективно окрашивать ядра клеток.

Анализ клеточного цикла после воздействия исследуемых соединений

Влияние новых веществ на клеточный цикл изучали с использованием двух контрольных лекарств – этопозида и иринотекана. Этопозид останавливал клеточный цикл в митозе, что видно по накоплению клеток в фазе G2/M и согласуется с данными [19]. Через 48 ч после обработки клеток этопозидом клеточная популяция в фазе G2/M увеличивалась с 47 до 70%. Иринотекан блокировал клеточный цикл в S-фазе, что приводило к уменьшению распределения клеточных популяций в других фазах [20]. Клетки под воздействием иринотекана через 24 ч накапливались в S-фазе и, как следствие, через 48 ч – в фазе G0/G1. Видимо, накопление в G0/G1 происходило за счет клеток, успевших поделиться и перейти из митоза в фазу G0/G1. Через 48 ч наблюдалось незначительное увеличение доли клеток, находящихся в раннем апоптозе (рис. 9).

Количественное определение клеток, присутствующих в различных фазах клеточного цикла, показало, что новые бисбензимидазолпирролы оказывают одинаковое действие на клеточный цикл, сходное с действием иринотекана. Через 24 ч происходит увеличение клеточной популяции в S-фазе клеточного цикла до 62–67% по сравнению с контролем.

Через 48 ч происходит перераспределение клеточных популяций в сторону увеличения клеток

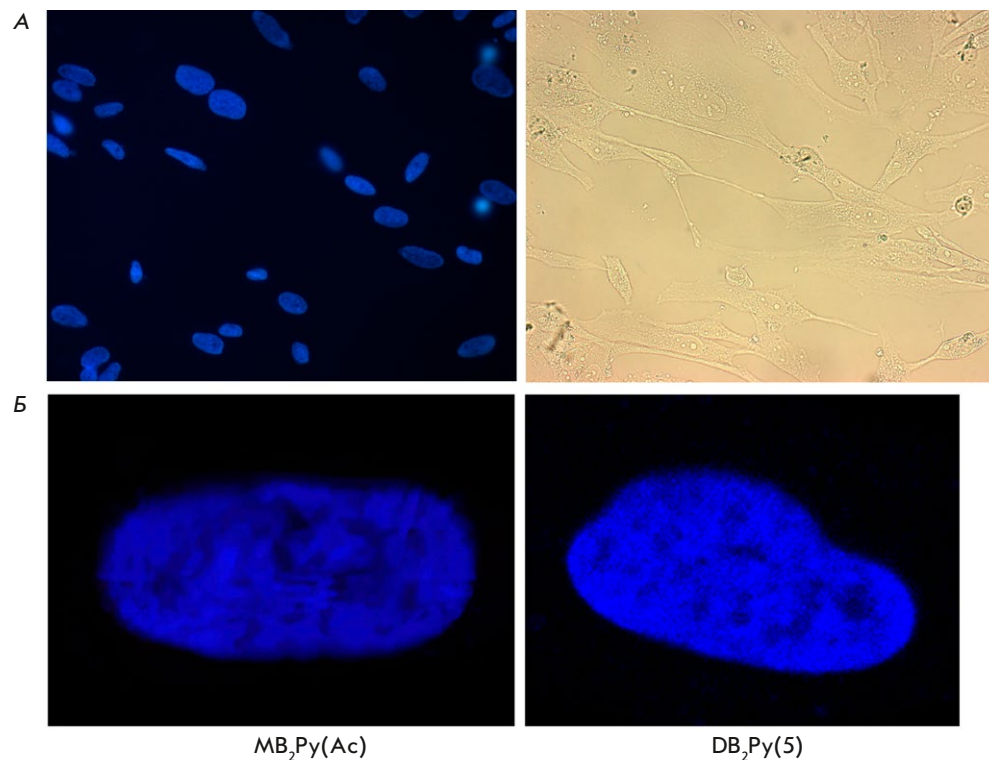


Рис. 8. Флуоресцентное окрашивание клеток глиобластомы Gbl13p, инкубированных с мономерным и димерным бисбензимидазолпирролом в концентрации 2 мкМ в течение 48 ч. А – популяция окрашенных клеток бисбензимидазолпирролом **DB₂Py(5)**. Слева – DAPI-фильтр, справа – фазово-контрастное изображение. Окрашивание **MB₂Py(Ac)** выглядит сходным образом через 2 суток. Б – фото окрашенных ядер, полученное с помощью конфокального микроскопа

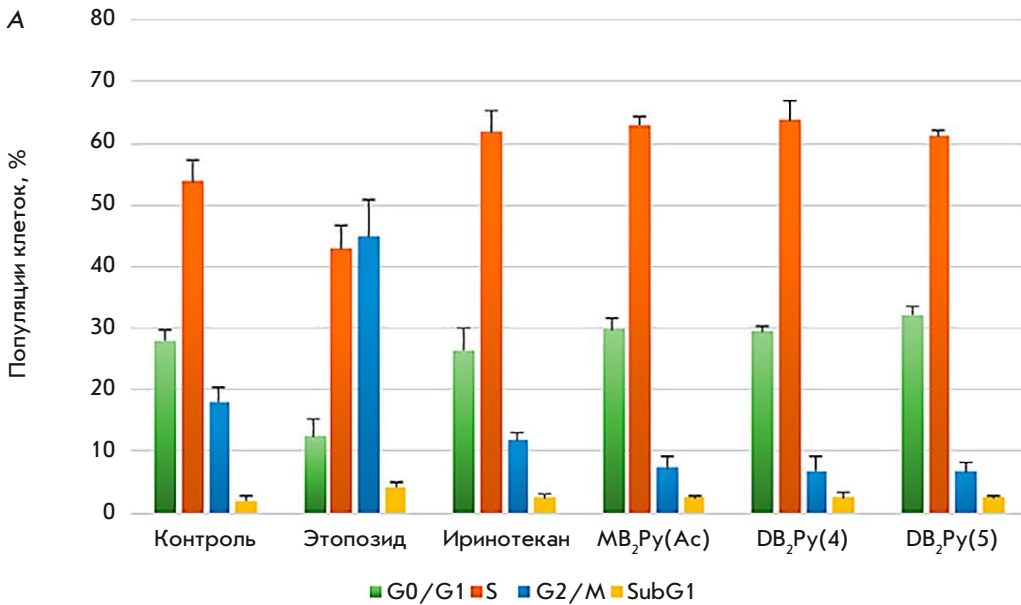
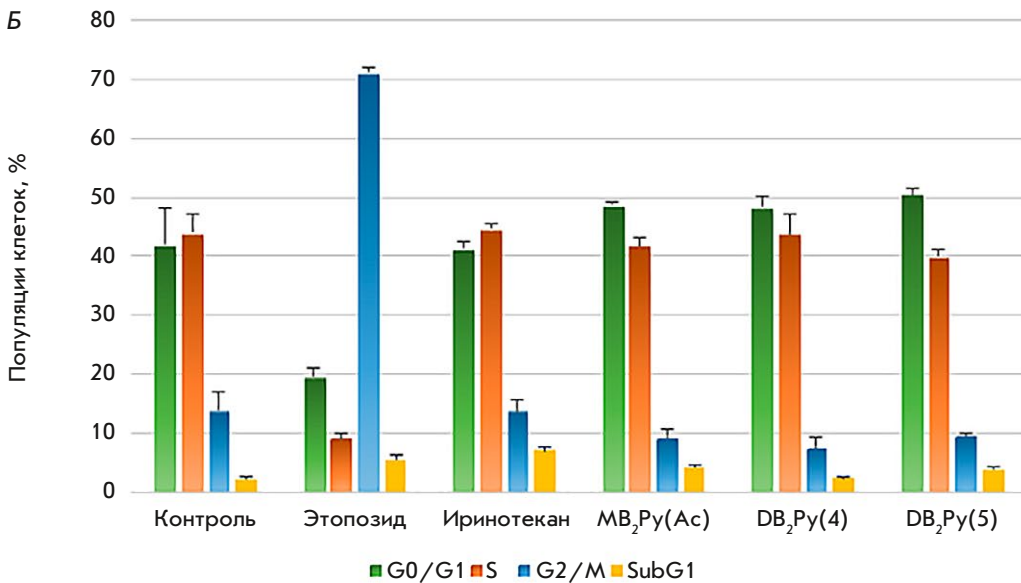


Рис. 9. Влияние бис-бензимидазолпирролов на клеточный цикл на примере клеточной линии HCT-116.

А – инкубация с веществами в течение 24 ч.

Б – инкубация с веществами в течение 48 ч

24 ч	Контроль	Этопозид	Иринотекан	MB ₂ Py(As)	DB ₂ Py(4)	DB ₂ Py(5)
G0/G1	28.0 ± 1.6	12.4 ± 2.7	26.4 ± 3.7	29.8 ± 1.8	29.5 ± 0.8	32.2 ± 1.2
S	53.9 ± 3.4	42.9 ± 3.8	61.8 ± 3.5	62.9 ± 1.4	63.7 ± 3.2	61.2 ± 0.9
G2/M	18.1 ± 2.3	44.7 ± 6.2	11.8 ± 1.3	7.3 ± 1.7	6.8 ± 2.5	6.6 ± 1.6
SubG1	2.0 ± 0.8	4.3 ± 0.8	2.4 ± 0.8	2.5 ± 0.2	2.6 ± 0.8	2.6 ± 0.3



48 ч	Контроль	Этопозид	Иринотекан	MB ₂ Py(As)	DB ₂ Py(4)	DB ₂ Py(5)
G0/G1	42.1 ± 6.2	19.7 ± 1.2	41.5 ± 0.9	48.8 ± 0.4	48.5 ± 1.7	50.6 ± 0.9
S	44.0 ± 3.2	9 ± 1	44.8 ± 0.8	41.9 ± 1.3	43.9 ± 3.1	40.0 ± 1.1
G2/M	13.9 ± 3.2	71.3 ± 0.7	13.8 ± 1.7	9.3 ± 1.4	7.6 ± 1.6	9.4 ± 0.6
SubG1	2.1 ± 0.4	5.4 ± 0.9	6.9 ± 0.6	4.1 ± 0.4	2.2 ± 0.5	3.8 ± 0.5

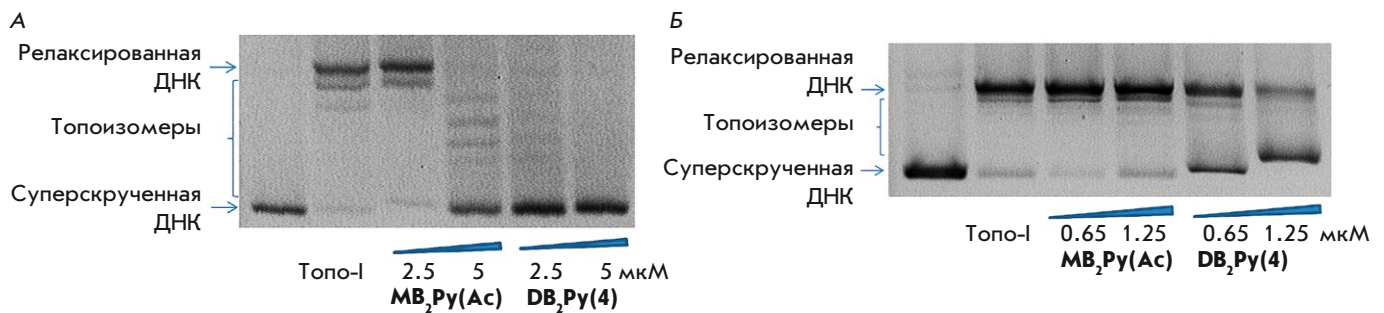


Рис. 10. Ингибирование Топо-I из тимуса теленка мономером **MB₂Py(Ac)** и его димером **DB₂Py(4)**. А – влияние веществ на активность Топо-I в концентрации 2.5 и 5 мкМ, Б – в концентрации 0.65 и 1.25 мкМ

в фазе G₀/G₁. Таким образом, новые бисбензимидазолпирролы воздействуют на фазу синтеза (S) клеточного цикла.

DB₂Py(4) почти не индуцировал апоптоз. Остальные вещества индуцировали ранний апоптоз, но значения превышали контрольные всего в 2–3 раза.

Топоизомераза I – возможная мишень новых производных Hoechst 33258

Некоторые типы опухолей, такие, как рак молочной железы, рак яичников, рак прямой кишки, характеризуются повышенной активностью Топо-I, фермента, который играет ключевую роль в функционировании клетки, регулируя структуру ДНК в процессах транскрипции, репликации, рекомбинации и репарации. Топо-I может релаксировать (раскручивать) суперскрученные молекулы ДНК путем образования одноцепочечных разрывов с их последующим лигированием для релаксации сверхвитков. В настоящее время Топо-I является признанной мишенью при таргетной терапии опухолей [21–23].

Узкобороздочные лиганды, не связываясь ковалентно с ДНК, не изменяя существенно ее конформацию, способны конкурировать с Топо-I за связывание по АТ-парам оснований. Эффект ингибирования Топо-I выявляли по способности исследуемых соединений задерживать реакцию релаксации ДНК *in vitro*.

Установлено, что исследуемые соединения (рис. 10) обладают Топо-ингибирующей активностью. При концентрации мономера и димера 5 и 2.5 мкМ, соответственно, наблюдалось сохранение суперскрученной ДНК в реакции релаксации ДНК Топо-I (ТопоGen) (рис. 10А). Наиболее эффективно каталитическую активность Топо-I ингибировал димер **DB₂Py(4)**. В сравнении с **MB₂Py(Ac)** уже при концентрации 0.65 мкМ **DB₂Py(4)** фиксировалось сохранение ДНК (рис. 10Б).

ОБСУЖДЕНИЕ

Бензимидазол является фундаментальным фармакофором при создании лекарств из-за его широкого спектра биологической активности [24–27]. При моделировании новых флуоресцентных бисбензимидазольных молекул мы предполагали, что введение в состав ранее полученных серий **DB(n)**, **DVA(n)** АТ-специфичного пирролкарбоксамидного фрагмента, имеющего сродство к АТ-парам ДНК, позволит усилить их цитотоксичность. Два бисбензимидазольных блока в составе новой молекулы несли флуоресцентные свойства и взаимодействовали с ДНК. Использование гибкого линкера в димерных соединениях **DB₂Py(n)** позволит молекуле связываться с двумя АТ-богатыми сайтами, находящимися на разных расстояниях друг от друга. Полученные новые бисбензимидазолпирролы в комплексе с ДНК имеют планарную форму, изогеометричную узкой бороздке ДНК, что благоприятствует лучшему взаимодействию новых лигандов с ДНК.

С использованием спектров поглощения, флуоресценции и кругового дихроизма мы показали способность бисбензимидазолпирролов взаимодействовать с ДНК. Так как в основе новых соединений лежит молекула **Hoechst 33258**, известная своей локализацией в узкой бороздке ДНК, мы относим наши новые бисбензимидазолы к узкобороздочным лигандам [28, 29]. Наличие в молекуле лиганда двух бисбензимидазольных фрагментов ведет к значительному увеличению его аффинности к полинуклеотиду, что дает экспериментальную основу для целенаправленного синтеза нового класса потенциальных противоопухолевых препаратов на основе димерных бисбензимидазолов.

Показана способность новых флуоресцентных соединений влиять на S-фазу клеточного цикла, проникать в ядро клетки, а также в низких концентрациях ингибировать Топо-I в бесклеточной модели. Новая серия бисбензимидазолпирролов оказалась более токсичной, чем ранее полученные серии

DB(n), DBA(n), в отношении опухолевых линий клеток человека и менее токсичной для клеточной линии неопухолевой природы. Небольшие, в 2 раза, но статистически значимые различия в цитотоксичности мономера и димера продемонстрированы на паре линий клеток молочной железы человека – опухолевого и не опухолевого происхождения.

Ранее в нашей работе была показана способность бисбензимидазолпирролов индуцировать Vcl-x1 -опосредованный апоптоз [30]. Известно, что нетропсин влияет на активность эукариотических транскрипционных факторов [31, 32]. Мы полагаем, что наши новые соединения, содержащие в своей структуре фрагмент нетропсина, имеют сходный механизм действия. Эти предположения подтверждаются данными о связывании с ДНК и остановке клеточного цикла в фазе синтеза при нетоксичной концентрации бисбензимидазолпирролов.

Димеризация молекулы усиливает аффинность к ДНК, повышает Топо-I-ингибирующие свойства *in vitro*. Однако определение методом МТТ цитотоксичности новых соединений на линиях опухолевых клеток не выявило очевидного преимущества димерной молекулы, несмотря на способность проникать в ядро клетки. Тем не менее высокочувствительный тест на пролиферацию в режиме реального времени подтвердил усиление токсических свойств при димеризации бисбензимидазолпиррола.

