

Acta Naturae

Особенности экспериментальной работы с приматами вида *Callithrix jacchus* в ходе доклинических испытаний противовирусных вакцин



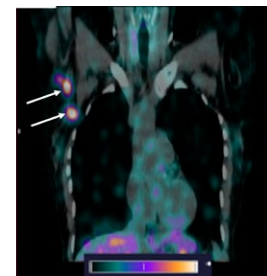
**МОЛЕКУЛЯРНЫЕ
МЕХАНИЗМЫ ГЕМОПОЭЗА
ДРОЗОФИЛЫ**
СТР. 4

**ВЕКТОРНАЯ НАНОПЛАТФОРМА
ДЛЯ ПРИЖИЗНЕННОЙ ВИЗУАЛИЗАЦИИ
ГЛУБИННЫХ ОПУХОЛЕЙ**
СТР. 72

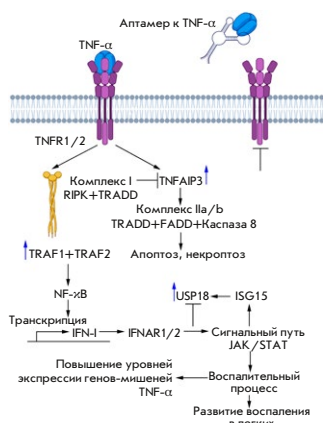
Оценка экспрессии рецептора HER2/neu в ткани метастатических аксиллярных лимфатических узлов у больных раком молочной железы с применением препарата [^{99m}Tc]Tc-(HE)₃-G3

О. Д. Брагина, Л. А. Таширева, Д. М. Лоос, С. В. Вторушин, А. А. Шульга, Е. Н. Коновалова, М. Е. Бородина, В. И. Чернов, В. М. Толмачев, С. М. Деев

Анатомическая визуализация и молекулярное типирование опухолевой ткани регионарных метастатических лимфатических узлов (мАЛУ) у больных раком молочной железы являются важной клинической проблемой в современной онкологии. Препарат [^{99m}Tc]Tc-(HE)₃-G3 показал эффективность в отношении дифференцировки статуса HER2/neu в метастатических аксиллярных лимфатических узлах у больных раком молочной железы, продемонстрировав соотношения мАЛУ/фон с показателями чувствительности и специфичности, равными 80%.



Накопление препарата [^{99m}Tc]Tc-(HE)₃-G3 в метастатических аксиллярных лимфатических узлах у больных раком молочной железы через 4 ч после введения



Общая схема сигналинга TNF-α

Липополисахарид-индуцированное острое повреждение легких: анализ особенностей развития и возможность подавления аптамером к TNF-α

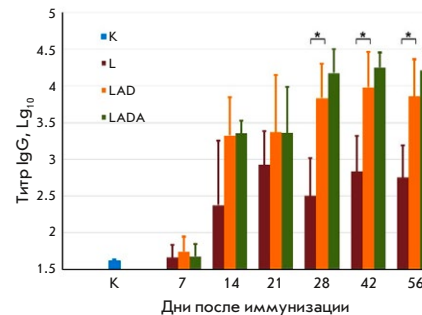
А. В. Сенькова, И. А. Савин, Е. Л. Черноловская, А. С. Давыдова, М. И. Мещанинова, А. Бишани, М. А. Воробьева, М. А. Зенкова

Острое повреждение легких (ОПЛ) является специфической формой воспаления, которое характеризуется диффузным повреждением альвеол, некардиогенным отеком легких, а также легочным и системным воспалением. В работе проанализированы особенности развития липополисахарид(ЛПС)-индуцированного ОПЛ у мышей, а также возможность его подавления аптамером к провоспалительному цитокину TNF-α.

Аттенуированный и высокоиммуногенный вариант вируса осповакцины

С. Н. Щелкунов, С. Н. Якубицкий, К. А. Титова, С. А. Пьянков, И. С. Шульгина, Е. В. Старостина, М. Б. Боргоякова, Д. Н. Кисаков, Л. И. Карпенко, Г. А. Щелкунова, А. А. Сергеев

В настоящее время актуальной задачей является создание безопасных высокоиммуногенных вакцин нового поколения против ортопоксвирусных инфекций. В данной работе создан штамм LADA с дополнительной делецией в гене *ati* штамма LAD, направляющего продукцию мажорного невирионного иммуногена. Вариант LADA является аттенуированным и более иммуногенным по сравнению со штаммом L, на основе которого получают противооспенную вакцину первого поколения, разрешенную для клинического применения в России. Гены *A35R* и *ati* можно рассматривать в качестве мишеней для встройки целевых генов в ДНК штамма LIVP-A34R* при создании безопасных эффективных живых поливалентных вакцин на основе VACV.



Титры VACV-специфичных IgG в сыворотках крови мышей, иммунизированных вирусами L, LAD или LADA

Acta Naturae

ТОМ 16, № 2 (61), АПРЕЛЬ—ИЮНЬ 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 июня 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

С. А. Синенко

Молекулярные механизмы

гемопоза дрозофилы 4

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ СТАТЬИ

О. Д. Брагина, Л. А. Таширева, Д. М. Лоос,

С. В. Вторушин, А. А. Шульга, Е. Н. Коновалова,

М. Е. Бородина, В. И. Чернов, В. М. Толмачев,

С. М. Деев

Оценка экспрессии рецептора HER2/neu

в ткани метастатических аксиллярных

лимфатических узлов у больных раком

молочной железы с применением

препарата [^{99m}Tc]Tc-(HE)₃-G3 22

СОДЕРЖАНИЕ

И. В. Гордейчук, О. С. Ганчарова, С. А. Гуляев,
Т. В. Гуляева, А. С. Житкевич, Д. В. Авдошина,
А. В. Мороз, А. С. Лунин, С. Е. Соцкова,
Е. А. Кордубан, А. И. Тухватулин, Е. О. Баюрова,
А. А. Ишмухаметов
**Особенности экспериментальной
работы с приматами вида *Callithrix jacchus*
в ходе доклинических испытаний
противовирусных вакцин** 30

Е. В. Иванов, М. Р. Ахметшина, А. Р. Гизатулина,
М. В. Гуляев, О. С. Павлова, Ю. А. Пирогов,
С. А. Гаврилова
**Дигидрокверцетин, инкапсулированный
в липосомах, изменяет распределение
фиброзной ткани в модели
блеомицин-индуцированного фиброза** 40

К. И. Кирсанов, Т. И. Фетисов, Е. Е. Антошина,
Т. Г. Горькова, Л. С. Труханова, С. И. Шрам,
И. Ю. Нагаев, Ю. А. Золотарев, Л. Або Кура,
В. С. Покровский, М. Г. Якубовская, В. К. Швядас,
Д. К. Нилов
**7-Метилгуанин подавляет рост
аденокарциномы толстой кишки *in vivo*** 50

Н. Г. Ложкина, О. И. Гущина, Н. В. Басов,
Е. В. Гайслер, А. Д. Рогачев, Ю. С. Сотникова,
Ю. В. Патрушев, А. Г. Покровский
**Церамиды как потенциально новые
предикторы тяжести течения острого
коронарного синдрома в сочетании
с инфекцией SARS-CoV-2** 53

А. В. Сенькова, И. А. Савин, Е. Л. Черноловская,
А. С. Давыдова, М. И. Мещанинова, А. Бишани,
М. А. Воробьева, М. А. Зенкова
**Липополисахарид-индуцированное острое
повреждение легких: анализ особенностей
развития и возможность подавления
аптамером к TNF- α** 61

Е. И. Шрамова, С. М. Деев, Г. М. Прошкина
**Векторная наноплатформа для прижизненной
визуализации глубоких опухолей** 72

С. Н. Щелкунов, С. Н. Якубицкий, К. А. Титова,
С. А. Пьянков, И. С. Шульгина, Е. В. Старостина,
М. Б. Боргоякова, Д. Н. Кисаков, Л. И. Карпенко,
Г. А. Щелкунова, А. А. Сергеев
**Аттенуированный и высокоиммуногенный
вариант вируса осповакцины** 82

Правила для авторов 90



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

УДК 577.218

Молекулярные механизмы гемопоэза дрозофилы

С. А. Синенко

Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург, 194064 Россия

E-mail: s.sinenko@incras.ru

Поступила в редакцию 05.04.2024

Принята к печати 31.05.2024

DOI: 10.32607/actanaturae.27410

РЕФЕРАТ Модельный организм – плодовая мушка *Drosophila melanogaster* – занял одно из ведущих мест в современных биологических исследованиях. Генетическая модельная система дрозофилы имеет ряд преимуществ, позволяющих ей лидировать в исследовании молекулярных механизмов процессов развития многоклеточных организмов. За последние два десятилетия достигнут существенный прогресс в изучении механизмов, регулирующих гемопоэз, или кроветворение у дрозофилы. В данном обзоре обсуждаются основные достижения в понимании молекулярных механизмов, участвующих в поддержании популяции мультипотентных прогениторных клеток и их дифференцировки в зрелые гемоциты, в гемопоэтическом органе личинки дрозофилы. Использование гемопоэтического органа дрозофилы в качестве модельной системы гемопоэза позволило охарактеризовать сложные взаимодействия между сигнальными путями и транскрипционными факторами в регуляции поддержания и дифференцировки прогениторных клеток посредством сигналов из гемопоэтической ниши, аутокринных и паракринных сигналов и сигналов, исходящих от дифференцированных клеток.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА гемопоэз, кроветворение, гемопоэтический орган, мультипотентность, гемопоэтические стволовые клетки, гемопоэтическая ниша, дрозофила, *Drosophila melanogaster*, гемоциты, дифференцировка, сигнальные пути, транскрипционные факторы.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ ГО – гемопоэтический орган (lymph glands); ДС – дорсальный сосуд (dorsal vessel); ППГ – препрогемоциты; ПГ – прогемоциты; ПроПГ – промежуточные прогемоциты; ЗСЦ – задний сигнальный центр (posterior signaling center); МЗ – медуллярная зона (medullary zone); КЗ – корковая зона (cortical zone); ПЗ – промежуточная зона (intermediate zone); ПЛ – плазматоциты (PL); КК – кристаллические клетки (CC); ЛМ – ламеллоциты (LM); АФК – активные формы кислорода; АМП – антимикробные пептиды; ВКМ – внеклеточный матрикс; UAS – активирующая последовательность (upstream activation sequence); scRNAseq – секвенирование РНК одиночных клеток (single-cell RNA sequencing); ГСК – гемопоэтические стволовые клетки; СК – стволовые клетки; АМГК – аортально-мезонефрально-гонадный комплекс; Odd – Odd-skipped; Crq – Croquemort; ТФ – транскрипционный фактор; Antp – Antennapedia; NimC1 – Nimrod C1; Col – Collier; Hth – Homothorax; Tin – Tinman; Pnr – Pannier; FGFR – рецептор фактора роста фибробластов; Htl – Heartless; Dpp – Decapentaplegic; Wg – Wingless; Hh – Hedgehog; Ser – Serrate; Dome – Domeless; E-кад – E-кадгерин; Vkg – Viking; Hml – Hemolletectin; PPO – профенолоксидаза; Lz – Lozenge; Hnt – Hindsight; Fz – Frizzled; Dot – Dorothy; Mad – mothers against dpp; Sd – Scalloped; Ptc – Patched; Ci – Cubitus interruptus; EGFR – рецептор эпидермального ростового фактора; TGF-beta – трансформирующий фактор роста бета; PCP – planar cell polarity; FGF – фактор роста фибробластов; Upd1–3 – Unpaired 1–3; FoxO – forkhead box protein O; Adgf-A – аденозиндезаминаза ростового фактора-A; AdoR – рецептор аденозина; PKA – протеинкиназа A.

ВВЕДЕНИЕ

Плодовая мушка *Drosophila melanogaster* является модельным организмом, который широко используется в генетических исследованиях в клеточной биологии, биологии развития и иммунологии. Более 100 лет прошло с того момента, когда Томас Хант Морган начал использовать эту модельную систе-

му в генетических исследованиях [1, 2]. При проведении генетических и биомедицинских исследований дрозофила имеет ряд преимуществ, в число которых входят (1) минимальный набор хромосом – всего четыре пары, три из которых (X/Y, II, III) содержат практически все гены данного организма. (2) Полностью секвенированный и аннотированный

геном дрозофилы состоит приблизительно из 13767 генов и характеризуется минимальным количеством дублированных генов и минимальной геной избыточностью. (3) Хорошо разработаны методы получения мутантных линий дрозофилы – с помощью химического, изотопного, транспозонного (P-элемент) и CRISPR/Cas9-опосредованного мутагенеза, UAS/Gal4-опосредованной системы условной инактивации экспрессии генов с помощью интерферирующих РНК (RNAi) и эктопической экспрессии генов, а также линий с визуализацией интересующих тканей [3–11]. Методы направленной инактивации гена позволяют использовать подходы обратной генетики, которые заключаются в инактивации интересующего гена с исследованием его фенотипа/функции в живом организме. На дрозофиле можно проводить обширные генетические скрининги с использованием методов прямой генетики: идентификации мутаций и функций гена после обнаружения интересующего фенотипа [12–14], и модифицированных генетических скринингов, направленных на определение генов, вовлеченных в интересующий процесс [15–17]. (4) Международные центры хранения обширных коллекций мутантных линий дрозофилы, включая коллекции генетических делеций, точечных мутаций и линий P-транспозонов, CRISPR/Cas9, промоторов-Gal4, UAS-RNAi и UAS-трансгенов. (5) Стабильная система поддержания мутаций с помощью балансирующих хромосом и комбинирование мутаций с использованием мейотической рекомбинации. (6) Возможность исследования фенотипа на уровне организма *in vivo*. (7) Мушка имеет короткий жизненный цикл (30 дней), удобные и относительно недорогие условия содержания и оборудования для поддержания и хранения мутантных линий дрозофилы. Недостатками данной модельной системы являются: (1) огромная эволюционная дистанция между насекомыми и млекопитающими и, соответственно, недостаточная гомология на генетическом и физиологическом уровнях; (2) малый размер организма и трудоемкость работы с тканями дрозофилы; (3) ограниченная возможность использования биохимических и иммунохимических методов.

В качестве модельной системы дрозофила интенсивно используется в течение последних 50 лет практически во всех областях современной биологии, начиная с расшифровки молекулярного механизма апоптоза и заканчивая механизмами старения [3, 18–23]. В свою очередь, данная система широко используется для исследования молекулярных механизмов кроветворения, или гемопоэза и гуморального и клеточного ответов врожденного

иммунитета. Термин кроветворение, или гемопоэз, обозначающий процесс образования, развития и созревания клеток крови, исторически относится к клеткам крови позвоночных животных. Гемопоэз позвоночных теплокровных животных поддерживается гемопоэтическими стволовыми клетками (ГСК), которые дают начало ряду мультипотентных и ограниченных гемопоэтических предшественников, дифференцирующихся во все виды клеток крови: эритроциты, тромбоциты, лейкоциты и лимфоциты. У беспозвоночных целомических организмов, к которым относится дрозофила, внутренняя полость тела содержит целомическую жидкость, или гемолимфу, содержащую гемоциты – аналоги клеток крови теплокровных организмов [24–27]. Гемопоэз дрозофилы – это процесс поддержания мультипотентных прогениторных клеток и их дифференцировки в три типа зрелых гемоцитов, происходящий в нескольких частях организма в течение стадий жизненного цикла. Важно отметить, что гемоциты насекомых функционально гомологичны миелоидным клеткам врожденного иммунитета позвоночных, параллельно возникшим в эволюции [28].

Двукрылые насекомые имеют четыре стадии жизненного цикла: эмбриональную, личиночную, стадии куколки и имаго. Основными биологическими функциями гемоцитов дрозофилы являются защитная, включающая неспецифические гуморальный и клеточный иммунные ответы, участие в регенеративных процессах, а также функция чистильщика от погибших клеток в процессе онтогенеза. У дрозофилы известны три линии зрелых клеток гемолимфы: плазматоциты, кристаллические клетки и ламеллоциты. На личиночной стадии наблюдается значительный рост и морфогенетические изменения организма, сопровождающиеся активной защитой от патогенных микроорганизмов. На этой стадии, которая широко используется для исследования гемопоэза, процесс гемопоэза происходит в гемопоэтическом органе (ГО), в котором можно наблюдать временную и пространственную динамику поддержания прогениторных клеток и их дифференцировки во все типы зрелых гемоцитов. Изучение гемопоэза дрозофилы показало, что механизм поддержания мультипотентных предшественников гемоцитов у дрозофилы и ГСК у млекопитающих существенно различается. Гемопоэтическая система дрозофилы не имеет (или пока не обнаружены) *bona fide* мультипотентных стволовых клеток, аналогичных клеткам позвоночных, у которых такие клетки поддерживаются на протяжении всей жизни. Использование преимуществ генетической модельной системы

дрозофилы позволило существенно продвинуться в расшифровке и понимании молекулярных механизмов гемопоэза. Исследования двух последних десятилетий показали, что молекулярные механизмы поддержания прогениторных клеток и их дифференцировки в различные линии гемоцитов имеют некоторую аналогию с путями регуляции процессов дифференцировки миелоидных клеток млекопитающих [27, 29]. На сегодняшний день опубликован ряд исчерпывающих обзорных статей, освещающих многие вопросы данной области исследования [27, 29–34]. В настоящем обзоре обсуждаются основные достижения в исследовании молекулярных механизмов кроветворения в гемопоэтическом органе дрозоды, что включает регуляцию поддержания мультипотентных прогениторных клеток и их дифференцировки с помощью транскрипционных факторов, сигнальных путей, метаболических и внешних факторов.

УЧАСТКИ ГЕМОПОЭЗА ДРОЗОФИЛЫ

Образование ранних клеток-предшественников, или препрогемоцитов, дрозоды происходит в двух независимых участках мезодермы эмбриона – в головной и дорсальной мезодерме. Соответственно, кроветворение у дрозоды происходит двумя независимыми путями или «волнами». В первом случае клетки головной мезодермы раннего эмбриона дают начало прогемоцитам эмбриона, которые далее поддерживаются и дифференцируются в зрелые линии гемоцитов, находящиеся в свободной циркуляции гемолимфы и называются циркулирующими гемоцитами [35–38]. Прогемоциты и их производные данного происхождения поддерживаются в циркулирующей гемолимфе на всех последующих стадиях жизненного цикла насекомого. Вторая волна гемопоэза происходит в дорсальной мезодерме, где формируется дорсальный «кровеносный» сосуд, или «аорта» (ДС, dorsal vessel), и гемопоэтический орган (первоначально названный lymph gland) (рис. 1), однако термин ГО наиболее точно соответствует данному органу [39–41]. ГО представлен парным тканевым образованием, состоящим из гемоцитов и их предшественников, ограниченных оболочкой внеклеточного матрикса. На личиночной стадии ГО является главным местом поддержания прогемоцитов и их дифференцировки в зрелые гемоциты. При этом гемоциты не покидают ГО до начала стадии куколки. Параллельно в гемолимфе на протяжении всех личиночных стадий находятся все типы циркулирующих гемоцитов. ГО распадается на начальной стадии куколки и высвободившиеся из него гемоциты смешиваются с циркулирующими гемо-

цитами. Таким образом, прогемоциты и гемоциты, происходящие из обеих участков мезодермы, существуют на постличиночных стадиях жизненного цикла дрозоды [36, 38, 42, 43].

ГЕМОЦИТЫ ДРОЗОФИЛЫ

Зрелые гемоциты дрозоды представлены тремя морфологически различными типами. Плазматоциты (ПЛ) – фагоцитарные клетки, осуществляющие защитные, антимикробные и регуляторные функции, составляют примерно 90–95% гемоцитов. Кристаллические клетки (КК) – нефагоцитирующие клетки, составляющие 2–5% гемоцитов, принимают участие в процессах заживления ран, реакциях врожденного иммунитета и гипоксии. Третий тип гемоцитов – ламеллоциты (ЛМ) – гигантские специализированные клетки, которые дифференцируются только в ответ на внедрение паразитарных организмов или в ответ на повреждение тканей (рис. 1Б'). Эти типы клеток были выявлены в результате ультраструктурных исследований, а затем подтверждены по функциональной активности и молекулярным маркерам. На основании обширных исследований определены сигнальные пути и транскрипционные факторы, обеспечивающие спецификацию, дифференцировку и поддержание данных клеточных линий (см. обзоры [27, 29, 32]). Кроме того, с помощью метода секвенирования РНК единичных клеток (single-cell RNA sequencing, scRNAseq) обнаружено большое разнообразие подгрупп циркулирующих гемоцитов. С помощью нескольких экспериментальных подходов определены восемь подгрупп гемоцитов, выполняющих различные функции [44–47]. В ГО были идентифицированы также ранее не описанные типы клеток: ранние предшественники, или препрогемоциты (ППГ), и подтип плазматоцитов – адипогемоциты [43]. Однако на сегодняшний день многие недавно идентифицированные подгруппы гемоцитов остаются недостаточно охарактеризованными, и их молекулярные и функциональные особенности нуждаются в дальнейшем изучении.

Плазматоциты

Плазматоциты – основной тип клеток крови дрозоды, осуществляющих защитные, иммунные и гомеостатические функции. Эти клетки представляют собой фагоциты, они участвуют в инактивации патогенных микроорганизмов и утилизации апоптотических клеток в процессе развития организма [26, 48–50]. Плазматоциты осуществляют фагоцитоз посредством рецепторов Croquemort (Crq), Eater и Nimrod C1 (NimC1) [51–54] и выпол-

няют защитные функции, секретируя антимикробные пептиды (АМП) (рис. 1Б', табл. 1) [55–57]. Данные клетки секретируют белки внеклеточного матрикса (ВКМ), коллаген IV, перлекан и ламинин А, способствуя формированию тканей [58, 59], а также фермент пероксидазин (Peroxidasin, Pxn) [60], удаляющий свободные радикалы. Отсутствие плазматоцитов в процессе эмбриогенеза вызывает дефекты органогенеза, ведущие к снижению жизнеспособности эмбрионов [61–64]. Идентификация с помощью scRNAseq молекулярных маркеров позволила выделить четыре подтипа плазматоцитов: PL1–4 (рис. 1Б') [43].

Кристаллические клетки

Кристаллические клетки содержат, как следует из их названия, кристаллы профенолоксидаз 1 и 2 (PPO1 и 2), которые участвуют в реакции меланизации. Эти клетки вовлечены в защитные реакции при повреждении тканей, а также во врожденном иммунном ответе, в первую очередь, за счет активации биохимического каскада меланизации [65–68], функционально схожего с каскадом тромбообразования у млекопитающих. При меланизации наблюдается потемнение и отверждение поврежденных тканей, что сопряжено с продукцией активных форм кислорода (АФК), способствующих нейтрализации патогенов и заживлению поврежденных тканей (рис. 1Б') [55, 65, 66, 69]. Подавление меланизации задерживает заживление поврежденных тканей [70–72] и снижает восприимчивость к микробным инфекциям [65, 66]. КК не обладают фагоцитирующей активностью, они экспрессируют специфические молекулярные маркеры и пролиферируют под действием определенных сигналов (см. далее, рис. 1Б', табл. 1). С помощью scRNAseq выявлены два подтипа кристаллических клеток: CC1 и 2 [43].

Ламеллоциты

Ламеллоциты – это большие плоские клетки, дифференцировка которых индуцируется вследствие сигналов, вызванных внедрением паразитарных организмов или при повреждении тканей. Клеточный иммунный ответ у дрозофилы опосредуется именно ламеллоцитами и в основном направлен на инактивацию яиц паразитических ос (*Leptopilina bouvardi*) посредством их инкапсуляции [73, 74]. Плазматоциты прикрепляются к поверхности инородного объекта, а затем дифференцируются в ламеллоциты [75]. Зрелые ламеллоциты экспрессируют специфические молекулярные маркеры, они не способны делиться и фагоцитировать (рис. 1Б', табл. 1) [13, 26, 30, 51, 55, 66, 75–81]. При помощи

scRNAseq в ГО выявлены два подтипа ламеллоцитов: LM1 и 2 [43].

Особенности стволовых клеток гемопоэтической системы дрозофилы: прогемоциты

Гемопоэтические стволовые клетки млекопитающих являются мультипотентными стволовыми клетками взрослого организма, способными к самообновлению и дифференцировке во все типы клеток крови. ГСК находятся в митотически покоящемся состоянии в гемопоэтических нишах, в костном мозге и других участках кроветворения, где под действием внешних факторов происходит их асимметричное деление, дальнейшее самообновление и дифференцировка [82–85]. ГСК способны к повторному заселению ниш и восполнению всего репертуара клеток крови. У дрозофилы к стволовым клеткам, способным к самообновлению на протяжении всей жизни, относятся мужские и женские стволовые клетки зародышевой линии, стволовые клетки кишечника и нейрональные стволовые клетки [86–89]. На сегодняшний день у дрозофилы не выявлены *bona fide* ГСК, но определены ранние мультипотентные прогениторные клетки или препрогемоциты, которые поддерживаются посредством сигналов из гемопоэтической ниши ГО и клеток ДС. Эти клетки активно пролиферируют и дают начало более дифференцированным клеткам: прогемоцитам. Прогемоциты находятся в митотически спокойном состоянии, они способны дифференцироваться во все типы гемоцитов [32, 38, 43, 90, 91]. Не установлено, способны ли препрогемоциты или прогемоциты к асимметричному делению [92, 93], в результате которого образуются стволовая и дифференцирующаяся дочерние клетки. Короткая продолжительность жизни дрозофилы и отсутствие необходимости поддержания и возобновления большого количества клеток крови говорят в пользу того, что механизм поддержания гемопоэтических прогениторных клеток у этого организма принципиально отличается от механизма у ГСК позвоночных.

ГЕМОПОЭТИЧЕСКИЙ ОРГАН ДРОЗОФИЛЫ: ЗОНЫ, КЛЕТКИ И МАРКЕРЫ

Генез гемопоэтического органа

С помощью клонального анализа установлено, что клетки-предшественники ГО и ДС образуются из общих клеток-предшественников, или так называемых гемангиобластов. В результате деления этих клеток образуются две дочерние клетки, одна из которых предшественник клеток сердечно-сосудистой системы (кардиобласты), диффе-

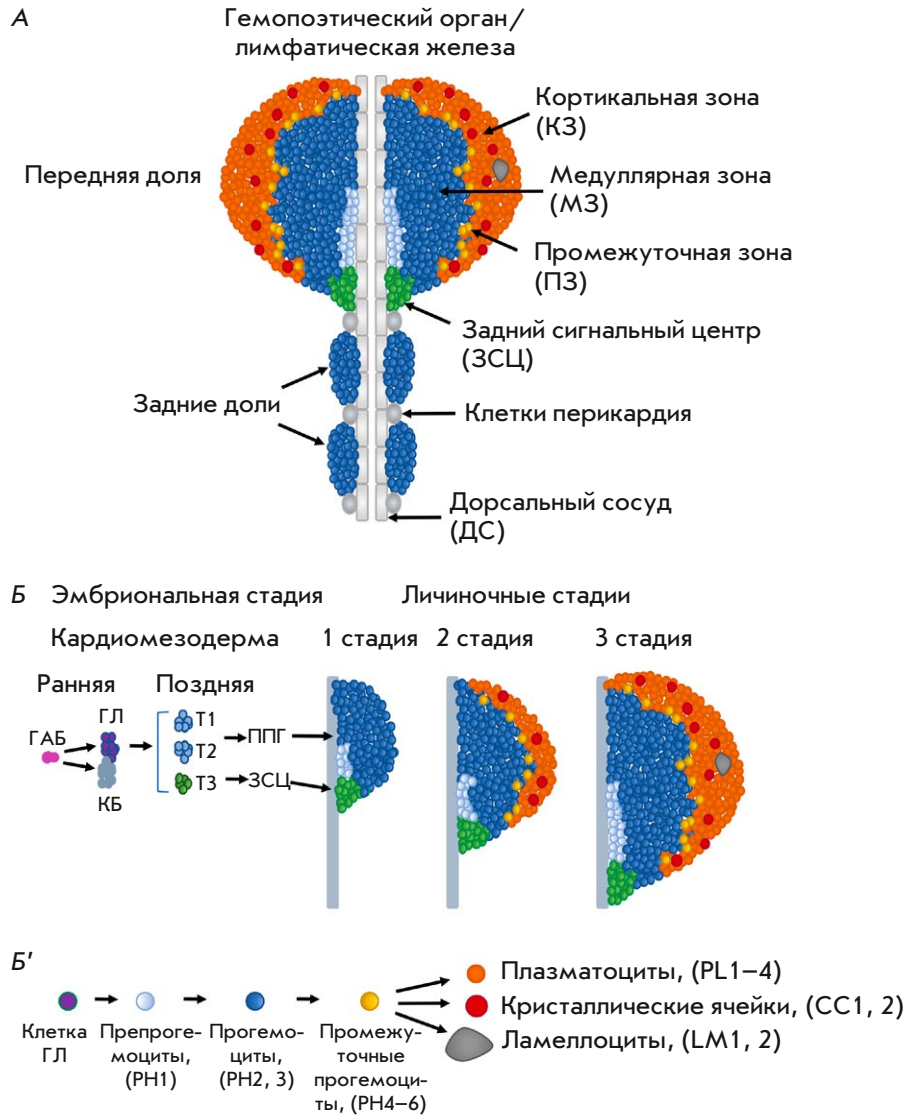


Рис. 1. А – схема строения гемопозитического органа или лимфатических желез (lymph gland) третьей личиночной стадии дрософилы. ГО состоит из парных передних долей и парных задних долей, прикрепленных и взаимодействующих с клетками дорсального сосуда и клетками перикардия. Передние доли ГО являются модельной системой исследования гемопоза дрософилы. Передняя доля ГО состоит из популяции клеток заднего сигнального центра (ЗСЦ) или гемопозитической ниши; медуллярной зоны, состоящей из популяций препрогемоцитов (ППГ) и прогемоцитов (ПГ); кортикальной зоны, состоящей из дифференцированных гемоцитов: плазматоцитов (ПЛ), кристаллических клеток (КК) и ламеллоцитов (ЛМ); и популяции промежуточных прогемоцитов (ПроПГ) промежуточной зоны (ПЗ). Б – схема генеза гемопозитического органа. На ранней эмбриональной стадии клетки кардио-генной мезодермы, или гемангиобласты (ГАБ), дают начало клеткам гемопозитической линии (ГЛ) и клеткам-предшественникам сердечно-сосудистой системы – кардиобластам (КБ). На последующих стадиях эмбриогенеза клетки гемопозитической линии кардио-генной мезодермы формируют три пары грудных сегментов (thoracic segments). Передние два сегмента сливаются и дают начало препрогемоцитам (ППГ) и всем гемоцитам передней доли ГО, тогда как третий задний сегмент дает начало клеткам гемопозитической ниши ЗСЦ (выделено зеленым). На первой личиночной стадии передние доли ГО содержат препрогемоциты, прогемоциты и клетки ЗСЦ. На второй личиночной стадии начинается дифференцировка прогемоцитов в промежуточные прогемоциты, которые дифференцируются в плазматоциты и кристаллические клетки, формируя кортиковую зону ГО (цветами выделены соответствующие линии гемоцитов как отмечено на панели Б'). На третьей личиночной стадии продолжается процесс дифференцировки ППГ в терминально дифференцированные линии гемоцитов, соответственно сопровождающийся ростом кортикальной зоны ГО. При этом прогемоциты МЗ поддерживаются в митотически покоем состоянии. Б' – схема гемопоза, происходящего в гемопозитическом органе дрософилы. Указаны гемопозитические прогениторные клетки и линии дифференцированных гемоцитов, в скобках указаны аббревиатуры подтипов соответствующих линий гемоцитов, обнаруженных с помощью метода scRNAseq.

ренцирующихся в клетки ДС, а другая – предшественник клеток гемопоэтической линии, дающих начало гемоцитам [94]. Аналогичный механизм, вероятно, наблюдается у гемангиобластов аортально-мезонефрально-гонадного комплекса (АМГК) позвоночных, дающих начало клеткам гемопоэтической и сосудистой систем [95]. ГО образуется из трех грудных сегментов T1–T3, экспрессирующих ТФ Odd-skipped (Odd) и фактор GATA Serpent (Srp) (рис. 1, табл. 1) [94]. При этом под действием фактора Antennapedia (Antp) клетки сегмента T3 формируют так называемый задний сигнальный центр (ЗСЦ, posterior signaling center, PSC), состоящий примерно из 30–40 клеток (рис. 1B) [96]. Эти клетки являются гемопоэтической нишей, контролирующей гемопоэз в ГО личинок [97]. В поддержании клеток ЗСЦ также участвует ТФ Collier (Col), который контролируется Antp [96, 97]. Сегменты T1–T2 формируют первичные доли ГО под действием кофактора Homothorax (Hth) (рис. 1B) [96]. Для формирования клеток ГО необходимы гены факторов транскрипции Tinman (Tin) и GATA Pannier (Pnr), лиганд морфогена Decapentaplegic (Dpp) и рецептор фактора роста фибробластов Heartless (Htl). Кроме того, сигнальный путь Wnt/Wingless (Wnt/Wg) положительно регулирует спецификацию кардиогенной мезодермы [94].

СТРОЕНИЕ ГЕМОПОЭТИЧЕСКОГО ОРГАНА

ГО – это парный орган, состоящий из четырех долей, расположенных вдоль аорты (рис. 1A). Основной является наибольшая передняя, или первичная доля. В ней происходят координированные процессы поддержания препрогемоцитов, прогемоцитов и их пролиферация и дифференцировка. Наименее изучены вторичные, третичные и четвертичные доли, они в несколько раз меньше и служат дополнительным источником гемоцитов при активации клеточного иммунного ответа [98]. Передняя доля ГО – наиболее структурированная часть органа, ее используют в качестве модели или основного объекта для изучения молекулярных механизмов гемопоэза у дрозофилы [41], и она, в частности, носит название ГО.

В передней доле ГО выделяют несколько зон, каждая из которых содержит функционально разные типы клеток, находящихся на разных стадиях дифференцировки: (1) ЗСЦ, функционирующая как ниша для регуляции самообновления и дифференцировки прогемоцитов; (2) медиально расположенная медуллярная или внутренняя зона (МЗ, medullary zone), состоящая из препрогемоцитов и прогемоцитов; (3) дистально расположенная

корковая зона (КЗ, cortical zone), непосредственно в которой происходит дифференцировка и накопление зрелых гемоцитов (рис. 1) [41]; (4) промежуточная зона (ПЗ, intermediate zone), расположенная между медуллярной и кортикальными зонами, которая содержит промежуточные прогемоциты (ПроПО), экспрессирующие как маркеры прогемоцитов, так и маркеры зрелых гемоцитов (рис. 1 и 2, табл. 1) [43, 93, 99, 100].

Как отмечено выше, первой зоной, возникающей как отдельная клеточная популяция, является ЗСЦ. Клетки ЗСЦ регулируют поддержание и дифференцировку прогемоцитов в первичной доле ГО на протяжении личиночных стадий. Эти клетки выполняют только сигнальные функции и не дифференцируются в гемоциты [43, 91, 96, 101–104]. Клетки ЗСЦ экспрессируют следующие молекулярные маркеры: Antp, Col, лиганд сигнального пути Hedgehog (Hh), лиганд рецептора Serrate (Ser) сигнального пути Notch (N), лиганд Wg сигнального пути Wg/Wnt (рис. 2, табл. 1) [96, 97, 99, 105].

До середины второй личиночной стадии в передней доле ГО представлены только прогемоциты *Dome*⁺, экспрессирующие репортер *Domeless-Gal4* (*Dome-Gal4*), и популяция препрогемоцитов, не экспрессирующих данный репортер *Dome*⁻ (см. далее). Прогемоциты *Dome*⁺ поддерживаются на второй и третьей личиночных стадиях и дифференцируются в зрелые гемоциты, формируя КЗ [6, 41, 90, 91, 99, 106]. Определенная популяция прогемоцитов ГО способна самообновляться, одновременно продуцируя зрелые гемоциты [90]. С помощью клонального анализа показано, что в непосредственной близости к ЗСЦ могут находиться гемопоэтические «стволовые» клетки дрозофилы [90, 91]. Присутствие данной клеточной популяции, именуемой препрогемоциты, или PH1, подтверждено с помощью анализа scRNAseq [43]. Однако, как уже ранее указывалось, у «стволовых» клеток дрозофилы не описана функция самообновления и асимметричного деления, характерного для ГСК млекопитающих [92, 93, 107]. На первой личиночной стадии препрогемоциты *Dome*⁻ находятся в непосредственном соприкосновении с дорсальной аортой и ЗСЦ. Предполагается, что эти клетки дают начало прогемоцитам *Dome*⁺ [41, 43, 90, 91]. На первой и ранней второй личиночной стадиях происходит активный рост и деление прогемоцитов *Dome*⁺ [41, 91]. С использованием scRNAseq показано, что прогемоциты *Dome*⁺ являются гетерогенной популяцией, состоящей из двух подтипов клеток (PH2,3), что, вероятно, отражает иерархию их дифференцировки [43].

Таблица 1. Молекулярные маркеры и гены, вовлеченные в спецификацию и поддержание линий гемоцитов в процессе гемопоэза дрозофилы

Клетки гемопоэтической системы ГО дрозофилы	Молекулярные маркеры типов гемоцитов	Гены человека, гомологичные генам маркеров гемоцитов	Гены, участвующие в спецификации и поддержании типов гемоцитов	Гены человека, гомологичные генам дрозофилы
Гемангиобласты эмбриона	Odd-skipped (Odd) Serpent (Srp)	<i>OSR2</i> <i>GATA1</i>	<i>Odd</i> <i>Srp</i>	<i>OSR2</i> <i>GATA1</i>
Клетки гемопоэтической ниши ЗСЦ (производные сегмента Т3 эмбриона)	Antennapedia (Antp) Collier (Col) Hedgehog (Hh) Serrate (Ser) Wingless (Wg) Spitz (Spi) Pvf1	<i>HOXA7</i> <i>EBF1</i> <i>SHH</i> <i>JAG1</i> <i>WNT1</i> <i>EPGN</i> <i>FLT1,4</i>	<i>Antp</i> <i>Col</i> <i>Wg</i> <i>Fz2</i> <i>Myc</i> <i>Robo1,2</i> <i>Dpp</i> <i>Dad</i> <i>Mad</i>	<i>HOXA7</i> <i>EBF1</i> <i>WNT1</i> <i>FZD5</i> <i>MYC</i> <i>ROBO1,2,3</i> <i>BMP2</i> <i>SMAD6</i> <i>SMAD1</i>
Гемопоэтическая линия – препрогемоциты сегментов Т1– 2 эмбриона	Homothorax (Hth)	<i>MEIS1</i>	<i>Homothorax (Hth)</i> <i>Decapentaplegic (Dpp)</i> <i>Tinman (Tin)</i> <i>Pannier (Pnr)</i> <i>Heartless (Htl)</i> <i>Wingless/Wg</i>	<i>MEIS1</i> <i>BMP2</i> <i>NKX2-2</i> <i>GATA4</i> <i>FGFR3</i> <i>WNT1</i>
Препрогемоциты	<i>Dome</i> ⁻ / <i>Pvf2</i> <i>Notch-GAL4</i> <i>Su(H)-lacZ</i> <i>E(spl)mβ</i> <i>Hand</i>	<i>VEGF A-D</i> <i>NOTCH1</i> <i>RBPJ</i> <i>HES2</i> <i>HAND1,2</i>	<i>Odd</i> <i>Pvf2/Pvr</i> <i>Notch</i> <i>Dpp</i> <i>Mad</i> <i>Scalloped (Sd)</i>	<i>OSR2</i> <i>VEGF A-D</i> <i>NOTCH1</i> <i>BMP2</i> <i>SMAD1</i> <i>TEAD1</i>
Прогемоциты	<i>Dome</i> ⁺ Е-кадгерин <i>Upd3</i> <i>Wg</i>	<i>PTPRQ</i> <i>CELSR1</i> - <i>WNT1</i>	<i>Patched (Ptc)</i> <i>Cubitus interruptus (Ci)</i> <i>Wg</i> <i>Wnt6</i> <i>β-кактенин</i> <i>Fz2</i> <i>Col</i> <i>Stat92E</i> <i>AdoR</i> <i>Pka-C</i> <i>EGFR</i>	<i>PTCH1</i> <i>GLI3</i> <i>WNT1</i> <i>WNT6</i> <i>CTNNB1</i> <i>FZD5</i> <i>EBF1</i> <i>STAT5A</i> <i>ADORA2A</i> <i>PRKACB</i> <i>EGFR</i>
Промежуточные прогемоциты	<i>Dome</i> ⁺ / <i>Pxn</i> ⁺ <i>Dome</i> ⁺ / <i>Hml</i> ⁺		<i>EGFR</i> <i>Pointed (Pnt)</i>	<i>EGFR</i> <i>ETS1</i>
Плазматоциты	Peroxidasin (Pxn) <i>Hemolletctin (Hml)</i> Nimrod (NimC) Eater <i>Pvr</i>	<i>PXDN</i> <i>MUC5AC</i> <i>SCARF1</i> <i>MEGF10</i> <i>FLT1,4</i>	<i>Thisbe (Ths)</i> <i>Heartless (Htl)</i> <i>Pointed (Pnt)</i> <i>u-shaped (Ush)</i> <i>Srp</i> <i>FoxO</i> <i>Pvr</i>	<i>FGF8</i> <i>FGFR3</i> <i>ETS1</i> <i>ZFPM1</i> <i>GATA1</i> <i>FOXO3</i> <i>FLT1,4</i>
Кристаллические клетки	Lozenge (Lz) Hindsight (Hnt) Sima/Hif-α Frizzled2 (Fz2) PPO1 и PPO2	<i>RUNX1,3</i> <i>RREB1</i> <i>HIF1A</i> <i>FZD5</i> -	<i>Notch</i> <i>Serrate (Ser)</i> <i>FoxO</i> <i>Fz2</i>	<i>NOTCH1</i> <i>JAG1</i> <i>FOXO3</i> <i>FZD5</i>
Ламеллоциты	L1/Atilla Misshapen Myospheroid	- <i>MINK1</i> <i>ITGB1</i>	<i>EGFR</i> <i>FoxO</i> <i>Ph-p</i> <i>E(Pc)</i> <i>Col</i>	<i>EGFR</i> <i>FOXO3</i> <i>PHC3</i> <i>EPC1</i> <i>EBF1</i>

Примечание. В столбцах 3 и 5 указаны гены человека, гомологичные соответствующим генам дрозофилы, указанным в столбцах 2 и 4. Синим отмечены гены, кодирующие негативные регуляторы соответствующих процессов гемопоэза.