Важными характеристиками новых соединений как потенциальных противоопухолевых средств являются селективность и преодоление МЛУ. Одной из основных причин слабой эффективности современной химиотерапии является селекция опухолевых клеток с фенотипом МЛУ, способных выжи-

вать при длительном применении лекарственных средств. Наиболее известный механизм МЛУ характеризуется сверхэкспрессией белка Р-гр, входящего в семейство АВС-транспортеров. Предварительное определение цитотоксичности бисбензимидазолпирролов на клеточной модели с фенотипом МЛУ показало, что димеризация молекулы приводит, по-видимому, к взаимодействию с белком Р-гр и, как следствие, к росту устойчивости линии HBL-100/DOX к этому соединению (в среднем в 9 раз) по сравнению с доксорубицином (50–100 и более раз). Интерес представляет возможность непосредственного взаимодействия новых молекул с Р-гр-транспортером.

Возможно, недооцененное преимущество димерных соединений в биологической активности связано с их большей склонностью к образованию агрегатов по сравнению с мономерными молекулами. Решение проблемы агрегации димерных молекул может привести к получению значительно более активных соединений.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Синтезированные новые цитотоксичные димерные бисбензимидазолпирролы **DB₂Py(n)** представляются перспективными для дальнейшего глубокого изучения их свойств и механизма действия в отношении опухолевых клеток человека, а также для дизайна новых молекул. ●

Данная работа выполнена при поддержке гранта РНФ № 23-25-00373.

Авторы выражают благодарность А. Зайцеву за помощь в оформлении рукописи.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Venugopal S., Kaur B., Verma A., Wadhwa P., Magan M., Hudda S., Kakoty V. // *Chem. Biol. Drug Design*. 2023. V. 102. P. 357–376.
- Wu K., Peng X., Chen M., Li Y., Tang G., Peng J., Peng Y., Cao X. // *Chem. Biol. Drug Design*. 2022. V. 99. № 5. P. 736–757.
- Tyagi Y.K., Jali G., Singh R. // *Anticancer Agents Med. Chem.* 2022. V. 22. № 19. P. 3280–3290.
- Brishty S.R., Hossain M.J., Khandaker M.U., Faruque M.R.I., Osman H., Rahman S.M.A. // *Front. Pharmacol.* 2021. V. 12. P. 762807.
- Ivanov A.A., Salyanov V.I., Strel'tsov S.A., Cherepanova N.A., Gromova E.S., Zhuze A.L. // *Rus. J. Bioorg. Chem.* 2011. V. 37. № 4. P. 530–541.
- Koval V.S., Ivanov A.A., Salyanov V.I., Stomakhin A.A., Oleinikov V.A., Zhuze A.L. // *Rus. J. Bioorg. Chem.* 2017. V. 43. № 2. P. 167–173.
- Koval V.S., Arutyunyan A.F., Salyanov V.L., Klimova R.R., Kushch A.A., Rybalkina E.Yu., Susova O.Yu., Zhuze A.L. // *Bioorg. Med. Chem.* 2018. V. 26. № 9. P. 2302–2309.
- Koval V.S., Arutyunyan A.F., Salyanov V.I., Kostyukov A.A., Melkina O.E., Zavigelsky G.B., Klimova R.R., Kushch A.A., Korolev S.P., Agapkina Y.Yu., et al // *Bioorg. Med. Chem.* 2020. V. 28. P. 115378.
- Teng M.K., Usman N., Frederick C.A., Wang A.H. // *Nucl. Acids Res.* 1988. V. 16. P. 2671–2690.
- Finlay A.C., Hochstein F.A., Sobin B.A., Murphy F.X. // *J. Am. Chem. Soc.* 1951. V. 73. № 1. P. 341–343.
- Lisitsina E.S., Durandin N.A., Ivanov A.A., Strel'tsov S.A., Susova O.Yu., Shtil A.A., Zhuze A.L., Kuz'min V.A. // *Mol. Biol. (Moscow)*. 2012. V. 46. P. 922–927.
- Yevdokimov Yu.M., Skuridin S.G., Lortkipanidze G.B. // *Liquid Crystals*. 1992. V. 12. № 1. P. 1–16.
- Gromyko A.V., Salyanov V.I., Strel'tsov S.A., Oleinikov V.A., Korolev S.P., Gottikh M.B., Zhuze A.L. // *Rus. J. Bioorg. Chem.* 2007. V. 33. № 6. P. 613–623.
- Susova O., Poletaeva A., Lupatov A., Kholodenko I., Karamysheva A., Mitrofanov A.A., Naskhletashvili D., Nasedkina T., Bekyashev A. // *Ann. Oncol.* 2021. № 32. P. 519.
- Ammour Y., Susova O., Krasnov G., Nikolaeva E., Varachev

- V., Schetinina Y., Gavrilova M., Mitrofanov A., Poletaeva A., Bekyashev A., et al // *Viruses*. 2022. V. 14. № 11. P. 2433.
16. Gaffney E.V. // *Cell Tissue Res*. 1982. V. 227. P. 563–568.
17. Saint-Ruf C., Nardeux P., Estrade S., Brouty-Boye D., Lavalie C., Rhim J.S., Cassingena R. // *Exp. Cell Res*. 1988. V. 176. P. 60–67.
18. Rybalkina E.Y., Moiseeva N.I., Karamysheva A.F., Eroshenko D.V., Konyseva A.V., Nazarov A.V., Grishko V.V. // *Chem. Biol. Interact*. 2021. V. 1. № 348. P. 109645.
19. Chen H., Shan J., Chen D., Wang R., Qi W., Wang H., Ke Y., Liu W., Zeng X. // *J. Cell. Physiol*. 2018. V. 234. P. 11871–11881.
20. Khader E.I., Ismail W.W., Mhaidat N.M., Alqudah M.A. // *Int. J. Hlth Sci. (Quassim)*. 2021. V. 15. P. 34–41.
21. Pommier Y. // *Nat. Rev. Cancer*. 2006. V. 6. № 10. P. 789–802.
22. Li T.-K. // *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol*. 2001. V. 41. P. 53–77.
23. Pommier Y. // *ACS Chem. Biol*. 2013. V. 8. № 1. P. 82–95.
24. Verma S., Ravichandiran V., Ranjan N., Flora S.J.S. // *Med. Chem*. 2020. V. 16. № 4. P. 454–486.
25. Akhtar W., Khan M.F., Verma G., Shaquiquzzaman M., Rizvi M.A., Mehdi S.H., Akhter M., Alam M.M. // *Eur. J. Med. Chem*. 2017. V. 27. № 126. P. 705–753.
26. Shrivastava N., Naim M.J., Alam M.J., Nawaz F., Ahmed S., Alam O. // *Arch. Pharm. Chem. Life Sci*. 2017. V. 350. P. 1700040.
27. Gao C., Li B., Zhang B., Sun Q., Li L., Li X., Chen C., Tan C., Liu H., Jiang Y. // *Bioorg. Med. Chem*. 2015. V. 23. № 8. P. 1800–1807.
28. Evdokimov Yu.M., Skuridin S.G., Lortkipanidze G.B. // *Liquid Crystals*. 1992. V. 12. № 1. P. 1–16.
29. Pjura P.E., Grzeskowiak K., Dickerson R.E. // *J. Mol. Biol*. 1987. V. 20. № 197. P. 257–271.
30. Ianevski A., Kuleskiy E., Krpina K., Lou G., Aman Y., Bugai A., Aasumets K., Akimov Y., Bulanova D., Gildemann K., et al. // *Cancers (Basel)*. 2020. V. 12. P. 1694.
31. Belikov S.V., Grokhovsky S.L., Isaguliantz M.G., Surovaya A.N., Gursky G.V. // *J. Biomol. Struct. Dyn*. 2005. V. 23. № 2. P. 193–202.
32. Dickinson L.A., Gulizia R.J., Trauger J.W., Baird E.E., Mosier D.E., Gottesfeld J.M., Dervan P.B. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 1998. V. 95. № 22. P. 12890–12895.

УДК 571.27

Наноантитело широкого спектра к гемагглютинуину вируса гриппа А подтипа Н3

Д. В. Щебляков¹, Д. В. Воронина^{1*}, И. А. Фаворская¹, И. Б. Есмагамбетов¹, И. А. Алексеева¹, А. И. Коробкова¹, Е. И. Рябова^{1,2}, А. А. Деркаев¹, В. Ю. Кан¹, А. Ш. Джаруллаева¹, А. И. Тухватулин¹, А. С. Бандельюк¹, М. М. Шмаров¹, Д. Ю. Логунов¹, А. Л. Гинцбург¹

¹Национальный исследовательский центр эпидемиологии и микробиологии имени почетного академика Н.Ф. Гамалеи Минздрава России, Москва, 123098 Россия

²Московская государственная академия ветеринарной медицины и биотехнологии – МВА имени К.И. Скрябина, Москва, 109472 Россия

*E-mail: daryavoronin2009@yandex.ru

Поступила в редакцию 24.01.2024

Принята к печати 09.02.2024

DOI: 10.32607/actanaturae.27374

РЕФЕРАТ Моноклональные антитела (мАт) и их антигенсвязывающие фрагменты являются перспективным средством борьбы с инфекционными заболеваниями. Наноантитела (VНН), благодаря уникальной структуре своего паратопа, имеют ряд преимуществ перед классическими мАт, особенно в случае вирусных инфекций. Вирусы гриппа А (ВГА) остаются серьезной угрозой для общественного здравоохранения. Основным протективным и иммунодоминантным антигеном ВГА является белок гемагглютинин (НА). В данной работе выделены три наноантитела с широкой реактивностью (D9.2, E12.2 и D4.2) к различным штаммам гриппа Н3N2, а также получены и охарактеризованы слитые с Fc-фрагментом VНН (VНН-Fc). Эта модификация улучшила связывающую способность VНН и позволила взаимодействовать с более широким спектром штаммов. Антитело D9.2-Fc продемонстрировало 100% защиту мышей от летального исхода *in vivo*. Кроме того, показано, что протективная активность D9.2-Fc обусловлена Fc-FcγR-взаимодействием. Представленные результаты говорят о том, что антитело D9.2-Fc может применяться как препарат, эффективный против инфекции, вызванной Н3N2.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА наноантитела, однодоменные антитела, вирус гриппа, гемагглютинин, Fc-фрагмент.
СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ ВГА – вирус гриппа А; НА – гемагглютинин; VНН – варибельный домен тяжелоцепочечных антител представителей семейства Camelidae, наноантитело; ИФА – иммуноферментный анализ; ЕС₅₀ – полумаксимальная эффективная концентрация; ЛД₅₀ – полумлетальная доза; мАт – моноклональные антитела; Fc – кристаллизующийся фрагмент антитела; SDS-PAGE – электрофорез белков в полиакриламидном геле; НRP – пероксидаза хрена; ОП_{450 нм} – оптическая плотность, измеренная при длине волны 450 нм; РТГА – реакция торможения гемагглютинации; РН – реакция нейтрализации; ДТТ – дитиотреитол; SEM – стандартная ошибка среднего.

ВВЕДЕНИЕ

Вирусы Н3N2 являются одними из возбудителей ежегодных сезонных эпидемий гриппа; представители данного подтипа ВГА циркулируют в человеческой популяции с 1968 г. [1]. Сезонную инфекцию Н3N2 в разные годы связывают с беспрецедентным увеличением количества госпитализаций пациентов с пневмонией в отделения интенсивной терапии [2], а также с высокой летальностью и частотой осложнений [3–5].

Вакцинация остается наиболее распространенной мерой борьбы с гриппом; однако ее эффективность сильно варьирует в различные эпидсезоны [6, 7].

Помимо низкой эффективности профилактических мер, активность современных противовирусных препаратов также снижается из-за растущей резистентности вируса [8, 9]. В связи с этим актуальна разработка новых универсальных противовирусных препаратов и терапевтических мАт против гриппа. Антигенсвязывающие фрагменты тяжелоцепочечных антител представителей семейства Camelidae (наноантитела, VНН) являются перспективным инструментом для ранней этиотропной терапии инфекционных заболеваний. VНН представляют собой полностью функциональный домен, который связывается с антигеном с высокой аффинностью

и специфичностью. Наноантитела также обладают выдающимися биохимическими характеристиками, такими, как хорошая растворимость и термическая/pH стабильность [10]. Более того, VHH кодируются одним полипептидом, поэтому их можно легко модифицировать, например, слить с Fc IgG [11, 12].

Основной мишенью иммунного ответа является гликопротеин HA; на сегодняшний день известно 18 различных вариантов HA [13, 14], образующих две филогенетические группы [15]. HA состоит из двух субъединиц – HA1 и HA2, играющих разную роль в инициации инфекционного процесса. Описано несколько антител, специфичных к HA подтипа H3 или всей филогенетической группе 2, с различными механизмами действия [16–27]. Одним из таких механизмов, вовлеченных в ликвидацию гриппозной инфекции, являются Fc-опосредованные функции антител [28, 29].

В данной работе мы выделили три H3-специфичных VHH, которые связываются с HA различных штаммов H3N2, выделенных в разные годы. Мы расширили спектр связывания и активность VHH путем их слияния с Fc-фрагментом. Наиболее перспективное антитело D9.2-Fc при профилактическом или терапевтическом введении защищает мышью от летальной инфекции, вызванной вирусом H3N2.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Клеточные линии

Клеточная линия CHO-S получена от Thermo Fisher Scientific, США (кат. № R80007), клеточные линии MDCK и Caco2 – из Российской коллекции клеточных культур позвоночных (Санкт-Петербург, Россия).

Вирусы

Использовали адаптированный к мышам ВГА A/Aichi/2/68 (H3N2).

Рекомбинантные белки

Список использованных в работе антигенов представлен в табл. 1.

Иммунизация верблюда, получение иммунной библиотеки, селекция индивидуальных клонов, экспрессия и очистка VHH

Двугорбого верблюда пятикратно иммунизировали рекомбинантным HA H3 НК внутримышечно в дозе 100 мкг с гидроксидом алюминия в качестве адъюванта. Спустя 5 дней после последней иммунизации проводили отбор крови (50 мл) у животного для выделения фракции периферических лимфоцитов.

Конструирование библиотеки и специфический скрининг клонов проводили согласно [30] с использованием в качестве антигена инактивированного ВГА A/Aichi/2/68 (H3N2).

Экспрессию и очистку наноантител выполняли как описано ранее [30].

Получение конструкций VHH-Fc, экспрессия и очистка модифицированных VHH

С помощью ПЦР получены последовательности генов D9.2-Fc, E12.2-Fc и D4.2-Fc, кодирующих соответствующее наноантитело, слитое с шарнирным участком и Fc человеческого IgG1 (GenBank: JQ666008.1). Полученные гены клонировали в вектор для эукариотической экспрессии pCER4 (Thermo Fisher Scientific, США). Аналогичным образом получали плазмиду pCER4-D9.2-mG2a, кодирующую наноантитело D9.2 с шарнирным участком и Fc IgG2a мыши (GenBank: V00798.1). Для создания

Таблица 1. Рекомбинантные белки HA, использованные в исследованиях *in vitro*

Подтип	Аббревиатура	Описание	Источник	Кат. №	№ в базе данных GenBank или GISAID
H3	H3 HA1 Swiz	HA1 A/Switzerland/9715293/2013 (H3N2)	Sino Biological	40497-V08H1	EPI541659
	H3 HA1 Vic	HA1 A/Victoria/210/2009 (H3N2)	Immune Technology	IT-003-00421p	EPI272062
	H3 Swiz	HA0 A/Switzerland/9715293/2013 (H3N2)	Sino Biological	40497-VNAB	EPI541659
	H3 Aichi	HA0 A/Aichi/2/1968 (H3N2)	Sino Biological	11707-V08H	AAA43178.1
	H3 Perth	HA0 A/Perth/16/2009 (H3N2)	Sino Biological	40043-VNAB	ACS71642.1
	H3 Sing	HA0 A/Singapore/INFIMH-16-0019/2016 (H3N2)	Xema	-	EPI1341068
	H3 HK	HA0 A/Hong Kong/45/2019 (H3N2)	-	-	EPI1691930
H4	H4	HA0 A/mallard/Ohio/657/2002 (H4N6)	Sino Biological	11714-V08H1	ABI47995.1
H7	H7 Anhui	HA0 A/Anhui/1/2013 (H7N9)	Sino Biological	40103-V08H	EPI439507
H10	H10	HA0 A/Jiangxi-Donghu/346/2013 (H10N8)	Sino Biological	40359-VNAB	EPI497477

плазмидной конструкции pСЕР4-D9.2-mG2a LALA-PG в плазмиду pСЕР4-D9.2-mG2a с помощью сайт-направленного мутагенеза вносили точечные мутации [31]. Экспрессию и очистку антител проводили как описано в [32]. Чистоту антител определяли с помощью электрофореза в полиакриламидном геле (SDS-PAGE) по Лэммли в восстанавливающих и невосстанавливающих условиях.

Аналогичным образом получали и анализировали контрольное VHH-Fc – SD36-Fc, соответствующее наноантителу (SD36) к стеблевому домену (субъединица HA2) HA H3, аминокислотную последовательность которого брали согласно [33], слитому с Fc IgG1 человека.