Пролиферация прогемоцитов *Dome*⁺ значительно снижается к середине второй личиночной стадии. При этом клетки на дистальном крае МЗ начинают дифференцироваться, что сопровождается снижением пролиферации, повышением гранулярности и отсутствием экспрессии Е-кадгерина (Е-кад). Клетки МЗ, или прогемоциты *Dome*⁺, характеризуются высоким уровнем экспрессии лиганда *Upd3* (сигнальный путь JAK/STAT), лиганда *Wg*, Е-кад и АФК [41, 99, 100, 108] и низким уровнем экспрессии *Col* [102, 109, 110]. Белки внеклеточного матрикса (ВКМ), в том числе коллаген типа IV (*Viking*, *Vkg*) и перлекан *Trol*, имеют повышенную локализацию между клетками МЗ [106, 111].

Плазматоциты в КЗ экспрессируют следующие маркеры: *Rxn*, гемолектин (*Hemollectin*, *Hml*), *Eater*, антиген P1 или *Nimrod-C* (*NimC*) (рис. 1Б', табл. 1) [41, 56, 81, 99, 112, 113]. С помощью scRNA-seq в кортикальной зоне ГО идентифицированы четыре подтипа плазматоцитов [43]. Кристаллические клетки экспрессируют такие факторы транскрипции, как *Lozenge* (*Lz*) с *Runt*-доменом, *Hindsight* (*Hnt*), *Sima/Hif-α*, рецептор *Frizzled2* (*Fz2*), *PPO1* и *PPO2* [65, 78, 114–116]. В норме без воздействия патогенных факторов ламеллоциты практически не образуются в КЗ. В ГО дифференцируются два подтипа ламеллоцитов, экспрессирующих *L1/Atilla*, *Misshapen*, интегрин α -PS4 и его партнер *Myospheroid* (рис. 1Б', табл. 1) [10, 43, 51, 55, 77, 80, 117].

Между прогемоцитами *Dome*⁺ и дифференцирующимися клетками *Rxn*⁺ медуллярной и кортикальных зон находится популяция клеток, которые одновременно экспрессируют маркеры обеих зон – это промежуточные прогемоциты (ПроПГ), которые представляют так называемую промежуточную зону (рис. 1, табл. 1) [34, 93, 99, 100, 118]. ПроПГ экспрессируют ранние маркеры дифференцировки *Hml* и *Rxn*, однако не экспрессируют зрелые маркеры плазматоцитов (*P1*) и кристаллических клеток (*PPO1* и *2*) [106], а также перестают экспрессировать Е-кадгерин. Последние исследования, проведенные методом scRNAseq, позволили более подробно охарактеризовать данную зону, в которую включили четыре стадии промежуточных прогемоцитов (PH4–6), ранние плазматоциты (PL1) и ранние кристаллические клетки (CC1) [43]. Показано также, что клетки популяции ПроПГ, характеризующиеся активацией митоза, дифференцируются в плазматоциты и КК под действием активации сигнальных путей: *Ras/Raf* или *Ser/Notch* соответственно [118]. Молекулярные механизмы, регулирующие данную популяцию, наименее охарактеризованы и требуют дальнейшего изучения.

СИГНАЛЬНЫЕ МЕХАНИЗМЫ, ВОВЛЕЧЕННЫЕ В ПОДДЕРЖАНИЕ И ДИФФЕРЕНЦИРОВКУ ПРЕПРОГЕМОЦИТОВ

В начале первой личиночной стадии в ГО находится популяция мультипотентных препогемоцитов, представляющих собой самую раннюю постэмбриональную популяцию гемопоэтических предшественников, которые, вероятнее всего, исчезают позднее первой личиночной стадии [91]. Для данных клеток характерно отсутствие экспрессии маркера прогемоцитов *Dome*, низкий уровень экспрессии маркера *Dorothy* (*Dot*) и активация сигнального пути *Notch* (*Notch-GAL4*, *Su(H)-lacZ*) и его целевого гена *enhancer of split mβ* (*E(spl)mβ*) (рис. 1, табл. 1) [43, 91]. Показано, что, помимо *Notch*, поддержание данных клеток регулируется лигандом-морфогеном *Dpp*, который секретируется клетками ниши ЗСЦ. Инактивация *Dpp* в ЗСЦ или подавление функции ТФ *mothers against dpp* (*Mad*) в препогемоцитах *Notch*⁺ вызывает существенное уменьшение размера ГО к 3-й личиночной стадии. Таким образом, активация сигнальных путей *Notch* и *Dpp* необходима для пролиферации препогемоцитов. Далее на 2-й и 3-й личиночных стадиях *Dome*⁻ препогемоциты начинают экспрессировать ТФ *Hand* и *Scalloped* (*Sd*) [119]. Обнаружено, что эти клетки также экспрессируют лиганд *Pvf2* рецептора *Pvr* (гомолог рецепторов PDGF/VEGF человека), и его экспрессия зависит от активности *Sd*. Инактивация *Pvf2* в данных клетках ведет к подавлению их пролиферации и к существенному последующему снижению размера ГО. При этом эктопическая экспрессия *Pvf2* в этих клетках восстанавливает пролиферативный дефект в ГО, частично утративших функцию *Sd* [119].

Показано также, что в поддержании ранних прогемоцитов *Dome*⁺ участвует кальций/кальмодулиновый сигнальный путь, который активируется через ионотропный рецептор γ -аминомасляной кислоты (ГАМК-рецептор, *GABABR*). *GABABR* экспрессируется в клетках ЗСЦ. Кальций/кальмодулиновый путь в ЗСЦ участвует в регуляции пролиферации препогемоцитов на ранних личиночных стадиях, не влияя на дифференцировку гемоцитов на третьей личиночной стадии. Нарушение кальций/кальмодулинового сигнального пути в клетках ЗСЦ вызывает значительное снижение пролиферации препогемоцитов [120]. Таким образом, эти данные указывают, что в поддержании и пролиферации ранних препогемоцитов *Dome*⁻ участвуют несколько сигнальных путей: сигнальные пути *Notch*, *Dpp*, *Pvf2/Pvr* (рис. 2). Интересно, что вовлеченность сразу нескольких сигнальных путей в регуляцию одного процесса может указывать на сложную си-

стему регуляции и возможность взаимной компенсации разных сигнальных путей. Следует отметить, что технические сложности работы с ГО на первой личиночной стадии и недостаток маркеров затрудняют изучение популяций клеток *Dome⁺Sd⁺* и *Dome⁺Notch⁺* [91].

СИГНАЛЬНЫЕ ПУТИ, РЕГУЛИРУЮЩИЕ ПОДДЕРЖАНИЕ И ДИФФЕРЕНЦИРОВКУ ПРОГЕМОЦИТОВ

Как уже отмечалось, прогемоциты являются мультипотентными предшественниками всех типов гемоцитов. Поддержание мультипотентности и митотического покоя данных прогемоцитов контролируется множеством сигналов, происходящих из трех разных источников (рис. 2). Сигналы первого типа – это сигналы цитокинов и ростовых факторов, секретируемых клетками сигнальной ниши ЗСЦ. Второй тип сигналов – это аутокринные или паракринные сигналы, возникающие и принимаемые одной и той же популяцией клеток в МЗ ГО. Третий тип – сигналы от дифференцированных клеток кортикальной зоны ГО, направленные на поддержание и дифференцировку прогемоцитов МЗ. К четвертому типу можно отнести системные сигналы, исходящие от различных тканей вне гемопоэтического органа, которые образуются в ответ на воздействия внешней среды и воспринимаются через нишу ЗСЦ.

Характерной особенностью прогемоцитов МЗ является строго скоординированный контроль их пролиферации. На первой и ранней второй личиночной стадии практически все клетки ГО, включая препрогемоциты и клетки ниши ЗСЦ, являются прогемоцитами *Dome⁺* (рис. 1Б). На этих стадиях данные клетки интенсивно пролиферируют асинхронно. Затем, с началом появления дифференцированных клеток в поздней фазе второй личиночной стадии пролиферация прогемоцитов резко замедляется. Далее при формировании КЗ прогемоциты *Dome⁺* практически перестают пролиферировать, в то время как клетки ПЗ и КЗ имеют более высокую скорость пролиферации на протяжении всей третьей личиночной стадии [41]. Таким образом, низкая скорость пролиферации и ее контроль коррелируют с поддержанием мультипотентного состояния прогемоцитов. Как уже отмечалось, известны четыре типа сигналов, необходимых для поддержания прогемоцитов дрозофилы: аутокринный сигнал, сигналы, исходящие из ниши ЗСЦ и от дифференцирующихся клеток, а также сигналы от других тканей организма. Потеря любого из этих сигналов ведет к потере мультипотентности прогемоцитов, вызывая их пролиферацию и, как следствие, дифференцировку [96, 103]. Важной

особенностью прогемоцитов является корреляция между их пролиферацией и дифференцировкой. На сегодняшний день появляется все больше данных, указывающих, что только пролиферирующие прогемоциты способны принимать сигналы дифференцировки, в то время как покоящиеся прогемоциты не воспринимают данные сигналы. Исследование механизмов, регулирующих пролиферативную активность промежуточных прогемоцитов, должно способствовать большему пониманию данного вопроса.

СИГНАЛЫ, ИСХОДЯЩИЕ ИЗ НИШИ ЗАДНЕГО СИГНАЛЬНОГО ЦЕНТРА, РЕГУЛИРУЮТ ПОДДЕРЖАНИЕ И ДИФФЕРЕНЦИРОВКУ ПРОГЕМОЦИТОВ

Центральная роль сигнального пути *Nh/Ptc/Ci* в поддержании мультипотентного состояния прогемоцитов

Клетки ЗСЦ выполняют роль гемопоэтической ниши в ГО, они секретируют ряд сигнальных лигандов или ростовых факторов, при этом практически не экспрессируют соответствующие рецепторы. В то же время рецепторы данных лигандов экспрессируются в прогемоцитах, и инактивация соответствующих лигандов в клетках ЗСЦ подавляет поддержание прогемоцитов МЗ, вызывая их дифференцировку.

Лиганд *Nh*, связываясь со своим рецептором *Patched* (*Ptc*), вызывает активацию ТФ *Cubitus interruptus* (*Ci*). *Nh* экспрессируется исключительно в клетках ЗСЦ в ходе второй и третьей личиночных стадий (рис. 1, табл. 1). В то время как в прогемоцитах *Dome⁺* на высоком уровне экспрессируется *Ptc* и активированный *Ci*, инактивация *Nh* не влияет на клетки ЗСЦ, но стимулирует дифференцировку прогемоцитов *Dome⁺* во все три типа гемоцитов [96, 97, 102–104, 121–124]. Кроме того, подавление функции *Ci* вызывает дифференцировку прогемоцитов, подобно инактивации *Nh* в клетках ЗСЦ (рис. 2) [96, 121]. Этот процесс осуществляется в том числе за счет морфологических особенностей клеток ЗСЦ, протяженные псевдоподии которых проходят через несколько слоев прогемоцитов, что позволяет доставить лиганд глубоко внутрь медуллярной зоны [96, 102]. Показано также, что абляция клеток ЗСЦ с помощью индукции апоптоза не вызывает ожидаемой дифференцировки прогемоцитов, наблюдаемой при инактивации *Nh* [109, 110, 121]. Однако установлено, что популяция прогемоцитов *Dome⁺* гетерогенна. Часть клеток *Dome⁺* (*Odd⁺ Col⁻*) отвечает на сигнал *Nh*, тогда как клетки *Odd⁺ Col⁺* не чувствительны к данному

сигналу [110, 121]. В связи с этим предполагается, что абляция клеток ЗСЦ не затрагивает отдельные прогемоциты. Возможно, что клетки Col⁺ являются отдельной популяцией прогемоцитов, которая контролируется сигналами из клеток дорсального сосуда [91, 119]. Установлено также, что ДС выполняет функцию дополнительной ниши. Так, лиганд Branchless (Bnl) (гомологичный фактору роста фибробластов, FGF), продуцируемый клетками ДС, активирует сигнальный путь FGF в прогемоцитах. Активация этого пути регулирует уровень внутриклеточного кальция и способствует поддержанию прогемоцитов в недифференцированном состоянии [125].

Подавление функции гена *Roundabout (Robo)* увеличивает количество клеток ЗСЦ, а также вызывает их распространение вглубь гемопоэтического органа. Эти события коррелируют со снижением дифференцировки плазматоцитов и кристаллических клеток [126]. При этом в ответ на патогенное вмешательство в клетках ЗСЦ происходит подавление активности фактора NF- κ B Relish сигнального пути Imd. Инактивация Relish проявляется нарушением цитоскелета клеток ЗСЦ в результате активации киназы Jun, что приводит к удерживанию лиганда Hh, тем самым нарушая поддержание прогемоцитов, вызывая их преждевременную дифференцировку и активацию клеточного иммунного ответа [127]. Показано также, что подавление передачи сигналов Ca²⁺ или нарушение межклеточных контактов между клетками ЗСЦ влияет на функции данных клеток и вызывает преждевременную дифференцировку прогемоцитов [128].

АФК регулирует дифференцировку ламеллоцитов через активацию сигнальных путей Spitz/EGFR и Toll/Dif в нише ЗСЦ

Помимо регуляции гемопоэза в ГО, клетки ЗСЦ регулируют дифференцировку ламеллоцитов внутри и вне ГО. Так, абляция клеток PSC при инактивации Col или индукции апоптоза предотвращает дифференцировку ламеллоцитов в ответ на заражение паразитическими осами [97, 109]. С помощью генетических методов установлено, что такое заражение приводит к существенному повышению уровня АФК в ЗСЦ и именно АФК являются ключевым сигналом, вызывающим дифференцировку ламеллоцитов [129]. В клетках ЗСЦ АФК в норме не детектируются, однако при заражении паразитическими осами уровень АФК в них резко возрастает. Искусственное повышение уровня АФК в клетках ЗСЦ за счет подавления работы дыхательной цепи митохондрий также приводит к масштабному

увеличению количества ламеллоцитов в циркуляции и ГО [129]. При этом в обоих случаях удаление АФК с помощью митохондриальной супероксиддисмутазы 2 (SOD2) или каталазы подавляет образование ламеллоцитов в ГО и циркуляции. Кроме того, активация сигнального пути киназа Akt (Akt1)/FoxO в клетках ЗСЦ, усиливающего антиоксидантный ответ, также отменяет генерацию ламеллоцитов. Показано, что АФК активирует сигнальный путь рецептора эпидермального фактора роста (EGFR), обеспечивая дифференцировку ламеллоцитов. Инактивация Spitz (лиганд EGFR) в клетках ЗСЦ или функции EGFR в гемоцитах подавляет образование ламеллоцитов (рис. 2) [129]. Функции белков Star и Rhomboid, непосредственно участвующих в переносе, расщеплении и активации лиганда Spitz (переводят его в растворимую форму), необходимы для индукции ламеллоцитов. Помимо этого, высокий уровень АФК активирует сигнальный путь Toll в клетках ЗСЦ, что также способствует индукции ламеллоцитов в ответ на воздействие паразитических ос [130]. Потеря компонентов сигнального пути Toll посредством инактивации Dif и pelle нарушает образование ламеллоцитов. Наряду со множеством вопросов о природе генерации АФК в клетках ЗСЦ и сигналов в ответ на инвазию паразитарных организмов, нерешенным остается и вопрос взаимодействия сигнальных путей Spitz/EGFR и Toll/Dif в клетках ЗСЦ в регуляции дифференцировки ламеллоцитов.

ЛОКАЛЬНЫЕ СИГНАЛЫ, ПОДДЕРЖИВАЮЩИЕ МУЛЬТИПОТЕНТНЫЕ СВОЙСТВА ПРОГЕМОЦИТОВ

Сигнальный путь Wg/Wnt/ β -катенин поддерживает прогемоциты в мультипотентном состоянии

Одним из важных сигнальных путей, участвующих в поддержании мультипотентности и самообновлении гемопоэтических стволовых клеток млекопитающих, является сигнальный путь Wnt/ β -катенин. Сигналы лигандов Wnt действуют как аутокринным, так и паракринным способом. В последнем случае лиганды секретируются из клеток гемопоэтической ниши и способствуют поддержанию идентичности ГСК. У дрозофилы, как и у млекопитающих, известно несколько генов, кодирующих лиганды Wnt (Wg, Wnt-2, -3/5, -4, -6, -8, -10), и два гена, кодирующих их рецепторы Fz и Fz2. Лиганды, связываясь с рецепторами, вызывают активацию или канонического пути через активацию ТФ β -катенина (Armadillo, Arm), или неканонического сигнального пути планарной клеточной полярности (англ. planar cell polarity), который вызывает активацию транс-

крипции посредством JNK. Канонический сигнальный путь Wg/Wnt/ β -катенин участвует в поддержании мультипотентного состояния прогеомоцитов (рис. 2, табл. 1) [99]. Так, рецептор Fz2, который передает сигнал по каноническому пути, экспрессируется на высоком уровне в прогеомоцитах *Dome*⁺. Усиленная активация сигнального пути Wg/Wnt/ β -катенина в прогеомоцитах *Dome*⁺, обусловленная сверхэкспрессией лиганда Wg или конститутивно активной формы β -катенина, не позволяет данным клеткам дифференцироваться, стимулируя их поддержание в недифференцированном состоянии [99]. В свою очередь, ингибирование данного сигнального пути с помощью комбинации доминантно-негативных форм рецепторов Fz и Fz2 в прогеомоцитах *Dome*⁺ вызывает нарушение зональности ГО, то есть кластеры дифференцированных клеток «перемешиваются» с кластерами прогеомоцитов (рис. 2). Одновременная экспрессия доминантно-негативных форм Fz и Fz2 увеличивает количество промежуточных прогеомоцитов ПЗ [99]. При этом подавляется экспрессия белка ЭКМ Е-кадгерина, который непосредственно вовлечен в поддержание прогеомоцитов. Подавление экспрессии Е-кадгерина в прогеомоцитах вызывает их дифференцировку, в то время как сверхэкспрессия Е-кадгерина способствует поддержанию прогеомоцитов [41, 131]. Показано также, что активация сигнального пути Wg/Wnt/ β -катенин в клетках *Hml*⁺ кортикальной зоны подавляет экспрессию белка ЭКМ Tig и влияет на созревание плазматоцитов [132, 133], что дополнительно указывает на функцию этого сигнального пути в клетках промежуточной зоны. Недавние исследования показали, что в прогеомоцитах экспрессируется также лиганд Wnt6, экспрессия которого контролируется сигнальным путем Hh [134]. Важно отметить, что Wnt6 передает сигналы через новый неканонический Wnt-путь, опосредуемый рецептором LRP6 и подавляющим активность β -катенина. Взаимодействие цитозольного β -катенина с Е-кадгерином подавляет сигнальный путь EGFR в прогеомоцитах. Таким образом, активация сигнального пути Wnt6/LRP6 ведет к задержке клеточного цикла в фазе G2, тем самым не позволяя прогеомоцитам отвечать на сигналы к дифференцировке [134]. Однако активация сигнального пути EGFR в промежуточных прогеомоцитах ПЗ снимает блокаду клеточного цикла путем активации бета-катенина и позволяет клеткам дифференцироваться посредством активации ТФ Pointed (Pnt) [134]. Таким образом, активация сигнальных путей: канонического Wg/бета-катенин и неканонического Wnt6 важна для поддержания прогеомоцитов в мультипотентном состоянии, возможно, и в различных по-

пуляциях прогеомоцитов, в том числе в популяции промежуточных прогеомоцитов ПЗ.

Сигнальный путь кальций/кальмодулин участвует в поддержании прогеомоцитов

Сигнальный путь кальций/кальмодулин участвует не только в ЗСЦ-зависимой регуляции пролиферации препрогеомоцитов, но также и в поддержании прогеомоцитов *Dome*⁺ (рис. 2). Подавление передачи сигналов кальция в прогеомоцитах ГО приводит к увеличению количества дифференцированных гемоцитов. Напротив, активация сигналов кальция в прогеомоцитах способствует их поддержанию и пролиферации, при этом образуется значительно меньше зрелых гемоцитов [120].

Активность фактора Collier важна для поддержания прогеомоцитов

Транскрипционный фактор Col экспрессируется в прогеомоцитах *Dome*⁺, а его инактивация в клетках приводит к дифференцировке данных клеток в плазматоциты и кристаллические клетки (табл. 1) [109, 110]. Экспрессия данного ТФ в прогеомоцитах не контролируется сигналами из ЗСЦ. При этом Col негативно регулирует также дифференцировку ламеллоцитов. Понижение уровня Col наблюдается при усиленной дифференцировке ламеллоцитов, в то время как его эктопическая экспрессия в прогеомоцитах предотвращает образование данных клеток. Остается не ясным, под действием какого сигнального пути активируется функция Col в прогеомоцитах.

Сигнальные пути FGF и Gbb/TGF-beta способствуют дифференцировке прогеомоцитов

В отличие от Wnt, активация сигнального пути FGF в прогеомоцитах *Dome*⁺ вызывает их дифференцировку в зрелые гемоциты всех трех типов. Ингибирование сигнального пути FGF вызывает значительный рост прогеомоцитов, при этом наблюдается подавление их дифференцировки. Интересно, что лиганд FGF Thisbe (Ths) и рецептор Htl экспрессируются в прогеомоцитах и некоторых, вероятно, промежуточных прогеомоцитах, экспрессирующих пероксидазин. Эктопическая экспрессия целевых для FGF транскрипционных факторов Pnt и Ush способствует дифференцировке прогеомоцитов [135]. Таким образом, передача сигнала FGF через Htl, Ras/MAPK, Pnt и Ush способствует дифференцировке прогеомоцитов (рис. 2). Показано также, что сигнальный путь TGF-beta через лиганд Glass bottom boat (Gbb) участвует в негативной регуляции дифференцировки ламеллоцитов и плазматоцитов КЗ за счет подавления сигнальных путей EGFR и JNK [136].

Сигнальный путь JAK/STAT участвует в поддержании прогеомоцитов

Цитокины Unpaired 1–3 (Upd1–3), действуя через рецептор Dome, активируют киназу JAK и далее ТФ Stat92E, индуцируя транскрипцию целевых генов [102, 137]. Показано, что сигнальный путь JAK/STAT активирован в прогеомоцитах *Dome*⁺ и участвует в поддержании их идентичности, предотвращая дифференцировку [41, 119, 137]. Активность ТФ Stat92E в прогеомоцитах значительно ниже, чем в дифференцированных гемоцитах КЗ [138]. Однако функция ТФ Stat92E необходима для поддержания прогеомоцитов. Инактивация Stat92E с помощью температурочувствительной мутации приводит к дифференцировке прогеомоцитов [102]. При этом инактивация компонентов сигнального пути JAK/STAT, таких, как Dome или киназы JAK (hopscotch, hop), или Stat92E в прогеомоцитах МЗ, не влияет на их поддержание [103, 139]. Показано, что ТФ Ush, регулируемый сигналами JAK/STAT, способствует экспрессии E-кадгерина и Ptc в прогеомоцитах, участвуя тем самым в их поддержании и подавлении дифференцировки [131, 140]. Белок переноса эндосом Arj (Arj) участвует в фосфорилировании и активации STAT. Инактивация Arj частично фенотипирует температурочувствительный аллель Stat92E – подавляет поддержание прогеомоцитов, вызывая их дифференцировку [141, 142]. Кроме того, сигнальный путь JAK/STAT положительно регулирует дифференцировку прогеомоцитов в ламеллоциты при индукции клеточного иммунного ответа (рис. 2, табл. 1) [137].

Активные формы кислорода участвуют в поддержании прогеомоцитов

Основными источниками АФК в клетке являются дыхательная цепь митохондрии и мембранные NADPH-оксидазы (NOX). Эти системы генерируют супероксидный анион-радикал, который далее под действием супероксиддисмутаза превращается в пероксид водорода. Главными формами АФК в клетке являются пероксид водорода и супероксидный анион-радикал. АФК являются мощными окислителями, в высоких концентрациях, а также при нарушении антиоксидантной системы клетки они вызывают необратимые изменения макромолекул, приводящие к старению и гибели клетки. Однако сублетальные, физиологические концентрации АФК служат важными сигнальными посредниками, участвующими в посттрансляционных модификациях белков сигнальных путей и транскрипционных факторов, тем самым регулируя различные процессы в клетке [143, 144].

Неожиданно оказалось, что в норме в прогеомоцитах *Dome*⁺ поддерживаются повышенные уровни АФК по сравнению с дифференцированными гемоцитами кортикальной зоны (рис. 2, табл. 1) [100]. Прогеомоциты находятся в митотическом покое. По аналогии с покоящимися (quiescent) ГСК млекопитающих можно предположить, что эти клетки имеют низкую митохондриальную/дыхательную активность и, соответственно, низкие уровни АФК. Однако известно, что в миелоидных предшественниках млекопитающих уровень АФК существенно выше, чем в ГСК, и также повышается при дифференцировке клеток миелоидной линии. Неясным остается механизм генерации повышенных уровней АФК в прогеомоцитах. Однако показано, что АФК функционируют как сигнальные молекулы в процессе дифференцировки прогеомоцитов. Снижение базального уровня АФК в прогеомоцитах *Dome*⁺ путем экспрессии антиоксидантных ферментов подавляет формирование зрелых гемоцитов. В то же время искусственная индукция избытка АФК и ослабление окислительного фосфорилирования посредством инактивации комплекса-1 дыхательной цепи митохондрий в прогеомоцитах через активацию сигнального пути JNK приводят к их дифференцировке во все три типа зрелых гемоцитов [100]. Увеличение уровня АФК в прогеомоцитах приводит также к снижению экспрессии E-кадгерина посредством активации сигнального пути JNK и ТФ Srp [145]. Эктопическая экспрессия ТФ FoxO сигнального пути JNK в прогеомоцитах вызывает их дифференцировку в плазматоциты и кристаллические клетки [100, 145]. При этом одновременная активация FoxO и инактивация белков хроматина Polyhomeotic proximal (Ph-p) и Enhancer of polycomb (E(Pc)) вызывает дифференцировку прогеомоцитов в ламеллоциты (рис. 2, табл. 1). Таким образом, умеренно высокий, но физиологически контролируемый уровень АФК необходим для поддержания прогеомоцитов. Однако повышенная продукция митохондриальных АФК в прогеомоцитах вызывает их дифференцировку через активацию сигнального пути JNK/FoxO. Важно отметить, что в данном контексте функция FoxO не опосредует регуляцию антиоксидантных генов. Обнаружено также, что предполагаемые прогеомоциты, циркулирующие в целоме личинки дрозофилы вне гемопоэтического органа, также характеризуются высокой продукцией АФК. Эти прогеомоциты недостаточно охарактеризованы, они отнесены к предшественникам по аналогии с прогеомоцитами ГО, которые экспрессируют повышенные уровни АФК и лиганд Wg [17]. Эти клетки образуются в большом избытке в результа-

те активности онкогенного химерного белка AML1-ETO, экспрессируемого в гемоцитах *Hml*⁺. Высокие уровни АФК в таких циркулирующих прогемоцитах способствуют их поддержанию и повышенной пролиферации. Так, эктопическая экспрессия антиоксидантных ферментов SOD2 или каталазы (Catalase, Cat), а также ТФ FoxO, активирующего их экспрессию, подавляет генерацию и избыточную пролиферацию гемоцитов и их предшественников, вызванную онкогеном AML1-ETO [17]. В данном случае наиболее вероятно, что сигнальный путь Akt1/FoxO канонически регулирует экспрессию антиоксидантных генов. Таким образом, наблюдается как сходство, так и значительные различия в регуляции поддержания прогемоцитов ГО и циркулирующих прогемоцитов под действием АФК.

Синтаза оксида азота (Nos), как недавно показано, специфически экспрессируется в прогемоцитах и через продукцию оксида азота (NO) участвует в посттрансляционном S-нитрозилировании белков по остаткам цистеина [146]. S-нитрозилирование белков совместно с цитозольным кальцием активирует Ire1-Xbp1-опосредованную реакцию на развернутый белок (unfolded protein response, UPR), необходимую для поддержания прогемоцитов в митотически неактивном состоянии путем их остановки в фазе G2 клеточного цикла [146]. Как уже отмечалось, такая блокировка клеточного цикла делает прогемоциты невосприимчивыми к паракринным факторам, вызывающим дифференцировку. Показано также, что S-нитрозилирование EGFR временно инактивирует данный рецептор и таким образом делает прогемоциты невосприимчивыми к соответствующим сигналам. Важно отметить, что Nos, экспрессирующаяся в прогемоцитах, не содержит редуктазный домен, но при этом способна генерировать NO [146]. В свою очередь, поскольку эти клетки имеют высокие уровни АФК, данная форма Nos может использовать АФК для синтеза NO. Таким образом, предполагается, что взаимодействие между АФК и NO может участвовать в поддержании соответствующих уровней АФК, генерировать NO и тем самым защищать прогемоциты от избыточной продукции АФК.

В целом, очевидно сложная сеть регуляции поддержания и дифференцировки прогемоцитов в ГО. В локальной регуляции данных процессов участвуют несколько сигнальных путей. При этом, вероятно, существует сложная сеть взаимодействий между компонентами данных сигнальных путей в определенных временных интервалах гемопоэза дрозофилы. При этом различные сигнальные пути способны вызывать дифференцировку клеток, что может указывать на повышенную пластичность

клеток-предшественников дрозофилы. Помимо данных сигналов и сигналов из ниши ЗСЦ, поддержание прогемоцитов контролируется сигналами дифференцированных клеток, о чем будет сказано в следующем разделе.

РАВНОВЕСНЫЕ СИГНАЛЫ МЕЖДУ КЛЕТКАМИ НИШИ ЗСЦ И ЗРЕЛЫМИ ГЕМОЦИТАМИ КОРТИКАЛЬНОЙ ЗОНЫ РЕГУЛИРУЮТ ПОДДЕРЖАНИЕ ПРОГЕМОЦИТОВ

С использованием генетической системы дрозофилы обнаружен уникальный механизм регуляции поддержания прогениторных клеток. Установлено, что поддержание и дифференцировка прогемоцитов контролируются «равновесно» двумя механизмами: (1) непосредственно сигналом из клеток гемопоэтической ниши ЗСЦ и (2) сигналом дочерних дифференцированных клеток, который также контролируется дополнительным сигналом, исходящим из той же гемопоэтической ниши. Клетки ЗСЦ регулируют не только поддержание мультипотентного состояния прогемоцитов, но также поддержание и дифференцировку гемоцитов кортикальной зоны (рис. 2). Этот процесс регулируется сигнальным путем Pvf1/Pvr [103]. Лиганд Pvf1 секретируется в клетках ЗСЦ, в то время как рецептор Pvr экспрессируется на высоком уровне в клетках кортикальной зоны. Инактивация Pvf1 в клетках ЗСЦ не влияет на пролиферацию и количество клеток ЗСЦ, однако приводит к подавлению поддержания прогемоцитов, вызывая их дифференцировку. Аналогичный эффект наблюдается и в результате подавления функции рецептора Pvr в дифференцированных гемоцитах кортикальной зоны, вызывающей обширную дифференцировку прогемоцитов [103, 119]. Важно отметить, что лиганд Pvf1 переносится на большие расстояния через несколько клеток посредством транспортных везикул, включающих связанные, но не сигнализирующие комплексы Pvf1 и Pvr на поверхности прогемоцитов.

Далее с помощью генетических методов было показано, что Pvf1, взаимодействуя с Pvr гемоцитов кортикальной зоны, активирует STAT-зависимую экспрессию секретируемой аденозиндезаминазы ростового фактора-A (Adgf-A) (рис. 2). Этот фермент осуществляет дезаминирование аденозина, превращая внеклеточную сигнальную молекулу аденозина в инертный инозин [147, 148]. Удаление аденозина посредством Adgf-A в гемоцитах КЗ приводит к подавлению соответствующего сигнального пути через рецептор аденозина (AdoR), находящийся в прогемоцитах. В результате снижается активность cAMP-зависимой протеинкиназы A (PKA), что, в свою очередь, активирует транскрипционный

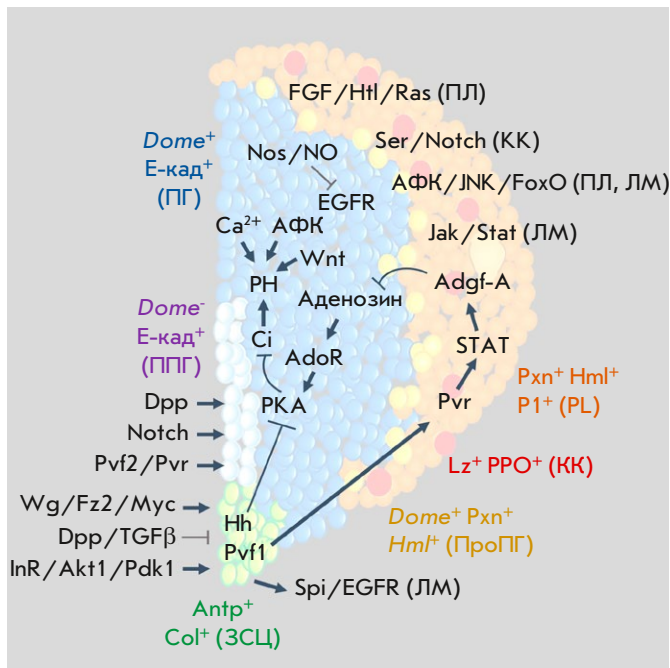


Рис. 2. Схема участия и взаимодействия основных сигнальных путей в регуляции гемопоэза дрозофилы в гемопоэтическом органе. Поддержание и пролиферация клеток гемопоэтической ниши ЗСЦ (отмечено зеленым цветом) положительно контролируется Wg/Fz2/Мус и негативно контролируется Dpp/TGFβ. Поддержание и пролиферация препрогемоцитов (ППГ, серый) положительно контролируется сигналами Dpp, Notch, Pvf2/Pvr. Поддержание прогемоцитов (ПГ, синий) положительно контролируется сигналами Hh/PKA/Ci из гемопоэтической ниши, аутокринными сигналами Wnt/Fz/Fz2 и Ca²⁺ и негативно контролируется сигналом Adgф-A, идущим из дифференцированных гемоцитов КЗ (отмечено оранжевым цветом). Клетки ЗСЦ положительно контролируют экспрессию Adgф-A, посредством активации Pvr и STAT в дифференцированных гемоцитах КЗ, являясь звеном равновесного сигнала между клетками ниши ЗСЦ и зрелыми гемоцитами, контролирующими поддержание ПГ. Промежуточные прогемоциты (ПроПГ) обозначены желтым цветом. Дифференцировка и пролиферация плазматоцитов (ПЛ) положительно регулируется FGF/Hh/Ras и АФК/JNK/FoxO, кристаллических клеток (КК) – Ser/Notch, ламеллоцитов (ЛМ) – Spi/EGFR, Jak/Stat и АФК/JNK/FoxO (см. детали в тексте)

фактор Ci, опосредующий поддержание прогемоцитов в мультипотентном состоянии. Важно отметить, что активация сигнального пути Hh/Ptc из ЗСЦ также ингибирует активность PKA в прогемоцитах, что приводит к активации Ci. Таким образом, Hh-

зависимый сигнал из клеток ниши ЗСЦ и сигнал аденозина из дифференцированных гемоцитов КЗ синергически ингибируют активность PKA и активируют Ci, что приводит к поддержанию прогемоцитов в медуллярной зоне [96, 103]. Можно предположить, что аналогичный равновесный сигнал присутствует и в гемопоэтической системе млекопитающих.

СИГНАЛЬНЫЕ ПУТИ, УЧАСТВУЮЩИЕ В ПОДДЕРЖАНИИ ФУНКЦИИ КЛЕТОК НИШИ ЗСЦ

ТФ Antp и Col экспрессируются в клетках ЗСЦ на протяжении всех личиночных стадий. Данные клетки пролиферируют на ранней личиночной стадии и образуют кластер из 30–40 клеток, которые поддерживаются в течение третьей личиночной стадии (рис. 1). Antp непосредственно контролирует спецификацию, поддержание и рост данных клеток, активирует экспрессию Col, который, в свою очередь, участвует в поддержании экспрессии Antp [96, 97, 116]. Лиганд Serrate рецептора Notch экспрессируется позднее в определенной популяции клеток ЗСЦ. Serrate необходим для дифференцировки кристаллических клеток в КЗ [96, 97, 105].

Пролиферацию клеток ЗСЦ антагонистически регулируют два сигнальных пути – Wg и Dpp [99, 123]. Все компоненты сигнального пути Wg, Fz2, β-катенин/Arm и Disheveled (Dsh) экспрессируются в ЗСЦ. Активация Wg необходима для увеличения количества клеток ЗСЦ (рис. 2, табл. 1). Так, при блокировании функции Fz2 происходит существенное снижение количества клеток ЗСЦ, в то время как эктопическая экспрессия Wg приводит к значительному увеличению количества этих клеток [99]. В противоположность Wg подавление сигнального пути Dpp/TGF-beta вызывает увеличение количества клеток ЗСЦ [123]. Активация сигнального пути TGF-beta через лиганд Dpp активирует транскрипционные факторы Daughters against dpp (Dad) и Mad, которые экспрессируются в клетках ЗСЦ [123, 149]. Количество клеток ЗСЦ существенно увеличивается при подавлении данного пути в результате инактивации гепарансульфат-протеогликан-связывающего белка Dally like (Dlp) и, соответственно, pMad в данных клетках (рис. 2). Одновременное подавление сигнальных путей Wg и Dpp восстанавливает ЗСЦ до размера дикого типа. Регуляция количества клеток ЗСЦ с помощью Wg зависит от Мус, поскольку инактивация Мус отменяет увеличение клеток ЗСЦ, вызванное эктопической экспрессией Wg [123]. В свою очередь, ТФ семейства forkhead – Jumu – вовлечен в регуляцию Мус в процессе регуляции пролиферации клеток ЗСЦ [150]. Для детального понимания механизма

взаимодействия данных сигнальных путей в регуляции пролиферации и функционирования клеток ЗСЦ требуются дальнейшие исследования.

Показано, что развитая сеть белков внеклеточно-матрикса между клетками ЗСЦ и прогемоцитами важна для регуляции передачи сигналов Dpp и Wg в процессе гемопоэза в ГО и ответа на стрессовые воздействия [151]. Обнаружено, что септированные контакты между клетками ЗСЦ разрушаются при активации сигнальных путей Toll или Imd или в ответ на бактериальную инфекцию. В норме кластер клеток ЗСЦ непроницаем для крупномолекулярных красителей. Однако инактивация белков плотных септированных межклеточных контактов Coracle (Cora) или нейрексина IV (Neurexin IV, NrxIV) приводит к проницаемости клеток ЗСЦ. Повышенная проницаемость способствует увеличению числа клеток ЗСЦ, уменьшению количества прогемоцитов и способствует дифференцировке плазматоцитов и кристаллических клеток. Потеря такого барьера нарушает передачу сигналов лигандов Wg и Dpp [151] как внутри ниши, так и сигналов прогемоцитам. Показано также, что в регуляции секреции Hg участвуют щелевые контакты (gap junctions, GJ), а также Ca²⁺-сигнальный путь [128].

В дополнение к этому показано, что сигналы от соседствующих с ЗСЦ клеток ДС регулируют пролиферацию, функционирование и локализацию клеток ЗСЦ. Так, гликопротеин Slit секретируется клетками дорсального сосуда. Рецепторы данного белка Roundabout 1 и 2 (Robo 1 и 2) экспрессируются на клетках ЗСЦ. Взаимодействие Slit с Robo 1 и 2 регулирует пролиферацию и локализацию клеток ЗСЦ [33, 126, 152]. Подавление функции Robo в ЗСЦ или экспрессии Slit в клетках дорсального сосуда увеличивает количество клеток ЗСЦ и вызывает их распространение вглубь гемопоэтического органа, в том числе посредством подавления экспрессии E-кад [126]. В свою очередь, Robo активирует сигнальный путь Dpp/TGF-beta, что приводит к подавлению экспрессии ТФ Мус и пролиферации клеток ЗСЦ (рис. 2) [33, 123, 126].

Важным открытием стало то, что сигналы извне, а именно от нервной и гуморальной систем, непосредственно влияют на состояние и функцию клеток гемопоэтической ниши ЗСЦ. Инсулиноподобные пептиды, экспрессирующиеся в нейронах, клетках глии и жирового тела [153], регулируют пролиферацию и рост клеток ЗСЦ посредством активации инсулинового сигнального пути [31, 32, 104, 122, 154]. Ингибирование данного сигнального пути в результате инактивации различных его компонентов: инсулинового рецептора (InR) или Akt1, или фосфоинозитид-зависимой киназы 1 (Pdk1),

или фосфоинозитид-3-киназы (PI3K), уменьшает количество клеток ЗСЦ. Кроме того, показано, что в этом процессе участвует активация сигнального пути рапамицина. Дальнейшие исследования позволят более детально установить взаимодействия между обнаруженными сигнальными путями в регуляции поддержания и функционирования клеток гемопоэтической ниши, которая является центром, регулирующим гемопоэз в ГО дрозофилы.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

За последние 20 лет был достигнут значительный прогресс в понимании молекулярных механизмов, регулирующих гемопоэз дрозофилы. Генетически наиболее совершенная модельная система дрозофилы позволила охарактеризовать сложные взаимодействия между сигнальными путями и транскрипционными факторами, участвующими в регуляции поддержания и дифференцировки мультипотентных клеток предшественников гемоцитов: препрогемоцитов и прогемоцитов. Данные клетки дифференцируются в процессе развития личинки в три типа зрелых гемоцитов: плазматоциты, кристаллические клетки и ламеллоциты. Показано, что у насекомых, как и у млекопитающих, в поддержании и регуляции дифференцировки гемопоэтических клеток-предшественников главную роль играет гемопоэтическая ниша – клетки ЗСЦ. Детерминация судьбы клеток гемопоэтической ниши происходит параллельно со спецификацией гемопоэтических предшественников в гемопоэтическом органе. На протяжении личиночных стадий клетки ЗСЦ координируют поддержание и дифференцировку прогемоцитов с помощью секретируемых лигандов: Hh, Pvf1, Ser, Wg/Wnt, активируя соответствующие сигнальные пути в предшественниках гемоцитов. Эти сигналы участвуют в том числе в поддержании аутокринных и паракринных сигналов (Wnt/бета-катенин, кальциевая сигнализация, АФК, Stat92E) в прогемоцитах, активируя или подавляя поддержание прогемоцитов в недифференцированном состоянии. Прогемоциты находятся в митотически покоящемся состоянии в медуллярной зоне гемопоэтического органа. Помимо этого, показана двусторонняя, равновесная регуляция поддержания прогемоцитов с помощью сигналов от дифференцированных клеток (Pvr, Adgf-A, AdoR, PKA) и клеток гемопоэтической ниши (Hh, Pvf1). Недавние исследования с использованием секвенирования транскриптома единичных клеток показали наличие промежуточных стадий дифференцировки прогемоцитов и неохарактеризованных популяций зрелых гемоцитов. Дифференцировка прогемоцитов происходит в так называемой промежуточной зоне, где клетки

начинают делиться и становятся восприимчивыми к сигналам дифференцировки. Однако данный механизм требует дальнейшей расшифровки. Кроме того, недавние исследования показали, что клетки дорсального сосуда также служат своего рода гемопоэтической нишей, участвуя в поддержании прогемотитов. До настоящего времени у дрозофилы не выявлены гемопоэтические стволовые клетки, способные самообновляться с помощью асимметрического деления. Однако определена наиболее наивная популяция препрогемотитов, клетки которой регулируются клетками гемопоэтической ниши с помощью активации сигнальных путей Notch, Dpp, Pvf2/Pvr. Показано также, что, помимо поддержания предшественников гемотитов, клетки гемопоэтической ниши участвуют в регуляции кле-

точного иммунного ответа и клеток, опосредующих меланизацию и инактивацию патогенных объектов с помощью сигнальных путей Spi/EGFR, Toll и Ser/Notch. На основании результатов рассмотренных исследований получена уникальная картина взаимодействия молекулярных механизмов, регулирующих гемопоэз одного из представителей артропод. Генетическая система дрозофилы позволила и позволяет с высоким разрешением, по некоторым параметрам опережая модельную систему мыши, расшифровать молекулярные события, регулирующие гемопоэз. ●

Исследование выполнено при финансовой поддержке Соглашения № 075-15-2021-1075 с Минобрнауки от 28-09-2021.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Morgan T.H. // *Sci. Mon.* 1935. V. 41. № 1. P. 5–18.
- Morgan T.H. // *Am. Nat.* 1917. V. 51. № 609. P. 513–544.
- Nefedova L.N. // *Russ. J. Dev. Biol.* 2020. V. 51. № 4. P. 201–211.
- Osadchiy I.S., Kamalyan S.O., Tumashova K.Y., Georgiev P.G., Maksimenko O.G. // *Acta Naturae.* 2023. V. 15. № 2. P. 70–74.
- Brand A.H., Perrimon N. // *Development.* 1993. V. 118. № 2. P. 401–415.
- Evans C.J., Olson J.M., Ngo K.T., Kim E., Lee N.E., Kuoy E., Patananan A.N., Sitz D., Tran P., Do M.-T., et al. // *Nat. Meth.* 2009. V. 6. № 8. P. 603–605.
- Hu Y., Comjean A., Rodiger J., Liu Y., Gao Y., Chung V., Zirin J., Perrimon N., Mohr S.E. // *Nucleic Acids Res.* 2021. V. 49. № D1. P. D908–D915.
- Cooley L., Kelley R., Spradling A. // *Science.* 1988. V. 239. № 4844. P. 1121–1128.
- Bokel C. // *Methods Mol. Biol.* 2008. V. 420. P. 119–138.
- Braun A., Lemaitre B., Lanot R., Zachary D., Meister M. // *Genetics.* 1997. V. 147. № 2. P. 623–634.
- Nemudryi A.A., Valetdinova K.R., Medvedev S.P., Zakian S.M. // *Acta Naturae.* 2014. V. 6. № 3. P. 19–40.
- Friedman A., Perrimon N. // *Curr. Opin. Genet. Dev.* 2004. V. 14. № 5. P. 470–476.
- Sinenko S.A., Kim E.K., Wynn R., Manfrulli P., Ando I., Wharton K.A., Perrimon N., Mathey-Prevot B. // *Dev. Biol.* 2004. V. 273. № 1. P. 48–62.
- Kaufman T.C. // *Genetics.* 2017. V. 206. № 2. P. 665–689.
- St Johnston D. // *Nat. Rev. Genet.* 2002. V. 3. № 3. P. 176–188.
- Reitman Z.J., Sinenko S.A., Spana E.P., Yan H. // *Blood.* 2015. V. 125. № 2. P. 336–345.
- Sinenko S.A., Hung T., Moroz T., Tran Q.M., Sidhu S., Cheney M.D., Speck N.A., Banerjee U. // *Blood.* 2010. V. 116. № 22. P. 4612–4620.
- Hales K.G., Korey C.A., Larracuenta A.M., Roberts D.M. // *Genetics.* 2015. V. 201. № 3. P. 815–842.
- Schneider D. // *Nat. Rev. Genet.* 2000. V. 1. № 3. P. 218–226.
- Perrimon N. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1998. V. 95. № 17. P. 9716–9717.
- Celniker S.E., Rubin G.M. // *Annu. Rev. Genomics Hum. Genet.* 2003. V. 4. P. 89–117.
- Sinenko S.A. // *Oncotarget.* 2017. V. 8. № 41. P. 70452–70462.
- Yang C.S., Sinenko S.A., Thomenius M.J., Robeson A.C., Freel C.D., Horn S.R., Kornbluth S. // *Cell Death Differ.* 2014. V. 21. № 4. P. 604–611.
- Shrestha R., Gateff E. // *Dev. Growth. Differ.* 1982. V. 24. № 1. P. 65–82.
- Mathey-Prevot B., Perrimon N. // *Cell.* 1998. V. 92. № 6. P. 697–700.
- Lanot R., Zachary D., Holder F., Meister M. // *Dev. Biol.* 2001. V. 230. № 2. P. 243–257.
- Evans C.J., Hartenstein V., Banerjee U. // *Dev. Cell.* 2003. V. 5. № 5. P. 673–690.
- Millar D.A., Ratcliffe N.A. // *Endeavour.* 1989. V. 13. № 2. P. 72–77.
- Evans C.J., Sinenko S.A., Mandal L., Martinez-Agosto J.A., Hartenstein V., Banerjee U., Rolf B. Genetic Dissection of Hematopoiesis Using *Drosophila* as a Model System // *Advances in Developmental Biology.* Elsevier, 2007. P. 259.
- Honti V., Csordas G., Kurucz E., Markus R., Ando I. // *Dev. Comp. Immunol.* 2014. V. 42. № 1. P. 47–56.
- Koranteng F., Cho B., Shim J. // *Mol. Cells.* 2022. V. 45. № 3. P. 101–108.
- Banerjee U., Girard J.R., Goins L.M., Spratford C.M. // *Genetics.* 2019. V. 211. № 2. P. 367–417.
- Morin-Poulard I., Tian Y., Vanzo N., Crozatier M. // *Front. Immunol.* 2021. V. 12. P. 719349.
- Kharrat B., Csordas G., Honti V. // *Int. J. Mol. Sci.* 2022. V. 23. № 14. P. 7767.
- Tepass U., Fessler L.I., Aziz A., Hartenstein V. // *Development.* 1994. V. 120. № 7. P. 1829–1837.
- Holz A., Bossinger B., Strasser T., Janning W., Klapper R. // *Development.* 2003. V. 130. № 20. P. 4955–4962.
- Honti V., Csordas G., Markus R., Kurucz E., Jankovics F., Ando I. // *Mol. Immunol.* 2010. V. 47. № 11–12. P. 1997–2004.
- Ghosh S., Singh A., Mandal S., Mandal L. // *Dev. Cell.* 2015. V. 33. № 4. P. 478–488.
- Srdić Ž., Reinhardt C. // *Science.* 1980. V. 207. № 4437. P. 1375–1377.
- Gateff E. // *Science.* 1978. V. 200. № 4349. P. 1448–1459.
- Jung S.H., Evans C.J., Uemura C., Banerjee U. // *Development.* 2005. V. 132. № 11. P. 2521–2533.
- Rugendorff A., Younossi-Hartenstein A., Hartenstein V. //

- Roux Arch. Dev. Biol. 1994. V. 203. № 5. P. 266–280.
43. Cho B., Yoon S.H., Lee D., Koranteng F., Tattikota S.G., Cha N., Shin M., Do H., Hu Y., Oh S. Y., et al. // *Nat. Commun.* 2020. V. 11. № 1. P. 4483.
44. Cattenoz P.B., Monticelli S., Pavlidaki A., Giangrande A. // *Front. Cell Dev. Biol.* 2021. V. 9. P. 643712.
45. Fu Y., Huang X., Zhang P., van de Leemput J., Han Z. // *J. Genet. Genomics.* 2020. V. 47. № 4. P. 175–186.
46. Cattenoz P.B., Sakr R., Pavlidaki A., Delaporte C., Riba A., Molina N., Hariharan N., Mukherjee T., Giangrande A. // *EMBO J.* 2020. V. 39. № 12. P. e104486.
47. Tattikota S.G., Cho B., Liu Y., Hu Y., Barrera V., Steinbaugh M.J., Yoon S.H., Comjean A., Li F., Dervis F., et al. // *Elife.* 2020. V. 9. P. e54818.
48. Russo J., Dupas S., Frey F., Carton Y., Brehelin M. // *Parasitology.* 1996. V. 112 (Pt 1). P. 135–142.
49. Brehelin M. // *Cell Tissue. Res.* 1982. V. 221. № 3. P. 607–615.
50. Charroux B., Royet J. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2009. V. 106. № 24. P. 9797–9802.
51. Kurucz E., Vaczi B., Markus R., Laurinyecz B., Vilmos P., Zsomboki J., Csorba K., Gateff E., Hultmark D., Ando I. // *Acta Biol. Hung.* 2007. V. 58 Suppl. P. 95–111.
52. Franc N.C., Heitzler P., Ezekowitz R.A., White K. // *Science.* 1999. V. 284. № 5422. P. 1991–1994.
53. Kocks C., Cho J. H., Nehme N., Ulvila J., Pearson A. M., Meister M., Strom C., Conto S. L., Hetru C., Stuart L. M., et al. // *Cell.* 2005. V. 123. № 2. P. 335–346.
54. Bretscher A.J., Honti V., Binggeli O., Burri O., Poidevin M., Kurucz E., Zsomboki J., Ando I., Lemaitre B. // *Biol. Open.* 2015. V. 4. № 3. P. 355–363.
55. Irving P., Ubeda J.M., Doucet D., Troxler L., Lagueux M., Zachary D., Hoffmann J.A., Hetru C., Meister M. // *Cell. Microbiol.* 2005. V. 7. № 3. P. 335–350.
56. Kurucz E., Markus R., Zsomboki J., Folkl-Medzihradzsky K., Darula Z., Vilmos P., Udvardy A., Krausz I., Lukacsovich T., Gateff E., et al. // *Curr. Biol.* 2007. V. 17. № 7. P. 649–654.
57. Баландин С.В., Овчинникова Т.В. // *Биооргани. химия.* 2016. V. 42. № 3. С. 255–275.
58. Olofsson B., Page D.T. // *Dev. Biol.* 2005. V. 279. № 1. P. 233–243.
59. Bunt S., Hooley C., Hu N., Scahill C., Weavers H., Skaer H. // *Dev. Cell.* 2010. V. 19. № 2. P. 296–306.
60. Nelson R.E., Fessler L.I., Takagi Y., Blumberg B., Keene D.R., Olson P.F., Parker C.G., Fessler J.H. // *EMBO J.* 1994. V. 13. № 15. P. 3438–3447.
61. Defaye A., Evans I., Crozatier M., Wood W., Lemaitre B., Leulier F. // *J. Innate Immun.* 2009. V. 1. № 4. P. 322–334.
62. Sears H.C., Kennedy C.J., Garrity P.A. // *Development.* 2003. V. 130. № 15. P. 3557–3565.
63. Guillou A., Troha K., Wang H., Franc N.C., Buchon N. // *PLoS Pathog.* 2016. V. 12. № 10. P. e1005961.
64. Shia A.K., Glittenberg M., Thompson G., Weber A.N., Reichhart J.M., Ligoxygakis P. // *J. Cell Sci.* 2009. V. 122. № 24. P. 4505–4515.
65. Binggeli O., Neyen C., Poidevin M., Lemaitre B. // *PLoS Pathog.* 2014. V. 10. № 5. P. e1004067.
66. Dudzic J.P., Kondo S., Ueda R., Bergman C.M., Lemaitre B. // *BMC Biol.* 2015. V. 13. P. 81.
67. Tang H., Kambris Z., Lemaitre B., Hashimoto C. // *J. Biol. Chem.* 2006. V. 281. № 38. P. 28097–28104.
68. Nam H.J., Jang I.H., You H., Lee K.A., Lee W.J. // *EMBO J.* 2012. V. 31. № 5. P. 1253–1265.
69. Nappi A.J., Vass E., Frey F., Carton Y. // *Eur. J. Cell. Biol.* 1995. V. 68. № 4. P. 450–456.
70. Ramet M., Manfrulli P., Pearson A., Mathey-Prevot B., Ezekowitz R.A. // *Nature.* 2002. V. 416. № 6881. P. 644–648.
71. Galko M.J., Krasnow M.A. // *PLoS Biol.* 2004. V. 2. № 8. P. E239.
72. Neyen C., Binggeli O., Roversi P., Bertin L., Sleiman M.B., Lemaitre B. // *Dev. Comp. Immunol.* 2015. V. 50. № 2. P. 166–174.
73. Rizki T.M., Rizki R.M. // *Dev. Comp. Immunol.* 1992. V. 16. № 2–3. P. 103–110.
74. Shrestha R., Gateff E. // *Development, Growth and Differentiation.* 1982. V. 24. № 1. P. 83–98.
75. Anderl I., Vesala L., Ihalainen T.O., Vanha-Aho L.M., Ando I., Ramet M., Hultmark D. // *PLoS Pathog.* 2016. V. 12. № 7. P. e1005746.
76. Nam H.J., Jang I.H., Asano T., Lee W.J. // *Mol. Cells.* 2008. V. 26. № 6. P. 606–610.
77. Honti V., Kurucz E., Csordas G., Laurinyecz B., Markus R., Ando I. // *Immunol. Lett.* 2009. V. 126. № 1–2. P. 83–84.
78. Tokusumi T., Shoue D.A., Tokusumi Y., Stoller J.R., Schulz R.A. // *Genesis.* 2009. V. 47. № 11. P. 771–774.
79. Evans C.J., Liu T., Banerjee U. // *Methods.* 2014. V. 68. № 1. P. 242–251.
80. Rus F., Kurucz E., Markus R., Sinenko S.A., Laurinyecz B., Pataki C., Gausz J., Hegedus Z., Udvardy A., Hultmark D., et al. // *Gene Expr. Patterns.* 2006. V. 6. № 8. P. 928–934.
81. Sinenko S.A., Mathey-Prevot B. // *Oncogene.* 2004. V. 23. № 56. P. 9120–9128.
82. Semenova N.Y., Bessmel'tsev S.S., Rugal' V.I. // *Klin. Onkogematol.* 2014. V. 7. № 4. P. 501–510.
83. Charbord P., Pouget C., Binder H., Dumont F., Stik G., Levy P., Allain F., Marchal C., Richter J., Uzan B., et al. // *Cell Stem Cell.* 2014. V. 15. № 3. P. 376–391.
84. Belyavsky A., Petinati N., Drize N. // *Int. J. Mol. Sci.* 2021. V. 22. № 17. P. 9231.
85. Comazzetto S., Shen B., Morrison S. J. // *Dev. Cell.* 2021. V. 56. № 13. P. 1848–1860.
86. Morrison S.J., Spradling A.C. // *Cell.* 2008. V. 132. № 4. P. 598–611.
87. Fuller M.T., Spradling A.C. // *Science.* 2007. V. 316. № 5823. P. 402–404.
88. Homem C.C., Knoblich J.A. // *Development.* 2012. V. 139. № 23. P. 4297–4310.
89. Micchelli C.A., Perrimon N. // *Nature.* 2006. V. 439. № 7075. P. 475–479.
90. Minakhina S., Steward R. // *Development.* 2010. V. 137. № 1. P. 27–31.
91. Dey N.S., Ramesh P., Chugh M., Mandal S., Mandal L. // *Elife.* 2016. V. 5. P. e18295.
92. Ho K.Y.L., Carr R.L., Dvoskin A.D., Tanentzapf G. // *Elife.* 2023. V. 12. P. e84085.
93. Girard J.R., Goins L.M., Vuu D.M., Sharpley M.S., Spratford C.M., Mantri S.R., Banerjee U. // *Elife.* 2021. V. 10. P. e67516.
94. Mandal L., Banerjee U., Hartenstein V. // *Nat. Genet.* 2004. V. 36. № 9. P. 1019–1023.
95. Medvinsky A., Dzierzak E. // *Cell.* 1996. V. 86. № 6. P. 897–906.
96. Mandal L., Martinez-Agosto J.A., Evans C.J., Hartenstein V., Banerjee U. // *Nature.* 2007. V. 446. № 7133. P. 320–324.
97. Crozatier M., Ubeda J.M., Vincent A., Meister M. // *PLoS Biol.* 2004. V. 2. № 8. P. E196.
98. Rodrigues D., Renaud Y., VijayRaghavan K., Waltzer L., Inamdar M. S. // *Elife.* 2021. V. 10. P. e61409.
99. Sinenko S.A., Mandal L., Martinez-Agosto J.A., Banerjee U. // *Dev. Cell.* 2009. V. 16. № 5. P. 756–763.
100. Owusu-Ansah E., Banerjee U. // *Nature.* 2009. V. 461.

- № 7263. P. 537–541.
101. Crozatier M., Meister M. // *Cell. Microbiol.* 2007. V. 9. № 5. P. 1117–1126.
 102. Krzemien J., Dubois L., Makki R., Meister M., Vincent A., Crozatier M. // *Nature.* 2007. V. 446. № 7133. P. 325–328.
 103. Mondal B.C., Mukherjee T., Mandal L., Evans C.J., Sinenko S.A., Martinez-Agosto J. A., Banerjee U. // *Cell.* 2011. V. 147. № 7. P. 1589–1600.
 104. Tokusumi Y., Tokusumi T., Shoue D.A., Schulz R.A. // *PLoS One.* 2012. V. 7. № 7. P. e41604.
 105. Lebestky T., Jung S.H., Banerjee U. // *Genes Dev.* 2003. V. 17. № 3. P. 348–353.
 106. Krzemien J., Oyallon J., Crozatier M., Vincent A. // *Dev. Biol.* 2010. V. 346. № 2. P. 310–319.
 107. Mohammad K., Dakik P., Medkour Y., Mitrofanova D., Titorenko V.I. // *Int. J. Mol. Sci.* 2019. V. 20. № 9. P. 2158.
 108. Hombria J.C., Brown S., Hader S., Zeidler M.P. // *Dev. Biol.* 2005. V. 288. № 2. P. 420–433.
 109. Benmimoun B., Polesello C., Haenlin M., Waltzer L. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2015. V. 112. № 29. P. 9052–9057.
 110. Oyallon J., Vanzo N., Krzemien J., Morin-Poulard I., Vincent A., Crozatier M. // *PLoS One.* 2016. V. 11. № 2. P. e0148978.
 111. Grigorian M., Liu T., Banerjee U., Hartenstein V. // *Dev. Biol.* 2013. V. 384. № 2. P. 301–312.
 112. Makhijani K., Alexander B., Tanaka T., Rulifson E., Bruckner K. // *Development.* 2011. V. 138. № 24. P. 5379–5391.
 113. Goto A., Kadowaki T., Kitagawa Y. // *Dev. Biol.* 2003. V. 264. № 2. P. 582–591.
 114. Mukherjee T., Kim W. S., Mandal L., Banerjee U. // *Science.* 2011. V. 332. № 6034. P. 1210–1213.
 115. Terriente-Felix A., Li J., Collins S., Mulligan A., Reekie I., Bernard F., Krejci A., Bray S. // *Development.* 2013. V. 140. № 4. P. 926–937.
 116. Lebestky T., Chang T., Hartenstein V., Banerjee U. // *Science.* 2000. V. 288. № 5463. P. 146–149.
 117. Tokusumi T., Sorrentino R.P., Russell M., Ferrarese R., Govind S., Schulz R. A. // *PLoS One.* 2009. V. 4. № 7. P. e6429.
 118. Spratford C.M., Goins L.M., Chi F., Girard J.R., Macias S.N., Ho V.W., Banerjee U. // *Development.* 2021. V. 148. № 24. P. 200216.
 119. Ferguson G.B., Martinez-Agosto J.A. // *Dev. Biol.* 2017. V. 425. № 1. P. 21–32.
 120. Shim J., Mukherjee T., Mondal B.C., Liu T., Young G.C., Wijewarnasuriya D.P., Banerjee U. // *Cell.* 2013. V. 155. № 5. P. 1141–1153.
 121. Baldeosingh R., Gao H., Wu X., Fossett N. // *Dev. Biol.* 2018. V. 441. № 1. P. 132–145.
 122. Benmimoun B., Polesello C., Waltzer L., Haenlin M. // *Development.* 2012. V. 139. № 10. P. 1713–1717.
 123. Pannetier D., Oyallon J., Morin-Poulard I., Dejean S., Vincent A., Crozatier M. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2012. V. 109. № 9. P. 3389–3394.
 124. Khadilkar R.J., Rodrigues D., Mote R.D., Sinha A.R., Kulkarni V., Magadi S.S., Inamdar M.S. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2014. V. 111. № 13. P. 4898–4903.
 125. Destalminil-Letourneau M., Morin-Poulard I., Tian Y., Vanzo N., Crozatier M. // *Elife.* 2021. V. 10. P. e64672.
 126. Morin-Poulard I., Sharma A., Louradour I., Vanzo N., Vincent A., Crozatier M. // *Nat. Commun.* 2016. V. 7. P. 11634.
 127. Ramesh P., Dey N. S., Kanwal A., Mandal S., Mandal L. // *Elife.* 2021. V. 10. P. e67158.
 128. Ho K.Y.L., An K., Carr R.L., Dvoskin A.D., Ou A.Y.J., Vogl W., Tanentzapf G. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2023. V. 120. № 45. P. e2303018120.
 129. Sinenko S.A., Shim J., Banerjee U. // *EMBO Rep.* 2012. V. 13. № 1. P. 83–89.
 130. Louradour I., Sharma A., Morin-Poulard I., Letourneau M., Vincent A., Crozatier M., Vanzo N. // *Elife.* 2017. V. 6. P. e25496.
 131. Gao H., Wu X., Fossett N. // *Molecular and Cellular Biology.* 2009. V. 29. № 22. P. 6086–6096.
 132. Zhang C.U., Cadigan K.M. // *Development.* 2017. V. 144. № 13. P. 2415–2427.
 133. Zhang C.U., Blauwkamp T.A., Burby P.E., Cadigan K.M. // *PLoS Genet.* 2014. V. 10. № 8. P. e1004509.
 134. Goins L.M., Girard J.R., Mondal B.C., Buran S., Su C.C., Tang R., Biswas T., Banerjee U. // *bioRxiv.* 2023. 10.1101/2023.06.29.547151. P. 2023.2006.2029.547151.
 135. Dragojlovic-Munther M., Martinez-Agosto J.A. // *Dev. Biol.* 2013. V. 384. № 2. P. 313–330.
 136. Zhang W., Wang D., Si J., Jin L. H., Hao Y. // *Cells.* 2023. V. 12. № 4. P. 661.
 137. Makki R., Meister M., Pannetier D., Ubeda J.M., Braun A., Daburon V., Krzemien J., Bourbon H.M., Zhou R., Vincent A., et al. // *PLoS Biol.* 2010. V. 8. № 8. P. e1000441.
 138. Flaherty M.S., Salis P., Evans C. J., Ekas L. A., Marouf A., Zavadil J., Banerjee U., Bach E.A. // *Dev. Cell.* 2010. V. 18. № 4. P. 556–568.
 139. Minakhina S., Tan W., Steward R. // *Dev. Biol.* 2011. V. 352. № 2. P. 308–316.
 140. Gao H., Wu X., Fossett N. // *PLoS One.* 2013. V. 8. № 9. P. e74684.
 141. Kulkarni V., Khadilkar R.J., Magadi S.S., Inamdar M.S. // *PLoS One.* 2011. V. 6. № 11. P. e27667.
 142. Sinha A., Khadilkar R.J., S V.K., Roychowdhury Sinha A., Inamdar M. S. // *Cell Rep.* 2013. V. 4. № 4. P. 649–658.
 143. Sinenko S.A., Starkova T.Y., Kuzmin A.A., Tomilin A.N. // *Front. Cell Dev. Biol.* 2021. V. 9. P. 714370.
 144. Lennicke C., Cocheme H.M. // *Mol. Cell.* 2021. V. 81. № 18. P. 3691–3707.
 145. Gao H., Wu X., Simon L., Fossett N. // *PLoS One.* 2014. V. 9. № 9. P. e107768.
 146. Cho B., Shin M., Chang E., Son S., Shin I., Shim J. // *Dev. Cell.* 2024. V. 59. № 8. P. 1075–1090.
 147. Dolezal T., Dolezelova E., Zurovec M., Bryant P. J. // *PLoS Biol.* 2005. V. 3. № 7. P. e201.
 148. Bajgar A., Dolezal T. // *PLoS Pathog.* 2018. V. 14. № 4. P. e1007022.
 149. Belenkaya T.Y., Han C., Yan D., Opoka R.J., Khodoun M., Liu H., Lin X. // *Cell.* 2004. V. 119. № 2. P. 231–244.
 150. Hao Y., Jin L.H. // *Elife.* 2017. V. 6. P. e25094.
 151. Khadilkar R.J., Vogl W., Goodwin K., Tanentzapf G. // *Elife.* 2017. V. 6. P. e28081.
 152. Labrosse C., Eslin P., Doury G., Drezen J.M., Poirie M. // *J. Insect Physiol.* 2005. V. 51. № 2. P. 161–170.
 153. Nassel D.R., Liu Y., Luo J. // *Gen. Comp. Endocrinol.* 2015. V. 221. P. 255–266.
 154. Dragojlovic-Munther M., Martinez-Agosto J.A. // *Development.* 2012. V. 139. № 20. P. 3752–3763.

УДК 618.19-006.6-033.2

Оценка экспрессии рецептора HER2/neu в ткани метастатических аксиллярных лимфатических узлов у больных раком молочной железы с применением препарата [^{99m}Tc]Tc-(HE)₃-G3

О. Д. Брагина^{1,2*}, Л. А. Таширева¹, Д. М. Лоос^{1,3}, С. В. Вторушин^{1,3}, А. А. Шульга^{2,4},
Е. Н. Коновалова^{2,4}, М. Е. Бородина⁵, В. И. Чернов^{1,2,6}, В. М. Толмачев⁷, С. М. Деев^{2,4,6}

¹Научно-исследовательский институт онкологии – филиал ФГБНУ «Томский национальный исследовательский медицинский центр Российской академии наук», Томск, 634009 Россия

²Национальный исследовательский Томский политехнический университет, Томск, 634050 Россия

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

⁴Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, Москва, 117997 Россия

⁵Московский научно-исследовательский онкологический институт имени П.А. Герцена филиал ФГБУ «НМИЦ радиологии» Минздрава России, Москва, 125284 Россия

⁶Национальный исследовательский центр «Курчатовский институт», Москва, 123098 Россия

⁷Уппсальский университет, Уппсала, 75185 Швеция

*E-mail: bragina_od@mail.ru

Поступила в редакцию 08.06.2024

Принята к печати 26.06.2024

DOI: 10.32607/actanaturae.27448

РЕФЕРАТ Анатомическая визуализация и молекулярное типирование опухолевой ткани регионарных метастатических лимфатических узлов (МАЛУ) у больных раком молочной железы являются важной клинической проблемой в современной онкологии. Препарат [^{99m}Tc]Tc-(HE)₃-G3 по результатам выполненных ранее исследований зарекомендовал себя как перспективный диагностический агент, позволяющий дифференцировать статус рецептора HER2/neu первичной опухоли молочной железы ($p < 0.05$, Mann–Whitney test). В связи с этим целью настоящего исследования является изучение возможностей использования [^{99m}Tc]Tc-(HE)₃-G3 для типирования статуса HER2/neu МАЛУ у больных раком молочной железы. Исследование было проведено на клиническом материале 20 больных раком молочной железы (T2-4N1-3M0-1) до начала системной терапии (10 больных с гиперэкспрессией HER2/neu в метастазах аксиллярных лимфатических узлов и 10 больных – с отрицательной), которым проводилось ОФЭКТ/КТ через 4 ч после введения [^{99m}Tc]Tc-(HE)₃-G3. У всех пациентов выполнялись морфологическое и иммуногистохимическое исследования опухолевой ткани метастатических аксиллярных лимфатических узлов с оценкой статуса HER2/neu. Выявлено, что использование соотношений МАЛУ/фон и МАЛУ/ШМС через 4 ч после введения [^{99m}Tc]Tc-(HE)₃-G3 следует рассматривать для типирования статуса HER2/neu в МАЛУ у больных раком молочной железы ($p < 0.05$, Mann–Whitney test). При этом, для параметра МАЛУ/фон показатели чувствительности и специфичности составили 80% при пороговом значении > 12.25 .

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА рак молочной железы, метастазы в лимфатические узлы, DARPInG3, HER2/neu, радионуклидная диагностика.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ РМЖ – рак молочной железы; УЗИ – ультразвуковое исследование; КТ – компьютерная томография; HER2/neu – human epidermal growth factor receptor-2, рецептор эпидермального

фактора роста 2 типа; РФП – радиофармацевтический препарат; мАЛУ – метастатические аксиллярные лимфатические узлы; ИГХ – иммуногистохимическое исследование; FISH – fluorescence *in situ* hybridization, флуоресцентная гибридизация *in situ*; ASCO/CAP – American Society of Clinical Oncology and the College of American Pathologists, Американское общество клинической онкологии и объединения американских патологов; ОФЭКТ – однофотонная эмиссионная компьютерная томография; ШМС – широчайшая мышца спины; SUV – standardized uptake value, стандартизированная величина поглощения.

ВВЕДЕНИЕ

Состояние регионарных лимфатических узлов при раке молочной железы (РМЖ) является важным прогностическим фактором, имеющим существенное значение как в выборе объема локального и системного лечения данной категории пациентов, так и оценке прогноза заболевания [1]. К сожалению, традиционные методы диагностики, такие, как ультразвуковое исследование (УЗИ), маммография, магнитно-резонансная томография и компьютерная томография (КТ), не характеризуются высокими показателями чувствительности и специфичности в дифференцировке нормальной и метастатической структур лимфатических узлов, что обуславливает большое количество ложноположительных и ложноотрицательных результатов на этапах догоспитального стадирования онкологического процесса [2, 3]. В то же время существует необходимость не только анатомической детекции, но и оценки молекулярного профиля всех выявленных метастатических очагов, что является важным аспектом для оценки опухолевой распространенности и определения показаний для назначения направленной (таргетной) терапии у больных раком молочной железы, существенно улучшающей показатели общей и безрецидивной выживаемости [4, 5].

В последние годы идет активное изучение таргетных радионуклидных методов визуализации, нацеленных на определенную молекулярную мишень [6, 7]. Ярким примером могут служить результаты исследований с использованием альтернативных каркасных протеинов, меченных различными радиоизотопами и нацеленных на рецептор эпидермального фактора роста 2 типа (HER2/neu) [8, 9]. Данные конструкции обладают оптимальными характеристиками для доставки диагностического изотопа к таргетному антигену: высокой специфичностью и аффинностью, низкой токсичностью, а также быстрым выведением из организма пациента, что существенно сокращает время от момента инъекции препарата до начала диагностической процедуры [10–12].

Так, данные выполненных на базе отделения радионуклидной терапии и диагностики НИИ онкологии ТНИМЦ I фаз клинических исследований препаратов [^{99m}Tc]Tc-ADAPT6 (ClinicalTrials.gov

Identifier: NCT03991260 и ClinicalTrials.gov Identifier: NCT05412446) и ^{99m}Tc-ZHER2:41071 (ClinicalTrials.gov Identifier: NCT05203497) у больных раком молочной железы продемонстрировали возможность определения статуса HER2/neu в первичной опухоли [13, 14] и метастатических лимфатических узлах у больных раком молочной железы [15]. Перспективной в отношении таргетной радионуклидной диагностики HER2-позитивного рака молочной железы также является молекула DARPInG3 (*Designed Ankyrin Repeat Proteins*), представляющая собой сконструированную на основе белков анкиринов структуру с молекулярной массой от 14 до 21 кДа и имеющая высокую тропность к рецептору эпидермального фактора роста 2 типа [16]. Данные доклинического анализа препарата [^{99m}Tc]Tc-(HE)₃-G3 в *in vitro* исследованиях [17] продемонстрировали его быстрое связывание с рецептором HER2/neu и медленную интернализацию в клеточных линиях SKOV3 и BT-74, а также более высокое накопление в HER2-позитивных SKOV3-ксенографтах по сравнению с HER2-негативными Ramos-ксенографтами и низкое накопление в печени в *in vivo* исследованиях. Результаты I фазы клинического исследования препарата [^{99m}Tc]Tc-(HE)₃-G3 (ClinicalTrials.gov Identifier: NCT05695859) в дозировке 3000 мкг показали безопасность использования данного соединения у больных раком молочной железы, а также высокую специфичность в оценке статуса HER2/neu в первичной опухоли при использовании ОФЭКТ без компьютерной томографии [18].

Целью настоящего исследования являются изучение возможностей клинического использования радиофармацевтического препарата [^{99m}Tc]Tc-(HE)₃-G3 для определения статуса HER2/neu в метастатических аксиллярных лимфатических узлах у больных раком молочной железы и выявление оптимальных параметров для определения положительного и отрицательного статуса изучаемого рецептора.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Наработка протеина

DARPIn(HE)₃-G3 (аминокислотная последовательность MRGSHENENEGSDLGKLLLEAARAGQDDEVRLMANGADVNAKEYGLTPYLATAHGHLEIVEV-

LLKNGADVNAVDAIGFTPLHLAAFIGHLEIAEVL-LKHGADVNAQDKFGKTAFDISIGNGNEDLAEILQ-KLN) синтезирован в ИБХ РАН.

Характеристика клинического материала

Исследование носило открытый, нерандомизированный и проспективный характер и было начато после регистрации на ClinicalTrials.gov Identifier: NCT15122022, одобрения биоэтического комитета НИИ онкологии ТНИМЦ и заполнения информированного согласия пациентов до введения радиофармацевтического препарата. В исследование было включено 20 больных раком молочной железы с метастатическим поражением аксиллярных лимфатических узлов (мАЛУ) (T2-4N1-3M0-1) до начала системного или локального лечения. У 10 пациенток отмечалась положительная экспрессия рецептора эпидермального фактора роста HER2/neu в мАЛУ ($n = 10$), у 10 – отрицательная ($n = 10$). Средний возраст больных, вошедших в исследование, составил 49.6 лет.

Комплексное клинично-инструментальное обследование всех пациентов на догоспитальном этапе выполнялось согласно протоколам RUSSCO (Российское общество клинической онкологии) от 2023 года. Наличие и анатомическое расположение, а также размеры опухолевых узлов молочной железы и аксиллярной области устанавливались по данным УЗИ. Средний размер первичной опухоли составлял 24 ± 5 мм, средний размер метастатического аксиллярного лимфатического узла – 20 ± 3 мм.

Морфологическое и иммуногистохимическое исследование

Во всех случаях проводились морфологическое и иммуногистохимическое исследования (ИГХ) биопсийного и/или операционного материала метастатических аксиллярных узлов с определением статуса HER2/neu самого крупного по размеру лимфатического узла по стандартным методикам. Операционный материал изучался у пациентов, у которых лечение начиналось непосредственно с хирургического этапа. Маркировка метастатического лимфатического узла для проведения ИГХ-анализа выполнялась под контролем УЗИ путем установки локализационной метки перед оперативным лечением. Положительной считалась экспрессия HER2/neu 3+ по данным ИГХ или 2+ с положительным FISH-анализом (флуоресцентная гибридизация *in situ*), к отрицательным относились случаи с экспрессией рецептора 0 и 1+ по ИГХ-исследованию, что соответствовало критериями ASCO/CAP (American Society of Clinical Oncology and the College of American Pathologists) от 2018 года [19, 20]. ИГХ-исследование

являлось референсным методом и сопоставлялось с данными радионуклидного анализа.

Приготовление препарата

Приготовление препарата $[^{99m}\text{Tc}]\text{Tc}-(\text{HE})_3\text{-G3}$ в дозировке 3000 мкг осуществлялось непосредственно перед внутривенным введением пациентам на базе отделения радионуклидной терапии и диагностики НИИ онкологии ТНИМЦ с использованием протокола, описанного ранее [18]. $[^{99m}\text{Tc}]\text{Tc}-(\text{HE})_3\text{-G3}$ очищался с помощью метода эксклюзионной хроматографии с применением стерилизованных колонок NAP-5 (Sephadex G-25, GE, Healthcare, Чикаго, Иллинойс, США), предварительно уравновешенных и элюированных стерильным натрий-фосфатным буфером. Очищенную фракцию доводили до объема 10 мл с помощью стерильного изотонического раствора NaCl. Отбирали 2 мкл соединения для определения pH и анализа радиохимической чистоты. pH лекарственного средства определяли с помощью тест-полосок для определения pH. Анализ радиохимической чистоты проводили с помощью мгновенной тонкослойной хроматографии (Agilent Technologies, Санта-Клара, Калифорния, США).

Протокол радионуклидных исследований

Оценка накопления препарата $[^{99m}\text{Tc}]\text{Tc}-(\text{HE})_3\text{-G3}$ проводилась через 4 ч после введения путем измерения максимального стандартного захвата (SUV_{max}) в метастатических аксиллярных лимфоузлах, проекции контрлатеральных аксиллярных л/у, а также проекций референсных органов, таких, как печень, широчайшая мышца спины и селезенка. Дополнительно у каждой больной рассчитывались такие параметры, как мАЛУ/фон и мАЛУ/референсные органы (табл. 1). SUV_{max} определялся в самом крупном мАЛУ, по анатомическому расположению, соответствующему описанию УЗИ и забору биопсийного материала.

Проведение радионуклидных исследований у больных раком молочной железы через 4 ч после введения выполнялось на гамма-камере Siemens Symbia Intevo Bold scanner с коллиматором низкого энергопотребления и высоким разрешением. Во всех случаях проводилось ОФЭКТ/КТ органов грудной клетки и верхнего этажа брюшной полости с реконструкцией с использованием протокола xSPECT (Siemens). Изображения были обработаны с помощью фирменного программного комплекса Syngo.via (Siemens).

Статистические методы

Для анализа и визуализации данных использовано программное обеспечение Prism 10 (GraphPad).

Таблица 1. Накопление [^{99m}Tc]Tc-(HE)₃-G3 в аксиллярных метастатических узлах (SUV_{max}), референсных органах и соотношения мАЛУ/референсные органы у больных раком молочной железы

№	SUV _{max} (мАЛУ)	SUV _{max} (фон мАЛУ)	мАЛУ/ фон	SUV _{max} (печень)	SUV _{max} (ШМС)	SUV _{max} (селезенка)	мАЛУ/ печень	мАЛУ/ ШМС	мАЛУ/ селезенка
HER2-позитивные мАЛУ									
1	1.8	0.3	6.7	9.1	0.3	4.0	0.2	6.2	0.5
2	2.6	0.2	15.2	5.2	0.3	2.5	0.5	8.6	1.04
3	2.2	0.2	13.5	3.0	0.3	1.3	0.7	6.2	1.7
4	10.7	0.3	33.3	4.7	0.4	2.5	2.3	26.0	4.3
5	8.7	0.3	34.9	5.7	0.4	2.1	1.5	21.3	4.2
6	2.4	0.4	5.9	4.1	0.2	1.7	0.6	10.9	1.5
7	14.0	0.3	41.2	2.9	0.5	3.1	4.9	25.9	4.5
8	6.5	0.1	50.3	8.7	0.4	4.2	0.8	17.7	1.6
18	8.7	0.4	23.5	3.4	0.3	4.4	2.6	27.2	1.9
19	4.8	0.1	36.9	6.9	0.3	0.1	0.7	15.0	4.8
	6.2±4.2	0.3±1.1	26.1±15.4	5.4±2.2	0.34±0.1	2.6±1.4	1.5±1.4	16.5±8.3	2.6±1.6
HER2-негативные мАЛУ									
9	3.9	0.5	8.6	6.3	0.5	2.1	0.6	8.4	1.8
10	3.1	0.4	8.5	15.2	0.2	8.1	0.2	21.1	0.3
11	1.2	0.1	11.0	0.6	0.3	4.9	2.2	4.5	0.2
12	0.5	0.2	2.3	2.7	0.0	0.4	0.2	13.2	1.3
13	3.8	0.3	13.7	9.7	0.7	5.6	0.4	5.2	0.7
14	6.8	0.4	18.9	6.2	0.6	1.9	1.1	11.4	3.5
15	6.8	0.7	10.4	10.3	0.8	3.7	0.7	8.7	1.8
16	1.0	0.7	1.5	13.8	0.5	6.6	0.1	2.1	0.1
17	5.6	0.5	10.8	10.1	0.6	2.5	0.6	9.5	2.3
20	1.7	0.4	4.5	1.5	0.3	0.9	1.2	5.6	1.8
	3.4±2.4	0.4±0.2	9.0±5.3	7.6±5.0	0.5±0.2	3.7±2.6	0.7±0.6	8.9±5.4	1.4±1.1

Примечание. мАЛУ – метастатический аксиллярный лимфатический узел; ШМС – широчайшая мышца спины.

Значения представлены в виде среднего ± стандартное отклонение (M±SD) или медианы и межквартильного размаха (Me(Q1-Q3)). Различия в поглощении органов в разные моменты времени были проанализированы с использованием однофакторного дисперсионного анализа (ANOVA). Непараметрический тест Mann–Whitney использовался для определения значимости различий между параметрами HER2-положительных и HER2-отрицательных опухолей. Для оценки прогностической ценности параметров был проведен ROC-анализ. Все критерии являлись двусторонними, и при значении уровня $p < 0.05$ различия считались достоверными.

РЕЗУЛЬТАТЫ

ИГХ-исследования

По результатам иммуногистохимического анализа у всех больных раком молочной железы, вошедших

в исследование, отмечалось совпадение статуса рецептора HER2/neu в первичной опухоли и метастатических аксиллярных лимфатических узлах.

Мечение препарата [^{99m}Tc]Tc-(HE)₃-G3 и радионуклидные исследования

Мечение препарата (рис. 1), а также проведение радионуклидной визуализации у всех больных раком молочной железы, вошедших в исследование, были выполнены согласно протоколам, описанным в «Экспериментальной части». Радиохимическая чистота препарата [^{99m}Tc]Tc-(HE)₃-G3 составила 98.7 ± 1.8%. Средняя активность введенной дозы соединения – 435 ± 138 МБк.