Иммуноферментный анализ (ИФА)

ИФА выполняли согласно [32]. Для детекции антител в сыворотке крови верблюда использовали конъюгированные с пероксидазой хрена (HRP) anti-Llama IgG (Bethyl, A160-100P). HRP-конъюгированные вторичные антитела anti-c-Мус (ab1326, Abcam), anti-human IgG и anti-mouse IgG (A8667 и A9044, MilliporeSigma, США) использовали для выявления связавшихся с антигеном VHH и VHH-Fc с Fc-фрагментом человека и мыши соответственно. Значения полумаксимальной эффективной концентрации (EC_{50}) рассчитывали с использованием четырехпараметрической логистической регрессии в GraphPad Prism 7 (GraphPad Software Inc., США).

Для проведения конкурентного ИФА VHH последовательно разводили в блокирующем буфере со стартовой концентрацией 800 нМ (~10 мкг/мл). Конкурентные антитела в формате VHH-Fc (5 нМ) добавляли в равном объеме в лунки, содержащие VHH. Связавшиеся VHH-Fc детектировали с использованием anti-human IgG HRP (A8667, MilliporeSigma, США). Оптическую плотность ($OP_{450\text{ нМ}}$) в лунках, содержащих только VHH-Fc, принимали за 100% уровень сигнала. Ингибирование выражали как процент снижения $OP_{450\text{ нМ}}$ в лунках, содержащих смесь VHH/VHH-Fc, по сравнению с лунками без VHH.

Вестерн-блоттинг

Белки разделяли с использованием 10% готовых гелей Mini-PROTEAN® (Bio-Rad, США) и переносили на нитроцеллюлозную мембрану Amersham™ Hybond™ P (Cytiva, США). После блокировки мембраны добавляли VHH-Fc в конечной концентрации 1 мкг/мл. Далее вносили антитела anti-human IgG HRP (A8667, MilliporeSigma, США). Иммунодетекцию проводили с использованием субстрата Clarity™ Western ECL (Bio-Rad).

Реакция торможения гемагглютинации (РТГА)

РТГА проводилась согласно [34].

Реакция нейтрализации (РН) вируса

РН в формате микронейтрализации в 96-луночных культуральных планшетах проводили как описано ранее [35]. Не нейтрализованные вирусные частицы выявляли с использованием поликлональных антител кролика к белку NP и anti-Rabbit IgG HRP вторичные антитела (Cat: 11675-T62 и SSA003, Sino Biological, Китай).

Способность антител ингибировать выход вирусного потомства из клетки и уменьшать размер бляшек оценивали с помощью описанных методик [16].

Оценка профилактической и терапевтической эффективности антител *in vivo*

Все эксперименты с животными, проведенные в соответствии с Директивой 2010/63/EU, рекомендациями FELASA [36], были одобрены этическим комитетом ФГБУ НИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи (протокол № 19 от 2022 г.).

Во всех экспериментах использовали SPF мышшей линии BALB/c в возрасте 6–8 недель, полученных из НПП «Питомник лабораторных животных» ФИБХ РАН. Животных интраназально инфицировали 5 ЛД₅₀ вируса A/Aichi/2/68 (H3N2), адаптированного к мышам. За животными наблюдали в течение 14 дней после заражения и ежедневно взвешивали, после чего эвтаназировали. Мышей, масса тела которых снизилась на 25% или более, эвтаназировали.

Подробная информация о схемах введения антител представлена в разделе «Результаты».

Выживаемость анализировали с использованием теста Мантела–Кокса в GraphPad Prism 7 (GraphPad Software Inc., США).

РЕЗУЛЬТАТЫ

Для получения наноантител, связывающихся с HA подтипа H3, двугорбого верблюда (*Camelus bactrianus*) иммунизировали рекомбинантным полноразмерным белком HA0 H3 НК, ранее полученным в клетках CHO-S (рис. 1А). Мониторинг уровня HA-специфических антител в сыворотке крови верблюда осуществляли методом ИФА (рис. 1Б). Иммуная сыворотка, полученная после всего цикла иммунизаций, проявляла, в отличие от контрольной, специфическую активность в отношении белка H3 НК с титром связывания более 1:1 500 000. Фаговую библиотеку размером 1.4×10^7 конструировали из кДНК, кодирующей последовательности VHH, выделенные из В-клеток. VHH, специфичные для HA H3, были отобраны методом фагового дисплея в ходе трех раундов биоэнтинга против инактивированного

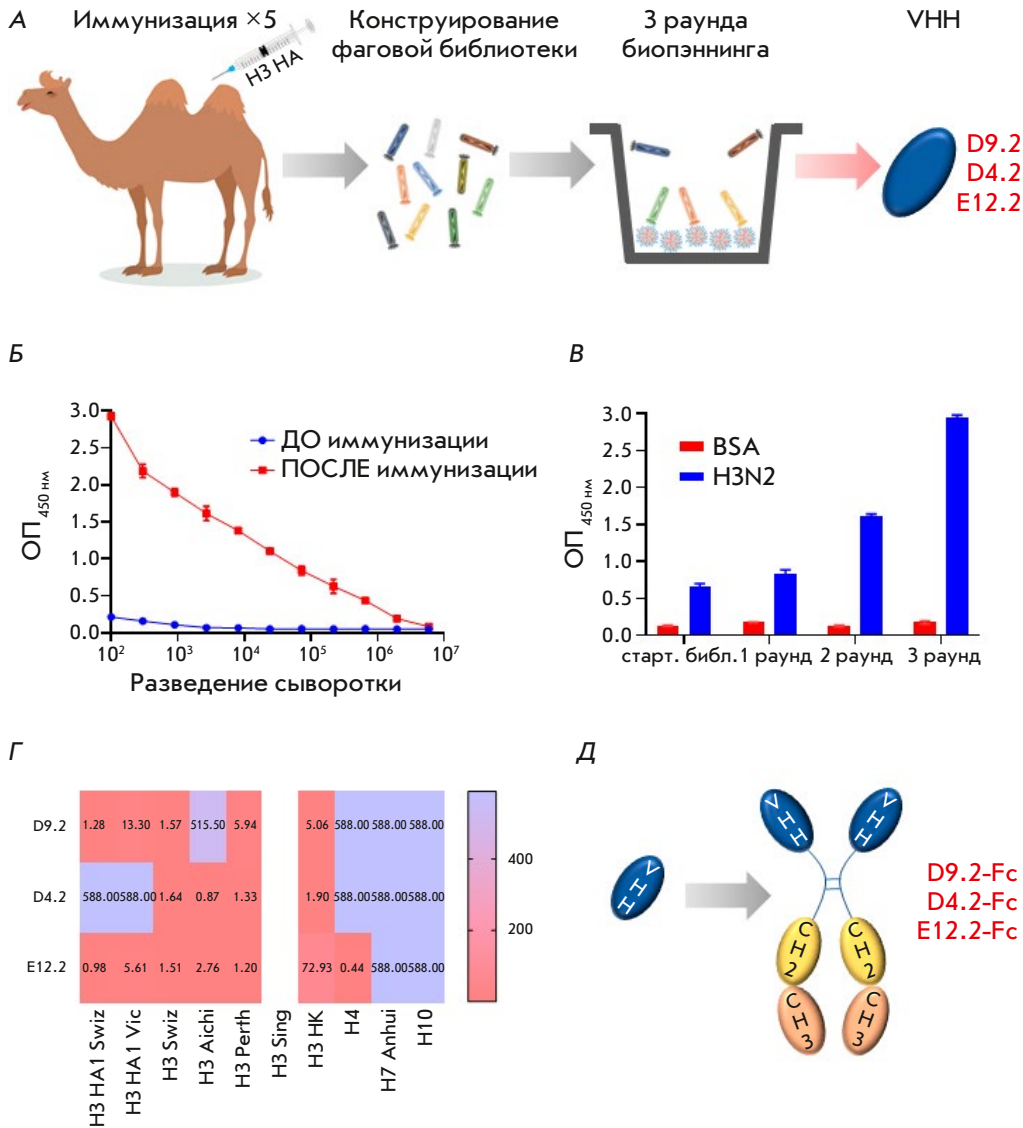


Рис. 1. Схема получения VHH, оценка связывающей способности выбранных VHH и схема их модификации: А – стратегия иммунизации животного и отбора VHH; Б – ИФА, показывающий уровень H3-специфичных антител в сыворотке крови верблюда до и после пятой иммунизации; В – результаты поликлонального фагового ИФА. BSA – бычий сывороточный альбумин, H3N2 – инактивированный ВГА А/Aichi/2/1968, старт. библи. – стартовая библиотека; Г – активность отобранных VHH в ИФА в отношении НА филогенетической группы 2 подтипов H3, H4, H7 и H10, выраженная в EC_{50} (нМ); Д – схема повышения эффективности VHH – модификация Fc-фрагментом

вируса A/Aichi/2/68 (H3N2) (рис. 1А). После третьего раунда пэннинга наблюдали значительное обогащение специфичными VHH к вирусу H3N2 (рис. 1В). Из полученной панели антител для дальнейших исследований отобрали три VHH (D4.2, D9.2 и E12.2), которые связывались с H3 НК (рис. 1А).

Иммунореактивность VHH анализировали с помощью ИФА на рекомбинантных НА, принадлежащих к подтипам H3, H4, H7 и H10 (рис. 1Г). Все VHH прочно связывались с иммобилизованными НА разных штаммов H3N2, включая изоляты 2009, 2013 и 2019 гг. Кроме того, E12.2 и D4.2 связывали НА штамма A/Aichi/2/1968. E12.2 также взаимодействовал с НА подтипа H4. И D9.2, и E12.2 узнавали субъединицу НА1 белка НА. В свою очередь, D4.2 не связывался с НА1, но взаимодействовал с полноразмерными НА0.

Для того чтобы повысить активность выбранных наноантител посредством естественной димеризации, увеличить период полувыведения из сыворотки и добавить Fc-опосредованные эффекторные функции, мы модифицировали VHH Fc-фрагментом (рис. 1Д). Последовательности выбранных VHH были слиты с шарнирной областью и Fc-доменом IgG1 человека. Таким образом получали конструкции VHH-Fc: D9.2-Fc, D4.2-Fc и E12.2-Fc. Димеризацию VHH-Fc подтверждали с помощью электрофореза (рис. 2А). Полоса с молекулярной массой примерно 80–90 кДа в невозстанавливающих условиях соответствует димерной форме VHH-Fc.

Широту связывающей способности VHH-Fc изучали в непрямом ИФА с использованием рекомбинантных белков НА0 и НА1 разных штаммов ВГА (рис. 2Б). Введение Fc-фрагмента в структуру мо-

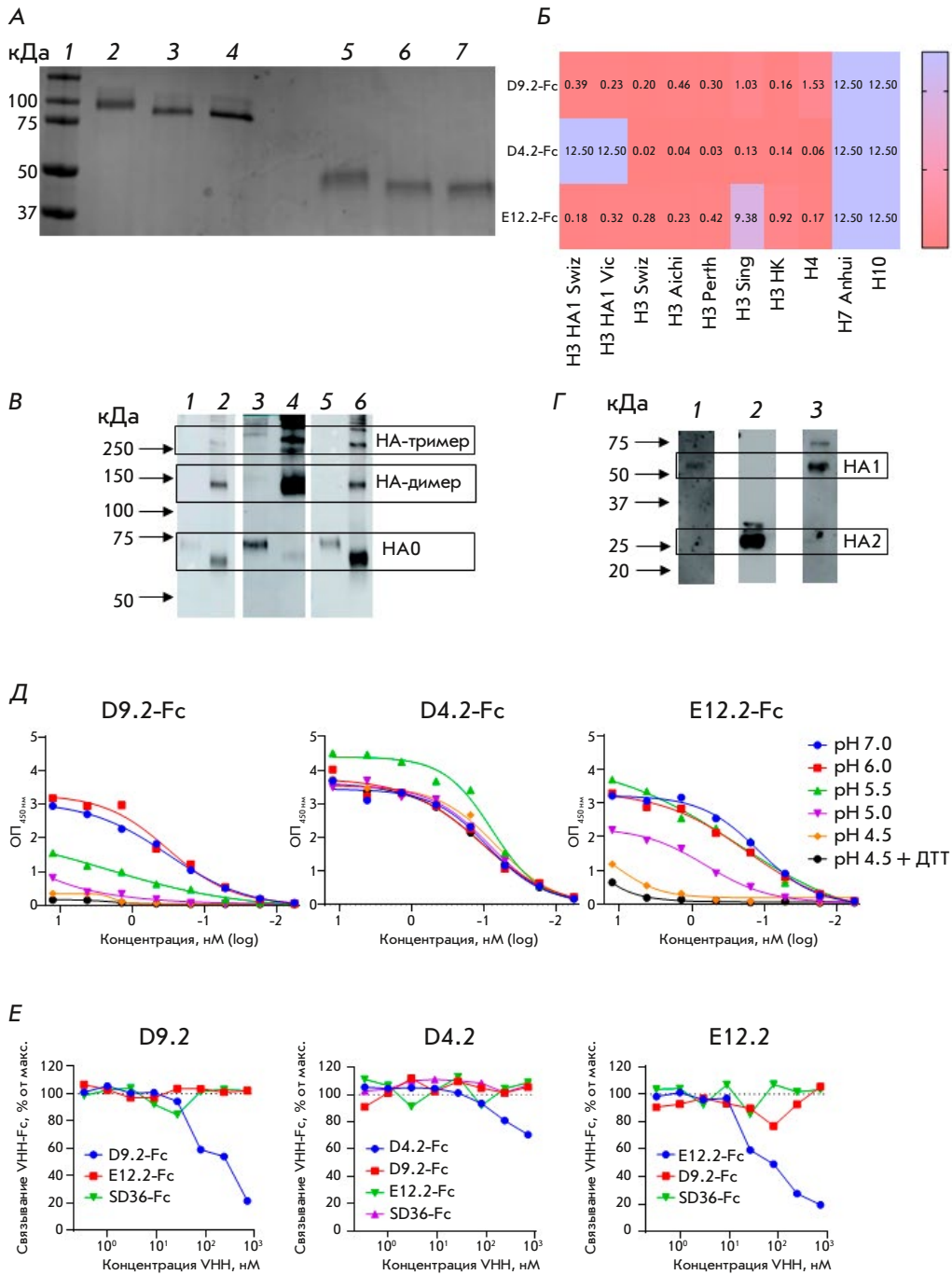


Рис. 2. Получение VNN-Fc и их характеристика *in vitro*: **А** – SDS-PAGE очищенных VNN-Fc в невосстанавливающих (2–4) и восстанавливающих (5–7) условиях: маркер молекулярных масс (1), D9.2-Fc (2, 5), E12.2-Fc (3, 6) и D4.2-Fc (4, 7); **Б** – спектр связывания VNN-Fc с различными HA филогенетической группы 2 по результатам ИФА, выражен в EC_{50} (нМ); **В** – вестерн-блот-анализ специфичности антител D9.2-Fc (1, 2), D4.2-Fc (3, 4) и E12.2-Fc (5, 6) к HA0 H3 Swiz в восстанавливающих (1–3) и невосстанавливающих (4–6) условиях; **Г** – вестерн-блот-анализ специфичности VNN-Fc к HA1 или HA2 субъединице HA: инактивированный ВГА А/Aichi/2/1968 в восстанавливающих условиях, детектированный D9.2-Fc (1), D4.2-Fc (2) или E12.2-Fc (3); **Д** – результаты непрямого ИФА, показывающие связывание VNN-Fc с H3 Aichi, обработанным трипсином-TPСК и инкубированным в буферах с различным pH или ДТТ; **Е** – конкурентный ИФА для определения эпипотной специфичности VNN-Fc

лекулы VNN повышало эффективность связывания каждого выбранного VNN-Fc, но в разной степени. Наиболее заметное увеличение аффинности продемонстрировало D4.2-Fc: его значение EC_{50} для H3 Swiz составило 22 пМ, в то время как EC_{50} мономера – 1642 пМ. Мономерная форма D9.2 едва могла связываться с H3 Aichi, в то время как EC_{50} Fc-слитой формы для этого штамма составила 0.46 нМ. И D9.2-Fc, и D4.2-Fc также получили способность связывать HA подтипа H4. Наименее выражен-

ный эффект модификация Fc-фрагментом оказала на E12.2.

Оценка специфичности VNN-Fc в вестерн-блот-анализе показала, что все отобранные антитела распознают как мономерную, так и ди- и тримерную формы HA (рис. 2B). Также с помощью иммуноблотинга показано, что антитела D9.2-Fc и E12.2-Fc специфически связываются с субъединицей HA1, в то время как D4.2-Fc – с субъединицей HA2 (рис. 2Г). Далее мы определяли, разрушают-

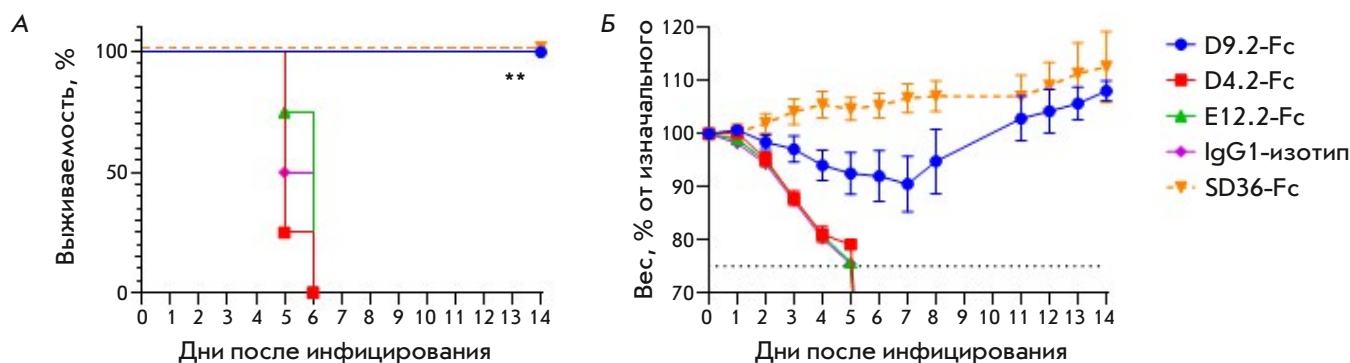


Рис. 3. Профилактическая эффективность VNH-Fc *in vivo*: А – кривые выживаемости, показано различие между контрольной и группой D9.2-Fc (** $p=0.002$); Б – кривые изменения массы тела выживших мышей, данные представлены как средние значения \pm SEM

ся ли распознаваемые нашими антителами эпитопы при снижении pH (рис. 2Д). Как известно, в процессе слияния мембран НА претерпевает значительные конформационные изменения, вызванные понижением pH в эндосомах клетки-хозяина. Несмотря на то, что субъединица HA1 не претерпевает таких серьезных перестроек, как HA2 [37, 38], активность связывающих HA1 антител (D9.2-Fc и E12.2-Fc) уменьшалась с уменьшением pH и полностью терялась при добавлении ДТТ, поскольку он удаляет субъединицу HA1 из НА. Однако D4.2-Fc одинаково связывалось с НА при различных значениях pH, как и с НА, обработанным ДТТ, что подтверждает нахождение его эпитопа именно в субъединице HA2.

По результатам конкурентного ИФА показано, что три отобранных клон VNH-Fc узнают различные не перекрывающиеся эпитопы на поверхности НА (рис. 2Е). Связывающее субъединицу HA2 антитело D4.2-Fc не конкурировало с контрольным VNH-Fc к HA2, SD36-Fc.

Протективную активность VNH-Fc *in vivo* изучали с использованием летальной мышинной модели (рис. 3). Мышам BALB/c интраназально вводили 1 мг/кг VNH-Fc за 1 ч до инфицирования. Животным контрольной группы вводили изотип IgG1 – нерелевантное VNH-Fc к S-белку вируса SARS-CoV-2; положительным контролем служило антитело SD36-Fc.

Антитело D9.2-Fc защищало 100% животных от летального исхода, потеря веса в данной группе в среднем не превышала 10%, к концу эксперимента вес мышей превышал изначальный. В свою очередь, ни E12.2-Fc, ни D4.2-Fc не показали протективной активности, поэтому D9.2-Fc было выбрано для дальнейшего исследования *in vivo*.

Далее мы оценили профилактическую эффективность системного введения D9.2-Fc в отноше-

нии летальной инфекции H3N2 (рис. 4А,Б). Мышам вводили антитела в дозе 10 мг/кг внутривентриально за 24 ч до заражения ВГА. У животных, получавших D9.2-Fc, не наблюдалось признаков заболевания, потеря веса отсутствовала или была незначительной, в то время как контрольные мыши пали спустя 7 суток.

Для определения терапевтической эффективности D9.2-Fc мышам вводили внутривентриально 40 мг/кг D9.2-Fc спустя 24 ч после инфицирования (рис. 4В,Г). Мыши из контрольной группы пали к 9 дню после заражения. Из животных, получивших D9.2-Fc, 80% выжили; изменение массы тела не превышало 15%, к концу наблюдения вес всех мышей вернулся к начальным значениям.

Чтобы изучить механизм противовирусного действия D9.2-Fc, мы оценивали активность VNH-Fc в РТГА и различных вариантах РН. Данное антитело не тормозило гемагглютинирующую активность ВГА в реакции микронеutralизации, и в реакции neutralизации бляшкообразования D9.2-Fc не обладало вируснейтрализующей активностью. При определении способности VNH-Fc ингибировать выход вируса из клетки антитело D9.2-Fc также не показало нейтрализующих свойств.

Поскольку D9.2-Fc не обладало способностью neutralизовать ВГА, мы предположили, что эффективность данного антитела *in vivo* опосредована Fc-зависимыми эффекторными функциями. Поэтому были получены две дополнительные формы D9.2: VNH с Fc IgG2a мыши (D9.2-mG2a), а также D9.2-mG2a LALA-PG, в которой в Fc внесены мутации L234A, L235A и P329G (рис. 5). Комплекс мутаций LALA-PG ингибирует связывание с FcγR и C1q, в то время как взаимодействие с FcRn и стабильность Fc не затрагиваются [39]. С помощью ИФА показано, что эти мутации не влияют на связывание D9.2 с НА (рис. 5Б). Для оценки и сравнения

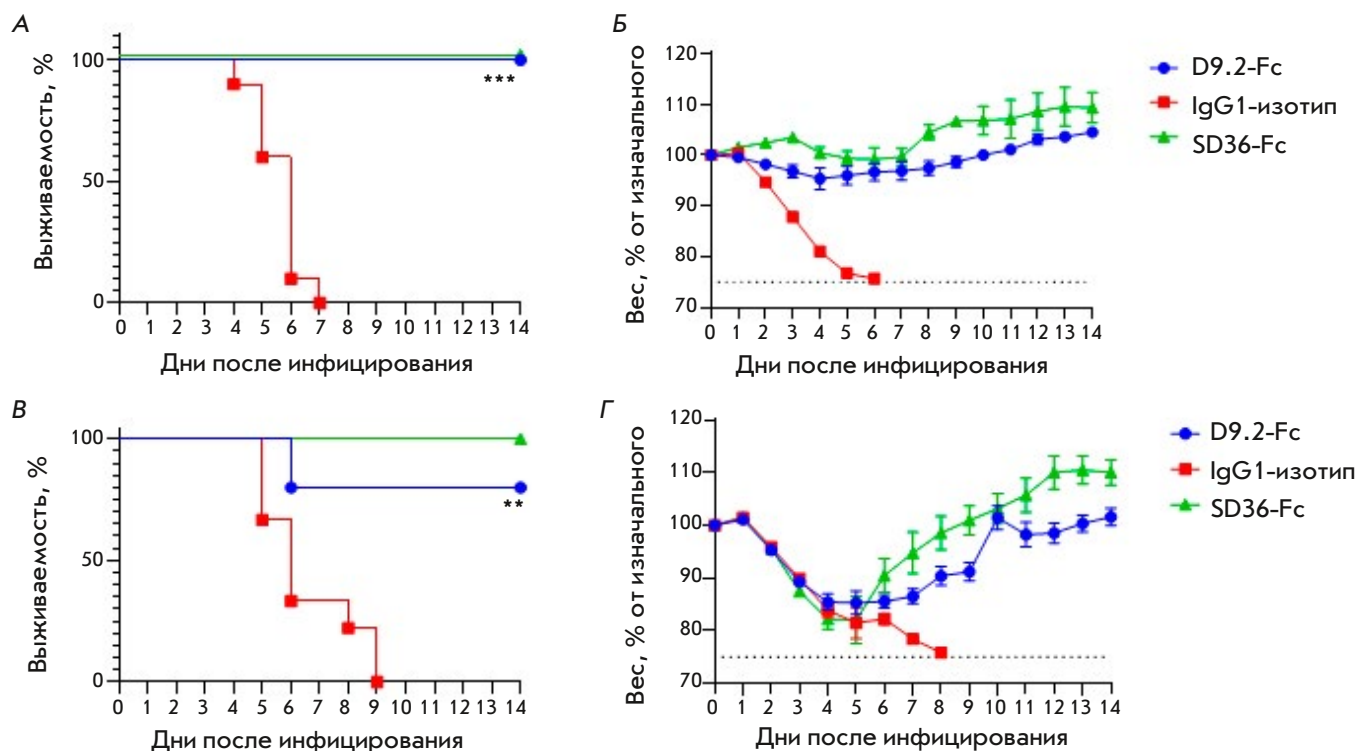


Рис. 4. Эффективность D9.2-Fc *in vivo* в режиме профилактического (А и Б) и терапевтического (В и Г) введения: А и В – кривые выживаемости ($***p = 0.0002$, $**p = 0.0021$); Б и Г – кривые изменения массы тела выживших мышей, данные представлены как средние значения \pm SEM

протективных свойств полученных конструкций мышам вводили внутрибрюшинно антитела в дозе 5 мг/кг за 24 ч до заражения (рис. 5В,Г). Мыши (4 из 5), получавшие антитело D9.2-mG2a, были защищены от летального исхода, тогда как все мыши, получавшие антитело LALA-PG, пали к 6 дню, как и мыши контрольной группы. Следовательно, взаимодействие Fc-Fc γ R необходимо для защиты животных *in vivo* с помощью ненейтрализующего антитела D9.2.

ОБСУЖДЕНИЕ

В настоящее время одним из перспективных направлений в медицине является использование мАт для профилактики и лечения инфекций. В частности, наноантитела (VНН) рассматриваются как практичная и эффективная альтернатива классическим IgG. В последнее время активно изучается возможность использования VНН в качестве антибактериальных [40, 41] или противовирусных антител [32, 42, 43]. VНН, состоящие из одного полипептида, могут успешно использоваться для пассивной иммунизации в составе аденовирусных векторов [44, 45], аденоассоциированных вирусных векторов [46, 47] или мРНК [48]. В данной работе нами выделены три VНН: D9.2, D4.2 и E12.2, специфичные к разным

эпитомам молекулы HA вируса H3N2. D9.2 и E12.2 связываются с субъединицей HA1, тогда как D4.2 взаимодействует с субъединицей HA2. Полученные VНН узнают HA различных штаммов H3N2. Кроме того, E12.2 в формате мономера может связывать HA подтипа H4.

Ранее сообщалось об усилении противовирусного действия VНН путем мультимеризации. Например, димеризация VНН P2C5 приводила к 200-кратному увеличению нейтрализующей активности против SARS-CoV-2 [49], в то время как димер другого анти-S VНН Fu2 в 10 раз эффективнее нейтрализовал вирус в отличие от его мономерной формы [50]. Согласно данным Hultberg A. и соавт., можно получить 4000-кратное усиление активности VНН, что и было показано для бивалентной формы VНН, нейтрализующего респираторно-синцитиальный вирус [12]. Аналогичное наблюдение сделано для молекул VНН, слитых с Fc, так как через Fc-фрагмент происходит естественная димеризация [51, 52]. Более того, показано расширение спектра связывания некоторых VНН в результате мультимеризации. Например, противогриппозный VНН R1a-B6 в бивалентном формате приобрел способность нейтрализовать вирусы H2N2 [53], а G2.3, слитый с Fc-фрагментом, подтипы H5N2 и H9N2 [32]. Fc-

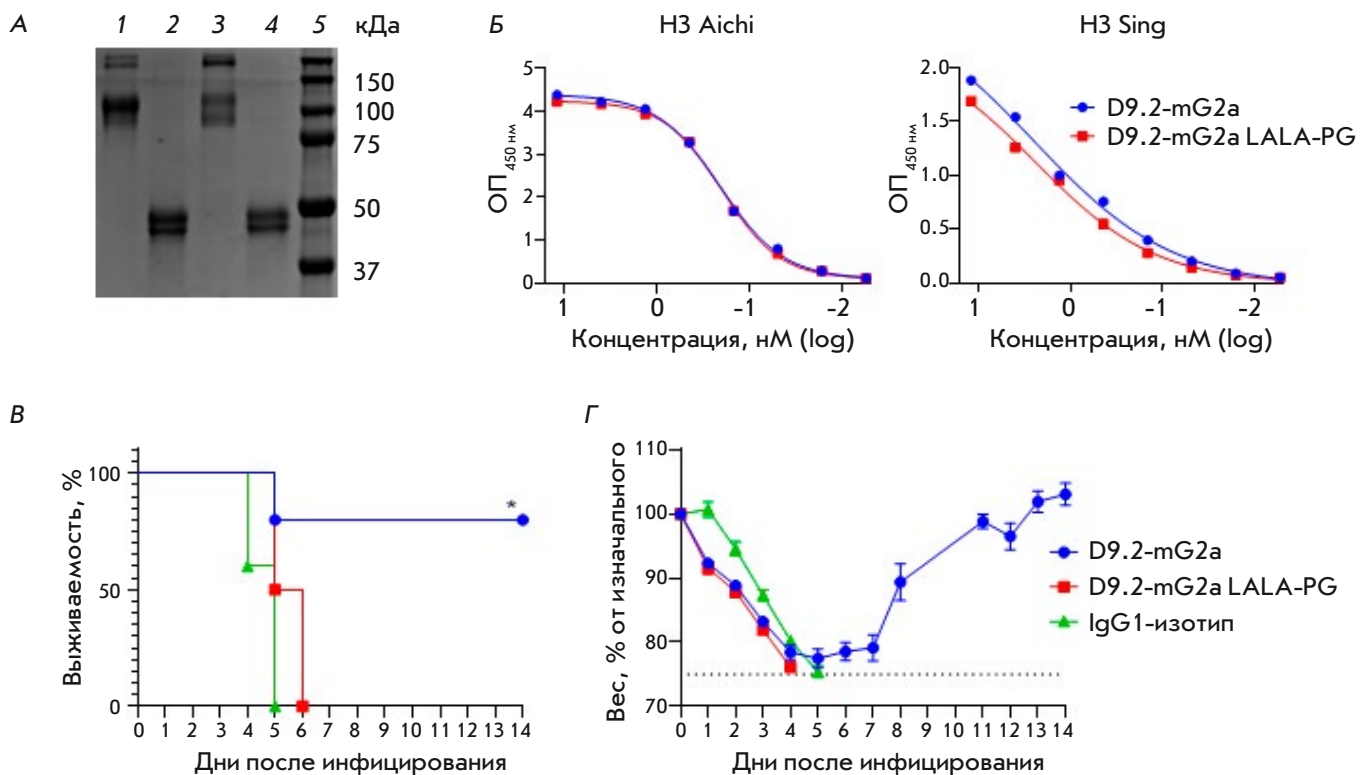


Рис. 5. Протективность D9.2 *in vivo* зависит от Fc-FcγR-взаимодействий. А – SDS-PAGE-анализ полученных конструкций в невосстанавливающих (1, 3) и восстанавливающих (2, 4) условиях: D9.2-mG2a (1, 2) и D9.2-mG2a LALA-PG (3, 4), маркер молекулярных масс (5). Б – результаты ИФА, отражающие связывание указанных антител с HA H3 Aichi и H3 Sing. В – кривые выживаемости (различия между группами D9.2-mG2a и IgG1: * $p = 0.0361$; между группами D9.2-mG2a и LALA-PG – * $p = 0.0116$). Г – кривые изменения массы тела выживших мышей, представлены средние значения \pm SEM

слитая форма VHN, активного в отношении SARS-CoV-1, демонстрировала перекрестную реактивность с SARS-CoV-2 [54]. Кроме того, модификация с помощью Fc позволяет задействовать эффекторные функции, включая активацию комплемента и/или антителозависимую клеточную цитотоксичность и фагоцитоз, которые имеют решающее значение при гриппозной инфекции [29]. Поэтому мы объединили наши VHN с Fc IgG1 человека, и опосредованная Fc димеризация привела к увеличению связывающей активности наряду с появлением способности реагировать с белком HA подтипа H4 (для VHN D9.2 и D4.2). Однако модификация E12.2 привела к минимальному (по сравнению с другими VHN) улучшению связывающей способности, что позволяет предположить, что потенциал увеличения эффективности и ширины спектра связывания антитела за счет мультимеризации зависит от его эпитопа.

Мы исследовали эффективность выбранных антител *in vivo* и показали, что D9.2-Fc при его интраназальном введении за 1 ч до заражения полностью

защищает животных от летального исхода, тогда как D4.2-Fc и E12.2-Fc не смогли обеспечить защиту животных. Учитывая эти результаты, D9.2-Fc отобрали для дальнейшей оценки его профилактических и терапевтических свойств *in vivo*. При системном введении D9.2-Fc за 24 ч до заражения наблюдали 100% протективность данного антитела, в то время как при введении через сутки после инфицирования выживало 80% животных, получивших D9.2-Fc.