Накопление препарата [^{99m}Tc]Tc-(HE)₃-G3 в метастатических и контрлатеральных аксиллярных лимфатических узлах

Метастатические аксиллярные лимфатические узлы визуализировались у всех больных раком мо-

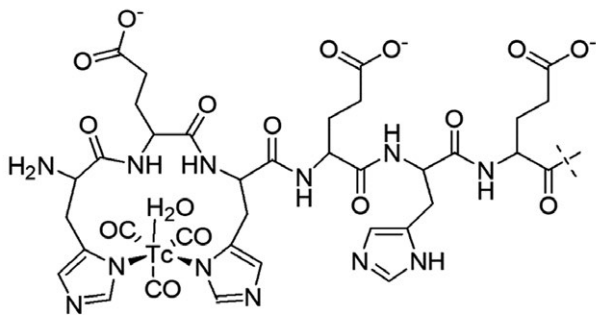


Рис. 1. Схема мечения технецием-99m по трикарбоксильной методике молекулы DARPinG3

лочной железы независимо от статуса рецептора эпидермального фактора роста 2 типа HER2/neu (рис. 2). Данные по количественному накоплению $[^{99m}\text{Tc}]\text{Tc}-(\text{HE})_3\text{-G3}$ в указанных анатомических структурах представлены в табл. 1.

Отличий в SUV_{max} в зависимости от статуса HER2/neu в МАЛУ у больных раком молочной железы (6.2 ± 4.2 для положительной экспрессии и 3.4 ± 2.4 для отрицательной) выявлено не было ($p = 0.1230$, Mann–Whitney test). В то же время показатель МАЛУ/фон имел статистические различия, в подгруппе пациентов с HER2-позитивным статусом МАЛУ значения были выше (26.1 ± 15.4), чем в случаях с отрицательными значениями изучаемого параметра (9.0 ± 5.3) ($p = 0.0115$, Mann–Whitney test) (табл. 1, рис. 3).

Накопление препарата $[^{99m}\text{Tc}]\text{Tc}-(\text{HE})_3\text{-G3}$ в референсных органах и соотношения МАЛУ к референсным органам

SUV_{max} препарата $[^{99m}\text{Tc}]\text{Tc}-(\text{HE})_3\text{-G3}$ в печени, ШМС и селезенке составил 5.4 ± 2.2 , 0.34 ± 0.1 и 2.6 ± 1.4 для HER2-положительных МАЛУ, в случаях с отрицательным статусом рецептора в МАЛУ – 7.6 ± 5.0 , 0.5 ± 0.2 и 3.7 ± 2.6 соответственно. Статистических различий в накоплении препарата $[^{99m}\text{Tc}]\text{Tc}-(\text{HE})_3\text{-G3}$ в каждом органе для случаев с положительным и отрицательным статусом HER2/neu выявлено не было ($p > 0.05$, Mann–Whitney test).

При расчете соотношений МАЛУ/референсные органы оказалось, что показатель МАЛУ/ШМС был выше в HER2-положительных МАЛУ по сравнению с HER2-отрицательными МАЛУ (16.5 ± 8.3 и 8.9 ± 5.4 соответственно) ($p = 0.035$, Mann–Whitney test) (табл. 1, рис. 4).

Определение наиболее информативного параметра для оценки статуса HER2/neu в МАЛУ при использовании препарата $[^{99m}\text{Tc}]\text{Tc}-(\text{HE})_3\text{-G3}$ у больных раком молочной железы

Для определения наиболее информативного параметра для оценки статуса HER2/neu в МАЛУ при использовании препарата $[^{99m}\text{Tc}]\text{Tc}-(\text{HE})_3\text{-G3}$ был проведен ROC-анализ, позволивший установить параметры чувствительности и специфичности каждого из них. Наиболее чувствительным и специфичным параметром для определения статуса HER2/neu в метастатических лимфатических узлах у больных раком молочной железы с помощью препара-

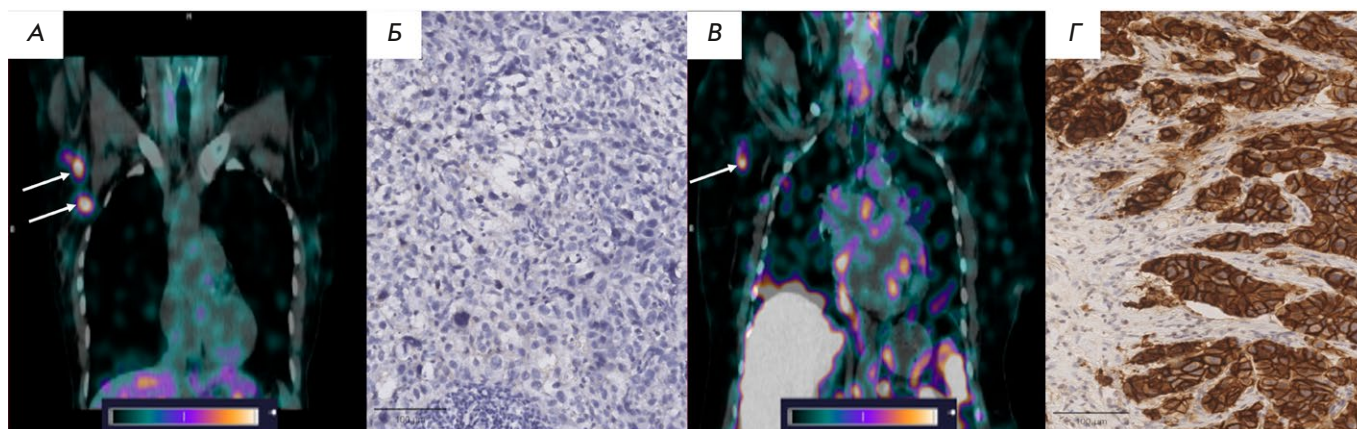


Рис. 2. Накопление препарата $[^{99m}\text{Tc}]\text{Tc}-(\text{HE})_3\text{-G3}$ в метастатических аксиллярных лимфатических узлах у больных раком молочной железы через 4 ч после введения: А – накопление препарата $[^{99m}\text{Tc}]\text{Tc}-(\text{HE})_3\text{-G3}$ в HER2-позитивных МАЛУ (указано белыми стрелками); Б – ИГХ-картина HER2-позитивного МАЛУ (увеличение $400\times$); В – накопление препарата $[^{99m}\text{Tc}]\text{Tc}-(\text{HE})_3\text{-G3}$ в HER2-негативном МАЛУ (указано белой стрелкой); Г – ИГХ-картина HER2-негативного МАЛУ (увеличение $400\times$)

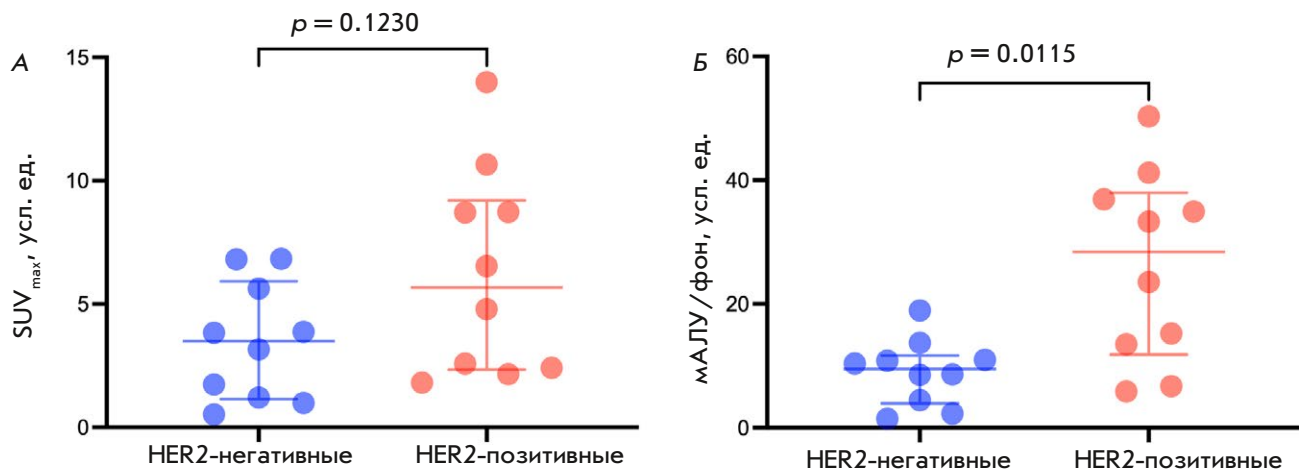


Рис. 3. SUV_{max} (А) и соотношение мАЛУ/фон (Б) через 4 ч после введения препарата $[^{99m}Tc]Tc-(HE)_3-G3$ у больных раком молочной железы с HER2-положительными и HER2-негативными метастатическими аксиллярными лимфатическими узлами

та $[^{99m}Tc]Tc-(HE)_3-G3$ являлось соотношение мАЛУ/фон – AUC 0.83 (95% ДИ 0.63–1.00), чувствительность 80% и специфичность 80%; пороговое значение > 12.25 усл. ед. Для соотношения мАЛУ/ШМС показатели составили AUC 0.78 (95% ДИ 0.58–1.00), чувствительность 70% и специфичность 70%; пороговое значение > 10.25 усл. ед. (рис. 5).

ОБСУЖДЕНИЕ

Использование альтернативных каркасных протеинов (скаффолдов) для радионуклидной рецепторной визуализации злокачественных образований является одним из перспективных направлений последних 10 лет, что обусловлено прежде всего высокой специфичностью таргетных молекул доставки и более коротким временным интервалом от момента введения препарата до начала исследования. Более того, возможность проведения диагностического этапа на современных аппаратах, совмещающих позитронно-эмиссионную томографию и однофотонную эмиссионную компьютерную томографию с данными КТ, обеспечивает более точную анатомическую визуализацию, а также измерение накопления введенного соединения *in vivo*.

Результатами I фаз клинических исследований, выполненных ранее на территории Российской Федерации на базе отделения радионуклидной терапии и диагностики НИИО ТНИМЦ в отношении HER2/neu у больных раком молочной железы, с использованием ряда диагностических радиофармацевтических препаратов ($[^{99m}Tc]Tc-(HE)_3-G3$, $[^{99m}Tc]Tc-ADAPT6$ и $^{99m}Tc-ZHER2:41071$) [13, 14, 18], была

показана не только безопасность, но и возможность типирования первичной опухоли молочной железы в зависимости от статуса HER2/neu ($p < 0.05$, Mann–Whitney test) [21]. Полученные результаты, а также расширение научного поля исследования в сторону местно-распространенных и метастатических форм рака молочной железы способствовало планированию и началу II фаз клинических исследований с препаратами $[^{99m}Tc]Tc-ADAPT6$ и $[^{99m}Tc]Tc-(HE)_3-G3$.

Опубликованные ранее результаты изучения радиофармацевтического препарата $[^{99m}Tc]Tc-ADAPT6$ в отношении определения статуса HER2/neu в метастатических аксиллярных лимфатических узлах у больных раком молочной железы продемонстрировали его высокое накопление ($SUV_{max} = 8.7 \pm 4.6$) со значительной разницей между HER2-положительными и HER2-отрицательными очагами ($p < 0.05$, Mann–Whitney test). Выполненный ROC-анализ показал, что использование порогового значения SUV_{max} (4.22) в мАЛУ обеспечивает чувствительность 92% и специфичность 100% [15].

В настоящем исследовании наиболее высокие статистические различия между HER2-положительными и HER2-негативными метастатическими очагами в аксиллярных лимфатических узлах у больных раком молочной железы через 4 ч после введения препарата $[^{99m}Tc]Tc-(HE)_3-G3$ были отмечены при использовании соотношения мАЛУ/фон 26.1 ± 15.4 ($p = 0.0115$, Mann–Whitney test). Пороговое значение параметра мАЛУ/фон по данным ROC-анализа составило 12.25, показатели чувствительности и специфичности 80%.

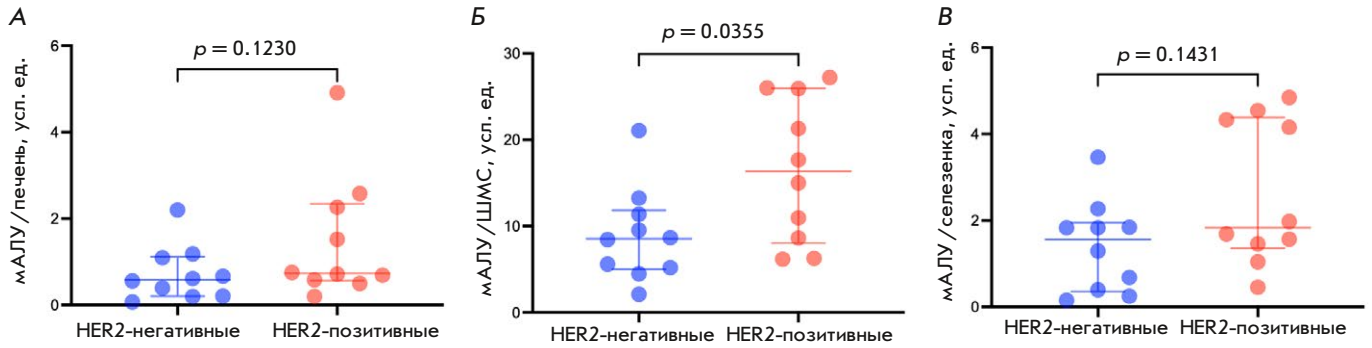


Рис. 4. Соотношения мАЛУ/печень (А), мАЛУ/ШМС (Б) и мАЛУ/селезенка (В) через 4 ч после введения препарата $[^{99m}\text{Tc}]\text{Tc}-(\text{HE})_3\text{-G3}$ у больных раком молочной железы с различным статусом HER2/neu

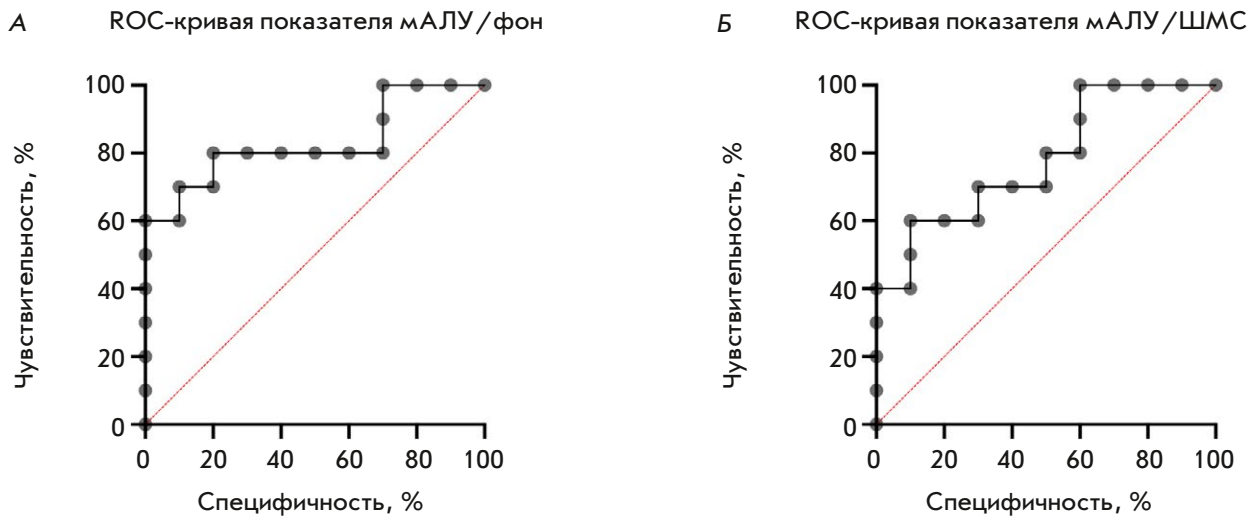


Рис. 5. ROC-кривые соотношений мАЛУ/фон (А) и мАЛУ/ШМС (Б) в определении статуса HER2/neu в мАЛУ у больных раком молочной железы через 4 ч после введения препарата $[^{99m}\text{Tc}]\text{Tc}-(\text{HE})_3\text{-G3}$

Отчасти полученные результаты подтверждают данные опубликованных ранее доклинических и клинических исследований, в которых был проведен сравнительный анализ диагностической эффективности препаратов $[^{99m}\text{Tc}]\text{Tc}\text{-ADAPT6}$ и $[^{99m}\text{Tc}]\text{Tc}-(\text{HE})_3\text{-G3}$ [22]. Так, у 11 больных HER2-положительным раком молочной железы при последовательном введении обоих диагностических препаратов в интервале 3 дня до начала системного лечения был показан более высокий захват первичной опухолью молочной железы $[^{99m}\text{Tc}]\text{Tc}\text{-ADAPT6}$ ($\text{SUV}_{\text{max}} = 4.7 \pm 2.1$) через 2 ч после введения по сравнению с $[^{99m}\text{Tc}]\text{Tc}-(\text{HE})_3\text{-G3}$ ($\text{SUV}_{\text{max}} = 3.5 \pm 1.7$) через 4 ч после введения ($p < 0.005$, paired t-test). При этом соотношение опухоль/фон в обоих случаях (15.2 ± 7.4 для $[^{99m}\text{Tc}]\text{Tc}\text{-ADAPT6}$ и 19.6 ± 12.4 для $[^{99m}\text{Tc}]\text{Tc}-(\text{HE})_3\text{-G3}$) статистически не имело различий ($p > 0.05$, paired t-test) [23].

По данным обоих исследований, $[^{99m}\text{Tc}]\text{Tc}\text{-ADAPT6}$ показал себя оптимальным препаратом для типирования первичного поражения молочной железы с возможностью дифференцировать статус рецептора HER2/neu. Это важно для оптимизации диагностического этапа и назначения таргетного лечения.

Принимая во внимание, что, в отличие от протеина ADAPT6, $[^{99m}\text{Tc}]\text{Tc}-(\text{HE})_3\text{-G3}$ не конкурирует с трастузумабом, связываясь с другими эпитопами HER2/neu, он может быть полезен в клинической практике для оценки мониторинга предоперационной системной терапии у больных с гиперэкспрессией HER2/neu.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Препарат $[^{99m}\text{Tc}]\text{Tc}-(\text{HE})_3\text{-G3}$ показал эффективность в отношении дифференцировки статуса HER2/neu в метастатических аксиллярных лимфатических

узлах у больных раком молочной железы, продемонстрировав соотношения мАЛУ/фон с показателями чувствительности и специфичности, равными 80%. Для расширения показаний для клинического применения следует продолжить изучение [^{99m}Tc] Tc-(HE)₃-G3 в динамике предоперационного систем-

ного лечения у больных раком молочной железы с гиперэкспрессией HER2/neu. ●

Работа поддержана грантом Министерства науки и высшего образования РФ № 075-15-2024-536.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Ge I., Erbes T., Juhasz-Böss I. // Gynecol Obstet Actions. 2022. V. 306. № 4. P. 943–957. doi: 10.1007/s00404-021-06352-9
- Chen H., Zhou J., Chen Q., Deng Y. // Medicine (Baltimore). 2021. V. 100. № 26. P. e26531. doi: 10.1097/MD.00000000000026531
- Sood R., Rositch A.F., Shakoor D., Ambinder E., Pool K., Pollak E., Mollura D., Mullen L., Harvey S. // Glob Oncol. 2019. V. 5. P. 1–17. doi: 10.1200/JGO.19.00127
- Han L., Li L., Wang N., Xiong Y., Li Y., Gu Y. // Interferon Cytokine Res. 2018. V. 38. № 12. P. 578–582. doi: 10.1089/jir.2018.0085
- Lower E.E., Khan S., Kennedy D., Baughman R.P. // Breast Cancer – Targets and Therapy. 2017. V. 9. P. 515–520. doi: 10.2147/BCTT.S137709
- Gebauer M., Skerra A. // Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol. 2020. V. 60. P. 391–415. doi: 10.1146/annurev-pharmtox-010818-021118.
- Tolmachev V., Orlova A., Sorensen J. // Semin. Cancer Biol. 2021. V. 72. P. 185–197. doi: 10.1016/j.semcancer.2020.10.005.
- Bragina O.D., Deyev S.M., Chernov V.I., Tolmachev V.M. // Acta Naturae. 2022. V. 14. № 2. P. 4–15. doi: 10.32607/actanaturae.11611
- Pernas S., Tolaney S.M. // Ther. Adv. Med. Oncol. 2019. V. 11. P. 1758835919833519. doi: 10.1177/1758835919833519
- Tolmachev V.M., Chernov V.I., Deyev S.M. // Russ. Chem. Rev. 2022. V. 91. RCR5034. <https://doi.org/10.1070/RCR5034>
- Krasniqi A., D'Huyvetter M., Devoogdt N., Frejd F.Y., Sorensen J., Orlova A., Keyaerts M., Tolmachev V. // J. Nucl. Med. 2018. V. 59. P. 885–891. doi: 10.2967/jnumed.117.199901
- Eissler N., Altena R., Alhuseinalkhudhur A., Bragina O., Feldwisch J., Wuerth Q., Loftenius A., Brun N., Axelsson R., Tolmachev V., et al. // Biomedicines. 2024. V. 12. № 5. P. 1088. doi: 10.3390/biomedicines12051088
- Bragina O., von Witting E., Garousi J., Zeltchan R., Sandstrom M., Orlova A., Medvedeva A., Doroshenko A., Vorobyeva A., Lindbo S., et al. // J. Nucl. Med. 2021. V. 62. P. 493–499. doi: 10.2967/jnumed.120.248799.
- Bragina O., Chernov V., Larkina M., Rybina A., Zelchan R., Garbukov E., Oroujeni M., Loftenius A., Orlova A., Sorensen J., et al. // Theranostics. 2023. V. 13. P. 4858–4871. doi: 10.7150/thno.86770.
- Bragina O., Tashireva L., Loos D., Chernov V., Hober S., Tolmachev V. // Pharmaceutics. 2024. V. 16. № 4. P. 445. doi: 10.3390/pharmaceutics16040445.
- Shilova O.N., Deyev S.M. // Acta Naturae. 2019. V. 11. № 4. P. 42–53. doi: 10.32607/20758251-2019-11-4-42-53
- Vorobyeva A., Schulga A., Konovalova E., Güler R., Löfblom J., Sandström M., Garousi J., Chernov V., Bragina O., Orlova A., et al. // Sci. Rep. 2019. V. 9. № 1. P. 9405.
- Bragina O., Chernov V., Schulga A., Konovalova E., Garbukov E., Vorobyeva A., Orlova A., Tashireva L., Sorensen J., Zelchan R., et al. // J. Nucl. Medicine. 2022. V. 63. № 4. P. 528–535. doi: <https://doi.org/10.2967/jnumed.121.262542>
- Wolff A.C., Hammond M.E.H., Allison K.H., Harvey B.E., Mangu P.B., Bartlett J.M., Bilous M., Ellis I.O., Fitzgibbons P., Hanna W., et al. // Pathol. Lab. Med. 2018. V. 42. P. 1364–1382. doi: 10.1200/JCO.2018.77.8738
- Wolff A.C., Somerfield M.R., Dowsett M., Hammond M.E.H., Hayes D.F., McShane L.M., Saphner T.J., Spears P.A., Allison K.H. // J. Clin. Oncol. 2023. V. 41. P. 3867–3872. doi: 10.1200/JCO.22.02864.
- Bragina O.D., Chernov V.I., Garbukov E.Yu., Doroshenko A.V., Vorobyeva A.G., Orlova A.M., Tolmachev V.M. // Bull. Siberian Medicine. 2021. V. 20. № 1. P. 23–30. <https://doi.org/10.20538/1682-0363-2021-1-23-30>
- Tolmachev V., Bodenko V., Oroujeni M., Deyev S., Konovalova E., Shulga A., Lindbo S., Hober S., Orlova A., Vorobyeva A. // Int. J. Mol. Sci. 2022. V. 23. № 23. P. 15181. doi: 10.3390/ijms232315181.
- Bragina O., Chernov V., Shulga A., Konovalova E., Hober S., Deyev S., Sorensen J., Tolmachev V. // Cancers. 2023. V. 15. P. 3149. doi: 10.3390/cancers15123149.

УДК 551.4.025, 578.7

Особенности экспериментальной работы с приматами вида *Callithrix jacchus* в ходе доклинических испытаний противовирусных вакцин

И. В. Гордейчук^{1,2*}, О. С. Ганчарова^{1,3}, С. А. Гуляев¹, Т. В. Гуляева¹, А. С. Житкевич¹, Д. В. Авдошина¹, А. В. Мороз¹, А. С. Лунин¹, С. Е. Соцкова¹, Е. А. Кордубан¹, А. И. Тухватулин⁴, Е. О. Баюрова¹, А. А. Ишмухаметов^{1,2}

¹Федеральный научный центр исследований и разработки иммунобиологических препаратов им. М.П. Чумакова РАН (Институт полиомиелита), Москва, 108819 Россия

²Институт трансляционной медицины и биотехнологии, Сеченовский университет, Москва, 117418 Россия

³Научно-исследовательский институт физико-химической биологии имени А.Н. Белозерского Московского государственного университета имени М.В. Ломоносова, Москва, 119992 Россия

⁴Национальный исследовательский центр эпидемиологии и микробиологии имени почетного академика Н.Ф. Гамалеи Министерства здравоохранения Российской Федерации, Москва, 123098 Россия

*E-mail: gordeychuk_iv@chumakovs.su

Поступила в редакцию 21.01.2024

Принята к печати 04.04.2024

DOI: 10.32607/actanaturae.27372

РЕФЕРАТ *Callithrix jacchus* – вид приматов Нового Света, представляющий интерес для доклинических испытаний иммунобиологических препаратов. В ходе данного исследования разработаны подходы к длительному лабораторному содержанию и разведению *C. jacchus*, установлены референсные значения основных клинических и биохимических показателей крови, оцениваемых в ходе доклинических испытаний иммунобиологических препаратов, а также проведено гистологическое описание структуры лимфоидных органов в норме и в ходе формирования поствакцинального иммунного ответа. Показано, что *C. jacchus*, выращенные в лабораторных условиях, исключающих фоновую инфекционную патологию, являются адекватной моделью, позволяющей с высоким уровнем достоверности характеризовать профиль безопасности и иммуногенности противовирусных вакцин в ходе доклинических испытаний.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА лабораторные приматы, *Callithrix jacchus*, разведение приматов в условиях лаборатории, противовирусные вакцины, безопасность и иммуногенность вакцин.

ВВЕДЕНИЕ

Приматы являются наиболее релевантной лабораторной моделью для большинства вирусных заболеваний человека, позволяющей воспроизводить все этапы развития инфекции, включая путь заражения, места репликации вируса, особенности патогенеза и формирование всех звеньев иммунного ответа. В настоящее время завершающие этапы доклинических испытаний эффективности и безопасности противовирусных вакцин в основном проводятся на макаках-резусах (*Macaca mulatta*), яванских макаках (*M. fascicularis*) и зеленых марьяшках

(*Chlorocebus sabaeus*), однако длительное содержание большого количества крупных приматов в экспериментальных лабораториях связано с этическими ограничениями и крайне высокими затратами, а приматы, содержащиеся в открытых питомниках, перед использованием в лаборатории требуют длительной акклиматизации и обследования, исключающего наличие сопутствующей патологии. Кроме того, у макак наблюдается значительно более высокая, чем у людей, вариабельность генов главного комплекса гистосовместимости (МНС) класса I, что в ряде случаев требует генотипирования жи-

вотных перед включением в эксперимент или значительного увеличения численности экспериментальных групп, дополнительно повышая стоимость исследований [1].

Обыкновенные игрунки *Callithrix jacchus* (*C. jacchus*) используются во многих областях биомедицинских исследований, включая репродуктивную биологию, когнитивные исследования, изучение аутоиммунных заболеваний, инфекционных болезней, онкологию и токсикологию [2]. Клетки *C. jacchus* также используются в эмбриологии и регенеративной медицине [3].

C. jacchus как биологический вид обладает рядом характеристик, обуславливающих их применимость в качестве лабораторной модели. К таким характеристикам относятся: (1) филогенетическая близость к человеку; (2) небольшая масса тела (300–500 г); (3) относительная простота содержания и разведения в лабораторных условиях [4]. Важной особенностью *C. jacchus* является минимальное разнообразие локусов МНС как класса I, так и II [5, 6], что способствует получению высоко воспроизводимых результатов.

C. jacchus восприимчивы ко многим вирусным, протозойным и бактериальным патогенам человека [7], включая вирус желтой лихорадки, вирус Эпштейна–Барр и другие герпесвирусы, вирус гепатита А, вирус Хунин, вирус кори, вирус гепатита Е и др. При этом работа с патогенами при использовании *C. jacchus* технически значительно менее сложна, и, соответственно, представляет меньшую опасность для экспериментатора, чем работа с крупными приматами. Кроме того, геном *C. jacchus* полностью расшифрован, что позволяет использовать этих приматов в *in vivo* испытаниях новых генотерапевтических препаратов, а также получать трансгенных животных [8, 9].

В сочетании с разработанными в последние годы методиками оценки гуморального и Т-клеточного иммунного ответа [10] описанные выше факторы делают вид *C. jacchus* оптимальной моделью для оценки безопасности, иммуногенности и эффективности противовирусных вакцин. Тем не менее, более широкое экспериментальное применение *C. jacchus* требует решения ряда задач, включая разработку и стандартизацию условий их длительного лабораторного содержания, а также функциональную и морфологическую характеристику органов иммунной системы.

В основе данной работы оптимизированы условия длительного лабораторного содержания животных, выработаны подходы к их разведению, установлены референсные значения основных клинических и биохимических показателей крови, оцениваемых

при проведении доклинических испытаний противовирусных вакцин, а также описаны гистологические характеристики лимфоидных органов *C. jacchus* в норме и при формировании поствакцинального иммунного ответа.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Этические требования

Протоколы всех описанных экспериментов с участием приматов одобрены Этическим комитетом ФНЦИРИП им. М.П. Чумакова РАН (Институт полиомиелита) (протоколы № 110520-1 от 11.05.2020 г., № 140720-1 от 14.07.2020 г. и № 141021-2 от 14.10.2021 г.).

Содержание и разведение приматов *C. jacchus* в лабораторных условиях

Животных содержали в виварии Лаборатории моделирования иммунобиологических процессов с экспериментальной клиникой игрунковых обезьян ФНЦИРИП им. М.П. Чумакова РАН (Институт полиомиелита) (далее – Лаборатории) в соответствии с СП 3.3686-21 «Санитарно-эпидемиологические требования по профилактике инфекционных болезней», ГОСТ 33218-2014 «Руководство по содержанию и уходу за лабораторными животными» и Директивой Европейского парламента и Совета Европейского союза 2010/63/ЕС от 22.09.2010 года по охране животных, используемых в научных целях.

Помещения Лаборатории включают зону разведения и экспериментальную зону с разделенными потоками перемещения персонала и материалов. Система автоматической вентиляции и кондиционирования круглогодично обеспечивает температуру воздуха в интервале 24–30°C, влажность не ниже 50% и содержит два независимых контура для чистой и грязной зоны.

Комнаты зоны разведения оснащены окнами для естественной инсоляции, а также лампами дневного света с круглогодичным ежедневным включением с 7:00 по 17:00.

В зоне разведения *C. jacchus* содержали семейными группами в вольерах размером 810 × 470 × 1760 мм (Д×Г×В). Семейные группы *C. jacchus* включали пару взрослых животных с двумя поколениями их потомства. Общая численность животных на один вольер в зоне разведения могла достигать шести. В возрасте 10–13 месяцев взрослых особей отсаживали в отдельные вольеры для неполовозрелых животных. Новые семейные пары составляли из приматов в возрасте не менее 18 месяцев с последующим наблюдением с целью оценки индивидуальной совместимости новой пары.

Энергетическая ценность рациона, используемого в Лаборатории, составляла 140 ккал в сутки на взрослое животное массой 350–450 г, при этом 18–24% составлял белок, получаемый из отварного куриного мяса, яиц, гречневой каши, овсяной каши и творожной запеканки. Рацион ежедневно дополнялся 360 МЕ витамина D₃, глюконатом кальция и витаминным комплексом.

Разборные автоклавируемые капельные поилки объемом 100 мл с питьевой водой, соответствующей ГОСТ Р 51232-98, закреплялись на стенках верхнего уровня каждого вольера.

Очистка поддонов вольеров от остатков пищи производилась ежедневно до утренней раздачи кормов и после полудня по мере загрязнения. Биологические отходы, получаемые в экспериментальной зоне, обеззараживали путем автоклавирования.

Условия проведения экспериментальных манипуляций

Все манипуляции с приматами проводились сертифицированными ветеринарными врачами либо специалистом, имеющим сертификат Федерации европейских научных ассоциаций по лабораторным животным (FELASA), прошедшим курс обучения работе с приматами.

Экспериментальные процедуры проводились в боксе микробиологической безопасности 2 класса типа А в исполнении vis-a-vis, установленном в операционной, оборудованной для проведения всех видов процедур с *S. jacchus* – от взятия биоматериала и введения экспериментальных препаратов до хирургических вмешательств.

Ингаляционную общую анестезию проводили с использованием прибора 410AP Anesthesia Unit (Univentor, Мальта) путем подачи животному через полнолицевую маску потока воздушно-газовой смеси, содержащей 4% изофлурана для индукции и 2–2,5% для поддержания наркоза.

Для идентификации животных использовали подкожные радиочипы стандарта ISO 11784 (LifeChip, Destron Fearing, США) в капсулах из биосовместимого стекла с антимиграционным покрытием. Микрочип является энергетически пассивным устройством без источника питания, что обеспечивает возможность его использования в течение всей жизни животного.

Массу тела приматов определяли с помощью электронных весов Pioneer PA4102 (Ohaus, США).

Все экспериментальные манипуляции с приматами проводились в операционной при исключении визуального и аудиального контакта животного, находившегося в эксперименте, с другими животными.

Методики оценки клинических и биохимических параметров крови

Взятие образцов цельной крови для клинического и биохимического анализа проводилось путем пункции бедренной вены с использованием трехкомпонентных шприцев объемом 2,5 мл с иглами 27G. Максимальный одновременно забираемый объем крови составлял 3 мл, что не превышает 8% циркулирующего объема. Для клинического анализа крови в шприцы предварительно набирался раствор Na-EDTA (финальная концентрация – 5 ммоль Na-EDTA на литр крови). Для биохимического анализа кровь собирали в сухие стерильные пробирки, перемешивали и выдерживали в течение 45 мин при комнатной температуре, после чего сыворотка отделялась центрифугированием (5810R, Eppendorf, Германия) при 600 *g* в течение 10 мин.

Клинический анализ крови с подсчетом количества эритроцитов и лейкоцитов, а также с определением лейкоцитарной формулы с окрашиванием по Романовскому проводили с использованием камеры Горяева.

Биохимический анализ сывороток крови животных проводили с использованием автоматизированного биохимического анализатора Cobas с 111 (Roche, Швейцария) с соответствующими наборами реактивов. Значения ниже минимального уровня детекции прибора учитывали как 0.

Гистологическое исследование поствакцинальных изменений в лимфоидных органах

Для исследования поствакцинальных изменений в лимфоидных органах *S. jacchus* использовали семь животных (три самца и четыре самки) в возрасте 2–5 лет, рожденных в Лаборатории и участвовавших в доклинических испытаниях инактивированной цельновирионной очищенной сорбированной вакцины КовиВак против COVID-19 [11].

В день первой иммунизации, а также через 14 суток в бедренные мышцы правой и левой нижних конечностей животным из экспериментальной группы вводили по 250 мкл препарата вакцины в виде суспензии для внутримышечного введения (суммарный введенный объем – 500 мкл на животное). Животным контрольной группы в те же дни вводили препарат плацебо, содержащий вакцинный адъювант (гидроксид алюминия), тем же путем, в том же объеме.

Эвтаназию проводили путем передозировки наркоза (внутримышечное введение трехкратной дозы смеси препаратов Ксила (De Adelaar, Нидерланды) и Золетил (Virbac, Франция)) под изофлурановой анестезией.

Лимфоидные органы (тимус, селезенка, мезентериальный лимфатический узел и паховый лим-

фатический узел, региональный к месту введения препарата) для гистологического исследования были зафиксированы сразу после некропсии путем погружения в 10% забуференный формалин («Биовитрум», Россия).

Образцы органов подвергали автоматизированной гистологической проводке, включавшей последовательную дегидратацию в повышающихся концентрациях этанола и в ксилоле, заливку в парафиновую среду Histomix («Биовитрум») на заливочной станции Leica EG1150H (Leica, Германия) и микротомии полученных блоков с образцами на ротационном микротоме Leica RM 2245 (Leica) с получением парафиновых срезов толщиной 3 мкм. Срезы лимфоидных органов монтировали на предметных стеклах, высушивали, депарафинировали, гидратировали, окрашивали квасцовым гематоксилином и водно-спиртовым эозином («Биовитрум») и заключали под покровные стекла в среду BioMount (Bio-Optica, Италия) для получения постоянных гистологических препаратов. С одного блока получали 1–4 репрезентативных среза надлежащего качества.

Готовые срезы анализировали под световым микроскопом Zeiss Axio Observer A1 (Carl Zeiss, Германия). Репрезентативные микрофотографии получали с помощью камеры высокого разрешения Digital Microscopy Camera AxioCam 305 в программном обеспечении Zeiss Zen 2 lite blue edition (Carl Zeiss). Обработку микрофотографий и составление панелей проводили с использованием программного обеспечения AxioVision v.3.0 (Carl Zeiss) и GIMP (S. Kimball, P. Mattis, США).

Статистический анализ

Возраст самок на момент родов, выживаемость потомства в неонатальном периоде, а также интервалы между родами представлены в виде среднего значения и стандартного отклонения (СО). Статистическую значимость различий параметров клинического и биохимического анализа крови оценивали с использованием критерия Манна–Уитни в программе GraphPad Prism 9 (9.3.0). Различия считали значимыми при $p < 0.05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Разведение *Callithrix jacchus* в условиях лабораторного содержания

Ретроспективное исследование проводилось на основании данных наблюдения за 23 родившимися в Лаборатории самками *C. jacchus*, у которых с 2015 по 2023 год в общей сложности произошло 69 родов. Результаты оценки среднего возраста самок на мо-

мент первых родов, а также среднего интервала между родами представлены на *рис. 1*.

Средний возраст самок на момент первых родов составил 37 (СО 12.2) месяцев, минимальный – 24.2 месяца (*рис. 1А*).

Средний интервал между родами в период наблюдения составил 220.1 (СО 102.9) суток, при этом в 21 из 46 случаев роды наступали через 148–158 суток после предыдущих (*рис. 1Б*). Поскольку продолжительность беременности у *C. jacchus* составляет в среднем 143–144 суток [4], наиболее часто наблюдаемый нами интервал между родами в 148–158 суток свидетельствует о том, что новое зачатие происходило в течение одной-двух недель после родов.

В общей сложности за исследуемый период одни роды произошли у 7 из 23 наблюдавшихся самок, двое – у 4, трое – у 8, четверо родов – у 2, восемь родов – у 1 и 14 родов у 1. Выжившими считались все детеныши, прошедшие неонатальный период, так как смертность после 28 суток жизни полностью отсутствовала. Основной причиной смерти детенышей были нарушения работы желудочно-кишечного тракта в первые 3-е суток после родов. Детенышей, погибших в неонатальном периоде, учитывали как мертворожденных. Таким образом, среднее количество выживших детенышей на одни роды в ходе периода наблюдения составило 1.45, при этом значительно различаясь между отдельными самками.

За период наблюдения наиболее частым результатом родов ($N = 69$) у самок *C. jacchus* в условиях лабораторного содержания было рождение двух детенышей (31/69). Один живой детеныш родился в 20/69 случаев, трое – в 6/69. В 12 случаях роды закончились появлением от 1 до 5 мертворожденных детенышей или их гибелью в течение первых 3-х суток.

Согласно нашим наблюдениям, значимые изменения плодовитости у самок отсутствовали как минимум до восьмьх-девятих родов, однако данный вывод требует дополнительного подтверждения, так как за период наблюдения только у двух самок из 23 произошло более четырех родов.

В апреле 2023 года в течение недели было проведено взвешивание 69 содержащихся в Лаборатории животных (37 самцов и 32 самки в возрасте от 2.6 мес. до 9.6 лет). Результаты приведены на *рис. 2*.