Мы оценили также вируснейтрализующую активность D9.2-Fc *in vitro*. Однако D9.2-Fc не обладает способностью нейтрализовать вирус H3N2, поэтому мы предположили, что его протективные свойства *in vivo* зависят от Fc-опосредованных эффекторных функций антитела. Как известно, Fc-фрагмент IgG1 человека способен связывать FcγR мыши [55]. Тем не менее, в определенных случаях подтип IgG играет решающую роль в протективности мАТ на летальной мышинной модели. Например, показано, что связывающиеся с субъединицей HA2, а также и нацеленные на интерфейс HA варианты мАТ

с константной областью тяжелой цепи IgG2a мыши улучшают защиту *in vivo* по сравнению с исходным субтипом IgG. Причиной этого является более высокое сродство Fc-фрагмента субтипа IgG2a к FcγR по сравнению с IgG1 [56, 57]. Несмотря на различия в представлениях ученых о том, до какой степени противовирусный эффект *in vivo* мАт, специфичных к HA1, зависит от Fc-опосредованных функций, опубликованы данные, подтверждающие по крайней мере частичную зависимость протективности анти-HA1 мАт от Fc-FcγR-взаимодействия [19, 25, 26, 58]. Мы сравнили протективные свойства *in vivo* D9.2, слитого с Fc IgG2a мыши (D9.2-mG2a), и D9.2 с мутациями LALA-PG (D9.2-mG2a LALA-PG) и показали, что D9.2-mG2a обеспечивало выживаемость 80% животных, в то время как вся группа мышей, получавших LALA-PG, пала. Таким образом установлено, что D9.2-Fc защищает животных благодаря Fc-FcγR-взаимодействию.

ВЫВОДЫ

В данной работе мы идентифицировали три клонна VHH, узнающие неперекрывающиеся эпитопы в структуре HA и активные в отношении HA различных штаммов вируса гриппа H3N2. Мы расширили спектр их связывания, модифицировав VHH Fc-фрагментом. Из трех отобранных VHH-Fc только D9.2-Fc продемонстрировало протективную активность *in vivo* на мышинной модели гриппозной инфекции. Несмотря на отсутствие нейтрализующей активности в отношении ВГА H3N2, D9.2-Fc способно обеспечивать эффективную защиту *in vivo* с помощью Fc-опосредованных механизмов. ●

*Исследование выполнено в рамках
Государственного задания Министерства
здравоохранения Российской Федерации
№ 121031800132-4.*

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Cockburn W.C., Delon P.J., Ferreira W. // Bull. W. Hlth Organ. 1969. V. 41. P. 345–348.
- Burrell A., Huckson S., Pilcher D.V. // N. Engl. J. Med. 2018. V. 378. № 22. P. 2138–2139.
- Huang S.Y., Huang W.C., Chen Y.C., Tsai C.Y., Lee I.K. // Am. J. Trop. Med. Hygiene. 2017. V. 97. № 6. P. 1945–1951.
- Nateghian A., Gouya M.M., Nabavi M., Soltani H., Mousavi S.V., Agah E., Erfani H., Parchami P., Dadras M., Robinson J.L. // J. Clin. Virol. 2020. V. 124. P. 104281.
- Tekin S., Keske S., Alan S., Batirel A., Karakoc C., Tasdelen-Fisgin N., Simsek-Yavuz S., Isler B., Aydin M., Kapmaz M., et al. // Inter. J. Infect. Dis. 2019. V. 81. P. 6–9.
- Darvishian M., van den Heuvel E.R., Bissielo A., Castilla J., Cohen C., Englund H., Gefenait G., Huang W.T., la Bastide-van Gemert S., Martinez-Baz I., et al. // Lancet Respir. Med. 2017. V. 5. № 3. P. 200–211.
- Lewnard J.A., Cobey S. // Vaccines (Basel). 2018. V. 6. № 2. P. 28.
- Hayden F.G., Sugaya N., Hirotsu N., Lee N., de Jong M.D., Hurt A.C., Ishida T., Sekino H., Yamada K., Portsmouth S., et al. // N. Eng. J. Med. 2018. V. 379. № 10. P. 913–923.
- Stephenson I., Democratis J., Lackenby A., McNally T., Smith J., Pareek M., Ellis J., Birmingham A., Nicholson K., Zambon M. // Clin. Infect. Dis. 2009. V. 48. № 4. P. 389–396.
- Huang K., Ying T., Wu Y. // Viruses. 2022. V. 14. № 6. P. 1162.
- Hoefman S., Ottevaere I., Baumeister J., Sargentini-Maier M.L. // Antibodies. 2015. V. 4. № 3. P. 141–156.
- Hultberg A., Temperton N.J., Rosseels V., Koenders M., Gonzalez-Pajuelo M., Schepens B., Ibañez L.I., Vanlandschoot P., Schillemans J., Saunders M., et al. // PLoS One. 2011. V. 6. № 4. P. e17665.
- Ferrara F., Molesti E., Temperton N. // Future Virol. 2015. V. 10. № 6. P. 731–749.
- Wu Y., Wu Y., Tefsen B., Shi Y., Gao G.F. // Trends Microbiol. 2014. V. 22. № 4. P. 183–191.
- Tong S., Zhu X., Li Y., Shi M., Zhang J., Bourgeois M., Yang H., Chen X., Recuento S., Gomez J., et al. // PLoS Pathog. 2013. V. 9. № 10. P. e1003657.
- Bangaru S., Lang S., Schotsaert M., Vanderven H.A., Zhu X., Kose N., Bombardi R., Finn J.A., Kent S.J., Gilchuk P., et al. // Cell. 2019. V. 177. № 5. P. 1136–1152.e18.
- Benjamin E., Wang W., McAuliffe J.M., Palmer-Hill F.J., Kallewaard N.L., Chen Z., Suzich J.A., Blair W.S., Jin H., Zhu Q. // J. Virol. 2014. V. 88. № 12. P. 6743–6750.
- DiLillo D.J., Palese P., Wilson P.C., Ravetch J.V. // J. Clin. Invest. 2016. V. 126. № 2. P. 605–610.
- Henry Dunand C.J., Leon P.E., Huang M., Choi A., Chromikova V., Ho I.Y., Tan G.S., Cruz J., Hirsh A., Zheng N.Y., et al. // Cell Host Microbe. 2016. V. 19. № 6. P. 800–813.
- Iba Y., Fujii Y., Ohshima N., Sumida T., Kubota-Koketsu R., Ikeda M., Wakiyama M., Shirouzu M., Okada J., Okuno Y., et al. // J. Virol. 2014. V. 88. № 13. P. 7130–7144.
- Kubota-Koketsu R., Mizuta H., Oshita M., Ideno S., Yunoki M., Kuhara M., Yamamoto N., Okuno Y., Ikuta K. // Biochem. Biophys. Res. Commun. 2009. V. 387. № 1. P. 180–185.
- Lee J., Boutz D.R., Chromikova V., Joyce M.G., Vollmers C., Leung K., Horton A.P., DeKosky B.J., Lee C.H., Lavinder J.J., et al. // Nat. Med. 2016. V. 22. № 12. P. 1456–1464.
- McCarthy K.R., Watanabe A., Kuraoka M., Do K.T., McGee C.E., Sempowski G.D., Kepler T.B., Schmidt A.G., Kelsoe G., Harrison S.C. // Immunity. 2018. V. 48. № 1. P. 174–184.e9.
- Son S., Ahn S. Bin, Kim G., Jang Y., Ko C., Kim M., Kim S.J. // Antiviral Res. 2023. V. 213. P. 105591.
- Tan G.S., Leon P.E., Albrecht R.A., Margine I., Hirsh A., Bahl J., Krammer F. // PLoS Pathog. 2016. V. 12. № 4. P. e1005578.
- Watanabe A., McCarthy K.R., Kuraoka M., Schmidt A.G., Adachi Y., Onodera T., Tonouchi K., Caradonna T.M., Bajic G., Song S., et al. // Cell. 2019. V. 177. № 5. P. 1124–1135.e16.
- Yoon A., Yi K.S., Chang S.Y., Kim S.H., Song M., Choi J.A., Bourgeois M., Hossain M.J., Chen L.M., Donis R.O., et al. // PLoS One. 2015. V. 10. № 10. P. e0141312.
- Gao R., Sheng Z., Sreenivasan C.C., Wang D., Li F. // Viruses. 2020. V. 12. № 3. P. 276.
- Boudreau C.M., Alter G. // Front. Immunol. 2019. V. 10. P. 440.
- Voronina D.V., Shcheblyakov D.V., Esmagambetov I.B., Derkaev A.A., Popova O., Shcherbinin D.N. // Acta Naturae. 2021. V. 13. № 4. P. 33–41.

31. Saunders K.O. // *Front. Immunol.* 2019. V. 10. P. 1296.
32. Voronina D.V., Shcheblyakov D.V., Favorskaya I.A., Esmagambetov I.B., Dzhharullaeva A.S., Tukhvatulin A.I., Zubkova O.V., Popova O., Kan V.Y., Bandelyuk A.S., et al. // *Viruses.* 2022. V. 14. № 11. P. 2485.
33. Laursen N.S., Friesen R.H.E., Zhu X., Jongeneelen M., Blokland S., Vermond J., van Eijgen A., Tang C., van Diepen H., Obmolova G., et al. // *Science.* 2018. V. 362. № 6414. P. 598–602.
34. Kaverin N.V., Rudneva I.A., Govorkova E.A., Timofeeva T.A., Shilov A.A., Kochergin-Nikitsky K.S., Krylov P.S., Webster R.G. // *J. Virol.* 2007. V. 81. № 23. P. 12911–12917.
35. He W., Mullarkey C.E., Miller M.S. // *Methods.* 2015. V. 90. P. 95–100.
36. Mähler M., Berar M., Feinstein R., Gallagher A., Illgen-Wilcke B., Pritchett-Corning K., Raspa M. // *Lab. Anim.* 2014. V. 48. № 3. P. 178–192.
37. Benhaim M.A., Prasad V.M., Garcia N.K., Guttman M., Lee K.K. // *Sci. Adv.* 2020. V. 6. № 18. P. eaaz8822.
38. Benton D.J., Gamblin S.J., Rosenthal P.B., Skehel J.J. // *Nature.* 2020. V. 583. № 7814. P. 150–153.
39. Mausser E., Nador E., Politch J.A., Pauly M.R., Marathe J.G., Moench T.R., Zeitlin L., Whaley K.J., Anderson D.J. // *PLoS One.* 2023. V. 18. № 3. P. e0282147.
40. Cawez F., Mercuri P.S., Morales-Yáñez F.J., Maalouf R., Vandevenne M., Kerff F., Guérin V., Mainil J., Thiry D., Saulmont M., et al. // *Antimicrob. Agents Chemother.* 2023. V. 67. № 4. P. e01499-22.
41. Kumar S., Athreya A., Gulati A., Nair R.M., Mahendran I., Ranjan R., Penmatsa A. // *Commun. Biol.* 2021. V. 4. № 1. P. 836.
42. Esmagambetov I.B., Shcheblyakov D.V., Egorova D.A., Voronina O.L., Derkaev A.A., Voronina D.V., Popova O., Ryabova E.I., Shcherbinin D.N., Aksenova E.I., et al. // *Acta Naturae.* 2021. V. 13. № 4. P. 53–63.
43. Wang R., Zhang H., Peng C., Shi J., Zhang H., Gong R. // *Virol. Sin.* 2021. V. 36. № 6. P. 1600–1610.
44. Burmistrova D.A., Tillib S.V., Shcheblyakov D.V., Dolzhikova I.V., Shcherbinin D.N., Zubkova O.V., Ivanova T.I., Tukhvatulin A.I., Shmarov M.M., Logunov D.Y., et al. // *PLoS One.* 2016. V. 11. № 3. P. e0150958.
45. Tutykhina I.L., Sedova E.S., Gribova I.Y., Ivanova T.I., Vasilev L.A., Rutovskaya M.V., Lysenko A.A., Shmarov M.M., Logunov D.Y., Naroditsky B.S., et al. // *Antiviral Res.* 2013. V. 97. № 3. P. 318–328.
46. Derkaev A.A., Ryabova E.I., Esmagambetov I.B., Shcheblyakov D.V., Godakova S.A., Vinogradova I.D., Noskov A.N., Logunov D.Y., Naroditsky B.S., Gintsburg A.L. // *Front Microbiol.* 2022. V. 13. P. 960937.
47. Esmagambetov I.B., Ryabova E.I., Derkaev A.A., Shcheblyakov D.V., Dolzhikova I.V., Favorskaya I.A., Grousova D.M., Dovgiy M.A., Prokofiev V.V., Gosudarev A.I., et al. // *Front. Immunol.* 2023. V. 14. P. 1129245.
48. Panova E.A., Kleymenov D.A., Shcheblyakov D.V., Bykonina E.N., Mazunina E.P., Dzhharullaeva A.S., Zolotar A.N., Derkaev A.A., Esmagambetov I.B., Sorokin I.I., et al. // *Front. Immunol.* 2023. V. 14. P. 1098302.
49. Favorskaya I.A., Shcheblyakov D.V., Esmagambetov I.B., Dolzhikova I.V., Alekseeva I.A., Korobkova A.I., Voronina D.V., Ryabova E.I., Derkaev A.A., Kovyrshina A.V., et al. // *Front Immunol.* 2022. V. 13. P. 822159.
50. Hanke L., Das H., Sheward D.J., Perez Vidakovic L., Urgard E., Moliner-Morro A., Kim C., Karl V., Pankow A., Smith N.L., et al. // *Nat. Commun.* 2022. V. 13. № 1. P. 155.
51. Liu H., Wu L., Liu B., Xu K., Lei W., Deng J., Rong X., Du P., Wang L., Wang D., et al. // *Cell Rep. Med.* 2023. V. 4. № 2. P. 100918.
52. Schepens B., van Schie L., Nerinckx W., Roose K., Fijalkowska D., Devos S., Weyts W., De Cae S., Vanmarcke S., Lonigro C., et al. // *Sci. Transl. Med.* 2021. V. 13. № 621. P. eabi7826.
53. Hufton S.E., Risley P., Ball C.R., Major D., Engelhardt O.G., Poole S. // *PLoS One.* 2014. V. 9. № 8. P. e103294.
54. Wrapp D., De Vlieger D., Corbett K.S., Torres G.M., Wang N., van Breedam W., Roose K., van Schie L., Hoffmann M., Pöhlmann S., et al. // *Cell.* 2020. V. 181. № 5. P. 1004–1015.e15.
55. Derebe M.G., Nanjunda R.K., Gilliland G.L., Lacy E.R., Chiu M.L. // *Immunol. Lett.* 2018. V. 197. P. 1–8.
56. DiLillo D.J., Tan G.S., Palese P.R.J.V. // *Nat. Med.* 2014. V. 20. № 2. P. 143–151.
57. Bruhns P. // *Blood.* 2012. V. 119. № 24. P. 5640–5649.
58. Ko Y.A., Yu Y.H., Wu Y.F., Tseng Y.C., Chen C.L., Goh K.S., Liao H.Y., Chen T.H., Cheng T.J.R., Yang A.S., et al. // *PLoS Pathog.* 2021. V. 17. № 8. P. e1009724.

ELABELA-APJ Axis Enhances Mesenchymal Stem Cell Proliferation and Migration via the METTL3/PI3K/AKT Pathway

D. Xu^{1#}, J. Fu^{1#}, X. Liu^{1,2}, Y. Hong¹, X. Chen¹, S. Li¹, J. Hou^{1,2}, K. Zhang^{1,2}, C. Zhou¹, C. Zeng², G. Zheng², H. Wu¹, T. Wang^{1*}

¹Department of Emergency, the Eighth Affiliated Hospital of Sun Yat-sen University, Shenzhen, Guangdong, 518003 China

²Department of Emergency, the Sun Yat-sen Memorial Hospital of Sun Yat-sen University, Guangzhou, Guangdong, 510120 China

#Equal contributors.

*E-mail: tongwang316@163.com

Received: October 26, 2023; in final form, February 13, 2024

DOI: 10.32607/actanaturae.17863

ABSTRACT Mesenchymal stem cells (MSCs) possess a strong therapeutic potential in regenerative medicine. ELABELA (ELA) is a 32 amino acid peptide that binds to the apelin peptide jejunum receptor (APJ) to regulate cell proliferation and migration. The aim of this study was to investigate the function of ELA vis-a-vis the MSC proliferation and migration, and further explore the underlying mechanism. We demonstrated that the exogenous supplement of ELA boosts the proliferation and migration ability of MSCs, alongside improved *in vitro* cell viability. These capabilities were rendered moot upon APJ knockdown. In addition, ELA (5–20 μ M) was shown to upregulate the expression of METTL3 in a concentration-dependent pattern, a capacity which was suppressed by APJ reduction, whereas the downregulation of METTL3 expression blocked the beneficial effects induced by ELA. ELA was also observed to upregulate the phosphorylation level of AKT. This ELA-induced activation of the PI3K/AKT pathway, however, is inhibited with knockdown of METTL3. Our data indicate that ELA could act as a promoter of MSC proliferation and migration *in vitro* through the APJ receptor, something which might be attributed to the activation of the METTL3/PI3K/AKT signaling pathway. Therefore, ELA is a candidate for optimizing MSC-based cell therapy, while METTL3 is a potential target for its promoting action on MSCs.

KEYWORDS ELABELA, METTL3, Mesenchymal stem cells, Apelin receptor, Proliferation, Migration.

ABBREVIATIONS MSCs – mesenchymal stem cells; ELA – ELABELA; APJ – apelin receptor; PI3K – phosphatidylinositol 3 kinase; METTL3 – Methyltransferase-like 3; m⁶A – N⁶-methyladenosine; hESCs – human embryonic stem cells; MTC – methyltransferase complex; HSPCs – human hematopoietic stem/progenitor cells; siRNA – small interfering RNA; p-Akt – phosphorylated Akt.

INTRODUCTION

Mesenchymal stem cells (MSCs) have attracted significant attention in the field of tissue repair and regenerative medicine for their differentiation potential, homing capacity, and self-renewal abilities [1, 2]. Due to their ease of extraction, the not-so-thorny ethical considerations associated with them, and their immunologic privilege, MSCs have become the most widely used stem cells in the regeneration of injured cells and tissues [3]. They can migrate to the sites of damage [4] and differentiate into the desired cell type [5] or contribute beneficial elements

[6] such as growth factors. Nevertheless, the curative potential of MSCs remains limited for the following reasons: The insufficient number of MSCs collected from donors [7], the low chance of survival in a hostile environment [8], and the insufficient number of cells capable of migrating to damaged sites [9]. The migration ability is crucial for MSCs, because they better exert their therapeutic effects at the sites of damage [10]. Therefore, exploring ways to improve the *in vitro* expansion and migration capability of MSCs could be key in fulfilling the therapeutic potential of MSCs in cell-based therapy,

opening up broader prospects in future regenerative medicine.

ELABELA (ELA, also known as Apela/Toddler) is a small peptide consisting of 32 amino acids that binds to APJ to form an essential signaling axis for modulating cellular events such as migration [11]. For example, ELA is an activator which promotes the movement of mesendodermal cells during the formation of zebrafish gastrulation [12], while ELA-APJ signaling is indispensable for angioblast migration towards the midline during vasculogenesis [13]. Of note, studies have confirmed that ELA expression is rapidly downregulated during the differentiation of human embryonic stem cells (hESCs) [14], and that this manifests itself in paracrine fashion to promote the proliferation of hESCs by accelerating cell-cycle progression. ELA can also activate the PI3K/AKT/mTORC1 signaling cascade, which is required for cell survival [15]. The PI3K/AKT signaling pathway occupies a prominent place in all manners of cellular behavior of MSCs such as proliferation [16], migration [17], and apoptosis [18]. Hence, the question of whether ELA could affect the proliferation and migration of MSCs piqued our interest. We have previously confirmed that ELA reduces MSC apoptosis by stimulating the PI3K/AKT pathway under ischemic and hypoxic conditions [19], but the effect of ELA on the expansion and migration of MSCs remains unclear, with the regulatory mechanisms requiring further investigation, as well.

m^6 -methyladenosine (m^6A) is a dynamic modification in eukaryotic RNAs that plays a pivotal role in the regulation of cellular processes [20]. A flurry of recent discoveries has pointed to the strong relationship between m^6A modification and stem cell regulation [21, 22]. As the main component of the m^6A methyltransferase complex (MTC), methyltransferase-like 3 (METTL3) has a direct influence on cell survival, differentiation potential, stem cell maintenance, and more [23]. The depletion of METTL3 was shown to promote cell differentiation and reduce cell proliferation in human hematopoietic stem/progenitor cells (HSPCs) [24]. Conditional knockout of METTL3 in MSCs induced pathological phenotypes of osteoporosis and brought about damaged bone formation, enhanced adipogenic capacity, together with incompetent osteogenic differentiation potential in [25]. Meanwhile, METTL3 participates in the regulation of the PI3K-AKT signaling pathway too. During the osteogenic differentiation process, the protein levels of METTL3 increased, whereas the knockdown of METTL3 suppressed AKT phosphorylation and decreased the osteogenic differentiation of MSCs in [26]. This evidence suggests that METTL3 is closely re-

lated to the lineage allocation of MSCs. Nevertheless, the role of ELA and the impact of its interaction with METTL3 on the proliferation and migration of MSCs are poorly understood and require further investigation.

In this study, we investigated the effects of ELA on the proliferation and migration of MSCs *in vitro* and attempted to elucidate the underlining regulatory mechanisms involving METTL3 and the PI3K/AKT signaling pathway.

EXPERIMENTAL PROCEDURES

Cell isolation and culture

MSCs were collected from the bone marrow of Sprague-Dawley (SD) rats (male, weighing between 80 and 120 g) as previously described [19]. All SD rats were purchased from Sun Yat-sen University (Guangzhou, China), and the study procedures were approved by the Animal Ethic Committee of Sun Yat-sen University. Briefly, bone marrow in femurs and tibias from the SD rats were flushed using sterile PBS with 1% penicillin/streptomycin (100 U/mL, HyClone, USA). The cell suspension was centrifuged at 1,000 rpm for 5 min. Then, the supernatant was removed and the cell pellet was resuspended in 4 mL of low-glucose Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM; GIBCO, USA) containing 10% fetal bovine serum (FBS; GIBCO, USA) and 1% penicillin/streptomycin (100 U/mL, HyClone, USA), before being plated in a 25 cm² flask. When the confluence of adherent cells reached 90%, digestion passage was performed at a dilution of 1 : 2. MSCs from the third-passage were positive for CD44 and CD29 but negative for CD34 [27], making them useable for subsequent experiments.

ELA treatment

The ELA containing 32 amino acids (sequence: QR PVNLTMRRLRKHNLQRRRCMPLHSRVPFP) was synthesized by GL Biochem Shanghai Ltd (China). To investigate the effects of ELA on the enhancement of cell proliferation and migration, the MSCs were treated with 5 μ M ELA for 24 h. The MSCs were treated with ELA at 0 to 40 μ M for 24 h to investigate the relationship between ELA and METTL3 in MSCs. To investigate the signaling pathway downstream of ELA, 5 μ M of ELA was added into the culture medium post-transfection for 24 h.

Cell transfection

Small interfering RNA (siRNA) targeting METTL3 (si-METTL3, sequence: CCTACAAGATGACGCACAT),

APJ (si-APJ, sequence: GCCTCAGCTTTGACCGATA) and their negative control (NC) were synthesized by RiboBio Co. (Guangzhou, China). Lipofectamine RNAiMax Reagent (Thermo Fisher, USA) was employed for siRNA transfection into the MSCs. Briefly, MSCs were cultured in plates with a penicillin/streptomycin-free medium. The transfection reagent and siRNA (50 nM) were dissolved in DMEM and mixed for 20 min before being dropped onto the culture plate.

CCK-8 assay

The Cell Counting Kit-8 (CCK-8; Dojindo Laboratories, Kumamoto, Japan) was used to detect cell proliferation and viability. The cells were seeded onto 96-well plates (3,000 cells per well) and treated accordingly. Afterwards, the cells were incubated with the CCK-8 working solution for 2 h. The optical density (OD) values at a wavelength of 450 nm were evaluated using a microplate reader (Thermo Varioskan LUX, USA).

EdU staining assay

The 5-ethynyl-2'-deoxyuridine (EdU) assay kit (Ribobio, Guangzhou, China) was applied to evaluate cell proliferation. The MSCs were seeded in a 96-well plate. After the designated treatment, 50 $\mu\text{mol/L}$ of EdU was added to the MSC medium and incubated for 2 h. Afterward, the MSCs were fixed with 4% paraformaldehyde and permeabilized with 0.5% Triton-X 100. After rinsing, the MSCs were incubated with the staining reagent (EdU Apollo) for 30 min. Consequently, all cell nuclei were stained with the Hoechst solution (1 : 1 000) and visualized with a confocal laser scanning microscope (ZEISS, Germany).

Transwell assay

The Transwell system (8-mm pore, Corning, Beijing, China) was applied to analyze the migration capability of MSCs. Cells were incubated with 0.25% trypsin (Gibco, USA) and resuspended in a serum-deficient (0.5% FBS) medium. A cell suspension containing 6×10^4 cells was added to the upper chamber, whereas a 600 μL medium containing 10% FBS was added into the bottom chamber. After incubation for 8h, the cells on the upper surface were wiped with cotton swabs and the cells which had migrated to the lower surface were fixed with 4% paraformaldehyde for 30 min and then stained with 0.1% crystal violet for 20 min. Subsequently, the membrane was air-dried after washing with PBS and 5 fields were randomly examined under the microscope (ZEISS, Germany).

Measurement of the m⁶A methylation level

The level of m⁶A modification in MSCs was measured using the EpiQuik m⁶A RNA Methylation Quantification Kit (Epigentek, USA). Briefly, 200 ng of total RNA was bound to the wells using the Binding Solution. Then, Capture Antibody, Detection Antibody, and Enhance Solution were added into the wells. After washing, Development Solution and Stop Solution were used to complete the reaction. Absorbance at 450 nm was evaluated using a microplate reader (Thermo Varioskan LUX, USA).

Western blot analysis

MSCs were lysed by a RIPA lysis buffer (Beyotime, China) supplemented with a protease inhibitor and a phosphatase inhibitor (CW BIO, China). After 30 min, the cell lysate was centrifuged at 12,000 rpm for 15 min. The supernatant was collected, and the protein concentration was measured by using the bicinchoninic acid (BCA) protein assay (CW BIO, China). After adding the loading buffer, the protein samples were heated for 10 min at 100°C. Equal-sized samples were separated by 10% SDS-PAGE and then transferred onto a polyvinylidene fluoride (PVDF) membrane (0.45 μm , Millipore, USA). Then, after incubation with 5% skim milk for 1 h, the membranes were incubated with the primary antibody at 4°C overnight: GAPDH (1 : 1000; # 2118; Cell Signaling Technology, USA), APJ (1 : 1000; # bs-2430R; Bioss, CHINA), phospho-Akt (Ser473) (1 : 2000; # 4060; Cell Signaling Technology, USA), AKT (1 : 1000; # 4691; Cell Signaling Technology, USA), METTL3 (1 : 1000; # 96391; Cell Signaling Technology, USA). After being washed with 1× TBST (3 times, per 5 min), the membranes were incubated with the secondary antibody (goat anti-rabbit IgG coupled with HRP, 1 : 2000, Cell Signaling Technology, USA) at room temperature for 1 h. About 1× TBST (3 times, per 5 min) was used to rinse the membranes, and chemiluminescence reagents were used to identify the bands by the ChemiDoc™ Touch Imaging System (Bio-Rad, USA).

Statistical analysis

The data were expressed in the form of mean \pm SD. All experiments were performed independently at least three times. One-way analysis of variance (ANOVA) was used for multigroup comparisons, and the Tukey's post-hoc test was used for comparisons between two independent groups. The significance of the difference between the two groups was evaluated by the Student's *t*-test, with $P < 0.05$ being considered as statistically significant.

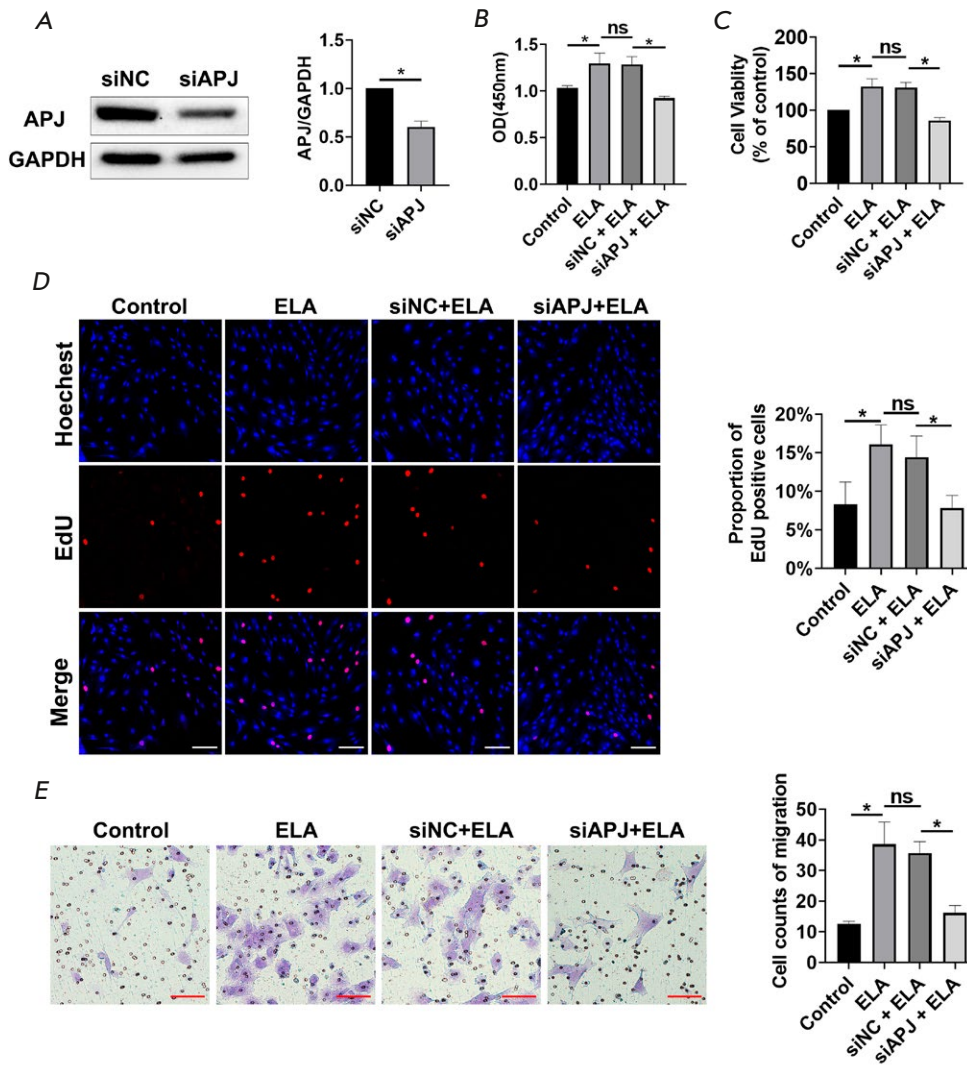


Fig. 1. ELA promotes the proliferation and migration of MSCs in an APJ-dependent manner. (A) – Knockdown efficiency of siAPJ evaluated by Western blot. (B, C) – CCK-8 assay results on MSC proliferation capacity and viability of various experimental groups. (D) – The representative images and quantification of EdU assay are shown. Scale bar 100 μ m. (E) – Transwell assay was performed to detect MSC migration. Scale bar 100 μ m. * $P < 0.05$; ns – no significance; siAPJ – APJ knockdown; siNC – negative control

RESULTS AND DISCUSSION

Results

ELA promotes the proliferation and migration of MSCs in an APJ-dependent manner. The MSCs were treated with 5 μ M of ELA to investigate the effect of ELA on MSC proliferation and migration. The CCK8 data revealed ELA-treated MSCs to show improved proliferation and viability compared with the control group (Fig. 1B,C), while data from the EdU assay indicated the percentage of EdU-positive cells to be markedly increased in the ELA group (Fig. 1D). In line with the results of the CCK8 and EdU assays, the migration ability of MSCs was increased after treatment with ELA (Fig. 1E). These results appeared to show the ability of ELA to promote MSC proliferation and migration. APJ is a known receptor for ELA. To verify the possible regulatory role of ELA through APJ,

the expression of APJ in MSCs was downregulated with small interfering RNAs. The results in Fig. 1A demonstrate the successful knockdown of APJ in the siAPJ group. It was discovered that the siAPJ + ELA group exhibited significantly decreased proliferation ability, cell viability, as well as cell migration when compared with the siNC + ELA group (Fig. 1). The results between the siNC + ELA and ELA groups showed no significant difference. In summary, it appears that ELA may promote the proliferation and migration capability of MSCs in an APJ-dependent manner.

ELA upregulated the m⁶A level and the protein level of METTL3 in MSCs. Recent studies have shown that m⁶A plays an important role in various biological functions of cells, such as proliferation and migration. Therefore, to further explore the mechanism by which ELA promotes the proliferation and migration

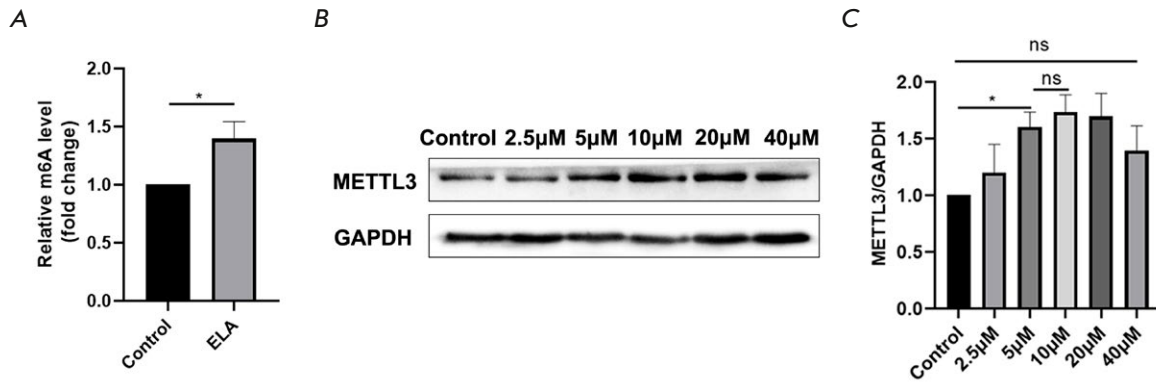


Fig. 2. ELA upregulates the m⁶A level and the protein level of METTL3 in MSCs. (A) – ELA upregulated the level of m⁶A RNA methylation in MSCs. (B, C) – ELA increased the protein expression of METTL3 in a concentration-dependent manner ranging from 5–20 µM. *P < 0.05; ns – no significance

ability of MSCs, we sought to establish the m⁶A level in MSCs. The results showed that, compared with the control group, the m⁶A level in ELA-treated MSCs was significantly upregulated (Fig. 2A).