В результате эксперимента установлено, что наиболее быстро масса тела *C. jacchus* нарастала в течение первых полутора лет жизни. К 18–20 мес. масса тела животных в среднем достигала 400 г и оставалась на том же уровне у всех исследованных животных до 9.6 лет. Не выявлено значимых

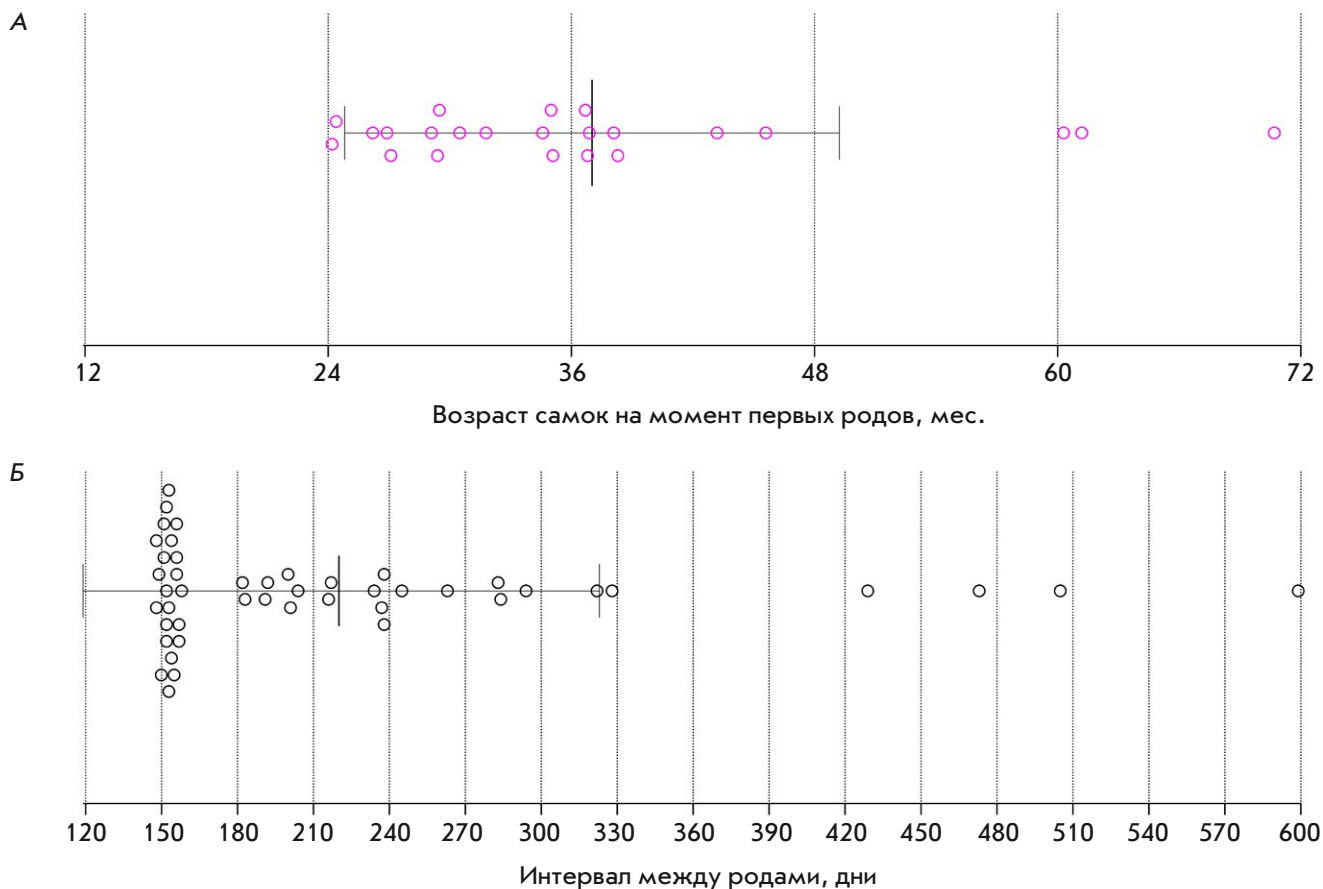


Рис. 1. Частота родов у самок *S. jacchus* в условиях лабораторного содержания. Розовыми окружностями обозначен возраст самок ($n = 23$) на момент первых родов (А). Черными окружностями обозначены интервалы между родами ($n = 46$) (Б). Вертикальными сплошными линиями обозначены среднее и стандартное отклонение

различий между массой тела самцов и самок (критерий Манна–Уитни, $p = 0.0823$).

Определение референсных значений клинического и биохимического анализа крови

С целью определения референсных значений результатов клинического анализа крови с мая 2020 по декабрь 2021 года в общей сложности были взяты образцы крови 38 *S. jacchus* (26 самцов и 12 самок) в возрасте 2–5 лет. Результаты оценки параметров клинического анализа крови у животных, содержащихся в Лаборатории, приведены на рис. 3.

Среднее количество эритроцитов в крови *S. jacchus*, содержащихся в Лаборатории, составило 6.6 (4.1–9.2) млн клеток/мкл; лейкоцитов – 7.8 (3.9–15.3) тыс. клеток/мкл. В лейкоцитарной формуле средняя доля лимфоцитов составила 32.8 (10–60)%, сегментоядерных нейтрофилов – 61.8 (37–89)%, палочкоядерных нейтрофилов – 0.8 (0–3)%, моноцитов – 4.3 (1–8)%, базофи-

лов – 0.2 (0–1)%, эозинофилов – 0.1 (0–1)%. У самок в крови в среднем наблюдалось большее количество лейкоцитов (критерий Манна–Уитни, $p = 0.0047$), чем у самцов. Не выявлено статистически значимых различий в значениях других параметров крови между самцами и самками.

С целью определения референсных значений биохимических параметров крови у *S. jacchus*, содержащихся в Лаборатории, оценивали уровень креатинина у 20 животных (10 самцов и 10 самок), триглицеридов – у 12 животных (5 самцов и 7 самок), амилазы – у 8 животных (5 самцов и 3 самок), С-реактивного белка – у 26 животных (21 самец и 5 самок), остальные параметры оценивали у 38 животных (26 самцов и 12 самок). Результаты биохимического анализа крови у животных, содержащихся в Лаборатории, приведены на рис. 4.

Среднее содержание общего белка в сыроворотке крови *S. jacchus*, содержащихся в Лаборатории, составило 71.3 (65–77.8) г/л; альбу-

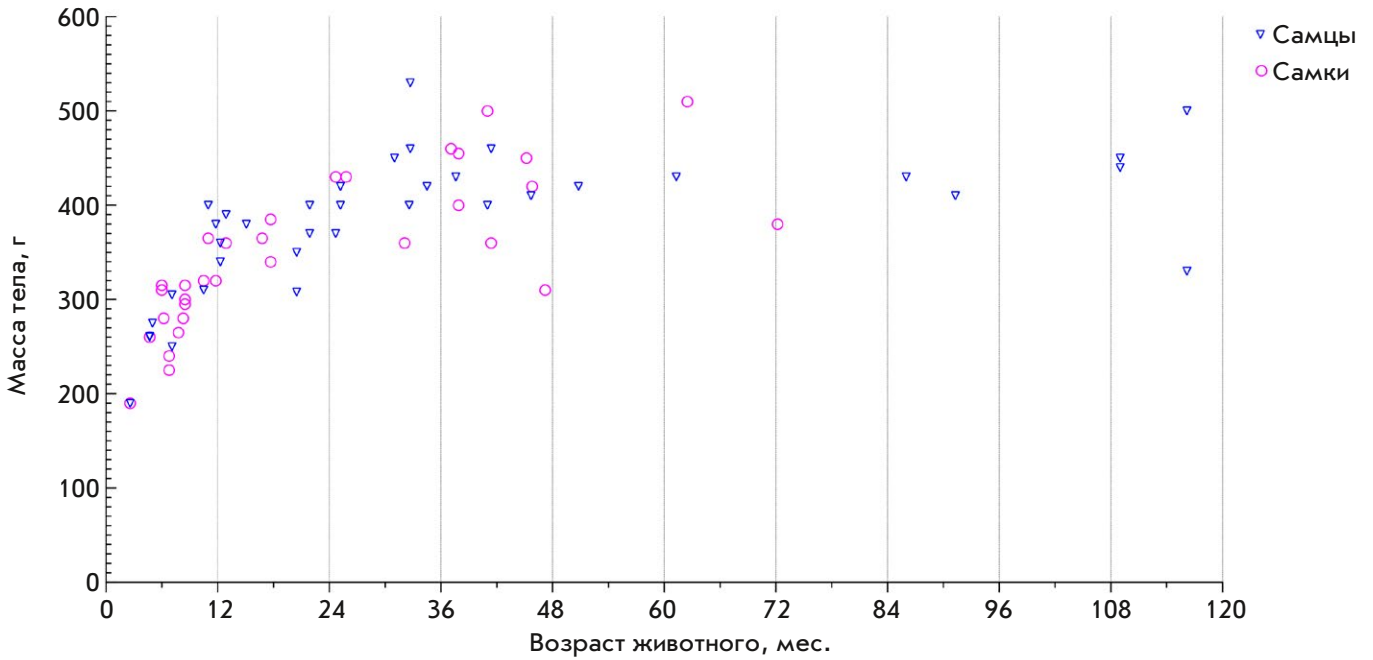


Рис. 2. Масса тела и возраст *C. jacchus*, содержащихся в Лаборатории. Общее количество животных – 69; самцов 37, самок 32

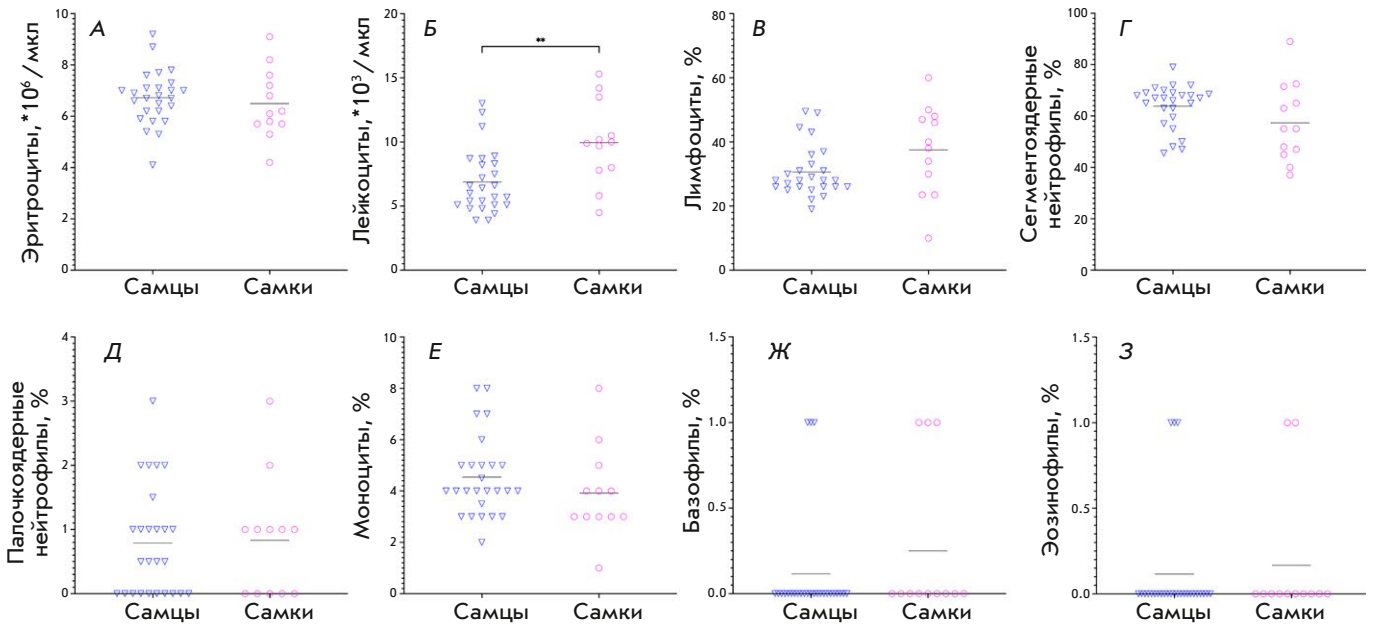


Рис. 3. Количество эритроцитов (А) и лейкоцитов (Б), а также доля лимфоцитов (В), сегментоядерных нейтрофилов (Г), палочкоядерных нейтрофилов (Д), моноцитов (Е), базофилов (Ж) и эозинофилов (З) в лейкоцитарной формуле крови *C. jacchus* ($N = 38$), содержащихся в Лаборатории. Горизонтальными линиями показаны средние значения. Статистическую значимость различий исследуемых параметров между самцами и самками оценивали с использованием критерия Манна–Уитни. **Статистически значимые различия ($p < 0.05$)

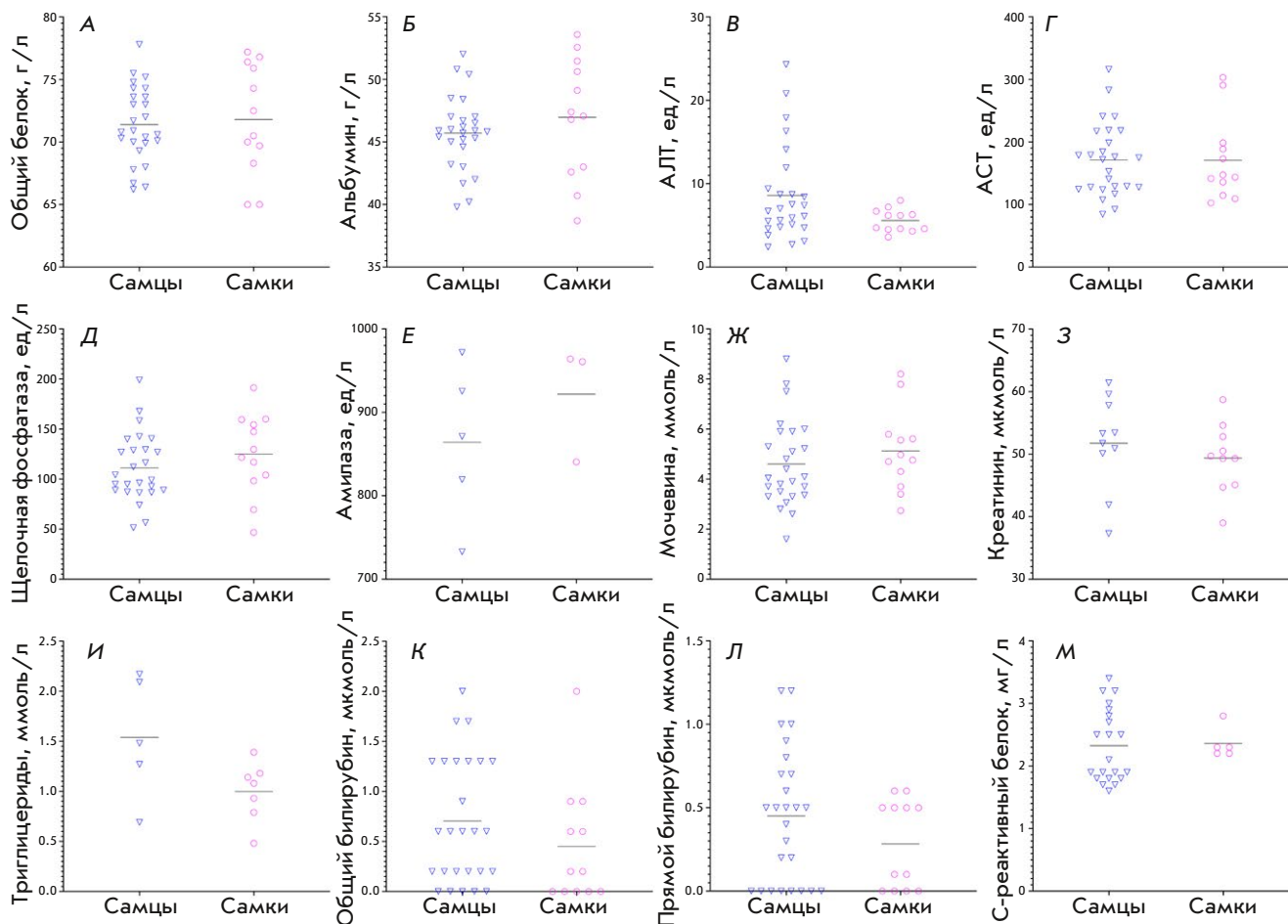


Рис. 4. Результаты биохимического анализа крови приматов *C. jacchus*, содержащихся в Лаборатории. Представлены уровни общего белка (А), альбумина (Б), аланинаминотрансферазы [АЛТ] (В), аспаратаминотрансферазы [АСТ] (Г), щелочной фосфатазы (Д), амилазы (Е), мочевины (Ж), креатинина (З), триглицеридов (И), общего билирубина (К), прямого билирубина (Л) и С-реактивного белка (М). Уровни креатинина определяли у 20 животных, триглицериды у 12, амилазу у 8, С-реактивный белок – у 26; остальные показатели – у 38. Горизонтальными линиями показано среднее значение. Статистическую значимость различий исследуемых параметров между самцами и самками оценивали с использованием критерия Манна–Уитни

мина – 44.8 (38.7–53.58) г/л; активности АЛТ – 8.0 (2.4–24.3) ед/л; АСТ – 182.8 (84.3–316.1) ед/л; щелочной фосфатазы – 106.5 (46.7–199) ед/л; амилазы – 885.7 (732.9–964) ед/л; содержание мочевины – 4.8 (1.6–8.8) ммоль/л; креатинина – 51 (37.3–61.4) мкмоль/л; триглицеридов – 1.22 (0.48–2.17) ммоль/л; общего билирубина – 0.8 (0–2) мкмоль/л; прямого билирубина – 0.4 (0–1.2) мкмоль/л; С-реактивного белка – 2.3 (1.6–3.4) мг/л. Не выявлено статистически значимых различий в биохимических параметрах крови у самцов и самок (критерий Манна–Уитни, $p > 0.05$ для всех показателей).

Исследование поствакцинальных изменений в лимфоидных органах приматов *Callithrix jacchus*

В ходе доклинических испытаний инактивированной очищенной цельновирионной сорбированной вакцины против COVID-19 КовиВак было проведено гистологическое исследование основных лимфоидных органов у четырех вакцинированных (один самец и три самки) и трех контрольных (два самца и одна самка) *C. jacchus* в возрасте 2–5 лет. Охарактеризована морфологическая структура лимфоидных органов у животных, получавших плацебо,

а также описаны изменения микроструктуры тимуса, селезенки и лимфатических узлов, наблюдаемые в ходе формирования специфического поствакцинального иммунного ответа.

Морфология лимфоидных органов контрольных животных. Тимус (рис. 5А) был сохранен у всех животных. Морфологически легко различались более светлое мозговое и более темное корковое вещество органа. Акцидентальная (стрессовая) инволюция коркового вещества тимуса отсутствовала или была выражена минимально, как и липоматоз коркового вещества. Гистологическое строение органа соответствовало описанной в литературе видовой норме [12], в том числе присутствовали тельца Гассалья мозгового вещества.

В селезенке (рис. 5В) контрольных приматов выявлено правильное строение белой и красной пульпы: атрофические и дистрофические изменения отсутствовали, патологическое расширение зон белой пульпы не наблюдалось, красная пульпа умеренно полнокровна. Макрофаги селезенки контрольных животных не демонстрировали вакуолизации или видимого накопления компонентов адъюванта (геля гидроокиси алюминия) либо иных веществ. Морфологические признаки миелоидной метаплазии красной пульпы у всех исследованных животных отсутствовали.

У контрольных животных паховый лимфатический узел, регионарный к месту введения плацебо (рис. 5Д), был построен правильно, состоял из коркового плато, паракортикальной зоны с медуллярными тяжами и системы синусов. У всех исследованных животных лимфатический узел не имел патологических изменений, соответствуя морфологически видовой норме.

Мезентериальный лимфатический узел (не показано) как у вакцинированных, так и у контрольных животных не имел особенностей и патологических изменений и демонстрировал морфологические проявления иммуногенеза: ярко выраженные герминативные (светлые) центры в корковом плато и минимально выраженный гистиоцитоз краевого синуса, что является нормальным отражением функции органа, получающего постоянную антигенную стимуляцию из кишечника.

Морфология лимфоидных органов вакцинированных животных. Тимус вакцинированных животных (рис. 5Б) не отличался морфологически от тимуса животных, получавших плацебо. Тимус является первичным лимфоидным органом, в котором при антиген-опосредованном В-иммуногенезе не возникают морфофункциональные изменения.

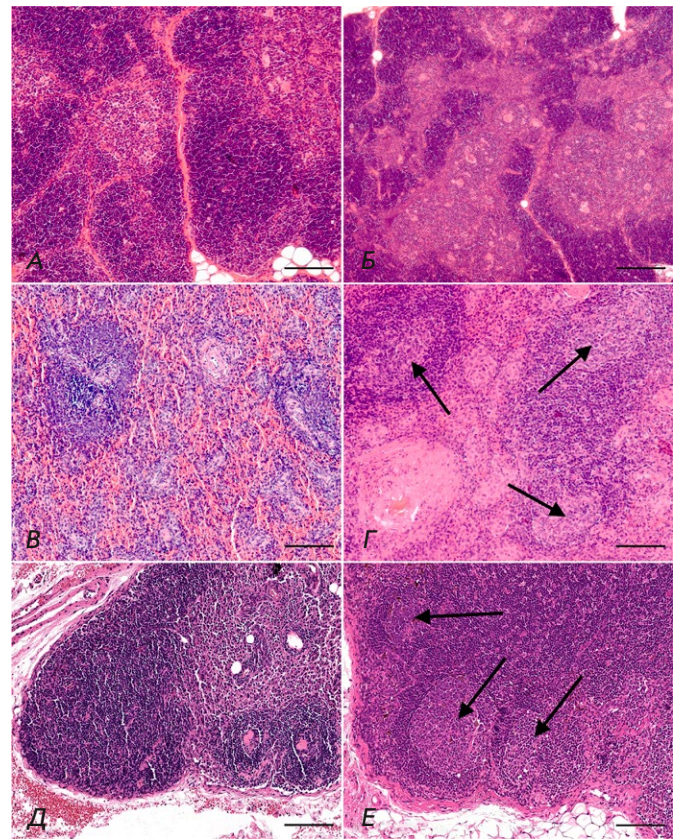


Рис. 5. Лимфоидные органы приматов *S. jacchus*, получивших цельновирионную инактивированную вакцину КовиВак (Б, Г, Е), в сравнении с контрольными животными, получившими плацебо (А, В, Д): тимус (А, Б), селезенка (В, Г), регионарный (паховый) лимфатический узел (Д, Е). Стрелки указывают на герминативные центры в корковом плато лимфатического узла и в мантийной зоне белой пульпы селезенки – области Т-зависимого В-иммуногенеза. Гематоксилин и эозин, увеличение: $\times 100$. Масштабная линейка 200 мкм

В некоторых образцах селезенки, взятых от вакцинированных *S. jacchus* (рис. 5Г), обнаружено формирование герминативных (светлых) центров в мантийной зоне белой пульпы. Эта картина морфологически отражает Т-зависимый В-иммуногенез, что соответствует формированию поствакцинального ответа. В остальном строение селезенки было таким же, как у контрольных животных. В макрофагах маргинальной зоны и красной пульпы селезенки вакцинированных животных отсутствовали вакуолизация или видимое накопление компонентов вакцины, геля гидроокиси алюминия либо иных веществ.

У вакцинированных приматов паховый лимфатический узел, регионарный к месту введения вакцины (рис. 5Е), был построен правильно, состоял из коркового плато, паракортикальной зоны с медуллярными тяжами и системы синусов. В нем наблюдались выраженные в разной степени морфофункциональные проявления иммуногенеза: возникновение герминативных (светлых) центров в корковом плато (так называемая В-зависимая зона лимфатического узла), а также минимальный гистиоцитоз краевого синуса, что соответствует формированию поствакцинального ответа и морфологически сходно с событиями в лимфатических узлах человека при антигенном воздействии.

ОБСУЖДЕНИЕ

S. jacchus (игрунка обыкновенная) – вид обезьян-эндемиков, обитающий в тропической зоне атлантического побережья северо-восточной Бразилии. В дикой природе *S. jacchus* живут семьями, состоящими из устойчивой пары животных и их многочисленного потомства. В группах наблюдается доминирование одной самки с подавлением репродуктивной активности окружающих самок, особенно матерей над дочерьми [4]. *S. jacchus* ведут дневной образ жизни и обитают в густых верхних и средних ярусах крон лиственных деревьев, спасаясь от змей и хищных птиц.

Этологические особенности вида были учтены в ходе разработки методик лабораторного содержания *S. jacchus*: периодичность включения освещения в помещениях для разведения животных соответствует продолжительности светового дня в регионах их обитания, состав семейных групп соответствует составу в дикой природе, а высокие вольеры позволяют животным перемещаться в верхние отделы, т.е. реализовывать поведенческий каскад, связанный с поиском укрытия при приближении опасности. Повышение разнообразия поведенческой активности животных в вольерах при длительном лабораторном содержании обеспечивается ветеринарным врачом в соответствии с циклической схемой изменения расположения компонентов обогащения среды внутри вольеров. Элементы обогащения среды обитания направлены на повышение разнообразия поведения и путей перемещения (звонки, зеркала, ветви, подвесы, качели-гамаки и перекладины) и усложнение доступа к пище (кормушки с отверстиями, располагаемые в различных зонах вольера). К однообразному расположению элементов обогащения среды приматы привыкают и теряют интерес в течение 3–5 суток, что впоследствии может приводить к стереотипиям и повышению уровня агрессии внутри группы.

В данной работе определен средний возраст самок на момент первых родов, средний интервал между родами, выживаемость детенышей и кинетика нарастания массы тела *S. jacchus*, что в совокупности позволяет управлять численностью колонии в зависимости от экспериментальных задач. По нашим данным, в среднем одна самка приносит около трех детенышей в год, при этом численность колонии *S. jacchus* при лабораторном содержании может повышаться как за счет составления максимального количества пар, так и путем отбора наиболее плодовитых самок.

Исследования безопасности иммунобиологических препаратов с применением *S. jacchus*, длительно содержащихся в лабораторных условиях, требуют определения референсных значений показателей клинического и биохимического анализа крови, так как опубликованные референсные показатели зачастую основываются на результатах, полученных при исследовании биоматериала, взятого у небольшого количества животных, содержащихся в открытых вольерах в питомниках и зоопарках. Анализ образцов, взятых от 38 здоровых самцов и самок *S. jacchus* в возрасте 2–5 лет, позволил определить уровни основных клинических и биохимических показателей крови. Статистически значимые различия между самцами и самками наблюдались только для количества лейкоцитов (критерий Манна–Уитни, $p = 0.0047$).

На доклиническом этапе испытания безопасности и иммуногенности вакцин необходимо определять гистологические изменения в лимфоидных органах, обусловленные иммунизацией. В ходе данной работы нами проведена гистологическая характеристика лимфоидных органов *S. jacchus* в норме, а также после применения инактивированной цельновирионной сорбированной вакцины против COVID-19.

Гистологически в мозговом веществе тимуса *S. jacchus* наблюдались тельца Гассалья – скопления концентрически расположенных эозинофильно окрашенных терминально дифференцированных эпителиальных клеток, что делает тимус *S. jacchus* морфологически сходным с тимусом человека. Известно, что у грызунов, наиболее часто используемых в доклинических и экспериментальных исследованиях лекарственных препаратов, в том числе вакцин, строение тимуса отличается от такового у человека, и в мозговом веществе тимуса тельца Гассалья отсутствуют [13].

Другим важным гистологическим наблюдением является отсутствие у исследованных приматов миелоидной метаплазии красной пульпы селезенки, при которой морфологические признаки кро-

ветворной ткани возникают вне костного мозга. У *S. jacchus*, как и у людей, наличие миелоидной метаплазии квалифицируется как фоновое патологическое состояние, связанное с кровотечениями [14], поэтому изменения в селезенке *S. jacchus* проще квалифицировать и проецировать на человека, нежели результаты, получаемые при работе с селезенками мышевидных грызунов.

Таким образом, в ходе проведенной работы нами получены свидетельства высокой степени сходства структуры лимфоидных органов *S. jacchus* и человека в норме, а также в ходе формирования поствакцинального иммунного ответа.

Полученные данные позволяют утверждать, что приматы *S. jacchus*, выращенные в изолированных лабораторных условиях, исключая фоновую инфекционную патологию, являются адекватной лабораторной моделью, позволяющей с высоким уровнем достоверности характеризовать профиль

безопасности и иммуногенности противовирусных вакцин в ходе доклинических испытаний.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Благодаря ряду биологических особенностей вида, а также разработке методик содержания, разведения и экспериментальной работы, приматы *S. jacchus*, содержащиеся в Лаборатории, показали высокую востребованность в биомедицинских исследованиях, включая доклинические испытания инактивированной [11, 15] и аденовирусной векторной [10] вакцин против COVID-19, аденовирусной векторной вакцины против ближневосточного респираторного синдрома [16], а также кандидатной рекомбинантной вакцины против гепатита E [17]. ●

Финансирование: ФГАНУ
«ФНЦИРИП им. М.П. Чумакова РАН»
(Институт полиомиелита).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Heijmans C.M.C., de Groot N.G., Bontrop R.E. // *Int. J. Immunogenet.* 2020. V. 47. № 3. P. 243–260.
- ‘t Hart B.A., Abbott D.H., Nakamura K., Fuchs E. // *Drug Discov. Today.* 2012. V. 17. № 21–22. P. 1160–1165.
- Bayurova E., Zhitkevich A., Avdoshina D., Kupriyanova N., Kolyako Y., Kostyushev D., Gordeychuk I. // *Cells.* 2023. V. 12. № 16. P. 2020.
- Tardif S.D., Smucny D.A., Abbott D.H., Mansfield K., Schultz-Darken N., Yamamoto M.E. // *Comparative Medicine.* 2003. V. 53. № 4. P. 364–368.
- Antunes S.G., de Groot N.G., Brok H., Doxiadis G., Menezes A.A., Otting N., Bontrop R.E. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1998. V. 95. № 20. P. 11745–11750.
- Cao Y.H., Fan J.W., Li A.X., Liu H.F., Li L.R., Zhang C.L., Zeng L., Sun Z.Z. // *Am. J. Primatol.* 2015. V. 77. № 5. P. 527–534.
- Carrion R., Patterson J.L. // *Curr. Opin. Virol.* 2012. V. 2. № 3. P. 357–362.
- Marmoset Genome Sequencing and Analysis Consortium // *Nat. Genet.* 2014. V. 46. № 8. P. 850–857.
- Sasaki E., Suemizu H., Shimada A., Hanazawa K., Oiwa R., Kamioka M., Tomioka I., Sotomaru Y., Hirakawa R., Eto T., et al. // *Nature.* 2009. V. 459. № 7246. P. 523–527.
- Tukhvatulin A.I., Gordeychuk I.V., Dolzhikova I.V., Dzharullaeva A.S., Krasina M.E., Bayurova E.O., Grousova D.M., Kovyrshina A.V., Kondrashova A.S., Avdoshina D.V., et al. // *Emerg. Microbes Infect.* 2022. V. 11. № 1. P. 2229–2247.
- Kozlovskaya L.I., Piniyaeva A.N., Ignatyev G.M., Gordeychuk I.V., Volok V.P., Rogova Y.V., Shishova A.A., Kovpak A.A., Ivin Y.Y., Antonova L.P., et al. // *Emerg. Microbes Infect.* 2021. V. 10. № 1. P. 1790–1806.
- Kaspereit J., Friderichs-Gromoll S., Buse E., Habermann G. // *Exp. Toxicol. Pathol.* 2006. V. 57. № 5–6. P. 405–410.
- Pearse G. // *Toxicol. Pathol.* 2006. V. 34. № 5. P. 504–514.
- David J.M., Dick E.J., Hubbard G.B. // *J. Med. Primatol.* 2009. V. 38. № 5. P. 347–359.
- Gordeychuk I.V., Kozlovskaya L.I., Siniugina A.A., Yagovkina N.V., Kuzubov V.I., Zakharov K.A., Volok V.P., Dodina M.S., Gmyl L.V., Korotina N.A., et al. // *Viruses.* 2023. V. 15. № 9. P. 1828.
- Dolzhikova I.V., Grousova D.M., Zubkova O.V., Tukhvatulin A.I., Kovyrshina A.V., Lubenets N.L., Ozharovskaia T.A., Popova O., Esmagambetov I.B., Shcheblyakov D.V., et al. // *Acta Naturae.* 2020. V. 12. № 3. P. 114–123.
- Gordeychuk I., Kyuregyan K., Kondrashova A., Bayurova E., Gulyaev S., Gulyaeva T., Potemkin I., Karlsen A., Isaeva O., Belyakova A., et al. // *Vaccine.* 2022. V. 40. № 1. P. 89–99.

УДК 616-004

Дигидрокверцетин, инкапсулированный в липосомах, изменяет распределение фиброзной ткани в модели блеомицин-индуцированного фиброза

Е. В. Иванов^{1*}, М. Р. Ахметшина¹, А. Р. Гизатулина¹, М. В. Гуляев¹, О. С. Павлова¹, Ю. А. Пирогов², С. А. Гаврилова¹

¹Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, факультет фундаментальной медицины, Москва, 119991 Россия

²Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, физический факультет, Москва, 119991 Россия

*E-mail: ivanovev102@yandex.ru

Поступила в редакцию 31.05.2024

Принята к печати 24.06.2024

DOI: 10.32607/actanaturae.27440

РЕФЕРАТ В модели легочного фиброза изучены эффекты антиоксиданта дигидрокверцетина, проникновение которого в очаг поражения было облегчено заключением в липосомы. Легочный фиброз моделировали у крыс введением блеомицина интратрахеально. Крысам одной экспериментальной группы в течение 7 дней вводили дигидрокверцетин в липосомах, в другой экспериментальной группе – соответствующее количество физиологического раствора. В третьей, контрольной группе интактные крысы не получали никакого воздействия. Через 30 суток исследовали размеры поражения и дыхательные объемы легких с помощью 7Т 1H МРТ, легкие забирали для гистологического исследования. При окрашивании трихромом по Массону подсчитывали долю фиброзной ткани. Обе экспериментальные группы характеризовались значительным снижением функции легких, при низкой смертности и не крупном участке поражения. У крыс, получавших препарат, существенно изменилось распределение фиброзной ткани: значимо больше в центре очага поражения, значимо меньше в интерстициальном пространстве альвеол на фоне меньшей плотности легкого. Заключенный в липосомы дигидрокверцетин влияет на механизмы развития блеомицинового легочного фиброза у крыс. В то время как ускоренное фиброзирование очага поражения локализует воспаление, замедленное фиброзирование интерстиция может в дальнейшем улучшить функциональное состояние легких.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА дигидрокверцетин, липосомы, блеомицин, антиоксиданты, легочный фиброз, 1H МРТ.
СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ АФК – активные формы кислорода; ДГК – дигидрокверцетин; ИП – импульсная последовательность; МРТ – магнитно-резонансная томография; FID – free induction decline, спад свободной индукции; FoV – field of view, поле зрения; HSV – hue-saturation-value; TE – echo time, время эхо; TR – repetition time, время повторения; UTE – ultra-short echo time, ультракороткое время эхо.

ВВЕДЕНИЕ

Распространенность легочного фиброза существенно возросла после пандемии COVID-19. Во многих исследованиях показано, что тяжелые случаи заболевания COVID-19 вызывали развитие легочного фиброза [1]. Выраженный фиброз приводит к развитию дыхательной недостаточности, существенно влияющей на продолжительность и качество жизни человека. Вторичный легочный фиброз возможен

в исходе и других легочных инфекций, преимущественно – вирусных [2, 3]. Для лечения наиболее распространенной формы идиопатического легочного фиброза используются глюкокортикостероиды, азотиаприн, циклофосфамид, микофенолата мофетил и некоторые новые антифибротические препараты, такие, как нинтеданиб и пирфенидон [4, 5]. В то время как последние оказались достаточно эффективны для увеличения периода без прогрес-

сирования заболевания на 3–5 лет и снижения ежегодной смертности, современная терапия не предоставляет возможности значительно продлить жизнь пациентов с легочным фиброзом.

Легочные альвеолы состоят из тонкого слоя альвеолоцитов, уязвимых к различным повреждающим факторам. Во время инфекционного процесса лейкоциты выделяют множество веществ, разрушающих патогены, инфицированные и здоровые клетки. К числу повреждающих факторов относятся активные формы кислорода (АФК), вырабатываемые нейтрофилами и макрофагами. Помимо прямого повреждения клеток, вызванного перекисным окислением липидов и окислением ДНК, АФК могут повреждать сурфактант и базальные мембраны, что впоследствии ухудшает репарацию легких [1, 2]. Преимущества применения антиоксидантов – простота, безопасность и доступность. Многие доклинические и большинство клинических исследований применения антиоксидантов при фиброзе легких не показали существенного эффекта. Возможные причины недостаточного действия антиоксидантов включают низкую эффективность отдельных выбранных препаратов или субстанций, неблагоприятный путь введения и доставки, нежелательное нарушение регуляторных путей, связанных с АФК [3, 4]. Существует множество механизмов, с помощью которых антиоксиданты могут улучшить течение легочного фиброза. Например, антиоксидант ресвератрол ослабил проявления фиброза у грызунов за счет ингибирования экспрессии Smad и Smad7, снижения пролиферации и дифференцировки фибробластов легких, уменьшения отложения коллагена [5].

Одна из наиболее перспективных групп антиоксидантов включает кверцетин и его производные, такие, как дигидрокверцетин (ДГК). В нескольких экспериментальных исследованиях кверцетин продемонстрировал способность ослаблять фиброз легких [6, 7]. L. Yuan и соавт. продемонстрировали, что ДГК заметно ослабляет у мышей воспаление легких и фиброз, вызванные SiO₂ [8]. D. Impellizzeri и соавт. обнаружили сходные эффекты кверцетина в модели фиброза, индуцированного блеомицином [9]. Одним из основных ограничений использования кверцетина или ДГК в чистом виде при лечении фиброза легких является их низкая растворимость в воде. Неспецифическое введение антиоксидантов также может быть сопряжено с приоритетным захватом препарата нецелевыми тканями организма. Для решения этих проблем необходимы системы доставки. Показано, что липосомы пассивно проникают в очаги воспаления с большей частотой, чем в здоровые ткани, поскольку для таких областей

характерно повышение проницаемости микроциркуляторного русла [10]. Различные липосомальные платформы *in vivo* показали свою эффективность в доставке антифибротических препаратов в очаг фиброза. J. Liu и соавт. обнаружили, что Nrf2-блокаторы в АФК-чувствительных липосомах эффективно проникают в очаг фиброза при ингаляционном пути введения препарата [11]. D. Li и соавт. показали эффективность ингаляционного введения липосом с препаратом в модели легочного фиброза [12]. В других исследованиях эффективность липосомальной доставки подтверждена для препаратов на основе РНК [13]. Хотя антифибротические препараты в липосомах не были исследованы в экспериментах с пероральным приемом препарата, значимая биодоступность при таком пути введения хорошо известна. Через лимфатические капилляры ворсин кишечника липосомы в неизменном виде могут всасываться в системный кровоток [14–17].

В данном исследовании мы изучали воздействие дигидрокверцетина, эмульгированного в липосомах (эмульсия Фламена, НК «Фламена», Россия), использованного для предотвращения развития легочного фиброза у крыс, поскольку ранее была показана эффективность данной эмульсии при других патологиях, обусловленная противовоспалительными и антиоксидантными свойствами данной субстанции [18–21].

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Работа с лабораторными животными

При проведении исследований авторы руководствовались положениями Европейской конвенции по защите позвоночных животных, используемых для экспериментов или в иных научных целях, а также правилами проведения работ с использованием экспериментальных животных. Исследование одобрено на заседании биоэтического комитета факультета фундаментальной медицины МГУ имени М.В. Ломоносова (протокол № 2 от 09.02.2023 г.).

Самцы крыс массой 200–250 г (линия Wistar) были получены из питомника конвенционального содержания в Институте медико-биологических проблем РАН (ИМБП РАН, Москва, Россия). Всего в исследование после периода акклиматизации в 2 недели ввели 30 животных (10 в группе контроля, 20 моделировали легочный фиброз). В течение всего времени крыс содержали в конвенциональном виварии факультета фундаментальной медицины МГУ имени М.В. Ломоносова при 12-часовом цикле освещения, со свободным доступом к воде и стандартному комбикорму при рассадке по 3 животных в клетке стандартного размера ТЗ.

Моделирование легочного фиброза

30 животных разделили на три группы, по 10 крыс в каждой: Лечение, Фиброз, Контроль. Крысам в группе Контроль не проводили никаких вмешательств на протяжении эксперимента. В двух экспериментальных группах (Лечение, Фиброз) животным интратрахеально вводили блеомицин (7.5 мг/кг) под изофлурановой анестезией. Для точности введения и дозировки и равномерного поступления вещества в легкие введение раствора блеомицина проводили инъекционно. Кожу анестезированных крыс дезинфицировали, после чего короткий разрез выполняли над перстневидным хрящем гортани. Мягкие ткани сепарировали пинцетом таким образом, чтобы не вызвать кровотечения и не затронуть щитовидную железу. После визуализации гортани и трахеи головной конец манипуляционного столика поднимали. Необходимое количество препарата вводили медленно с помощью шприца. Доза и способ введения были подобраны по данным литературы [22, 23]. После введения ткани зашивали атравматическим шовным материалом, кожу обрабатывали антисептиком. 30-дневный период эксперимента был выбран для развития устойчивого фиброзирования.

Лечение

24 ч спустя крысам в экспериментальных группах начинали введение ДГК в липосомах (эмульсия Фламена) или стерильного физиологического раствора в равном количестве. В соответствии с патентными документами и данными исследований, Фламена – эмульсия фосфолипидов, содержащая лецитина 30 мг/мл, глицина 35 мг/мл, ДГК 4 мг/мл [20]. В процессе производства по крайней мере один мембранный фосфолипид вортиксерировали с водой и этанолом для получения липосомальной фазы, содержащей активные ингредиенты (Патент RU 2369383, 30.10.2007). Комбинированный путь введения был выбран для достижения максимальной экспозиции препаратом. Ранее мы показали эффективность Фламены при пероральном введении в модели ишемии/реперфузии миокарда [19]. Эффективность при ингаляционном введении была ранее показана для липосомальных препаратов в других исследованиях. Результаты опубликованных и неопубликованных работ указывают на безопасность Фламены в широком диапазоне доз и путей введения [21]. Эмульсию комнатной температуры (25 мг/кг или 6.25 мл/кг) вводили *per os* через желудочный зонд. Далее животные получали препарат ингаляционно в 20-литровой камере через ультразвуковой ингалятор (приблизительно 5 мл препарата на 3 животных). Двойное введение препарата продолжали в течение 5 дней.

Конечная точка

Смертность оценивали вплоть до конечной точки. Массу животных измеряли перед конечной точкой. На 30-й день эксперимента выполняли МРТ для измерения размеров очагов поражения и дыхательных объемов. В процессе эвтаназии под глубокой анестезией в нижнюю полую вену вводили 1% раствор разведенного в фосфатно-солевом буфере нейтрального формалина до остановки сердца. После изъятия легкие взвешивали (весы Sartorius, точность 10 мг). Легкие заполняли 1% раствором разведенного в фосфатно-солевом буфере нейтрального формалина через трахею. Нижние и верхние доли обеих легких иссекали, поперечные участки толщиной до 6 мм вырезали для гистологического исследования и фиксировали в 4% разведенном в фосфатно-солевом буфере нейтральном формалине в течение 36 ч.

МРТ-исследование

МРТ-исследования проводили на МР-томографе Bruker BioSpec 70/30 USR («БиоСпин», Эттлинген, Германия) с постоянным магнитным полем 7 Тл, работающем с программной оболочкой ParaVision® версии 5.1 и оснащенном градиентным устройством с амплитудой градиента 105 мТл/м. МРТ-изображения легких получали с использованием объемной радиочастотной катушки «птичья клетка» с внутренним диаметром 72 мм. Для введения животных в наркоз применяли газовую смесь изофлурана и кислорода: сначала помещали животных в специальную камеру, в которую подавали 4%-ный изофлуран при скорости потока O_2 1 л/мин; для поддержания анестезии в МР-томографе в носовую маску подавали 1.5%-ный изофлуран при потоке O_2 1 л/мин. Изофлуран подавали с использованием испарителя от Ugo Basile S.R.L. I-21025 (Комерио, Италия), а кислород нарабатывался концентратором кислорода JAY-10 (Лунфиан Сайтех Ко., Лтд, Китай).

МРТ-изображения легких получали с использованием импульсной последовательности (ИП) 3D UTE (ultra-short echo time – ультракороткое время эхо), основанной на радиальном заполнении k-пространства [24]. Параметры сканирования были установлены следующим образом: область сканирования $7 \times 7 \times 7$ см³, матрица сканирования $152 \times 152 \times 152$, полоса пропускания частот 100 кГц, TE (echo time – время эхо) 18 мкс, TR (repetition time – время повторения) 8 мс, угол отклонения 6°, количество накоплений 1, количество радиальных проекций 72231, фактор ускорения путем децимации радиального k-пространства (polar undersampling) 1. Общее время сбора данных составило 9 мин и 38 с.

Постобработка данных МРТ

ИП на основе радиального сканирования, такие, как UTE, меньше подвержены влиянию артефактов движения, что позволяет проводить визуализацию легких без необходимости синхронизации дыхания. В результате МРТ-изображения легких усредняются по всему дыхательному циклу. Такие МРТ-изображения можно «ретроспективно стробировать» и сгенерировать два новых изображения, соответствующих фазам вдоха и выдоха. Такая дополнительная информация расширяет диагностические возможности МРТ для оценки заболеваний в легких.

Полученные МРТ-изображения легких обрабатывали по методике, изложенной в работе [25]. В ИП 3D UTE центр радиального k-пространства подвергается избыточной выборке, а величина первой точки каждой собранной проекции (FID, спад свободной индукции) модулируется дыхательным процессом. Следовательно, первые точки каждой проекции отражают фазу дыхания. Эти данные можно отсортить для создания двух новых k-пространств с неполным заполнением, полученных из исходного k-пространства: одно представляет фазу вдоха, а другое – фазу выдоха. Последний шаг включает в себя восстановление «стробируемых» данных с использованием итеративной функции компенсации плотности с последующей повторной выборкой на декартовой сетке перед быстрым преобразованием Фурье.

Метод ретроспективного стробирования реализован с использованием языка программирования Python 3.8 и программы Matlab 2019b (MathWorks, Натик, Массачусетс, США), в результате чего были получены два набора МРТ-изображений, соответствующих фазам вдоха и выдоха. Поскольку фаза вдоха длится быстрее, чем фаза выдоха, то всего 8–10% всех проекций соответствуют фазе вдоха, а 55–60% – фазе выдоха. Следовательно, качество изображений (отношение сигнал/шум, четкость и разрешение), полученных на фазе выдоха, заметно выше. Исходя из этого, изображения на фазе выдоха использовали для сегментации масок легких на выдохе и масок патологии, а изображения на фазе вдоха – только для сегментации масок легких на вдохе. Маски легких и патологий сегментировали вручную с использованием программы ImageJ (НИН, Бетесда, Мэриленд, США) [26] с помощью инструмента «freehand selection tool» – «инструмент выделения от руки». На основе полученных бинарных масок путем суммирования ненулевых пикселей и умножения на пространственное разрешение изображений рассчитывали объем легких на вдохе ($V_{\text{вдох}}$), объем легких на выдохе ($V_{\text{выдох}}$)

и объем патологии – область воспаления/фиброза ($V_{\text{пат}}$). Дополнительно рассчитывали дыхательный объем легких ($V_{\text{дых}} = V_{\text{вдох}} - V_{\text{выдох}}$), относительный дыхательный объем ($V_{\text{дых}}/V_{\text{выдох}}$) и процент поражения легких ($V_{\text{пат}}/V_{\text{выдох}}$). Параметр $V_{\text{выдох}}/m$ (мл/г) использовали для оценки плотности легких.

Гистологическая обработка

После фиксации ткань промывали проточной водой в течение 2 ч, затем дегидратировали в изопропиловом спирте, минеральном масле, парафине, заливали парафином. Стандартные микропрепараты толщиной 5 мкм изготавливали из парафиновых блоков с помощью микротомы ThermoFisher 355S. Микропрепараты высушивали, после чего окрашивали гематоксилином и эозином по стандартной методике. Также препараты окрашивали по Массону (наборы для окрашивания по Массону BioVitrum, РФ) для выявления коллагена.

Слайды были проанализированы и оцифрованы с помощью микроскопа Zeiss Axio A2 и программного обеспечения Zeiss Zen. Изображения были дополнительно обработаны с помощью программного обеспечения ImageJ. Для оценки степени патологического поражения была разработана шкала оценки с максимумом в 27 баллов. Были оценены 9 параметров по 4-балльной шкале от 0 (нормальная ткань) до 3 баллов (нефункциональная ткань, общее воспаление, обильный фиброз) в каждом поле зрения (FoV): наличие альвеол, целостность альвеол, целостность бронхов, тяжесть воспаления, тип инфильтрации, некроз в FoV, наличие фиброзной ткани, интерстициальный фиброз, очаговый фиброз. На каждом слайде было усреднено десять случайных изображений поля зрения с 200-кратным увеличением.

Окрашенные по Массону препараты фотографировали в трех областях: участке патологического поражения, области альвеол, ближайшей к очагу поражения, и области, максимально удаленной от очага поражения. Для каждой области были отобраны 5 полей зрения с 200-кратным увеличением. На основе цветовой шкалы HSV выполняли сегментацию по синему и красному цвету. Далее рассчитывали общее количество синих и красных пикселей в областях, соотношение синего и красного окрашивания в каждом поле зрения.

Статистический анализ

Обработку данных и статистический анализ проводили с помощью языка программирования Python 3.8 и открытых библиотек алгоритмов. Статистический анализ выполняли с помощью библиотек Statsmodels и Scipy. В связи с небольшо-

ми размерами выборок использовали непараметрические критерии и универсальные статистические модели. Из библиотеки Statsmodels использовали смешанную линейную модель (mixed-effects generalized linear model, GLM) для анализа изменений факторов во времени. Для зависимых переменных использовали критерий Краскела–Уоллеса, затем post-hoc-тест множественных сравнений Dwass-Steel-Critchlow-Fligner (DSCF). Для оценки корреляций использовали R-критерий Спирмена. Значения p менее 0.05 считали статистически значимыми. Данные визуализировали с помощью диаграмм типа «ящик с усами», показывающих медианы, квартили, минимальные и максимальные значения, с помощью алгоритмов библиотек Matplotlib и Seaborn.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Смертность и прирост массы

В ходе эксперимента смертность достигла 20% ($N=2$) в группе, получавшей физиологический раствор, из которых 1 крыса умерла после окончательного введения анестезии. В группе, получавшей Фламену, смертность составила 10% ($N=1$), при использовании критерия хи-квадрат существенной разницы обнаружено не было. Поскольку уровень смертности был низким, мы не проводили анализ выживаемости с учетом факторов риска смерти.

Прибавка массы тела в обеих группах была значительно снижена по сравнению с интактными крысами. Через 30 дней эксперимента интактные крысы набрали 23.93% (МКР 20.42, 28.33) от исходной массы тела, в то время как крысы, получавшие физиологический раствор, набрали 14.65% (МКР -8.55, 22.08, $p = 0.047$), а крысы, получавшие Фламену – 11.58% (МКР -1.21, 17.07, $p = 0.01$). У двух групп с фиброзом не было существенных различий в увеличении массы тела ($p = 0.86$).

Масса легких

Общая масса легких в группах с фиброзом была в 1.5 раза выше по сравнению с интактными крысами. В группе, получавшей физиологический раствор, она составила 3.76 г (МКР 2.84, 4.22, $p = 0.001$ по сравнению с интактной группой, *рис. 2А*), в группе, получавшей Фламену, она достигла 3.77 г (МКР 3.39, 3.83, $p < 0.001$ по сравнению с интактной группой). В интактной группе средняя масса легких составила 2.43 г (МКР 2.33, 2.60). Показатели массы легких не отличались в двух группах с фиброзом ($p = 0.796$).

Результаты МРТ

Примеры обработки результатов МРТ показаны на *рис. 1*.

Две группы не имели статистически значимых различий как в абсолютном объеме патологического очага (0.38 мл (МКР 0.18, 0.61) в группе физиологического раствора, 0.45 мл (МКР 0.25, 0.67) в группе Лечение, $p = 0.606$), так и в относительном объеме очага (3.24% (МКР 1.77, 6.04) в группе Фиброз, 3.18% (МКР 2.14, 4.22), $p = 0.96$, *рис. 2Б и 2В*).

Объемы выдоха ($V_{\text{выдох}}$) и вдоха ($V_{\text{вдох}}$) были выше в экспериментальных группах в сравнении с группой Контроль (*табл. 1*). В то время как респираторное отношение ($V_{\text{вдох}}/V_{\text{выдох}}$) было значимо ниже в группах с фиброзом по сравнению с группой Контроль, респираторный объем ($V_{\text{дых}}$) не отличался, возможно, из-за нерегулируемой частоты и глубины дыхания во время выполнения МРТ, что привело к широкому разбросу измерений (*рис. 3*). Среди всех характеристик объем на выдохе ($V_{\text{выдох}}$) наиболее различался между группами Лечение и Фиброз, $p = 0.074$ (*рис. 3А*). Мы также рассчитали отношение объема на выдохе ($V_{\text{выдох}}$) к массе легких в качестве суррогатного признака плотности легких (*рис. 3Б*). В то время как в группе Фиброз объем легких на единицу массы был ниже по сравнению с группой Контроль ($p = 0.027$), что указывает на большую плотность, между группами Лечение и Контроль различий не было ($p = 0.387$). Медианные значения в группах Лечение и Фиброз показали близкие к статистически значимым различия с $p = 0.059$.

Гистологическое исследование

Гистологический анализ проводили на срезах, полученных из основания долей, где были обнаружены более крупные повреждения. Срезы, окрашенные гематоксилином и эозином, оценивали полуколичественным методом с максимальной оценкой в 27 баллов. Анализ проводили с усреднением случайных полей зрения, общий балл не отличался в двух группах: медиана составила 12.8 балла (МКР 9.36, 14.88) в группе Фиброз и 11.5 балла (МКР 10.17, 13.50, $p = 0.918$) в группе Лечение (*рис. 4А*).

Окрашивание по Массону показало, что коллагеновые пучки распределены по-разному в группах Лечение и Фиброз. Фиброзирование внутри патологического очага представляет собой завершённую фазу воспаления, и в группе Лечение обнаружено более интенсивное окрашивание коллагена. Несмотря на тот же размер поражения, в группе, получавшей физиологический раствор, на большинстве препаратов отложение коллагена было выражено не так сильно, с большим количеством некрозов, воспалений и волокон, не окрашенных по Массону. Соотношение синего и красного окрашивания в патологическом очаге составило 0.61

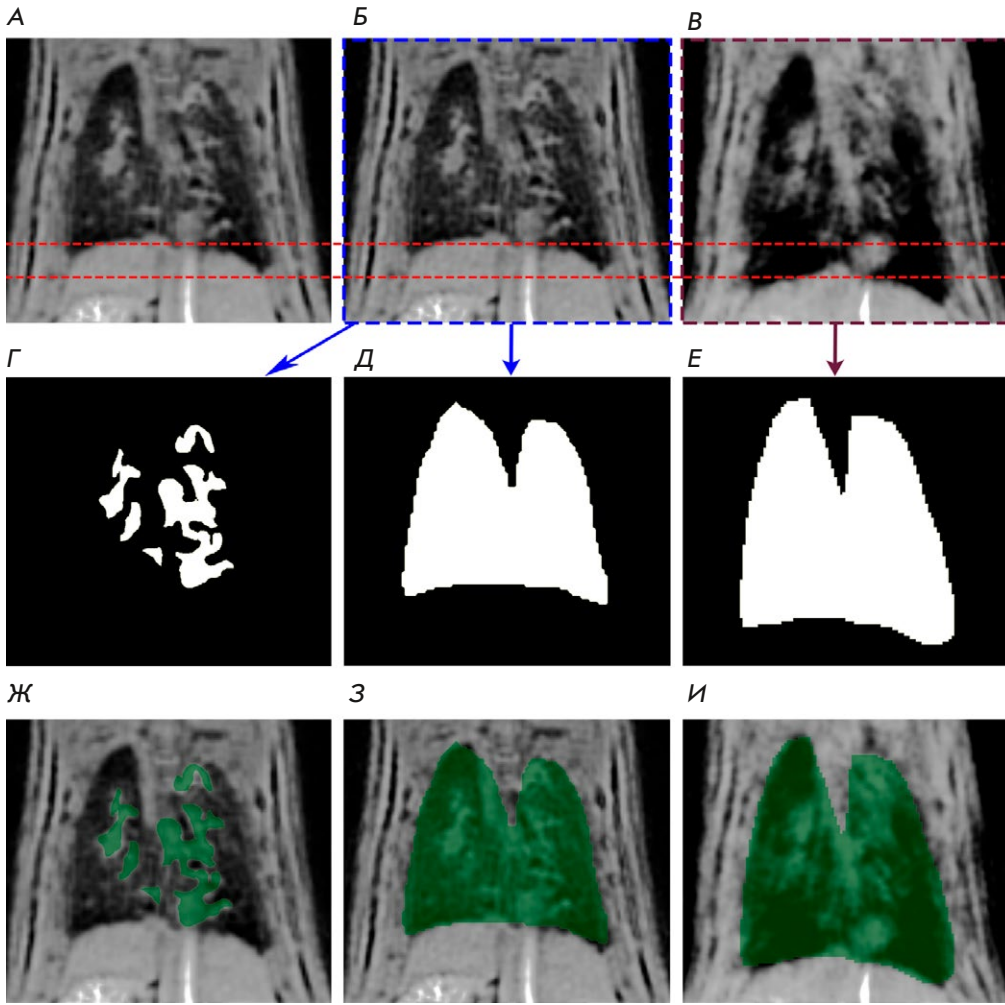


Рис. 1. МРТ-снимки легких случайно выбранной крысы из группы с физиологическим раствором, а также соответствующие маски для легких и патологии. Данные представлены только для одного среза. А – исходное МРТ-изображение легких, Б – изображение фазы выдоха, В – изображение фазы вдоха, Г – маска патологии, Д – маска выдоха, Е – маска вдоха, Ж – маска патологии, наложенная на исходное МРТ-изображение легких, З – маска выдоха, наложенная на изображение выдоха, И – маска вдоха, наложенная на изображение фазы вдоха

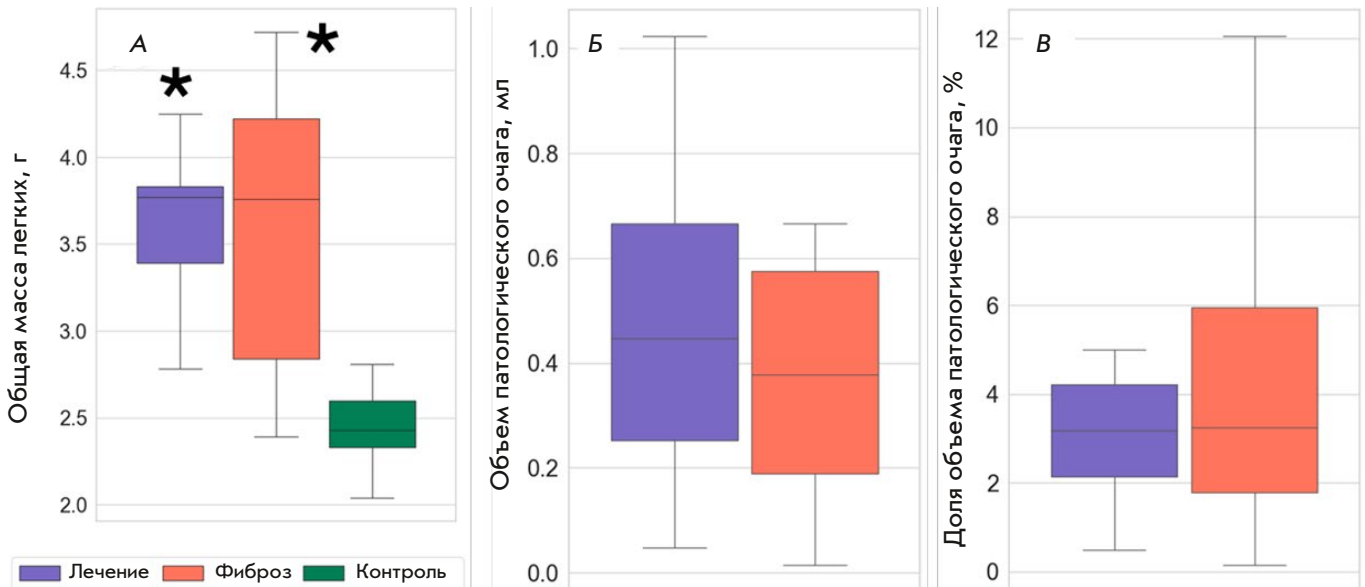


Рис. 2. Структурные изменения при блеомин-индуцированном фиброзе. А – общая масса легкого, Б – абсолютный объем патологического очага, В – относительный объем патологического очага, %. * $p < 0.05$ по сравнению с интактной группой

Таблица 1. Функциональные параметры легких для различных групп животных, используемых в эксперименте

Группа животных	$V_{\text{вдох}}$, мл		$V_{\text{выдох}}$, мл		$V_{\text{дых}}/V_{\text{выдох}}$, отн. ед.		$V_{\text{пат}}/V_{\text{выдох}}$, %	
	МЕ	МКР	МЕ	МКР	МЕ	МКР	МЕ	МКР
Интактная	9.76	9.49–10.20	7.54	7.04–8.16	0.31*	0.27–0.35*	-	-
0.9% раствор NaCl	13.02	11.58–14.49	10.45	9.39–11.75	0.23*	0.15–0.29*	3.61	1.77–6.04
Фламена®	14.27	13.59–15.75	11.78	11.18–13.31	0.17*	0.09–0.21*	3.52	2.11–4.61

Примечание. МЕ – медианные значения, МКР – межквартильный размах. * $p < 0.05$.

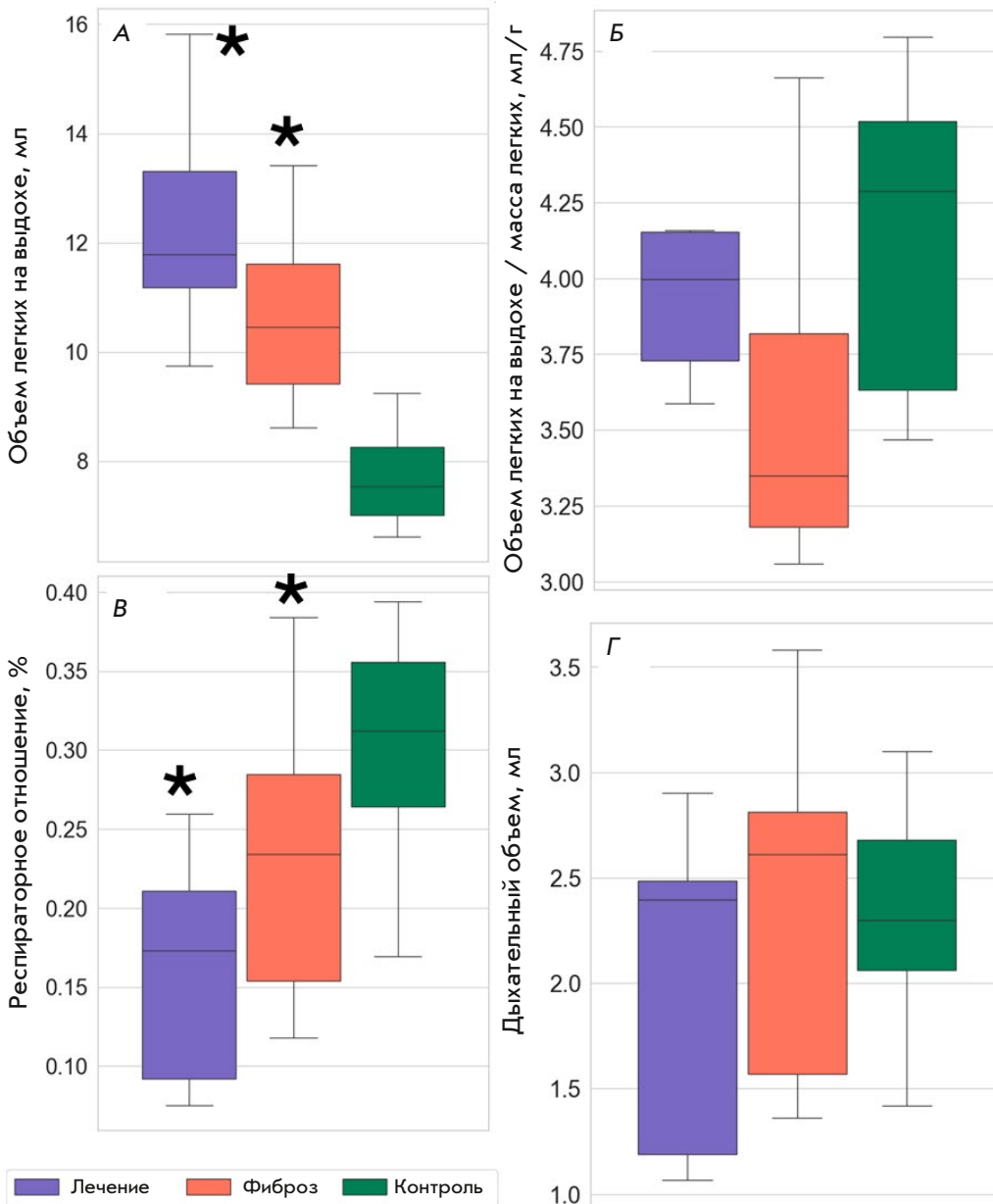


Рис. 3. Функциональные изменения легких при фиброзе, вызванном блеомицином. А – объем выдоха, Б – отношение объема выдоха к массе легких, В – дыхательный коэффициент, Г – дыхательный объем. * $p < 0.05$ по сравнению с интактной группой

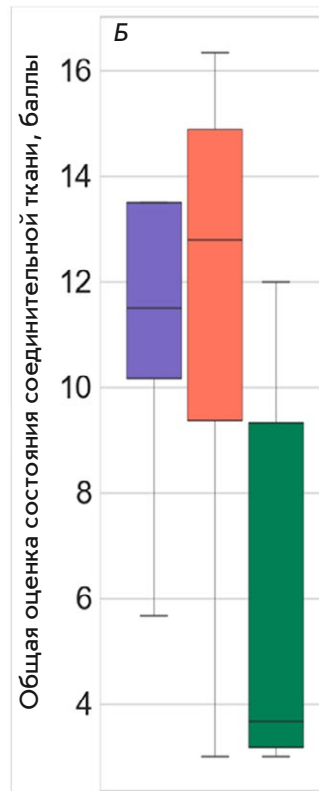
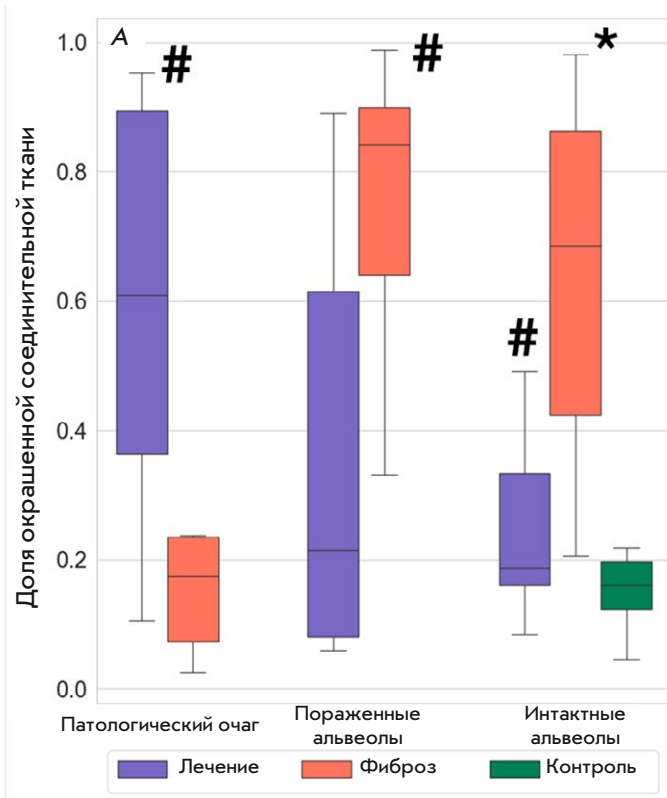


Рис. 4. Оценка гистологической целостности. А – соотношение площадей синих и красных пикселей, Б – общий балл гистологической целостности. * $p < 0.05$ по сравнению с интактной группой, # $p < 0.05$ по сравнению с группой, получавшей физиологический раствор

(МКР 0.35, 0.92) в группе Лечение и 0.16 (МКР 0.07, 0.23) в группе Фиброз ($p = 0.006$, рис. 4Б). В наиболее пораженной легочной ткани соотношение синего и красного окрашивания было значительно выше в группе, получавшей физиологический раствор, и составило 0.21 (МКР 0.12, 0.62) против 0.72 (МКР 0.64, 0.92), $p = 0.01$. В наиболее интактной легочной ткани также было выявлено более интенсивное окрашивание интерстициального коллагена в группе, получавшей физиологический раствор, с соотношением 0.71 (МКР 0.42, 0.85) против 0.19 (МКР 0.16, 0.34), $p = 0.01$. Окрашивание коллагеном интактных тканей было сопоставимо с таковым в группе Лечение (0.17 (МКР 0.12, 0.2), $p = 0.27$). Как правило, наряду с утолщением интерстициального пространства и интенсивным воспалением присутствовало отложение интерстициальной фиброзной ткани (рис. 5).

ОБСУЖДЕНИЕ

Антиоксидантная терапия легочного фиброза была изучена во многих исследованиях с обнадеживающими, но все еще не достаточными результатами. В нашем исследовании мы оценивали препарат стабилизированного дигидрокверцетина в липосомах

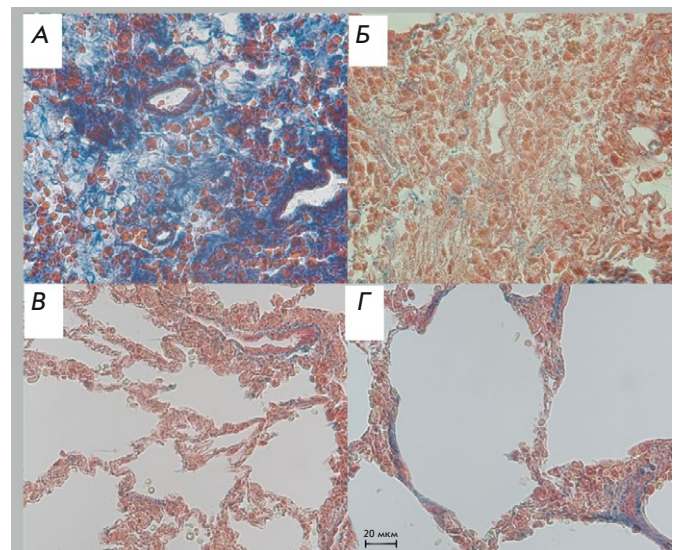


Рис. 5. Гистологические срезы легких, иллюстрирующие закономерности отложения коллагена. А, Б – патологическое поражение легких для крыс из групп Лечение и Фиброз соответственно. В, Г – нормальная легочная ткань для крыс из группы Лечение и Фиброз соответственно. Синим окрашен коллаген базальных мембран альвеол. Окраска трихромом по Массону, увеличение в 200 раз

на крысиной модели фиброза, вызванного блеомицином. Последняя является одной из наиболее изученных и широко используемых экспериментальных моделей легочного фиброза, поэтому ее особенности хорошо известны. Липосомальный транспорт улучшает стабильность и эффективность ДГК, поэтому мы ожидали получить заметные терапевтические эффекты. Липосомы также обеспечивают избирательность в отношении очагов воспаления [10]. Длительность приема была произвольной, более высокая суммарная доза или длительный период лечения потенциально могли привести к лучшим результатам. Поскольку ранее мы обнаружили, что Фламена эффективна в модели ишемии/реперфузии миокарда крыс, мы ожидали увеличения экспозиции при комбинированном лечении [19]. Мы решили лечить крыс через 24 ч после инъекции блеомицина, имитируя профилактическое антифиброзное лечение при тяжелой легочной инфекции, такой, как COVID-19.

В нашем исследовании общая смертность была низкой, и какие-либо статистические изменения в отношении выживаемости были невозможны. Мы использовали 7Т МРТ как один из лучших методов для изучения размера поражения и экскурсии легких. В большинстве случаев патологические изменения не занимали большую часть легких. Поэтому при любом типе вмешательства было трудно добиться значимых расхождений. Кроме изменения веса и плотности легких, мы наблюдали значительное изменение степени легочной дисфункции. У крыс, получавших Фламену, выявлена тенденция к уменьшению плотности легких, что является важным признаком менее выраженного воспаления и фиброза.

Существует множество разновидностей моделей фиброза, вызванного блеомицином, и они сопровождаются различной степенью патологического поражения. Однократное интратрахеальное введение обычно приводит к сопоставимым с описанными нами результатам. В течение 1 месяца у самцов крыс обычно не наблюдается летального исхода и уровень смертности низок [27]. Хотя в большинстве исследований не проводится количественное измерение объема поражения, в тех, где были проведены необходимые измерения, сообщается о доле фиброзной ткани около 3% от общего объема, как и в нашем исследовании [28, 29]. Обнаруженные нами гистологические изменения в тканях легких были похожи на те, о которых сообщалось в литературе: широко распространенная воспалительная инфильтрация, очаги некроза, пучки коллагеновых волокон. Альвеолы вблизи патологических очагов имели более толстые стен-

ки, обычно были слитыми и дисфункциональными, с поврежденными стенками [30, 31]. Согласно литературным данным [22, 27], легочный фиброз в модели блеомицинового повреждения становится значительным уже через 2 недели после начала лечения и сохраняется в течение нескольких месяцев. В то время как через 3–6 месяцев после инъекции фиброз у грызунов может перейти в стадию разрешения, он проявляется в полной мере через 1 месяц после инъекции [32–35]. Мы обнаружили значительный уровень фиброзирования, характер которого различен у крыс, получавших и не получавших лечение.

В нашем исследовании применение препарата Фламена значительно изменило распространение фиброзной ткани. Интерстициальный фиброз является серьезным осложнением, которое может привести к дальнейшему снижению функции легких, и его признаки были менее заметны в группе, получавшей лечение. Напротив, увеличение количества фиброзной ткани внутри патологического очага является положительным признаком, поскольку указывает на более быстрое разрешение воспалительных реакций. Кверцетин – это препарат, который уменьшает признаки старения. Он взаимодействует со стареющими клетками, усиливает их апоптоз и снижает фиброгенный потенциал. ДГК в стабилизированной форме является более мощным антиоксидантом, и мы ожидали, что он будет по меньшей мере таким же эффективным, как кверцетин. Показана эффективность ДГК при различных заболеваниях, но он не был так подробно изучен при блеомициновом фиброзе. Мы показали, что ДГК при липосомальной доставке может изменять механизмы развития блеомицинового фиброза. Хотя это не вызвало значимых изменений в функциональном состоянии легких, различия могут быть обнаружены на более длительных сроках.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Наше исследование показало, что стабилизированный ДГК может значительно модифицировать легочный фиброз у крыс и изменить его признаки. Фиброз внутри патологического очага является естественным исходом, препятствующим распространению инфекции и воспаления. Более быстрая организация патологического очага может быть полезной, поскольку сохраняет функции интактной ткани. Прогрессирование интерстициального фиброза в функциональных альвеолах, напротив, может привести к тяжелым респираторным нарушениям. Мы впервые изучили эффекты воздействия стабилизированного дигидрокверцетина в липосомах

при фиброзе легких, вызванном блеомицином, и обнаружили, что он ограничивает интерстициальный фиброз. Необходимы дальнейшие исследования с более длительным сроком эксперимента и другими протоколами введения блеомицина, чтобы

выяснить, может ли ДГК снизить заболеваемость и смертность в долгосрочной перспективе. ●

*Исследование выполнено за счет гранта
Российского научного фонда № 21-75-10038.*

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Walters D.M., Cho H.Y., Kleeberger S.R. // *Antioxid. Redox Signal.* 2008. V. 10. № 2. P. 321–332. doi: 10.1089/ARS.2007.1901.
- Otoupalova E., Smith S., Cheng G., Thannickal V.J. // *Compr. Physiol.* 2020. V. 10. № 2. P. 509–547. doi: 10.1002/CPHY.C190017.
- Gonzalez-Gonzalez F.J., Chandel N.S., Jain M., Budinger G.R.S. // *Transl. Res.* 2017. V. 190. P. 61–68. doi: 10.1016/J.TRSL.2017.09.005.
- Diebold L.P., Jain M. // *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* 2023. V. 69. № 1. P. 3–5. doi: 10.1165/RCMB.2023-0110ED.
- Huo R., Huang X., Yang Y., Yang Y., Lin J. // *Front. Pharmacol.* 2023. V. 14. P. 1139460. doi: 10.3389/FPHAR.2023.1139460.
- Hohmann M.S., Habel D.M., Coelho A.L., Verri W.A., Hogaboam C.M. // *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* 2019. V. 60. № 1. P. 28–40. doi: 10.1165/RCMB.2017-0289OC.
- Boots A.W., Veith C., Albrecht C., Bartholome R., Drittij M.J., Claessen S.M.H., Bast A., Rosenbruch M., Jonkers L., van Schooten F.J., et al. // *BMC Pulm. Med.* 2020. V. 20. № 1. doi: 10.1186/S12890-020-1142-X.
- Yuan L., Sun Y., Zhou N., Wu W., Zheng W., Wang Y. // *Front. Pharmacol.* 2022. V. 13. P. 845600. doi: 10.3389/FPHAR.2022.845600.
- Impellizzeri D., Talero E., Siracusa R., Alcaide A., Cordaro M., Maria Zubelia J., Bruschetta G., Crupi R., Esposito E., Cuzzocrea S., et al. // *Br. J. Nutr.* 2015. V. 114. № 6. P. 853–865. doi: 10.1017/S0007114515002597.
- van Alem C.M.A., Metselaar J.M., van Kooten C., Rotmans J.I. // *Pharmaceutics.* 2021. V. 13. № 7. P. 1004. doi: 10.3390/PHARMACEUTICS13071004.
- Liu J., Wu Z., Liu Y., Zhan Z., Yang L., Wang C., Jiang Q., Ran H., Li P., Wang Z. // *J. Nanobiotechnology.* 2022. V. 20. № 1. P. 213. doi: 10.1186/S12951-022-01435-4.
- Li D., Zhao A., Zhu J., Wang C., Shen J., Zheng Z., Pan F., Liu Z., Chen Q., Yang Y. // *Small.* 2023. V. 19. № 30. e2300545. doi: 10.1002/SMLL.202300545.
- Cheng D., Li Z., Wang Y., Xiong H., Sun W., Zhou S., Liu Y., Ni C. // *J. Transl. Med.* 2022. V. 20. № 1. P. 523. doi: 10.1186/S12967-022-03740-W.
- Ashkar A., Sosnik A., Davidovich-Pinhas M. // *Bio-technol. Adv.* 2022. V. 54. P. 107789. doi: 10.1016/J.BIO-TECHADV.2021.107789.
- Managuli R.S., Raut S.Y., Reddy M.S., Mutalik S. // *Expert. Opin. Drug Deliv.* 2018. V. 15. № 8. P. 787–804. doi: 10.1080/17425247.2018.1503249.
- Zhang L., Wang S., Zhang M., Sun J. // *J. Drug Target.* 2013. V. 21. № 6. P. 515–527. doi: 10.3109/1061186X.2013.789033.
- Jash A., Ubeyitogullari A., Rizvi S.S.H. // *J. Mater. Chem. B.* 2021. V. 9. № 24. P. 4773–4792. doi: 10.1039/D1TB00126D.
- Mereuta I., Valica V., Parii S., Caraus V., Clecicov M., Svet V., Cernat M. // *Revistă științifico-practică.* 2016. V. 2. № 1. P. 75–83.
- Matveev D.V., Gavrilova S.A., Kuznetsov M.R., Akhmetshina M.R., Ivanov E.V., Evteev A.V., Kuznetsova M.M., Nochnoy M.S. // *Head and Neck J.* 2022. V. 10. № 4. P. 16–23. doi: 10.25792/HN.2022.10.4.16-23.
- Ovcharuk E.A., Khabarov S.V., Khadartseva K.A. // *J. New Med. Technol.* 2018. V. 25. № 3. P. 87–95. doi: 10.24411/1609-2163-2018-16234.
- Mereuță I., Parii S., Caraus V., Valica V. // *Revista Farmaceutică a Moldovei.* 2016. V. 1. № 4. P. 27–27.
- Danaei N., Kokhdan E.P., Sadeghi H., Sadeghi H., Hassanzadeh S., Rostamzadeh D., Azarmehr N., Ghoran S.H. // *Evid Based Complement Alternat Med.* 2022. V. 2022. P. 1–9. doi: 10.1155/2022/6208102.
- Ren Y.-X., Zhou R., Tang W., Wang W.-H., Li Y.-C., Yang Y.-F., Zuo J.-P. // *Acta Pharmacol. Sin.* 2007. V. 28. № 4. P. 518–525. doi: 10.1111/j.1745-7254.2007.00524.x.
- Togao O., Tsuji R., Ohno Y., Dimitrov I., Takahashi M. // *Magn. Reson. Med.* 2010. V. 64. № 5. P. 1491–1498. doi: 10.1002/MRM.22521.
- Stecker I.R., Freeman M.S., Sitaraman S., Hall C.S., Niedbalski P.J., Hendricks A.J., Martin E.P., Weaver T.E., Cleveland Z.I. // *J. Magn. Reson. Open.* 2021. V. 6–7. P. 100013. doi: 10.1016/J.JMRO.2021.100013.
- Schneider C.A., Rasband W.S., Eliceiri K.W. // *Nat. Methods.* 2012. V. 9. № 7. P. 671–675. doi: 10.1038/NMETH.2089.
- Gharaee-Kermani M., Hatano K., Nozaki Y., Phan S.H. // *Am. J. Pathol.* 2005. V. 166. № 6. P. 1593–1606. doi: 10.1016/S0002-9440(10)62470-4.
- Babin A.L., Cannet C., Gérard C., Wyss D., Page C.P., Beckmann N. // *J. Magn. Reson. Imaging.* 2011. V. 33. № 3. P. 603–614. doi: 10.1002/JMRI.22476.
- Scotton C.J., Hayes B., Alexander R., Datta A., Forty E.J., Mercer P.F., Blanchard A., Chambers R.C. // *Eur. Respir. J.* 2013. V. 42. № 6. P. 1633–1645. doi: 10.1183/09031936.00182412.
- Izbicki G., Segel M.J., Christensen T.G., Conner M.W., Breuer R. // *Int. J. Exp. Pathol.* 2002. V. 83. № 3. P. 111. doi: 10.1046/J.1365-2613.2002.00220.X.
- Mouratis M.A., Aidinis V. // *Curr. Opin. Pulm. Med.* 2011. V. 17. № 5. P. 355–361. doi: 10.1097/MCP.0B013E328349AC2B.
- Li S., Shi J., Tang H. // *Cell Biol. Toxicol.* 2022. V. 38. № 5. P. 699–723. doi: 10.1007/S10565-021-09676-Z.
- Moore B.B., Hogaboam C.M. // *Am. J. Physiol. Lung Cell. Mol. Physiol.* 2008. V. 294. № 2. P. L152–L160. doi: 10.1152/AJ-PLUNG.00313.2007.
- Ishida Y., Kuninaka Y., Mukaida N., Kondo T. // *Int. J. Mol. Sci.* 2023. V. 24. № 4. P. 3149. doi: 10.3390/IJMS24043149.
- Della Latta V., Cecchetti A., Del Ry S., Morales M.A. // *Pharmacol. Res.* 2015. V. 97. P. 122–130. doi: 10.1016/J.PHRS.2015.04.012.

УДК 547.857.7; 616-006.66

7-Метилгуанин подавляет рост аденокарциномы толстой кишки *in vivo*

К. И. Кирсанов^{1,2}, Т. И. Фетисов¹, Е. Е. Антошина¹, Т. Г. Горькова¹, Л. С. Труханова¹, С. И. Шрам³, И. Ю. Нагаев³, Ю. А. Золотарев³, Л. Або Кура^{1,2}, В. С. Покровский^{1,2}, М. Г. Якубовская¹, В. К. Швядас^{4,5}, Д. К. Нилов^{4*}

¹Национальный медицинский исследовательский центр онкологии имени Н.Н. Блохина, Научно-исследовательский институт канцерогенеза, Москва, 115478 Россия

²Российский университет дружбы народов, Медицинский институт, Москва, 117198 Россия

³Национальный исследовательский центр «Курчатовский институт», Москва, 123182 Россия

⁴Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, НИИ физико-химической биологии имени А.Н. Белозерского, Москва, 119991 Россия

⁵Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, факультет биоинженерии и биоинформатики, Москва, 119234 Россия

*E-mail: nilovdm@gmail.com

Поступила в редакцию 08.05.2024

Принята к печати 26.06.2024

DOI: 10.32607/actanaturae.27422

РЕФЕРАТ 7-Метилгуанин (7-МГ) является природным ингибитором поли(ADP-рибозо)полимеразы 1 и тРНК-гуанинтрансгликозилазы, ферментативная активность которых важна для пролиферации опухолевых клеток. Недавно в ряде доклинических тестов была продемонстрирована безопасность 7-МГ и подобрана доза для внутрижелудочного введения мышам. В представленной работе исследована фармакологическая активность 7-МГ на мышах BALB/c и BALB/c nude с перевитой опухолью. Показано, что 7-МГ эффективно проникает в опухолевую ткань и подавляет рост аденокарциномы толстой кишки в модели Акатол, а также в ксенографтной модели с использованием клеток человека HCT116.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА 7-метилгуанин, ингибитор, поли(ADP-рибозо)полимераза 1, тРНК-гуанинтрансгликозилаза, аденокарцинома толстой кишки, мыши BALB/c.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ в/б – внутривнутрибрюшинное введение; в/ж – внутривнутрижелудочное введение; 7-МГ – 7-метилгуанин; ПАРП-1 – поли(ADP-рибозо)полимераза 1; ТГТ – тРНК-гуанинтрансгликозилаза.