As the main component of the m⁶A methyltransferase complex (MTC), METTL3 has a definitive influence on the regulation of stem cell function. Therefore, the expression of METTL3 was measured under increasing concentrations (0–40 µM) of ELA. As shown in Fig. 2B,C, the protein level of METTL3 increased in a concentration-dependent fashion within a certain concentration gradient (5–20 µM). No significant difference was observed at 40 µM compared with the control group. These results indicated that ELA could upregulate the expression of METTL3. Based on these results, it appeared reasonable suspect that ELA might affect the proliferation and migration of MSCs by regulating the protein expression of METTL3.

ELA promotes MSC proliferation and migration by regulating the expression level of METTL3. To validate the hypothesis that ELA may promote MSC proliferation and migration by regulating the expression of METTL3, METTL3 knockdown was performed in MSCs and the protein level was examined by Western blot (Fig. 3A). The analysis showed ELA to upregulate the METTL3 protein level in MSCs, and this effect was reversed by METTL3 knockdown (Fig. 3B).

In Fig. 3C,D, cell proliferation and viability were observed to increase in the presence of ELA compared with the control group, while it was significantly decreased in the siMETTL3 + ELA group compared with the siNC + ELA group. Moreover, compared with the control group, the ratio of EdU-positive MSCs increased upon ELA treatment but decreased in the METTL3 knockdown group (Fig. 3E). Consistent with the results for proliferation, METTL3

knockdown also appeared to decrease cell migration when compared with the ELA group and the siNC + ELA group (Fig. 3F). In addition, no distinct difference was observed between the ELA group and siNC + ELA group (Fig. 3). Therefore, it appears reasonable to infer that METTL3 deficiency may block the promotion effect of ELA on MSC proliferation and migration.

ELA/APJ activates the PI3K/AKT pathway by upregulating the expression of METTL3. To explore the regulatory mechanism behind the effects of ELA on the MSC proliferation and migration abilities, the expression level of METTL3 and the key kinase of the PI3K/AKT pathway were further assessed. As shown in Fig. 4A, METTL3 was observed to be markedly upregulated in the ELA group compared with the control group, but this effect ceased upon APJ knockdown, indicating the ability of ELA to upregulate METTL3 expression through the APJ receptor. Additionally, previous studies confirmed that ELA could regulate the PI3K/AKT pathway in MSCs [19], and that this pathway is regulated by METTL3 [26]. Therefore, further experiments were carried out to check AKT phosphorylation, with Western blot results confirming increased levels of p-AKT after treatment with ELA. However, METTL3 knockdown reversed this pattern (Fig. 4B), suggesting that ELA had activated the APJ receptor, which promotes the proliferation and migration capacity of MSCs, via the METTL3/PI3K/AKT pathway.

Discussion

In this study, the effects and underlying mechanisms of ELA vis-a-vis MSCs were evaluated. Our results revealed that ELA could promote the proliferation, viability, and migration of MSCs *in vitro* in an APJ-

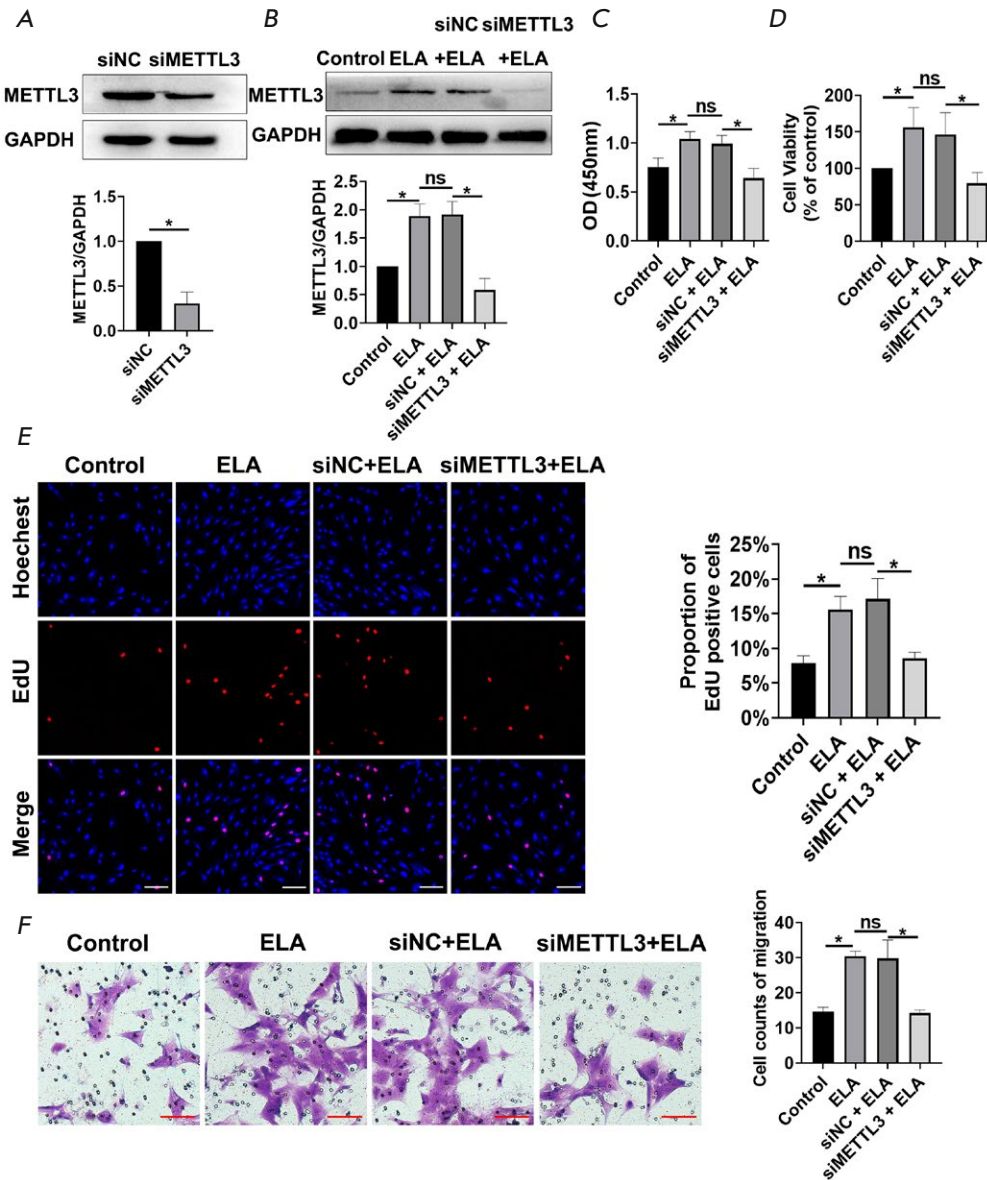


Fig. 3. ELA promotes MSC proliferation and migration by upregulating METTL3. (A) – METTL3 knockdown was successfully performed using small interfering RNA. (B) – METTL3 knockdown attenuated the upregulation of METTL3 caused by ELA at the protein level. (C, D) – CCK-8 assay results demonstrate that METTL3 knockdown reversed the synergistic effects of ELA-enhanced MSC proliferation and viability. (E) – EdU assay shows that METTL3 knockdown decreases the percentage of EdU-positive MSCs that was increased by ELA. Scale bar 100 μ m. (F) – Transwell assay results show the inhibitory effects of METTL3 knockdown on cell migration was increased by ELA. Scale bar 100 μ m. * $P < 0.05$; ns – no significance; siMETTL3 – METTL3 knockdown; siNC – negative control

dependent manner. In addition, ELA was shown to upregulate the m^6A level and the protein level of METTL3 in MSCs and to activate the PI3K/AKT pathway. METTL3 knockdown not only reversed the effect of ELA on cellular proliferation and migration, but also inhibited the synergistic effect of ELA on p-AKT, suggesting the activation of the METTL3/PI3K/AKT axis as the underlying mechanism. At present, no research has reported any relationship between ELA and m^6A , but the results from this study have confirmed that the ELA-APJ signaling pathway may have synergistic effects on the proliferation and migration of MSCs by activating the METTL3/PI3K/AKT axis. This finding provides new strategies for improving the expansion and migration abilities of MSCs *in vitro* and partially sheds light

on the potential mechanism of ELA in terms of its promoting effects on MSCs.

The results of this study show that the administration of exogenous ELA can lead to improved proliferation, viability, and migration ability for MSCs. Growing evidence points to the critical role of ELA in the biological functions of the cell [28]. Ho and colleagues confirmed that ELA could improve the proliferation ability of hESCs via the PI3K/Akt pathway [14]. The PI3K/Akt signaling pathway regulates multiple cellular processes of MSCs such as proliferation [16] and migration [17], implying that ELA exerts these effects on MSCs through the PI3K/Akt signaling pathway. Consistent with our results, previous studies have demonstrated that the ELA-APJ signaling pathway stimulates cell motility [12] and influ-

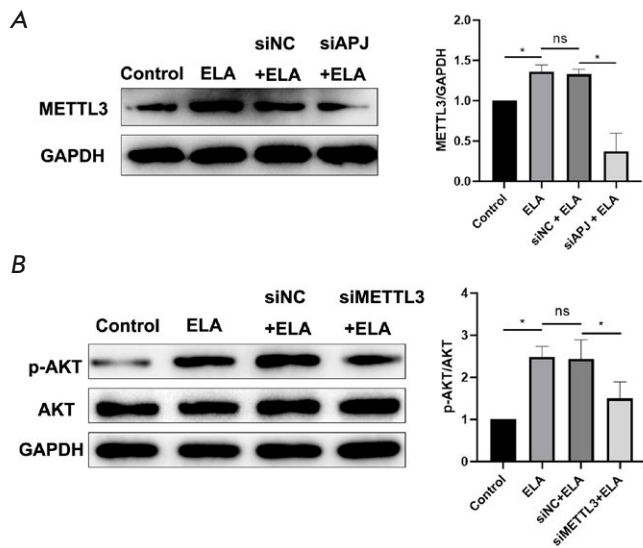


Fig. 4. ELA upregulates the expression of p-AKT by enhancing APJ-associated METTL3 upregulation. (A) – Western blot results show that APJ knockdown reversed the upregulation of METTL3 caused by ELA. (B) – The downregulation of METTL3 inhibited the increasing ratio of p-AKT/ACT caused by ELA. * $P < 0.05$; ns – no significance; p-AKT – phosphorylated AKT; siAPJ – APJ knockdown; siMETTL3 – METTL3 knockdown; siNC – negative control

ences angioblast migration [13] during vasculogenesis. Meanwhile, the activation of APJ has been reported to promote cellular proliferation and migration [29]. Thus, the effect of ELA in MSCs is most likely mediated through APJ. Ho and colleagues also suggested that ELA can function through an alternate receptor in hESCs [14]. However, it was observed in this study that APJ knockdown reversed the proliferation and migration abilities induced by ELA in MSCs, making APJ the key receptor of ELA in MSCs. Based on these results, ELA should be considered as a complement for the *in vitro* expansion of MSCs, besides its role as improving MSC migration.

At present, little is known about the molecular mechanisms of ELA in various biological functions. This research confirms that the expression level of the METTL3 protein is considerably upregulated by ELA in a concentration-dependent manner within 5–20 μM . A significant difference was observed from the concentration of 5 μM onward, which was consistent with the concentration used in the cell proliferation experiment. This concentration was thus used in all subsequent experiments. N⁶-Methyladenosine (m⁶A), which accounts for the most prevalent RNA internal modification in eukaryotes, plays a critical role in various bioprocesses and diseases, such as stem cell self-renewal [30], differentiation [31], and tumorigen-

esis [32]. METTL3 is the active component in the m⁶A methyltransferase complex that has been confirmed to be implicated in biological functions such as cell proliferation and migration [23]. A previous study demonstrated the oncogenic effects of METTL3 in breast cancer [33]. Furthermore, Tian et al. found that Mettl3 knockdown suppressed the activation of the PI3K/AKT pathway during the process of MSC osteogenic differentiation in [26], and this pathway has been confirmed to be initiated by ELA [19]. Therefore, based on these results, it appeared legitimate to speculate that ELA affects MSC proliferation and migration by regulating the expression of METTL3. The protein level of METTL3 was then downregulated, and it was noticed that the promoting effects of ELA on the proliferation and migration of MSCs were significantly attenuated upon METTL3 knockdown. It is thus concluded that ELA fosters the proliferation and migration abilities of MSCs by upregulating the expression of METTL3. This is the first report of the regulatory effect of ELA on the expression of METTL3.

When the mechanism by which the ELA-induced function changes in MSCs was explored, the phosphorylation level of AKT was observed to be upregulated in ELA-treated MSCs. Activation of the PI3K/AKT pathway could enhance cell-cycle progression through the G1/S phase to promote cell proliferation [34], whereas increased expression of MMP-2 and MMP-9 appeared to stimulate cell migration [35]. Additionally, fate determination of bone marrow MSCs could be regulated by METTL3 via PI3K-Akt signaling [26], indicating that ELA might activate the PI3K-Akt signaling by upregulating the expression of METTL3. Therefore, METTL3 expression was downregulated and METTL3 knockdown was found to inhibit the activation of the PI3K/AKT signaling pathway caused by ELA. Based on the results of this study, it can be concluded that ELA/APJ signaling affects proliferation and migration via the METTL3/PI3K/AKT pathway. However, it is worth noting that the downstream target genes of METTL3 have yet to be explored in this study. Therefore, future research should focus on identifying the genes that are regulated by METTL3 to fully clarify the mechanism of ELA action on MSCs, and whether METTL3 functions in an m⁶A-dependent manner.

CONCLUSION

Over all, this study provides evidence that support the role of ELA/APJ signaling in promoting the proliferation and migration of MSCs, which may be a result of the activation of the METTL3/PI3K/AKT pathway. ●

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (No. 81070125, 81270213, 81670306, 81700242); Science and Technology Foundation in Guangdong (No. 2010B031600032, 2014A020211002); National Natural Science Foundation of Guangdong Province (No. 2017A030313503); Science and Technology Foundation in Guangzhou City

(No. 201806020084); Fundamental Research Funds for Central Universities (No.13ykzd16, 17ykjc18); Futian District Health and Public Welfare Research Project of Shenzhen City (No. FTWS2019001, FTWS2021016) and the Shenzhen Fundamental Research Program (No. JCYJ20190808101405466, JCYJ20210324115003008).