ВВЕДЕНИЕ

7-Метилгуанин (7-МГ) является метаболитом нуклеиновых кислот, который в малом количестве обнаруживается в крови и моче человека [1]. Изучение 7-МГ как потенциального противоопухолевого ингибитора началось с работы по компьютерному скринингу природных азотистых оснований и их производных в отношении поли(ADP-рибозо)полимеразы 1 (ПАРП-1) – ключевого фермента репарации ДНК [2]. Моделирование продемонстрировало комплементарность 7-МГ к активному центру ПАРП-1, дальнейшие *in vitro* исследования подтвердили предположение о конкурентном характере ингибирования [3–5]. 7-МГ также является ингибитором тРНК-гуанинтрансгликозилазы (ТГТ) – фермента, участвующего в механизме трансляции [6]. Показано, что при нокауте/нокадауне гена ТГТ снижается пролиферация и миграция опухолевых клеток [7].

Синтетические ингибиторы ПАРП-1 олапариб, рупапариб и нирапариб используются в медицине в качестве инновационных противоопухолевых пре-

паратов, однако обладают серьезными побочными эффектами (в частности, миелодиспластический синдром/острый миелоидный лейкоз) [8, 9]. В то же время природный ингибитор 7-МГ продемонстрировал безопасность в проведенном нами токсикологическом исследовании; была подобрана доза для его введения мышам – 50 мг/кг внутривнутрижелудочно (в/ж), 3 раза в неделю [10]. Наличие нескольких релевантных мишеней (ПАРП-1, ТГТ) и безопасность 7-МГ обуславливают перспективность дальнейших *in vivo* исследований. В представленной работе впервые описано противоопухолевое действие 7-МГ на моделях аденокарциномы толстой кишки.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Мыши BALB/c (самцы, возраст 4 недели) были получены из разведения НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина. Образец мышинной аденокарциномы Акатол [11] был получен из коллекции опухолей НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина. Суспензию опухолевых клеток (0.5 мл, 0.1 г/мл) вводили подкожно в надло-

паточную область. Введение тестируемых веществ начинали на 5-й день после перевивки. Мышей разбивали на группы по 9 животных в каждой: контрольная группа I, вода (в/ж, 3 раза в неделю); группа II, цисплатин (2.5 мг/кг в/б, 2 раза в неделю в течение 1 недели); группа III, 7-МГ (50 мг/кг в/ж, 3 раза в неделю); группа IV, 7-МГ + цисплатин. Для приготовления суспензии 7-МГ (5 мг/мл) навеску вещества смешивали с дистиллированной водой, встряхивали на вортексе, после чего оставляли на 5 мин в ультразвуковой бане при температуре 45°C. Полученную суспензию 7-МГ вводили с помощью гастрального зонда. При комбинированном лечении 7-МГ вводили за 3 ч до цисплатина. После развития опухолевых узлов измеряли их объем по формуле: $V = 1/2 \times \text{длина} \times \text{ширина}^2$. Анализ результатов проводили по достижении среднего значения объема опухоли в контрольной группе 4000 мм³.

Фармакокинетический эксперимент проводили на самцах мышей BALB/c на 15-й день после перевивки опухоли Акатол. За 18 ч до проведения эксперимента мышей лишали доступа к корму. Животным однократно вводили 7-МГ (50 мг/кг в/ж) и затем производили забор крови и опухолевой ткани через 15 мин (2 мыши), 60 мин (2 мыши) и 180 мин (3 мыши). Полученные образцы замораживали и подвергали лиофилизации, механическому измельчению и последовательной экстракции растворителями (90% водным раствором ацетонитрила, содержащим 2% трифторуксусной кислоты, ацетоном и 0.1% водным раствором гептафтормасляной кислоты). Количественный анализ 7-МГ проводили с помощью хромато-масс-спектрометрического анализа на приборе LCQ Advantage MAX (Thermo Electron Co., США), оснащенного хроматографом Surveyor Plus и источником ионизации ESI. В качестве внутреннего стандарта использовали дейтерированный 7-МГ, полученный методом твердофазного изотопного обмена [12].

Иммунодефицитные мыши BALB/c nude (самки, возраст 6–7 недель) были получены из разведения лаборатории биохимических основ фармакологии и опухолевых моделей НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина. Суспензию опухолевых клеток человека HCT116 (0.2 мл, 1.2×10^6 кл/мл) вводили подкожно в правый и левый бок мыши. Введение тестируемых веществ начинали на 10-й день после перевивки. Мышей разбивали на группы по 4 животных в каждой: контрольная группа I, калий-фосфатный буфер (в/б, 3 раза в неделю); группа II, цисплатин (1 мг/кг в/б, 3 раза в неделю в течение 1 недели); группа III, 7-МГ (50 мг/кг в/ж, 3 раза в неделю); группа IV, 7-МГ + цисплатин. При комбинированном лечении 7-МГ вводили за 3 ч до цисплатина. Объем опухолевых узлов измеряли по формуле $V = \pi/6 \times \text{длина} \times \text{ширина} \times \text{глубина}$.

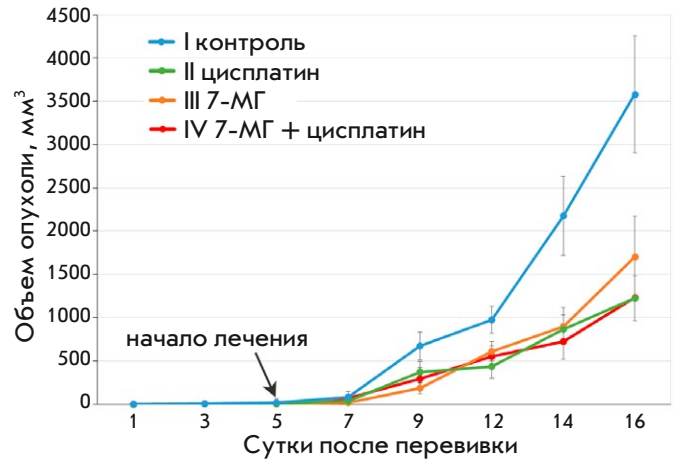


Рис. 1. Динамика роста аденокарциномы толстой кишки в модели Акатол

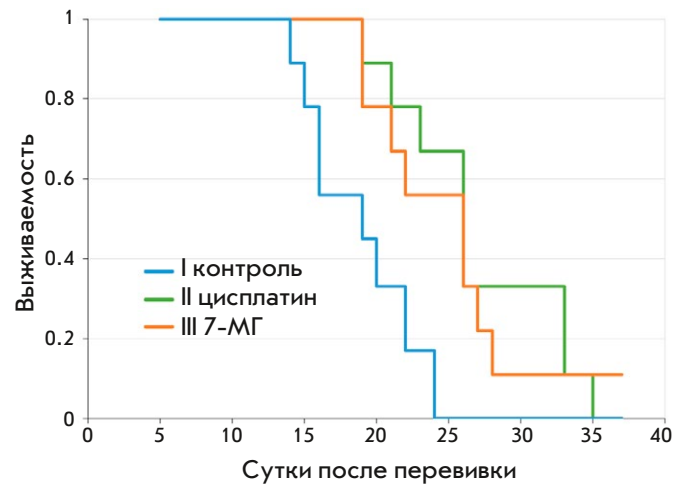


Рис. 2. Выживаемость мышей с перевитой опухолью Акатол (животное выбывало из группы по достижении размера опухоли 4000 мм³)

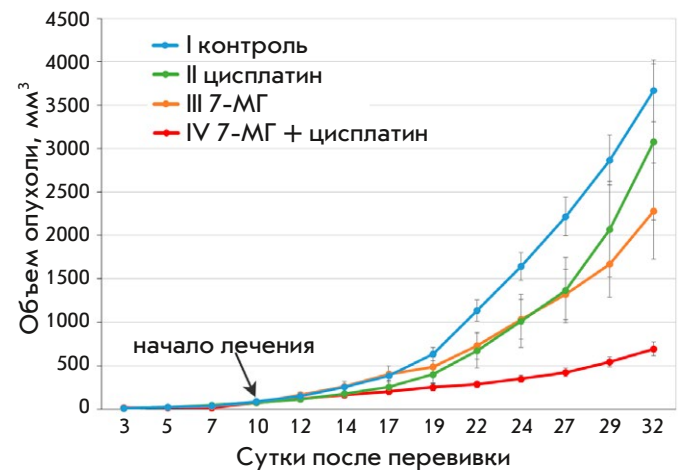


Рис. 3. Динамика роста аденокарциномы толстой кишки в ксенографтной модели

Все эксперименты на животных выполняли в соответствии с требованиями Этического комитета НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина по работе с животными.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Биологическая активность ингибитора 7-МГ при в/ж введении была исследована на модели рака толстой кишки мыши Акатол. В качестве препарата сравнения использовали классический генотоксичный агент цисплатин, эффективность которого была ранее продемонстрирована в отношении модели Акатол. В результате показано существенное торможение роста опухоли в случае введения цисплатина (65.8%), 7-МГ (52.5%) и их комбинации (65.5%) на 16-е сутки эксперимента (рис. 1). Эффекты известного химиопрепарата цисплатина и обнаруженного ингибитора ПАРП-1 7-МГ оказались сопоставимы, а использование их комбинации не привело к усилению противоопухолевого действия.

Согласно регламенту работы с модельными мышами, при достижении критического размера опухоли (4000 мм³) животное может быть исключено из экспериментальной группы. Время, за которое опухоль достигает такого размера, можно условно принять за продолжительность жизни после перевивки. На рис. 2 показано выбывание мышей из группы по достижении критического размера опухоли, можно видеть заметное увеличение выживаемости при введении цисплатина и 7-МГ.

Для подтверждения накопления 7-МГ в перевитой опухоли Акатол был осуществлен фармакокинетический эксперимент. После в/ж введения 7-МГ его содержание в опухоли постепенно возрастало и через 15, 60 и 180 мин составило 218±13, 460±28 и 989±59 нг/г соответственно. При этом соотношение концентраций 7-МГ в опухоли и крови практически не зависело от времени и равнялось в среднем 0.44, что, с учетом низкой васкуляризации ткани, свидетельствует об эффективном проникновении 7-МГ в опухоль.

Также противоопухолевая активность 7-МГ была протестирована на ксенографтной модели рака толстой кишки, полученной в результате перевивки мышам опухолевых клеток человека НСТ116. На 32 сутки эксперимента торможение роста опухоли при введении цисплатина, 7-МГ и их комбинации составило 16.1, 37.8 и 80% соответственно (рис. 3). Интересно, что комбинация 7-МГ и цисплатина привела к аддитивному эффекту, который не наблюдался в случае модели Акатол. Вероятно, опухолевые клетки человека НСТ116 более чувствительны к комбинированному воздействию тестируемых препаратов.

ВЫВОДЫ

Осуществлен *in vivo* анализ противоопухолевой активности природного соединения 7-МГ на модели рака толстой кишки Акатол, а также на ксенографтной модели с использованием опухолевых клеток человека НСТ116. Показатели торможения роста опухоли при введении 7-МГ свидетельствуют о высокой эффективности препарата в выбранном режиме – 50 мг/кг в/ж, 3 раза в неделю. С использованием хромато-масс-спектрометрического анализа показана высокая степень накопления 7-МГ в опухолевой ткани. В случае ксенографтной модели обнаружено существенное усиление противоопухолевого действия при комбинированном введении 7-МГ и известного химиотерапевтического препарата цисплатина (торможение роста 80%). Полученные данные подтверждают перспективность дальнейших исследований 7-МГ в качестве нового противоопухолевого средства. ●

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда (грант № 19-74-10072). Получение дейтерированного 7-МГ осуществлено в рамках выполнения государственного задания НИЦ «Курчатовский институт».

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Topp N., Sander G., Heller-Schöch G., Schöch G. // *Anal. Biochem.* 1987. V. 161. P. 49–56.
2. Нилов Д.К., Тараров В.И., Куликов А.В., Захаренко А.Л., Гущина И.В., Михайлов С.Н., Лаврик О.И., Швядас В.К. // *Acta Naturae.* 2016. Т. 8. № 2. С. 120–128.
3. Nilov D., Maluchenko N., Kurgina T., Pushkarev S., Lys A., Kutuzov M., Gerasimova N., Feofanov A., Švedas V., Lavrik O., et al. // *Int. J. Mol. Sci.* 2020. V. 21. P. 2159.
4. Кургина Т.А., Шрам С.И., Кутузов М.М., Абрамова Т.В., Щербакова Т.А., Мальцева Е.А., Поройков В.В., Лаврик О.И., Швядас В.К., Нилов Д.К. // *Биохимия.* 2022. Т. 87. С. 794–803.
5. Шрам С.И., Щербакова Т.А., Абрамова Т.В., Барадиева Э.Ц., Ефремова А.С., Смирновская М.С., Сильников В.Н., Швядас В.К., Нилов Д.К. // *Биохимия.* 2023. Т. 88. С. 962–972.
6. Пушкарев С.В., Винник В.А., Шаповалова И.В., Швядас В.К., Нилов Д.К. // *Биохимия.* 2022. Т. 87. С. 550–557.
7. Zhang J., Lu R., Zhang Y., Matuszek Ž., Zhang W., Xia Y., Pan T., Sun J. // *Cancers (Basel).* 2020. V. 12. P. 628.
8. Ohmoto A., Yachida S. // *Onco Targets Ther.* 2017. V. 10. P. 5195–5208.
9. Mittica G., Ghisoni E., Giannone G., Genta S., Aglietta M., Sapino A., Valabrega G. // *Recent Pat. Anticancer Drug Discov.* 2018. V. 13. P. 392–410.
10. Kirsanov K., Fetisov T., Antoshina E., Trukhanova L., Gor'kova T., Vlasova O., Khitrovo I., Lesovaya E., Kulbachevskaya N., Shcherbakova T., et al. // *Front. Pharmacol.* 2022. V. 13. P. 842316.
11. Фетисов Т.И., Тилова Л.Р., Лесовая Е.А., Антошина Е.Е., Горькова Т.Г., Труханова Л.С., Морозова О.В., Шипаева Е.В., Иванов Р.В., Пурмаль А.А. и др. // *Усп. мол. онкол.* 2016. Т. 3. С. 67–72.
12. Zolotarev Y.A., Dadayan A.K., Borisov Y.A., Kozik V.S. // *Chem. Rev.* 2010. V. 110. P. 5425–5446.

УДК 616-074

Церамиды как потенциально новые предикторы тяжести течения острого коронарного синдрома в сочетании с инфекцией SARS-CoV-2

Н. Г. Ложкина^{1,2,3}, О. И. Гущина^{2,3*}, Н. В. Басов^{1,4}, Е. В. Гайслер¹, А. Д. Рогачев^{1,4}, Ю. С. Сотникова^{1,4,5}, Ю. В. Патрушев^{1,5}, А. Г. Покровский¹

¹Новосибирский национальный исследовательский государственный университет, Новосибирск, 630090 Россия

²Федеральный исследовательский центр фундаментальной и трансляционной медицины, Новосибирск, 630060 Россия

³Городская клиническая больница № 1, Новосибирск, 630047 Россия

⁴Новосибирский институт органической химии им. Н.Н. Ворожцова СО РАН, Новосибирск, 630090 Россия

⁵Институт катализа СО РАН, Новосибирск, 630090 Россия

*E-mail: Varalenna@yandex.ru

Поступила в редакцию 25.03.2024

Принята к печати 07.06.2024

DOI: 10.32607/actanaturae.27400

РЕФЕРАТ Острые коронарные события (ОКС) в сочетании с инфекцией SARS-CoV-2 могут существенно отличаться от классических проявлений ОКС. Новые биомаркеры, такие, как церамиды, способны помочь в диагностике и лечении данного заболевания. В исследование вошли 73 пациента с диагнозом ОКС, у которых верифицирована инфекция SARS-CoV-2. Выделено две подгруппы: благоприятного и летального исхода. У всех пациентов на момент поступления были отобраны образцы плазмы для проведения метаболомного анализа. При анализе метаболитов выявлено, что в подгруппе летальных исходов уровни церамидов были существенно ниже, чем в подгруппе выживших пациентов. Таким образом, определение уровня церамидов у больных ОКС в сочетании с COVID-19 может помочь в определении прогноза таких пациентов и управлении их рисками.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА острый коронарный синдром, инфаркт миокарда, SARS-CoV-2-инфекция, метаболомика, церамиды.

ВВЕДЕНИЕ

Острые коронарные события (ОКС) в сочетании с SARS-CoV-2-инфекцией могут существенно отличаться от классических проявлений данного заболевания. Многие симптомы, характерные для тяжелой вирусной инфекции, маскируют проявления острого коронарного синдрома. В свою очередь, ОКС также могут скрывать признаки инфекции. Дыхательная недостаточность, высокая активность воспалительных маркеров, боли в грудной клетке, а в тяжелых клинических случаях – шок и гипотония – трудно дифференцируемы по отправной точке своего развития. Одной из главных проблем при постановке клинического диагноза является позднее развитие симптомов заболевания, включая поздний вираж маркеров некроза миокарда. Так, например, титры

высококочувствительного тропонина при развитии инфаркта миокарда достигают диагностической значимости через 4 ч от момента появления симптомов [1]. Полезными для ранней диагностики и определения тактики лечения могут быть новые наборы биомаркеров. Сравнительно недавно для выявления молекулярных механизмов, вовлеченных в сердечно-сосудистые заболевания, стали использовать стратегии, основанные на метаболомном подходе.

Метаболомные технологии позволяют идентифицировать, количественно определять и характеризовать низкомолекулярные метаболиты массой менее 1500 Да [2]. Определение метаболомного профиля пациентов и нахождение возможных биомаркеров могут помочь в ранней диагностике заболеваний и применении персонифицированной терапии.

Один из перспективных классов сигнальных молекул – церамиды. Это подкласс липидных молекул составляет гидрофобную основу всех сложных сфинголипидов (например, сфингомиелина (СМ), цереброзидов, ганглиозидов), в его структуру входит ацильный заместитель с переменной длиной углеродной цепи, связанный с аминогруппой сфингоидного основания, обычно сфингозина. Церамиды являются важными компонентами всех клеточных мембран. Жирные ацильные цепи, как правило, насыщенные или мононенасыщенные, могут содержать ОН-группу, связанную с С2 или с концевым атомом углерода (α - и ω -гидроксигирные кислоты соответственно) [3]. Ценность церамидов как диагностических маркеров связана с высокой устойчивостью при различных температурах (что отражается в простоте забора, хранения и транспортировки биологического материала). Результаты изучения взаимосвязи церамидов с сердечно-сосудистой патологией противоречивы. Эти биомаркеры активно изучали во время пандемии COVID-19 у больных с разными вариантами течения инфекции, однако их роль в патогенезе, течении и прогнозе острого коронарного синдрома в сочетании с SARS-CoV-2-инфекцией остается неясной. В связи с этим оценка роли ряда ключевых метаболитов, включая церамиды, как потенциально новых предикторов тяжести течения ОКС в сочетании с SARS-CoV-2-инфекцией представляется актуальной.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Характеристика больных и методы исследования

В исследование включено 73 больных, последовательно поступивших в региональный сосудистый центр № 1 ГБУЗ НСО ГКБ № 1 г. Новосибирска с диагнозом острый коронарный синдром (подтвержденным согласно российским и европейским клиническим рекомендациям), у которых верифицирована SARS-CoV-2-инфекция (не более чем за 28 дней до или в течение 14 дней после наступления ОКС). Всем пациентам выполнен полный спектр исследований согласно действующим клиническим рекомендациям по обеим патологиям: общий и биохимический анализ крови, коагулограмма с определением Д-димера, ПЦР-диагностика COVID-19, электрокардиография (ЭКГ), эхокардиография (ЭхоКГ) в момент поступления, компьютерная томография органов грудной клетки (КТ ОГК), коронароангиография (КАГ) с выполнением чрескожной транслюминальной баллонной ангиопластики (ЧТКА) и стентированием инфаркт-связанной артерии с использованием современного сертифицированного медицинского оборудования [4, 5]. Помимо

стандартного обследования у всех больных на момент поступления были забраны и заморожены при температуре -70°C образцы плазмы для проведения метаболомного анализа, который был выполнен на базе Новосибирского государственного университета. Протокол исследования одобрен на заседании локального этического комитета.

Критерии включения

Мужчины и женщины 18–90 лет, поступившие в клинику с диагнозом острый коронарный синдром (с элевацией и без элевации сегмента ST), подтвержденным типичной клинической картиной, ЭКГ, селективной коронарографией, количественным определением тропонина I; имеющие верифицированный диагноз инфекции SARS-CoV-2 (не более чем за 28 дней до или в течение 14 дней после наступления острого коронарного события); наличие подписанного добровольного информированного согласия.

Критерии исключения

Отсутствие подписанного добровольного информированного согласия. В исследование не включали больных со злокачественными новообразованиями, тяжелыми аутоиммунными заболеваниями, терминальной соматической патологией (цирроз печени любой степени тяжести, хроническая болезнь почек выше ХБП С4, пациентов на программном гемодиализе), имеющимися исходно психическими расстройствами.

Дизайн исследования

Открытое сплошное проспективное нерандомизированное методом параллельных групп исследование, включающее больных острым коронарным синдромом с выявленной новой коронавирусной инфекцией, которые последовательно поступали в отделение неотложной кардиологии ГКБ № 1 в 2021–2023 годах. Диагноз ОКС устанавливали по совокупности критериев, разработанных европейским и российским обществом кардиологов (2020), включающих: а) клинические признаки или симптомы ишемии миокарда; б) изменения ЭКГ в двух и более последовательных отведениях для ОКС_{нST} (высокоамплитудный Т, отрицательный Т, подъем сегмента ST, патологический Q, депрессия сегмента ST, наличие QR). Диагноз новой коронавирусной инфекции ставили согласно временным рекомендациям по профилактике, диагностике и лечению новой коронавирусной инфекции (версия 13 от 14.10.2021), включающим: а) положительный результат лабораторного исследования на наличие РНК SARS-CoV-2 с применением методов амплификации нуклеиновых кислот (МАНК) или антигена SARS-CoV-2

с применением иммунохроматографического анализа; б) высокую клиническую вероятность (данные компьютерной томографии легких (КТ), клинической картины, соответствующего эпидемиологического анамнеза) [4, 5].

Отбор, пробоподготовка и анализ образцов

Образцы крови были взяты у пациентов в день поступления в стационар. Венозную кровь отбирали в вакуумные пробирки, содержащие антикоагулянт К-EDTA. Плазма получена путем центрифугирования, затем перенесена в чистую пробирку и заморожена при -80°C до проведения пробоподготовки. Пробоподготовку проводили согласно [6]. К 100 мкл плазмы крови прибавляли 400 мкл охлажденной смеси метанола и ацетонитрила (1:1). Образцы встряхивали на шейкере, затем центрифугировали в течение 15 мин при $+4^{\circ}\text{C}$ и 16 000 об/мин. Супернатант переносили в стеклянную вставку для виалы и анализировали. Для контроля качества использовали образцы, полученные путем смешивания равных объемов образцов плазмы крови от пациентов.

Метаболомный анализ проводили согласно [7]. ВЭЖХ-МС/МС-анализ проводили на хроматографе Shimadzu LC-20AD Prominence, оснащенном градиентным насосом, автодозатором SIL-20AC (Shimadzu, Япония), термостатируемым при $+10^{\circ}\text{C}$, и термостатом для колонок СТО-10ASvp с температурой $+35^{\circ}\text{C}$. Хроматографическое разделение проводили на монолитной колонке с сорбентом на основе 1-винил-1,2,4-триазола, приготовленной по методике, описанной в работе [8]. В качестве подвижной фазы А использовали водный раствор $(\text{NH}_4)_2\text{CO}_3$ (20 мМ), доведенный 25% раствором аммиака до pH 9.8 и содержащий 5 об. % ацетонитрила; подвижной фазой Б был чистый ацетонитрил. Градиент обращенно-фазовой хроматографии: 0 мин – 0% Б, 1 мин – 0% Б, 6 мин – 98% Б, 16 мин – 98% Б, после чего колонку уравнивали в течение 3 мин. Градиент гидрофильной (HILIC) хроматографии: 0 мин – 98% Б, 2 мин – 98% Б, 6 мин – 0% Б, 10 мин – 0% Б, после чего колонку уравнивали в течение 4 мин. Скорость потока – 300 мкл/мин, объем пробы 2 мкл.

Детекцию метаболитов проводили на масс-спектрометре API 6500 QTRAP (AB SCIEX, США), оснащенном источником электрораспылительной ионизации, работающем в режимах положительной и отрицательной ионизации. Метаболиты детектировали в режиме мониторинга множественных реакций (multiple reaction monitoring, MRM). Основные масс-спектрометрические параметры были следующими: напряжение ионного распыления (IS) 5500 В

для положительной и -4500 В для отрицательной ионизации. Температура газа-осушителя – 475°C , газ в ячейке соударений (CAD) – «высокий», давление газа 1, газа 2 и газовой завесы – 33, 33 и 30 фунт/дюйм² (227.5, 227.5 и 206.8 кПа соответственно). Потенциал декластеризации (DP) ± 91 В, потенциал входа (EP) ± 10 В, а потенциал выхода из ячейки соударений (CXP) ± 9 В. Управление прибором и сбор информации осуществлены с помощью программного обеспечения Analyst 1.6.3 (AB SCIEX, США). Хроматограммы обрабатывали с помощью программы MultiQuant 2.1 (AB SCIEX, США).

Полученные образцы были разделены на две группы: с благоприятным исходом (выздоровление) и с внутрибольничным летальным исходом. Произведен метаболомный анализ образцов этих групп и установлены ключевые метаболиты. Для оценки различия двух подгрупп «летальная» и «выжившие больные» использовали критерий Манна–Уитни. Критическое значение для размерности подгрупп **MW crit = 32**.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Выделенные группы достоверно различались по возрасту: средний возраст в первой группе составил 63.6 ± 9.6 лет, во второй (группа неблагоприятного исхода) – 73 ± 8.2 г. ($p = 0.003$). В группу 1 вошли 37 мужчин и 24 женщины, в группе 2 было 5 мужчин и 6 женщин. У всех умерших пациентов имел место ОКС с подъемом ST, в группе благоприятного исхода подъем ST диагностирован у 56 пациентов, у 5 – ОКС без подъема ST.

Течение SARS-CoV-2-инфекции по степени тяжести распределилось следующим образом: в группе благоприятного исхода легкое и бессимптомное течение отмечено в 22 случаях, у 26 человек инфекция имела среднетяжелое течение, у 12 тяжелое. В группе летального исхода бессимптомного течения SARS-CoV-2-инфекции не отмечено, легкая форма выявлена у одного пациента, у одного отмечена средняя степень тяжести, у 9 зарегистрирована крайне тяжелое течение соответственно.

При анализе клинико-лабораторных показателей выявлены достоверные различия между изучаемыми подгруппами пациентов: наличие любой формы фибрилляции предсердий чаще встречалось в группе летального исхода, чем в группе выживших ($p < 0.5$); уровень сывороточного железа был ниже в группе неблагоприятного исхода ($p < 0.001$), альбумин достоверно был ниже в группе неблагоприятного госпитального исхода в сравнении с группой выживших ($p < 0.001$). Уровень Д-димера, напротив, был выше в группе 2 ($p < 0.0001$). Средняя концентрация С-реактивного белка при поступле-

Таблица 1. Значения ключевых метаболитов в исследуемых группах

Метаболит	MW*	Кратность летальн. /нелетальн.
Церамид (d18:1/22:0)	4	0.503
Церамид (d18:1/24:0)	9	0.531
Церамид (d18:1/24:0 OH)	11	0.579
Церамид (d18:1/22:2 OH)	12	0.564
Церамид (d18:1/23:0) или церамид (d18:1/22:1 OH)	12	0.529
Церамид (d18:1/25:0)	13	0.524
Гликофинголипид (18:1/22:0)	13	0.486
Гликофинголипид (18:1/24:1)	15	0.356
Церамид (d18:1/20:1 OH)	18	0.621
Церамид (d18:1/22:0 OH)	18	0.685
Церамид (d18:1/24:1)	19	0.450
Церамид (d18:1/20:0)	21	0.658
Церамид (d18:1/18:0)	23	0.695
Церамид (d18:1/26:1)	23	0.702
Сфингомиелин (d18:1/22:0 OH)	23	0.663
Церамид (d18:1/16:0 OH)	24	0.712
Церамид (d18:1/26:2)	24	0.653
Церамид (d18:1/16:1 OH)	25	0.731
Церамид (d18:1/24:2 OH)	27	0.641
Сфингомиелин (d18:1/22:2)	27	0.683
3-Фосфоглицериновая кислота	28	0.456
Церамид (d18:1/18:0 OH)	28	0.680
Сфингомиелин (d18:1/24:0)	28	0.569
Церамид (d18:1/18:1 OH)	29	0.719
Церамид (d18:1/18:1)	29	0.738
Кортикостерон	29	0.594
Гликофинголипид (18:1/20:0)	29	0.648
Сфингомиелин (d18:1/16:2 OH)	29	0.750
Сфингомиелин (d18:1/18:2 OH)	30	0.686
Плазмалоген (p18:0/22:6)	31	0.655
5-Гидроксииндолуксусная кислота	32	1.788
Гликофинголипид (18:1/16:0)	32	0.561

*MW – значение U-статистики Манна–Уитни.

нии в 1-й группе было значимо ниже, чем во 2-й ($p = 0.0243$). Показатели сократимости миокарда как левого, так и правого желудочков были значимо хуже в группе летального исхода ($p < 0.0001$). Не обнаружено значимых различий в степени поражения коронарных артерий, параметрах липидного спектра. Таким образом, по значениям клинико-лабораторных, инструментальных показателей, используемых в рутинной клинической практике, полученные нами результаты согласуются с данными других исследователей [9, 10].

На следующем этапе определили ключевые метаболиты в плазме крови подгрупп больных. Сравнение средних величин показателей обнаружи-

ло «насыщение» выделенных метаболитов группой церамидов (19 соединений, табл. 1), а также пять метаболитов класса сфингомиелинов (SM) и четыре метаболита, относящихся к классу гликозилцерамидов (GC).

Сравнительный анализ содержания выявленных метаболитов в образцах групп пациентов показал, что уровни всех метаболитов в плазме пациентов с летальным исходом были заметно ниже, чем у выживших пациентов. Исключение составила только 5-гидроксииндолуксусная кислота, уровень которой увеличился более чем в 1.5 раза. На рис. 1 представлены нормализованные значения площадей пиков ряда церамидов в двух группах.

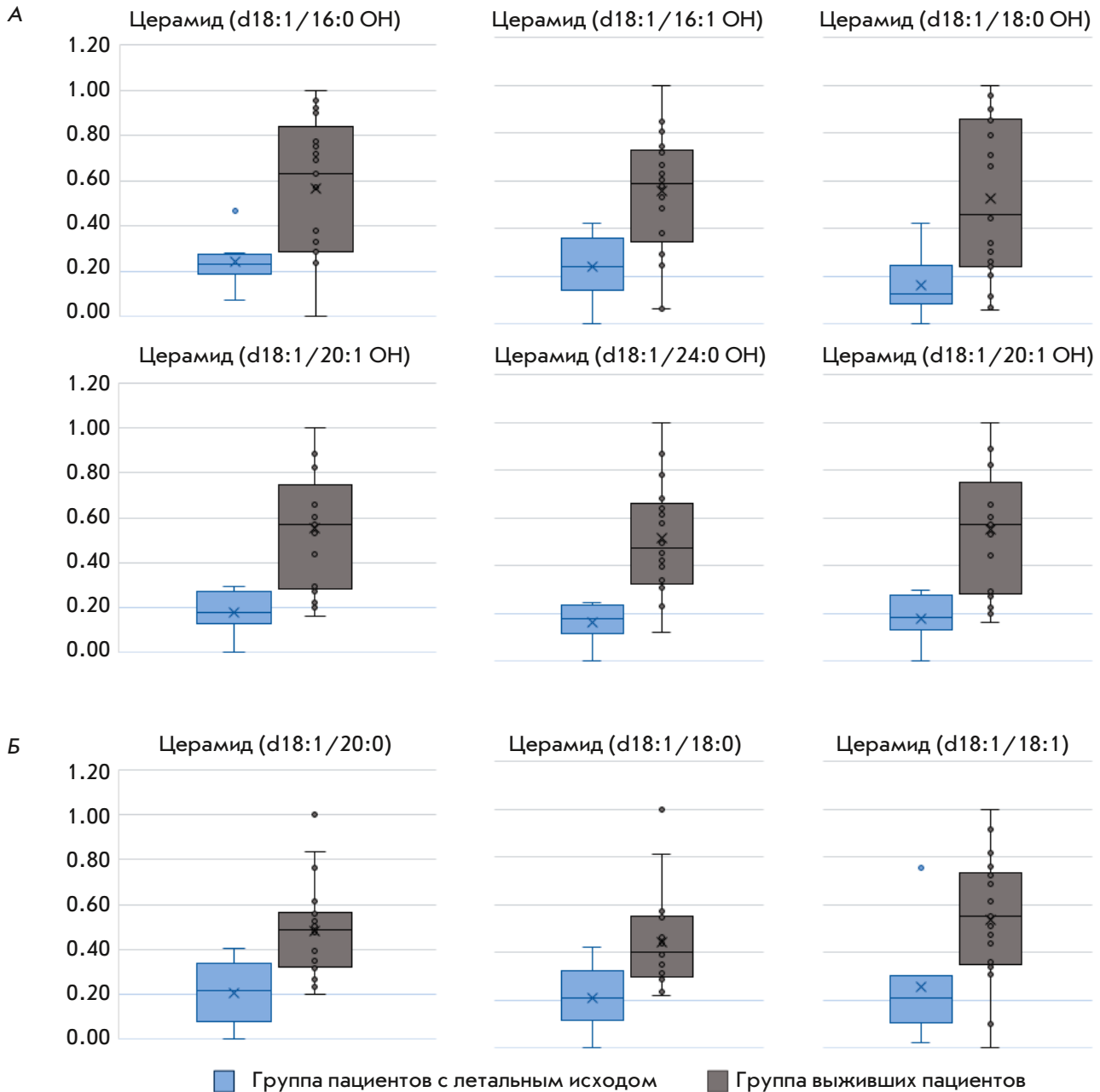


Рис. 1. Содержание церамидов в исследуемых группах. А – гидроксильные церамиды; Б – церамиды без гидроксильных групп

ОБСУЖДЕНИЕ

Церамиды участвуют в различных клеточных процессах, включая патологические. В покоящихся клетках их уровень чрезвычайно низок, однако он может существенно увеличиваться в условиях клеточного стресса или в ответ на различные стимулы (цитокины, лиганды рецепторов апоптоза, противоопухолевые препараты). Более того, накопленные данные свидетельствуют о том, что струк-

турные особенности различных видов церамидов могут определять их специфичность по отношению к определенным клеточным процессам [11]. Однако молекулярные механизмы, детерминирующие эту специфичность и способ действия церамидов на клетки, еще предстоит детально изучить. Предполагается, что основой этого механизма могут быть изменения биофизических свойств мембран, возникающие при образовании церамидов.

Эти изменения частично связаны с уникальной молекулярной структурой керамидов, включая их очень малые функциональные группы, гидрофобность и высокую температуру плавления, что способствует снижению их смешиваемости с другими мембранными липидами. В нескольких исследованиях сообщается об увеличении проницаемости мембран при образовании керамидов под действием бактериальной сфингомиелинфосфодиэстеразы (SMase) или при добавлении керамида к предварительно сформированным мембранам. Предполагается, что образование керамидов на клеточной мембране может приводить к изменениям липид-липидных, липид-белковых и белок-белковых взаимодействий, что может значительно влиять на активность белка и, таким образом, на сигнальные процессы [12].

Роль керамидов изучали в ходе развития и течения сердечно-сосудистой патологии. Известно, что развитие атеросклеротических бляшек представляет собой сложный процесс, в значительной мере связанный с воспалением, который начинается с повреждения эндотелия и сопровождается местной инвазией иммунных клеток, накоплением липидов и ремоделированием сосудистой стенки. Изначально считалось, что индукция клеточного апоптоза является основной причиной повреждения клеток, связанного с керамидами [13], однако далее это предположение было поставлено под сомнение, поскольку оказалось, что увеличение уровня клеточных керамидов происходит только на более поздних стадиях апоптоза [14, 15]. На макрофагах, эндотелиальных клетках, гепатоцитах и линиях опухолевых клеток, таких, как линия MCF7 клеток рака молочной железы, показано, что керамиды опосредуют клеточные эффекты рецептора фактора некроза опухоли- α (TNF- α) [16]. Высокие уровни керамидов также были связаны с гибелью клеток миокарда в одной мышечной модели инфаркта миокарда. Кроме того, керамиды могут вызывать сосудистую дисфункцию за счет дезактивации эндотелиальной NO-синтазы [17].

Снижение уровня керамидов в клетках и тканях путем ингибирования ферментов, участвующих в образовании керамидов, препятствует развитию атеросклероза в животных моделях [18]. В сосудистых тканях керамиды продуцируются в ответ на гипергликемию и передачу сигналов TNF- α , участвуют в передаче сигналов NO и воспалении. Повышенный уровень керамидов в крови человека ассоциирован с сердечно-сосудистыми событиями. Кроме того, такие сердечно-сосудистые факторы риска, как ожирение и сахарный диабет, связаны с накоплением керамидов [19].

Одно из первых исследований, связывающих уровни керамидов в крови с прогрессированием сердечно-сосудистых заболеваний, выполнено Meikle и соавт. [20]. С тех пор были проведены наблюдательные исследования, которые ясно показали связь определенных подвидов керамидов с повышенным риском сердечно-сосудистых событий. Наиболее полные из этих исследований проведены группами Nilvo и Navulinna [21, 22]. На основании этих работ созданы две различные шкалы риска, показывающие, что, в частности, керамиды C16:0, C18:0, а также C24:1 могут быть маркерами высокого риска сердечно-сосудистых событий, независимыми от других установленных сердечно-сосудистых факторов риска у пациентов с ишемической болезнью сердца [21, 22]. Отметим, что связь повышенных уровней керамида C18:0 с серьезными сердечно-сосудистыми событиями также присутствовала у пациентов без известной ишемической болезни сердца, причем она не зависела от других сердечно-сосудистых факторов риска.

Множество исследований демонстрируют значимость керамидов в реакции воспаления. Например, керамиды участвуют в передаче провоспалительных сигналов в эндотелиальных клетках [23]. В сердечно-сосудистой системе воспалительные процессы активируются различными стимулами, например, молекулярными паттернами, связанными с патогенами или с повреждением [24]. Хотя точные механизмы, лежащие в основе этого явления, до конца не изучены, в нескольких исследованиях показана корреляция между керамидами и активацией воспалительных заболеваний. Впервые этот факт описали Кока и соавт., которые применили фармакологическое ингибирование кислой сфингомиелиназы (ASM) с помощью амитриптилина, а также РНК-интерференцию (RNAi) для изучения эндотелиальных клеток мышцей ASM-/-, чтобы показать, что ASM опосредует воспалительную реакцию с участием NLRP3 (пириновый домен семейства NLR3-инфламмасом) [25]. Эти результаты подтверждены *in vivo* на мышцах ASM-/-, а также воспроизведены в исследовании, использующем RNAi против ASM в эндотелиальных клетках [26]. Менее ясна роль керамидов в активации NLRP3 в макрофагах. Camell и соавт. [27] не обнаружили участия пути синтеза *de novo*, включающего серин-пальмитоилтрансферазу, в активации воспаления, однако иные пути производства керамидов не анализировались. Scheiblich и соавт. показали, что активация SPT или внешнее применение нефизиологического керамида C2 приводит к активации NLRP3 и высвобождению интерлейкина-1 β (IL-1 β) в клетках микроглии [28]. Введение керамида C2 приводило

к активации воспаления в макрофагах костномозгового происхождения [29]. Было высказано предположение, что керамида и активация воспаления связаны между собой [30, 31]. В частности, керамида, полученные в реакции с ASM, по-видимому, важны для передачи сигналов воспаления [32]. Наконец, остается неясным, активируются ли керамида напрямую при воспалительных процессах или если активация опосредуется молекулярными паттернами, связанными с патогеном, или молекулярными паттернами, связанными с повреждением. Доказательства прямой активации воспаления керамидами в настоящее время отсутствуют.

Церамиды и SARS-CoV-2

Исследования показывают, что при SARS-CoV-2 может наблюдаться как повышение, так и понижение уровней керамидов. Повышенные уровни керамидов могут быть связаны с активацией апоптоза, что приводит к гибели клеток и, возможно, способствует развитию воспалительных процессов, характерных для тяжелых форм COVID-19. С другой стороны, снижение уровней керамидов может быть связано с истощением их предшественников или нарушением их синтеза под влиянием вируса [33, 34]. Хотя механизм связывания вируса SARS-CoV-2 с его рецептором [35, 36], ангиотензин-превращающим ферментом 2 (ACE2) и протеазой TMPRSS2, которая активирует вирусную пепломеразу, хорошо изучен, изменения в клеточной мембране, происходящие в процессе инфекции, представляют собой сложный и многофакторный процесс. Во время процессинга вируса в клетке-хозяине происходят значительные изменения в липидном составе мембраны, включая изменения в уровнях керамидов и других сфинголипидов. Эти изменения могут быть вызваны не только апоптозом, но и тем, что вирус может изменять состав мембраны для оптимизации своей репликации, влияя на уровень керамидов и других липидов; нарушением нормального липидного обмена в клетке, что может приводить к изменениям в уровнях керамидов и других липидов. Эти патологические процессы участвуют в микро-

сосудистом повреждении при SARS-CoV-2, поэтому ассоциируются с сердечно-сосудистыми осложнениями у больных SARS-CoV-2.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В настоящем исследовании изучен уникальный фенотип заболевания – сочетание острого коронарного синдрома с SARS-CoV-2. При сравнении с ОКС без SARS-CoV-2 выявлен повышенный уровень керамидов в группе ОКС без SARS-CoV-2, что может указывать на их роль в патогенезе данного сочетания заболеваний. Кроме того, отмечен парадоксальный ответ метаболической системы организма на острое коронарное событие в сочетании с COVID-19: в подгруппе с летальными исходами уровни керамидов значительно ниже, чем в подгруппе выживших. Возможное объяснение низких уровней керамидов у пациентов с летальным исходом заключается в истощении предшественников этих метаболитов в терминальном состоянии, что может быть обусловлено влиянием неструктурных белков вируса SARS-CoV-2, которые активируют метаболические пути, участвующие в процессе апоптоза и воспаления. Также предполагается, что активная продукция вирусных частиц может приводить к истощению клетки и разрушению клеточной мембраны, что может объяснять необычайно высокий уровень компонентов клеточной мембраны в плазме у лиц, зараженных вирусом SARS-CoV-2, однако этот феномен требует дальнейшего изучения.