REFERENCES

- Fan X.L., Zhang Y., Li X., Fu Q.L. // *Cell. Mol. Life. Sci.* 2020. V. 77. № 14. P. 2771–2794.
- Szydlak R. // *World J. Stem Cells.* 2021. V. 13. № 6. P. 619–631.
- Galipeau J., Sensebe L. // *Cell Stem Cell.* 2018. V. 22. № 6. P. 824–833.
- Naji A., Eitoku M., Favier B., Deschaseaux F., Rouas-Freiss N., Suganuma N. // *Cell. Mol. Life Sci.* 2019. V. 76. № 17. P. 3323–3348.
- Liu C., Tsai A.L., Li P.C., Huang C.W., Wu C.C. // *Stem Cell Res. Ther.* 2017. V. 8. № 1. P. 29.
- Elahi F.M., Farwell D.G., Nolte J.A., Anderson J.D. // *Stem Cells.* 2020. V. 38. № 1. P. 15–21.
- Mena F., Shahrokhi S., Shastri V.P. // *Stem. Cells. Int.* 2018. V. 2018. P. 5023925.
- Raziyeva K., Smagulova A., Kim Y., Smagul S., Nurkesh A., Saparov A. // *Int. J. Mol. Sci.* 2020. V. 21. № 19. P. 7301.
- Karpov A.A., Udalova D.V., Pliss M.G., Galagudza M.M. // *Cell Prolif.* 2017. V. 50. № 2. P. e12316.
- Fu X., Liu G., Halim A., Ju Y., Luo Q., Song A.G. // *Cells.* 2019. V. 8. № 8. P. 784.
- Liu W., Yan J., Pan W., Tang M. // *Ann. Transl. Med.* 2020. V. 8. № 5. P. 243.
- Pauli A., Norris M.L., Valen E., Chew G.L., Gagnon J.A., Zimmerman S., Mitchell A., Ma J., Dubrulle J., Reyon D., et al. // *Science.* 2014. V. 343. № 6172. P. 1248636.
- Liu L., Yi X., Lu C., Wang Y., Xiao Q., Zhang L., Pang Y., Guan X. // *Front. Oncol.* 2021. V. 11. P. 658253.
- Ho L., Tan S.Y., Wee S., Wu Y., Tan S.J., Ramakrishna N.B., Chng S.C., Nama S., Szczerbinska I., Chan Y.S., et al. // *Cell Stem Cell.* 2015. V. 17. № 4. P. 435–447.
- Dagamajalu S., Rex D.A.B., Suchitha G.P., Rai A.B., Rainey J.K., Prasad T.S.K. // *J. Cell Commun. Signal.* 2022. V. 16. № 1. P. 145–154.
- Li J.Y., Ren K.K., Zhang W.J., Xiao L., Wu H.Y., Liu Q.Y., Ding T., Zhang X.C., Nie W.J., Ke Y., et al. // *Stem Cell Res. Ther.* 2019. V. 10. № 1. P. 247.
- Samakova A., Gazova A., Sabova N., Valaskova S., Jurikova M., Kyselovic J. // *Physiol. Res.* 2019. V. 68. № suppl_2. P. S131–S138. doi: 10.33549/physiolres.934345.
- Mai L., He G., Chen J., Zhu J., Chen S., Hou X., Yang H., Zhang M., Wu Y., Lin Q., et al. // *Stem Cells Int.* 2021. V. 2021. P. 5555590.
- Fu J., Chen X., Liu X., Xu D., Yang H., Zeng C., Long H., Zhou C., Wu H., Zheng G., et al. // *Stem Cell Res. Ther.* 2020. V. 11. № 1. P. 541.
- Zaccara S., Ries R.J., Jaffrey S.R. // *Nat. Rev. Mol. Cell. Biol.* 2019. V. 20. № 10. P. 608–624.
- Dixit D., Prager B.C., Gimple R.C., Poh H.X., Wang Y., Wu Q., Qiu Z., Kidwell R.L., Kim L.J.Y., Xie Q., et al. // *Cancer Discov.* 2021. V. 11. № 2. P. 480–499.
- Xie Z., Yu W., Zheng G., Li J., Cen S., Ye G., Li Z., Liu W., Li M., Lin J., et al. // *Nat. Commun.* 2021. V. 12. № 1. P. 5373.
- Liu S., Zhuo L., Wang J., Zhang Q., Li Q., Li G., Yan L., Jin T., Pan T., Sui X., et al. // *Am. J. Cancer Res.* 2020. V. 10. № 6. P. 1631–1646.
- Vu L.P., Pickering B.F., Cheng Y., Zaccara S., Nguyen D., Minuesa G., Chou T., Chow A., Saletore Y., MacKay M., et al. // *Nat. Med.* 2017. V. 23. № 11. P. 1369–1376.
- Chen X., Hua W., Huang X., Chen Y., Zhang J., Li G. // *Front. Endocrinol (Lausanne).* 2019. V. 10. P. 911.
- Tian C., Huang Y., Li Q., Feng Z., Xu Q. // *Int. J. Mol. Sci.* 2019. V. 20. № 3. P. 551.
- Hou J., Wang L., Wu Q., Zheng G., Long H., Wu H., Zhou C., Guo T., Zhong T., Wang L., et al. // *Stem Cell Res. Ther.* 2018. V. 9. № 1. P. 109.
- Ma Z., Song J.J., Martin S., Yang X.C., Zhong J.C. // *Heart Failure Rev.* 2021. V. 26. № 5. P. 1249–1258.
- Xu J., Chen L., Jiang Z., Li L. // *J. Cell. Physiol.* 2018. V. 233. № 9. P. 6472–6482.
- Wen J., Lv R., Ma H., Shen H., He C., Wang J., Jiao F., Liu H., Yang P., Tan L., et al. // *Mol. Cell.* 2018. V. 69. № 6. P. 1028–1038.e6.
- Geula S., Moshitch-Moshkovitz S., Dominissini D., Mansour A.A., Kol N., Salmon-Divon M., Hershkovitz V., Peer E., Mor N., Manor Y.S., et al. // *Science.* 2015. V. 347. № 6225. P. 1002–1006.
- Melstrom L., Chen J. // *Cancer Gene Ther.* 2020. V. 27. № 9. P. 625–633.
- Cai X., Wang X., Cao C., Gao Y., Zhang S., Yang Z., Liu Y., Zhang X., Zhang W., Ye L. // *Cancer Lett.* 2018. V. 415. P. 11–19.
- Vasjari L., Bresan S., Biskup C., Pai G., Rubio I. // *Cell Cycle.* 2019. V. 18. № 2. P. 204–225.
- Gao X., Qiao X., Xing X., Huang J., Qian J., Wang Y., Zhang Y., Zhang X., Li M., Cui J., Yang Y. // *Front. Oncol.* 2020. V. 10. P. 1563.

ОБЩИЕ ПОЛОЖЕНИЯ

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

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

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

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

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

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

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

ОФОРМЛЕНИЕ РУКОПИСЕЙ

Рукопись должна быть построена следующим образом:

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

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

РЕКОМЕНДАЦИИ ПО НАБОРУ И ОФОРМЛЕНИЮ ТЕКСТА

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

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

в данной области исследований, и по результатам рецензирования редколлегия определяет дальнейшую судьбу 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, doi. 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. doi: 10.1038/nature03440.

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.

Приложения

Таблица S1. Морфологические характеристики роста *S. phaeochromogenes* БВ-204 на различных индикативных средах

Среда	Пигментация воздушного (ВМ), субстратного мицелия (СМ), наличие растворимых пигментов (РП)	Среда	Цвет воздушного (ВМ), субстратного мицелия (СМ), наличие растворимых пигментов (РП)
ISP2	ВМ: палевый, СМ: темно-бурый, РП: нет	ISP5	ВМ: светло-палевый, СМ: темно-бурый, РП: нет
			
ISP3	ВМ: розовато-палевый, СМ: темно-бурый, РП: темно-бурый	ISP6	ВМ: отсутствует, СМ: бежевый, РП: нет
			

Таблица S2. Культуральные характеристики штамма *S. phaeochromogenes* БВ-204 (1) и наиболее ему филогенетически ближайших *S. phaeochromogenes* JCM 4958 (2), *S. umbrinus* JCM 4521 (3)

	1	2*	3*
Морфологические и физиологические признаки			
Поверхность спор	гладкая	гладкая	гладкая
Форма спороносов	прямые длинные	прямые или извитые	прямые или извитые
Диапазон температур/ оптимальная температура (°C)	8–37/ 28	н/о/28°C	н/о/28°C
Диапазон pH/ pH-оптимум	4.5–8.5/ 7	5–11	5–11
Утилизация источников углерода			
Арабиноза	+	+	+
Галактоза	+	н/о	н/о
Глюкоза	+	+	н/о
Инозитол	+	+	н/о
Ксилоза	+	+	+
Лактоза	+	н/о	н/о
Мальтоза	–	н/о	н/о
Маннитол	+	н/о	н/о
Раффиноза	+	н/о	н/о
Рамноза	+	+	+
Сорбитол	–	–	–
Сахароза	+	н/о	н/о
Фруктоза	+	+	+
Разложение субстратов и ферментативная активность			
Крахмал	+	н/о	н/о
Желатин	+	+	+
Карбоксиметилцеллюлоза	+	–	–
Оксидаза	+	н/о	н/о
Нитрат-редуктаза	–	н/о	н/о
Устойчивость к антибиотикам			
Хлорамфеникол, 34 мкг/мл	+	н/о	н/о
Стрептомицин, 12.5 мкг/диск	+	н/о	н/о
Тетрациклин, 10 мкг/диск	+	н/о	н/о
Спектиномицин, 5 мкг/диск	+	н/о	н/о
Эритромицин, 5 мкг/диск	+	н/о	н/о
Ванкомицин, 5 мкг/диск	37 мм**	н/о	н/о
Левофлоксацин, 5 мкг/диск	16 мм**	н/о	н/о

* Данные о штаммах *Streptomyces phaeochromogenes* JCM 4958, *Streptomyces umbrinus* JCM 4521 были взяты из каталога DSMZ Bacdiv (https://bacdiv.dsmz.de/) и литературных источников [31–33].

** Диаметр зоны отсутствия роста штамма вокруг диска с антибиотиком.

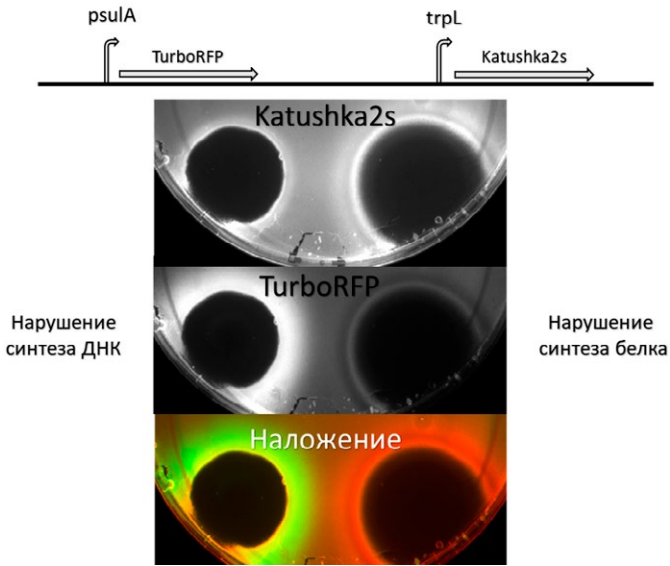


Рис. S7. Схема работы репортерной системы

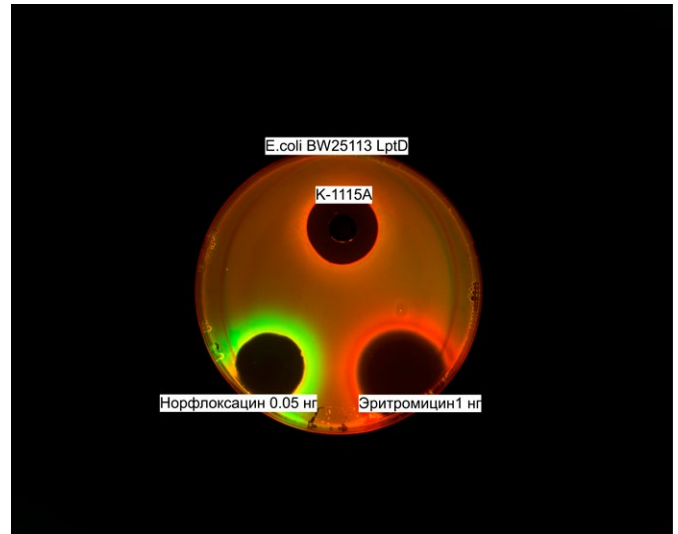


Рис. S8. Активность очищенного вещества К-1115А



Рис. S9. Выравнивание транслированной аминокислотной последовательности гена *aln5*

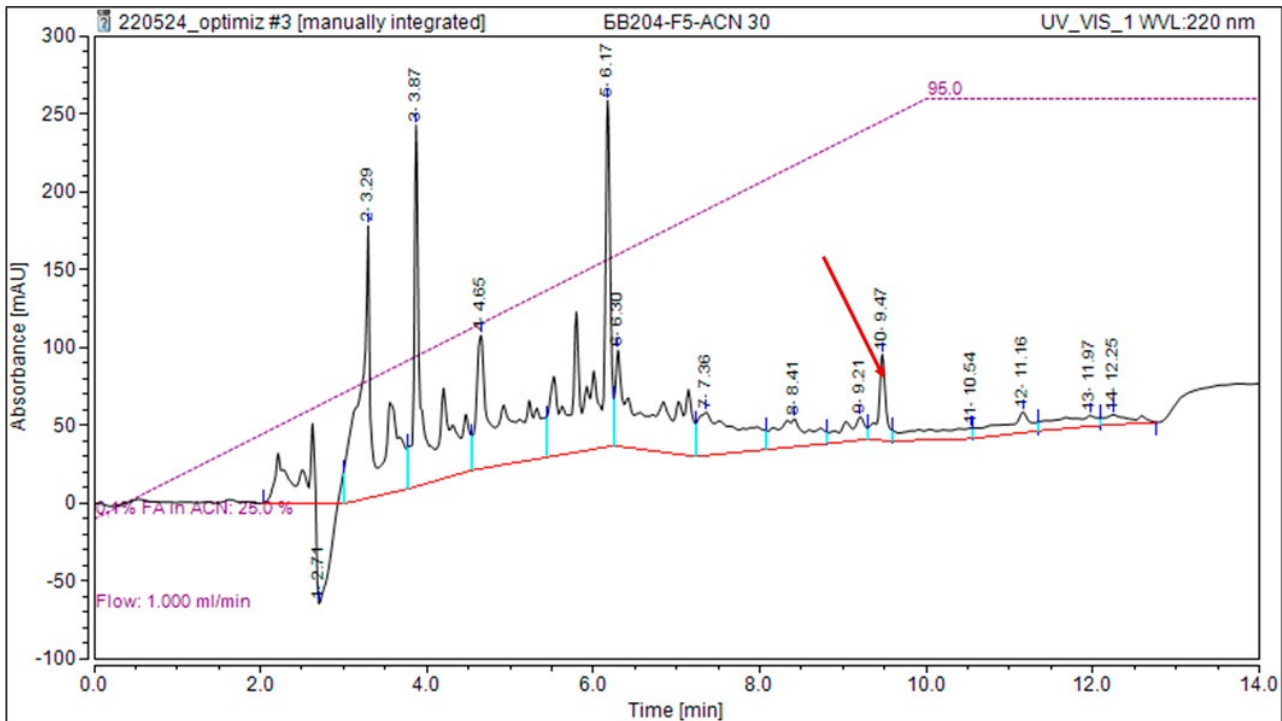


Рис. S10. ВЭЖХ-профиль активной ТФЭ-фракции, элюированной 30–40% ацетонитрила. Стрелкой выделен пик активной фракции

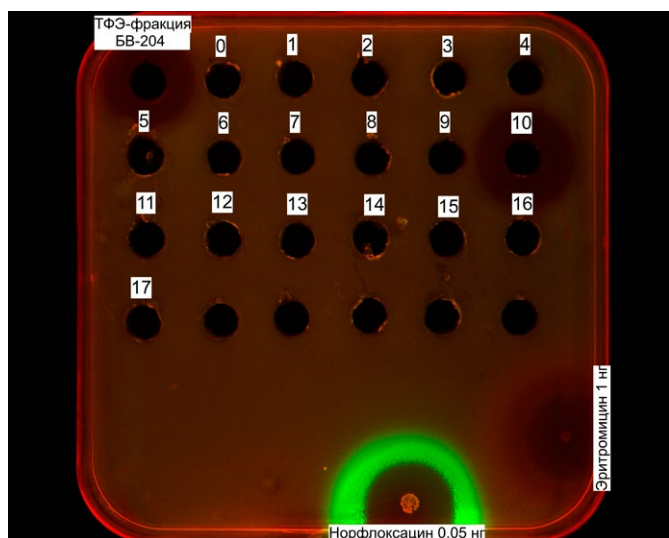


Рис. S11. Проверка активности ВЭЖХ-фракций

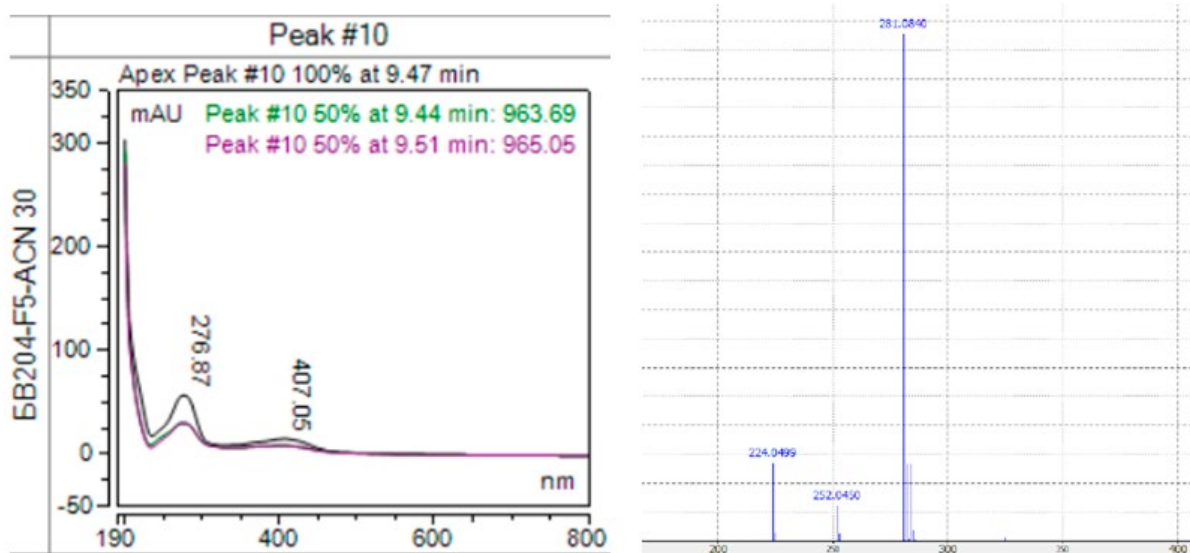


Рис. S12. УФ- и масс-спектр пика ВЭЖХ активного компонента