Таким образом, настоящее пилотное исследование показало, что анализ метаболомного профиля с акцентом на уровни керамидов может помочь в определении риска летального исхода у пациентов с острым коронарным синдромом в сочетании с инфекцией SARS-CoV-2. Полученные данные нуждаются в проверке на других популяциях пациентов. ●

*Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.
Источники финансирования: нет.*

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Westwood M., Ramaekers B., Grimm S., Worthy G., Fayter D., Armstrong N., Buksnys T., Ross J., Joore M., Kleijnen J. // Health Technol. Assess. 2021. V. 25. № 33. P. 1–276.
- Zhang A., Sun H., Wang P., Han Y., Wang X. // J. Proteomics. 2012. V. 75. № 4. P. 1079–1088.
- Colombini M. Ceramide Channels // Adv. Exp. Med. Biol. 2019. V. 1159. P. 33–48.
- Клинические рекомендации «Острый инфаркт миокарда с подъемом сегмента ST электрокардиограммы от 2020 г.» // Рос. кардиол. журн. 2020. Т. 25. № 11. С. 4103.
- Временные методические рекомендации «Профилактика, диагностика и лечение новой коронавирусной инфекции (COVID-19). Версия 17 (09.12.2022)». Министерство здравоохранения Российской Федерации. 2022. С. 1–210.
- Li K., Naviaux J.C., Bright A.T., Wang L., Naviaux R.K. // Metabolomics. 2017. V. 13 № 10. P. 122.
- Basov N.V., Rogachev A.D., Aleshkova M.A., Gaisler E.V., Sotnikova Y.S., Patrushev Y.V., Tolstikova T.G., Yarovaya O.I., Pokrovsky A.G., Salakhutdinov N.F. // Talanta. 2023. V. 267. P. 125168.
- Patrushev Y.V., Sotnikova Y.S., Sidelnikov V.N. // Protect.

- Met. Phys. Chem. Surf. 2020. V. 56. № 1. P. 49–53.
9. Wu Z., McGoogan J.M. // *JAMA*. 2020. V. 323. № 13. P. 1239–1242.
10. Akhtar Z., Chowdhury F., Aleem M.A., Ghosh P.K., Rahman M., Rahman M., Hossain M.E., Sumiya M.K., Islam A.M., Uddin M.J., et al. // *Open Heart*. 2021. V. 8. e001617.
11. Colombini M. // *J. Bioenerg. Biomembr.* 2017. V. 49. № 1. P. 57–64.
12. Chaurasia B., Summers S.A. // *Annu. Rev. Physiol.* 2021. V. 10. № 83. P. 303–330.
13. Hannun Y.A. // *J. Biol. Chem.* 1994. V. 4. № 269. № 5. P. 3125–3128.
14. Watts J.D., Gu M., Patterson S.D., Aebersold R., Polverino A.J. // *Cell Death Differ.* 1999. V. 6. P. 105–114.
15. Thomas R.L., Matsko C.M., Lotze M.T., Amoscato A.A. // *J. Biol. Chem.* 1999. V. 274. P. 80–88.
16. Al-Rashed F., Ahmad Z., Thomas R., Melhem M., Snider A.J., Obeid L.M., Al-Mulla F., Hannun Y.A., Ahmad R. // *Sci. Rep.* 2020. V. 10. P. 16802.
17. Lallemand T., Rouahi M., Swiader A., Grazide M.H., Geofre N., Alayrac P., Recazens E., Coste A., Salvayre R., Nègre-Salvayre A., et al. // *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 2018. V. 38. P. 1479–1492.
18. Choi R.H., Tatum S.M., Symons J.D., Summers S.A., Holland W.L. // *Nat. Rev. Cardiol.* 2021. V. 18. № 10. P. 701–711.
19. Junqueira D.L.M., Stach A., Caixeta A., Sallum J., Yasaki E., Tsutsui J., Rizatti E., Rochitte C.E., Ching-Jianhong, Kovalik J.P., et al. // *Arq. Bras. Cardiol.* 2022. V. 118. № 4. P. 768–777.
20. Meikle P.J., Hopwood J.J., Clague A.E., Carey W.F. // *JAMA*. 1999. V. 281. № 3. P. 249–254.
21. Hilvo M., Vasile V.C., Donato L.J., Hurme R., Laaksonen R. // *Front. Endocrinol. (Lausanne)*. 2020. V. 11. P. 628.
22. Havulinna A.S., Sysi-Aho M., Hilvo M., Kauhanen D., Hurme R., Ekroos K., Salomaa V., Laaksonen R. // *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 2016. V. 36. P. 2424–2430.
23. Laaksonen R., Ekroos K., Sysi-Aho M., Hilvo M., Vihervaara T., Kauhanen D., Suoniemi M., Hurme R., März W., Scharnagl H., et al. // *Eur. Heart J.* 2016. V. 37. № 25. P. 1967–1976.
24. Takahashi M. // *Cardiovasc. Res.* 2022. V. 118. P. 372–385.
25. Koka S., Xia M., Chen Y., Bhat O.M., Yuan X., Boini K.M., Li P.L. // *Redox Biol.* 2017. V. 13. P. 336–344.
26. Chen Y., Yuan M., Xia M., Wang L., Zhang Y., Li P.L. // *Front. Biosci.* 2016. V. 21. P. 635–650.
27. Camell C.D., Nguyen K.Y., Jurczak M.J., Christian B.E., Shulman G.I., Shadel G.S., Dixit V.D. // *J. Biol. Chem.* 2015. V. 290. P. 402–413.
28. Scheiblich H., Schlütter A., Golenbock D.T., Latz E., Martinez-Martinez P., Heneka M.T. // *J. Neurochem.* 2017. V. 143. № 5. P. 534–550.
29. Vandanmagsar B., Youm Y.H., Ravussin A., Galgani J.E., Stadler K., Mynatt R.L., Ravussin E., Stephens J.M., Dixit V.D. // *Nat. Med.* 2011. V. 17. P. 179–188.
30. Hong J., Bhat O.M., Li G., Dempsey S.K., Zhang Q., Ritter J.K., Li W., Li P.L. // *Biochim. Biophys. Acta Mol. Cell. Res.* 2019. V. 1866. P. 849–860.
31. Grassmé H., Carpinteiro A., Edwards M.J., Gulbins E., Becker K.A. // *Cell Physiol. Biochem.* 2014. V. 34. P. 45–55.
32. Li C., Guo S., Pang W., Zhao Z. // *Front. Cell Dev. Biol.* 2019. V. 7. P. 378.
33. Wang H., Liu C., Xie X., Niu M., Wang Y., Cheng X., Zhang B., Zhang D., Liu M., Sun R., et al. // *Immunity*. 2023. V. 56. № 6. P. 1410–1428.
34. Gui Y.K., Li Q., Liu L., Zeng P., Ren R.F., Guo Z.F., Wang G.H., Song J.G., Zhang P. // *Brain Res. Bull.* 2020. V. 158. P. 122–127.
35. Kornhuber J., Hoertel N., Gulbins E. // *Mol. Psychiatry*. 2022. V. 27. № 1. P. 307–314.
36. Ivanisenko V.A., Gaisler E.V., Basov N.V., Rogachev A.D., Cheresiz S.V., Ivanisenko T.V., Demenkov P.S., Mishchenko E.L., Khripko O.P., Khripko Y.I., et al. // *Sci. Rep.* 2022. V. 12. № 1. P. 977.

УДК 577.19

Липополисахарид-индуцированное острое повреждение легких: анализ особенностей развития и возможность подавления аптамером к TNF- α

А. В. Сенькова*, И. А. Савин, Е. Л. Черноловская, А. С. Давыдова, М. И. Мещанинова, А. Бишани, М. А. Воробьева, М. А. Зенкова

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

*E-mail: alsenko@mail.ru

Поступила в редакцию 22.03.2024

Принята к печати 15.04.2024

DOI: 10.32607/actanaturae.27393

РЕФЕРАТ Острое повреждение легких (ОПЛ) является специфической формой воспаления, которое характеризуется диффузным повреждением альвеол, некардиогенным отеком легких, а также легочным и системным воспалением. Патогенез ОПЛ включает развитие каскадной воспалительной реакции, сопровождающейся подъемом уровней провоспалительных цитокинов и хемокинов на локальном и системном уровне. Разработка молекулярно-генетических инструментов, направленных на ключевые компоненты цитокинового сигналинга в качестве мишени, представляется перспективным подходом к терапии ОПЛ. В работе проанализированы особенности развития липополисахарид (ЛПС)-индуцированного ОПЛ у мышей, а также возможность его подавления аптамером к провоспалительному цитокину TNF- α . Показано, что уровень TNF- α резко повышается и остается стабильно высоким при развитии ОПЛ, а морфологические признаки воспаления в дыхательной системе мышей, вызванные ЛПС, наиболее выражены через 24 ч после индукции. Интраназальное введение мышам с ОПЛ аптамера к TNF- α , конъюгированного с полиэтиленгликолем 40 кДа (PEG-aptTNF- α), вызывало уменьшение интенсивности воспалительных изменений в ткани легких. Оценка уровней потенциальных генов-мишеней TNF- α (*Usp18*, *Traf1*, *Tnfrsf25*) показала повышение их экспрессии в легких при развитии ОПЛ и снижение – при введении PEG-aptTNF- α . Таким образом, топическое использование аптамеров, направленных к TNF- α , может служить эффективным инструментом терапии ОПЛ и других воспалительных заболеваний легких.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА острое повреждение легких, провоспалительные цитокины, аптамерные конструкции, гены-мишени.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ ОПЛ – острое повреждение легких; ОРДС – острый респираторный дистресс-синдром; TNF- α – фактор некроза опухоли альфа; aptTNF- α – аптамер к TNF- α ; PEG – полиэтиленгликоль; ЛПС – липополисахарид; БАЛЖ – бронхоальвеолярная жидкость.

ВВЕДЕНИЕ

Острое повреждение легких (ОПЛ), а также его последствие – острый респираторный дистресс-синдром (ОРДС) – являются специфической формой воспаления легких, которое характеризуется диффузным повреждением альвеол, некардиогенным отеком легких, а также легочным и системным нейтрофил-ассоциированным воспалением [1, 2]. Этиологическими факторами ОПЛ и ОРДС могут быть различные стимулы и заболевания, такие, как бактериальные и вирусные пневмонии [3, 4], механическая вентиляция [5, 6], воздействие хи-

микатов [7, 8], острая травма головного мозга [9], сепсис [10, 11], острый панкреатит [12] и многие другие патологии. В последние годы рост показателей заболеваемости и смертности от ОПЛ/ОРДС связан с пандемией новой коронавирусной инфекции (COVID-19), вызванной коронавирусом, ассоциированным с тяжелым острым респираторным дистресс-синдромом (SARS-CoV-2) [13, 14]. Патогенез ОПЛ/ОРДС включает развитие местной и системной каскадной воспалительной реакции, сопровождающейся подъемом уровней провоспалительных цитокинов (TNF- α , IFN- γ , IL-6, IL-1 β , GM-CSF, G-CSF)

и хемокинов (CXCL10/IP10, MIP-1 α , CCL2), вплоть до критических значений, приводящих к развитию полиорганной недостаточности [14–16].

В настоящее время терапия ОРДС и сопутствующих ему иммунных нарушений в основном симптоматическая, направлена на облегчение симптомов и часто включает механическую вентиляцию легких и введение кортикостероидных гормонов. Перспективным подходом к лечению указанной патологии может быть использование молекулярно-генетических инструментов, направленных на ключевые цитокины в качестве мишени. Одним из таких инструментов являются моноклональные антитела к TNF- α , IL-6, IL-1 β , IFN- γ и другим компонентам цитокинового сигналинга [17, 18]. Олигонуклеотидные аптамеры представляют собой другой класс биомолекул, селективно узнающих мишень, которые в настоящее время рассматриваются в качестве потенциальной альтернативы антителам для создания таргетных терапевтических средств. От антител аптамеры выгодно отличаются воспроизводимый химический синтез и стабильность ключевых характеристик, возможность введения в их состав дополнительных химических модификаций для регуляции времени жизни аптамера в организме с сохранением его сродства к молекуле-мишени [19, 20]. Важно отметить, что по своей природе аптамеры являются нуклеиновыми кислотами, что позволяет дополнительно регулировать их функциональную активность, используя комплементарный олигонуклеотид-антидот [21, 22]. Такой набор свойств вызывает интерес к использованию аптамеров для подавления активности растворимых сывороточных белков, в том числе ассоциированных с воспалением [23, 24].

В настоящей работе проанализированы особенности развития ЛПС-индуцированного ОПЛ у мышей, а также возможность его подавления аптамером к провоспалительному цитокину TNF- α . Показано, что TNF- α является ключевым игроком в развитии ОПЛ, а интраназальное введение мышам с ОПЛ

аптамера к TNF- α , конъюгированного с полиэтиленгликолем 40 кДа (PEG-aptTNF- α), подавляет развитие воспаления в дыхательной системе экспериментальных животных.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Синтез ДНК-аптамера к TNF- α и контрольного олигонуклеотида

Нуклеотидные последовательности олигодезоксирибонуклеотидов, использованных в работе, представлены в *табл. 1*. Контрольный неаптамерный олигонуклеотид со случайной последовательностью был сгенерирован на основе ДНК-аптамера aptTNF- α с использованием сервиса (<https://www.gensm/tools/create-scrambled-sequence>).

Олигонуклеотиды были синтезированы твердофазным фосфитамидным методом в масштабе 0.4 мкмоль на автоматическом ДНК/РНК-синтезаторе ASM-800 («Биоссет», Россия) по протоколу, оптимизированному для данного прибора, с использованием β -цианэтил-N,N-диизопропилфосфитаминов 5'-N-защищенных 2'-дезоксирибонуклеозидов (Glen Research, США). В качестве полимерного носителя использовали стеклянные частицы CPG (controlled pore glass) с диаметром пор 500 Å с присоединенным через 5'-гидроксильную группу 3'-O-диметокситритилтимидином (Glen Research). Олигонуклеотиды, содержащие на 5'-конце остаток аминоксанола, синтезировали с использованием коммерчески доступного модификатора 6-(трифторацетиламино)-гексил-(2-цианоэтил)-(N,N-диизопропил)-фосфитамида (Glen Research). После синтеза олигонуклеотиды отделяли от носителя и удаляли защитные группы обработкой 40% водным раствором метиламина (300 мкл) в течение 15 мин при 65°C. Полностью деблокированные олигонуклеотиды очищали методом препаративного электрофореза в денатурирующем 15% полиакриламидном геле (ПААГ).

Таблица 1. ДНК-аптамер к TNF- α , неаптамерный скрамблированный олигодезоксирибонуклеотид и их конъюгаты с PEG

Аптамер	Нуклеотидная последовательность, 5'-3'
PEG-aptTNF- α	PEG-NH ₂ -(CH ₂) ₆ -GCG CCA CTA CAG GGG AGC TGC CAT TCG AAT AGG TGG GCC GCT _{inv}
aptTNF- α	NH ₂ -(CH ₂) ₆ -GCG CCA CTA CAG GGG AGC TGC CAT TCG AAT AGG TGG GCC GCT _{inv}
PEG-Scr	PEG-NH ₂ -(CH ₂) ₆ -AGA GGC GGT ATG ACC AGG CTA ATC GGC CGA GCC TCC GTG CGT _{inv}
Scr	NH ₂ -(CH ₂) ₆ -AGA GGC GGT ATG ACC AGG CTA ATC GGC CGA GCC TCC GTG CGT _{inv}

PEG – остаток полиэтиленгликоля 40 кДа; T_{inv} – 3'-концевой остаток тимидина, соединенного с соседним нуклеотидом 3'-3'-фосфодиэфирной связью.

Синтез конъюгатов с полиэтиленгликолем 40 кДа

Для синтеза пегилированных конъюгатов к раствору 5'-аминомодифицированного олигонуклеотида (0.1 мкмоль) в 0.1 М тетраборатном буфере (рН 9.5) добавляли раствор 1 мкмоль N-гидроксисукцинимидного эфира линейного полиэтиленгликоля (PEG) с молекулярной массой 40 кДа (Sigma-Aldrich, США) в диметилформамиде (Sigma-Aldrich). Реакционную смесь инкубировали при перемешивании при 25°C в течение 16 ч. Полученные конъюгаты очищали от избытка реагентов с помощью электрофореза в денатурирующем 12% ПААГ с последующей элюцией водой и концентрированием с использованием ультрацентрифужных модулей Amicon 10K (Merck, США). Очищенные конъюгаты перед введением животным стерилизовали фильтрованием через фильтр с диаметром пор 0.22 мкм.

Лабораторные животные

В работе использовали 6–8-недельных мышей-самок линии Balb/C разведения вивария Института химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН (Новосибирск, Россия). Животных содержали по шесть особей в клетке в хорошо освещенном помещении. Мыши имели свободный доступ к еде и воде. Все процедуры с животными проводили в соответствии с рекомендациями по правильному использованию и уходу за лабораторными животными (Директива ЕС 2010/63/ЕС). Эксперименты на животных одобрены межинститутской Комиссией по биоэтике Института цитологии и генетики СО РАН (Новосибирск, Россия) (протокол № 56 от 10.08.2019 г.).

ЛПС-индуцированное острое повреждение легких

Острое повреждение легких (ОПЛ) у мышей индуцировали путем интраназального (и/н) введения ЛПС (055:B5, Sigma-Aldrich) в дозе 10 мкг/мышь под изофлюрановой анестезией. В эксперименте по исследованию динамики воспалительных изменений в дыхательной системе мышей выводили из эксперимента через 6, 16 и 24 ч после индукции и производили забор бронхоальвеолярной жидкости (БАЛЖ), сыворотки крови и ткани легких для последующего анализа. В эксперименте по исследованию противовоспалительной активности аптамеров к TNF- α мышам через 1 ч после индукции ОПЛ и/н вводили аптамер aptTNF- α в дозе 1 мг/кг или его конъюгат PEG-aptTNF- α в дозах 1 и 5 мг/кг. Мышей с ОПЛ без лечения и получавших соответствующие скрамблированные олигонуклеотиды (Scr в дозе 1 мг/кг и PEG-Scr в дозах 1 и 5 мг/кг) использова-

ли в качестве контроля. Все препараты вводили и/н в 50 мкл физиологического раствора под изофлюрановой анестезией. Мышей выводили из эксперимента через 24 ч после индукции и производили забор материала (БАЛЖ и ткань легких) для последующего анализа. Всего было по шесть мышей в каждой группе.

Анализ бронхоальвеолярной жидкости

Легкие мышей из контрольных и экспериментальных групп промывали 1 мл холодного физиологического раствора. Собранную БАЛЖ центрифугировали на 1500 об/мин в течение 10 мин при 4°C, супернатант собирали для иммуоферментного анализа (ИФА). Осадок клеток ресуспендировали в 50 мкл физиологического раствора и определяли общее число лейкоцитов ($\times 10^5$ клеток/мл) в камере Горяева после разбавления раствором Тюрка в соотношении 1 : 20.

Оценка уровня провоспалительных цитокинов методом ИФА

Уровни провоспалительных цитокинов TNF- α и IL-6 определяли в образцах БАЛЖ с помощью наборов для проведения ИФА (#BMS607-3 и #KMC0061, Thermo Fisher Scientific, США) в соответствии с инструкциями производителя. Абсорбцию измеряли на длине волны 450 нм с помощью спектрофотометра Multiscan RC (Thermo LabSystems, Финляндия).

Оценка профиля цитокинов

Для оценки уровня провоспалительных цитокинов и хемокинов в БАЛЖ использовали LEGENDplex™ Mouse Inflammation Panel (13-plex) (Biolegend, США) в соответствии с инструкцией производителя и проточный цитометр NovoCyte 3000 (ACEA Bioscience, США). Данные анализировали с помощью программного обеспечения Legendplex online software.

Гистология

Ткань легких фиксировали в 10% забуференном формалине, дегидратировали в растворах этанола и ксилола восходящей концентрации и заключали в парафин HISTOMIX. Парафиновые срезы толщиной до 5 мкм нарезали на микротоме Microm HM 355S и окрашивали гематоксилином и эозином. Все гистологические препараты были исследованы и отсканированы с помощью микроскопа AxioStar Plus с цифровой камерой AxioCam MRc5 на увеличении $\times 200$.

Оценку интенсивности воспалительных изменений в легких проводили полуколичественным методом с использованием следующей шкалы: 0 – патологические изменения отсутствуют, 1 – воспаление вы-

ражено слабо, 2 – воспаление выражено умеренно, 3 – выраженные воспалительные изменения. Всего проанализировано по пять полей зрения в каждом образце (по 30 полей зрения в каждой группе).

Определение уровней экспрессии генов методом ОТ-ПЦР в реальном времени

Уровни мРНК генов *Usp18*, *Traf1*, *Tnfaip3* и *Hprt* в ткани легких определяли методом количественной обратной транскрипции-полимеразной цепной реакции (ОТ-ПЦР) в реальном времени. Суммарную РНК выделяли из легких экспериментальных животных с помощью реагента TRIzol согласно инструкции производителя с предварительной гомогенизацией (гомогенизатор FastPrep-24™ 5G с адаптером QuickPrep 24, MP Biomedicals, США). кДНК синтезировали с использованием RT-буфера и ревертазы M-MuLV-RH («Биолабмикс», Россия) согласно инструкции производителя. ОТ-ПЦР в реальном времени проводили с использованием мастер-микса HS-qPCR (×2) («Биолабмикс») согласно инструкции производителя. Амплификацию проводили с использованием температурных условий: (1) – 94°C, 5 мин; (2) 94°C, 10 с; (3) 60°C, 30 с (50 циклов) на амплификаторе C1000 Touch с модулем CFX96 (Bio-Rad, США). Данные обрабатывали с помощью программного обеспечения BioRad CFX Manager. Последовательности олигонуклеотидов, использованных в качестве праймеров, приведены в табл. 2. Относительный уровень экспрессии генов нормализовали на уровень экспрессии *Hprt* по методу ΔΔCt.

Статистический анализ

Статистический анализ проводили с помощью двухстороннего непарного *t*-теста по Стьюденту в программном обеспечении Microsoft Excel. Значения $p \leq 0.05$ считали статистически значимыми. Данные

представлены как среднее значение ± стандартное отклонение.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Цитокиновый профиль и динамика воспалительных изменений в дыхательной системе мышей с ЛПС-индуцированным острым повреждением легких

Для оценки уровня цитокинов и интенсивности воспаления в дыхательной системе мышей в динамике индуцировали острое повреждение легких (ОПЛ) путем интраназального (и/н) введения ЛПС (10 мкг/мышь) с последующим забором материала через 6, 16 и 24 ч после индукции (рис. 1А). Установлено, что уже через 6 ч после введения ЛПС уровень TNF-α в бронхоальвеолярной жидкости (БАЛЖ) повышался в 21 раз по сравнению со здоровыми животными и составлял 3.4 нг/мл, оставаясь приблизительно на том же уровне вплоть до 24 ч после индукции. Уровень IL-6 также повышался через 6 ч после введения ЛПС до 2 нг/мл, а затем постепенно снижался до 1.3 нг/мл к 24 ч после индукции, что многократно превышает уровень IL-6 у здоровых животных (рис. 1Б, левая панель). Оценка общего числа лейкоцитов в БАЛЖ показала, что максимальное значение данного показателя приходилось на 24 ч после индукции: введение ЛПС вызывало повышение числа лейкоцитов в 8.6 раза по сравнению со здоровыми животными (рис. 1Б, средняя панель). В сыворотке крови мышей с ОПЛ TNF-α и IL-6 детектировались во всех временных точках на крайне низком уровне, сопоставимом с уровнями у здоровых животных (рис. 1Б, правая панель).

Определение цитокинового профиля БАЛЖ мышей с ОПЛ в динамике с помощью мультиплексно-го ИФА показало, что и/н введение ЛПС вызывает

Таблица 2. Специфические праймеры для проведения ОТ-ПЦР в реальном времени

Ген	Тип праймера	Нуклеотидная последовательность
<i>Usp18</i>	Forward	5'- GCCCTCATGGTCTGGTTG-3'
	Probe	5'-((5,6)-FAM)-ACGTGTTGCCTTAACCTCCTTGCTTCA-BHQ1-3'
	Reverse	5'- САТТСТСТССТСТСТСТСТСТС-3'
<i>Traf1</i>	Forward	5'- AGATCACCAATGTCACCAAGC-3'
	Probe	5'-((5,6)-FAM)-ACTGTTCAGCCTCTCTCTCCAGCTT-BHQ1-3'
	Reverse	5'- САТССССТССТССТССТССТССТС-3'
<i>Tnfaip3</i>	Forward	5'- AGCCAGCACTTTGTACCC-3'
	Probe	5'-((5,6)-FAM)-AGTCTTCAAACCTACCCGGTCTCT-BHQ1-3'
	Reverse	5'- GCTTTTCTTTCACTCTCATCTCAG-3'
<i>Hprt</i>	Forward	5'-CCCCAAAATGGTTAAGGTTGC-3'
	Probe	5'- ((5,6)-ROX)-CTTGCTGGTGAAGGACCT-3'-BHQ2
	Reverse	5'-AACAAAGTCTGGCCTGTATCC-3'

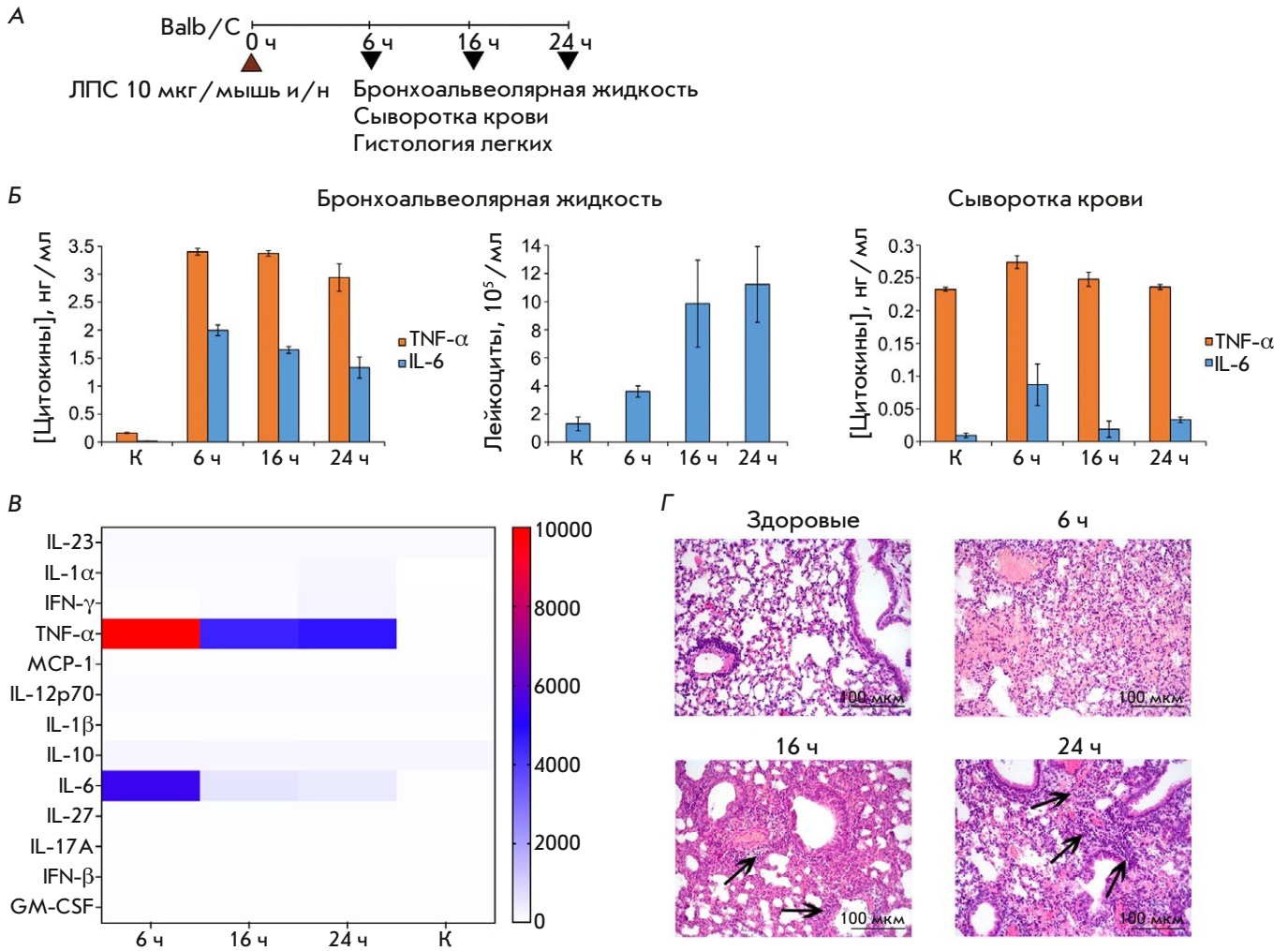


Рис. 1. Цитокиновый профиль и воспалительные изменения в дыхательной системе мышей с ЛПС-индуцированным острым повреждением легких в динамике. **А** – схема эксперимента. У мышей линии Balb/C индуцировали острое повреждение легких (ОПЛ) путем интраназального (и/н) введения ЛПС (10 мкг/мышь). Забор материала проводили через 6, 16 и 24 ч после индукции. **Б** – уровни провоспалительных цитокинов (TNF-α и IL-6) и общее число лейкоцитов в БАЛЖ, а также уровни TNF-α и IL-6 в сыворотке крови мышей с ОПЛ через 6, 16 и 24 ч после индукции. **В** – цитокиновый профиль БАЛЖ мышей с ОПЛ в динамике, оцененный с помощью мультиплексного ИФА. Данные приведены в виде пг/мл. **Г** – гистологический анализ ткани легких мышей с ОПЛ через 6, 16 и 24 ч после индукции. Окр. гематоксилином и эозином, ув. ×200. Черными стрелками обозначена воспалительная инфильтрация. К – контроль (здоровые животные)

значимое повышение только двух провоспалительных цитокинов: TNF-α и IL-6. Причем уровень TNF-α оставался высоким на протяжении всего периода наблюдения, тогда как уровень IL-6 снижался уже через 16 ч после индукции (рис. 1Б). Уровни остальных цитокинов (IL-23, IL-1α, IFN-γ, MCP-1, IL-12p70, IL-1β, IL-10, IL-27, IL-17A, IFN-β, GM-CSF) не изменялись.

Гистологический анализ ткани легких мышей с ОПЛ показал, что введение ЛПС вызывает развитие патологических изменений в дыхательной

системе, представленных воспалительной гранулоцитарной инфильтрацией, деструктивными (десквамация альвеолярного эпителия) и дисциркуляторными (венозное полнокровие, отек и кровоизлияния) нарушениями (рис. 1Г). Следует отметить, что на разных сроках наблюдения степень выраженности данных изменений была различной: через 6 ч после индукции преобладали изменения, связанные с нарушением кровообращения, через 16 ч появлялись начальные признаки миграции клеток к очагу воспаления, тогда как к 24 ч воспали-

тельная инфильтрация в ткани легких была полностью сформирована, локализуясь преимущественно вокруг сосудов и бронхов (рис. 1Г).

Таким образом, определение динамики воспалительных изменений и цитокинового профиля мышцей с ОПЛ показало, что именно TNF- α остается на стабильно высоком уровне на протяжении всего периода наблюдения, свидетельствуя о важной роли данного цитокина в сигнальных путях воспалительного ответа. Морфологические признаки воспаления, вызванные ЛПС в дыхательной системе мышцей, были наиболее выражены через 24 ч после индукции, делая данный временной интервал оптимальным для оценки противовоспалительной активности исследуемых конструкций.

Выбор и синтез ДНК-аптамера к TNF- α

На данный момент опубликовано несколько нуклеотидных последовательностей РНК- и ДНК-аптамеров, способных специфично связывать TNF- α [25]. Большинство из них обладают сродством к белку-мишени в наномолярном диапазоне и способны ингибировать функциональную активность TNF- α *in vitro*. Для исследования был выбран ДНК-аптамер aptTNF- α , который, как показано ранее, обладает способностью подавлять развитие воспаления в *in vivo* моделях острого повреждения легких и печени при его внутривенном или интратрахеальном введении [26]. Общая длина этого аптамерного олигонуклеотида составляет 41 нуклеотид, что делает его химический синтез достаточно быстрым и экономичным (последовательность aptTNF- α приведена в табл. 1). В качестве аналогичной неаптамерной ДНК для контроля специфичности действия аптамера использовали скрамблированный олигонуклеотид той же длины и нуклеотидного состава. Противовоспалительная активность бивалентных аптамеров *in vivo*, в которых два аптамерных модуля ковалентно соединены остатком полиэтиленгликоля 20 кДа, была показана ранее [26]. В нашей работе мы выбрали другую стратегию химической модификации аптамера для увеличения времени его жизни в организме животных и использовали модификации, которые в настоящее время являются практически «золотым стандартом» для аптамеров, предназначенных для экспериментов *in vivo* или клинических исследований [27, 28]. На 3'-конец для защиты от экзонуклеазного гидролиза был введен дополнительный остаток тимидина, присоединенный 3'-3'-фосфодиэфирной связью, для чего при твердофазном синтезе олигонуклеотидов использовали коммерчески доступный полимерсвязанный 3'-О-диметокситритилтимидин, а на 5'-конец вводили полиэтиленгликоль (PEG) с молекулярной

массой 40 кДа для улучшения фармакокинетических характеристик аптамера при его топической доставке в дыхательную систему мышцей.

Таким образом, предложенный нами вариант аптамерной конструкции обеспечивает более контролируемый синтез и выделение пегилированного конъюгата, поскольку при детектированных нами уровнях TNF- α в БАЛЖ (не более 4 нг/мл) этот белок с высокой вероятностью представлен мономерной, а не тримерной формой [29]. Аналогичный набор модификаций использован и для контрольного неаптамерного олигонуклеотида.

Противовоспалительная активность аптамера к TNF- α на модели ЛПС-индуцированного острого повреждения легких

Противовоспалительную активность аптамеров к TNF- α (aptTNF- α и PEG-aptTNF- α) изучали на модели ЛПС-индуцированного ОПЛ. Аптамеры вводили мышам интраназально, поскольку высокий уровень данного цитокина детектировался именно в БАЛЖ. В качестве контроля специфичности действия аптамера мышам вводили соответствующие скрамблированные олигонуклеотиды (Scr или PEG-Scr). Исследуемые конструкции вводили через 1 ч после индукции ОПЛ с последующим забором материала через 24 ч (рис. 2А), поскольку именно в эту временную точку морфологические изменения в дыхательной системе мышцей были наиболее выражены и окончательно сформированы.

Введение ЛПС вызывало повышение общего числа лейкоцитов в БАЛЖ мышцей с ОПЛ в 7.7 раза по сравнению со здоровыми животными (рис. 2Б). Введение aptTNF- α или соответствующего Scr не влияло на данный показатель, тогда как введение пегилированного аптамера PEG-aptTNF- α в дозе 5 мг/кг достоверно снижало общее число лейкоцитов в БАЛЖ в 1.8 раза по сравнению с контролем и в 2.7 раза по сравнению с PEG-Scr, введенным в той же дозе (рис. 2Б). PEG-aptTNF- α в дозе 1 мг/кг также вызывал снижение данного показателя в 1.5 и 1.8 раза по сравнению с контролем и Scr соответственно. Данные различия (для дозы 1 мг/кг) оказались статистически недостоверными, однако они показывают дозозависимый характер действия PEG-aptTNF- α . Уровень TNF- α в БАЛЖ мышцей с ОПЛ был повышен в 85 раз по сравнению со здоровыми животными, а введение PEG-aptTNF- α не оказывало значительного влияния на этот показатель (рис. 2В). Уровень TNF- α после введения непегилированного аптамера не исследовали, поскольку данная конструкция не вызывала снижения общего числа лейкоцитов в БАЛЖ как одного из показателей противовоспалительного действия препарата.

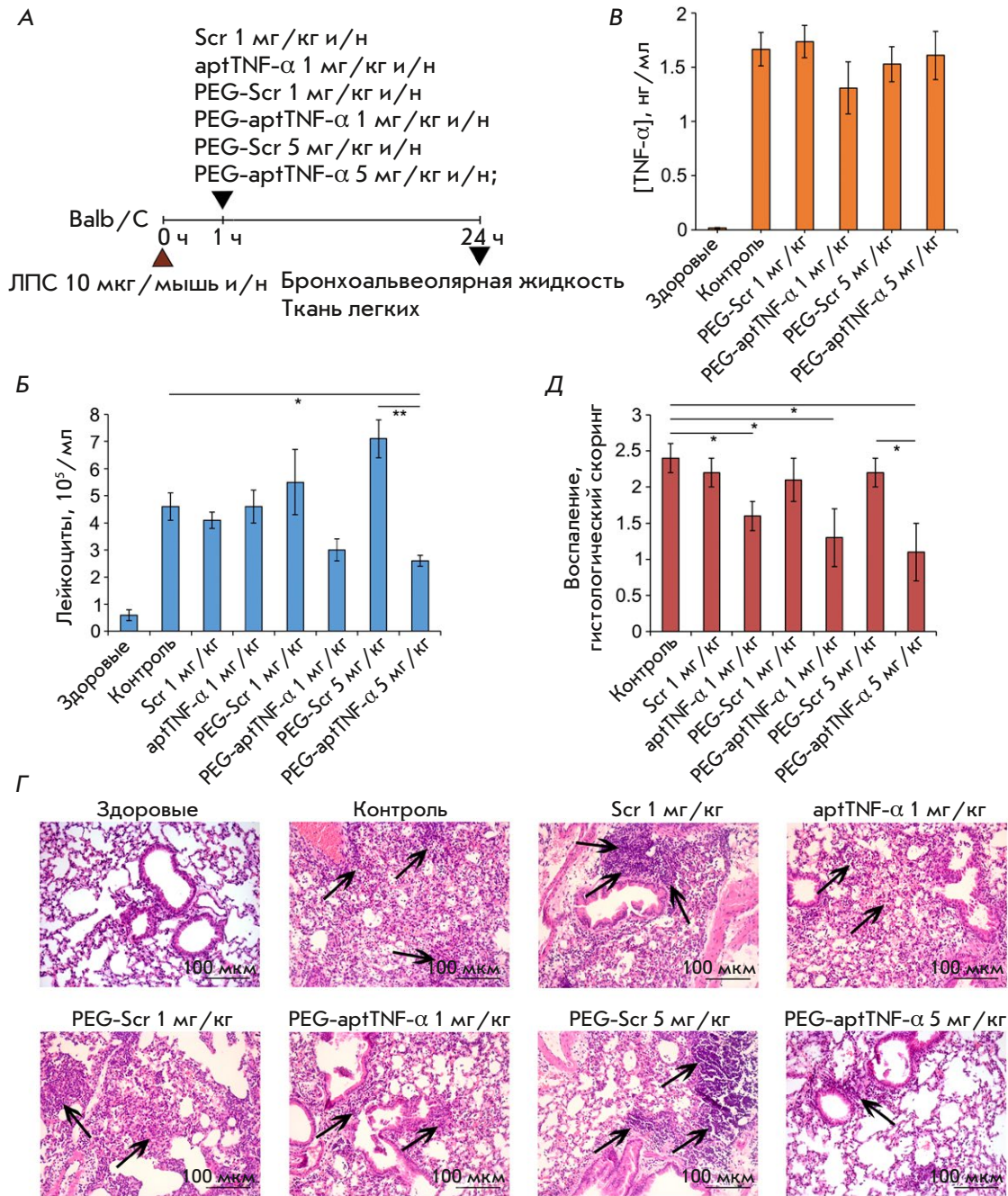


Рис. 2. Влияние аптамеров к TNF-α на развитие ЛПС-индуцированного острого повреждения легких у мышей. А – схема эксперимента. У мышей линии Balb/C индуцировали острое повреждение легких (ОПЛ) путем интраназального (и/н) введения ЛПС (10 мкг/мышь). Через 1 ч после индукции мышам и/н вводили аптамеры к TNF-α: aptTNF-α в дозе 1 мг/кг и PEG-aptTNF-α в дозах 1 и 5 мг/кг. Мышей с ОПЛ без лечения и получавших соответствующий скрамблированный олигонуклеотид (Scr и PEG-Scr) использовали в качестве контролей. Мышей выводили из эксперимента через 24 ч после индукции и производили забор материала для последующего анализа. Б, В – общее число лейкоцитов (Б) и уровень TNF-α (В) в БАЛЖ мышей с ЛПС-индуцированным ОПЛ без лечения и после введения аптамеров к TNF-α. Г, Д – гистологическое исследование (Г) и полуколичественная оценка интенсивности воспалительных изменений (Д) в легких мышей контрольных и экспериментальных групп. Окр. гематоксилином и эозином, ув. ×200. Черными стрелками обозначена воспалительная инфильтрация. Для оценки воспаления в легких использована следующая шкала: 0 – патологические изменения отсутствуют, 1 – воспаление выражено слабо, 2 – воспаление выражено умеренно, 3 – выраженные воспалительные изменения. Данные представлены как среднее ± стандартное отклонение; **p* < 0.05, ***p* < 0.01

Согласно результатам гистологического исследования, введение исследуемых конструкций вызывает дозозависимое снижение интенсивности описанных ранее морфологических проявлений ЛПС-индуцированного ОПЛ. Применение aptTNF- α и PEG-aptTNF- α в дозе 1 мг/кг приводило к снижению интенсивности воспалительных изменений в ткани легких – в 1.5 и 1.8 раза по сравнению с контролем и в 1.4 и 1.6 раза по сравнению с соответствующим Scr (рис. 2Г,Д). Однако эти различия были статистически значимыми только при сравнении аптамеров и контроля. Введение PEG-aptTNF- α в дозе 5 мг/кг вызывало статистически значимое снижение воспаления в ткани легких как по сравнению с группой контроля (в 2.2 раза), так и по сравнению с группой, получавшей PEG-Scr (в 2 раза).

Таким образом, аптамер PEG-aptTNF- α , направленный к провоспалительному цитокину TNF- α , блокирует развитие воспалительных изменений в дыхательной системе мышей, вызванных введением ЛПС, однако не нормализует показатели до уровня здоровых животных. Следует отметить дозозависимый характер противовоспалительного действия aptTNF- α /PEG-aptTNF- α , что, скорее всего, связано с более эффективным связыванием TNF- α при увеличении дозы препарата, а противовоспалительное действие достоверно показано только для конъюгата с PEG за счет улучшенных фармакокинетических характеристик препарата.

Анализ уровней экспрессии генов-мишеней TNF- α в ткани легких мышей с ЛПС-индуцированным острым повреждением легких без лечения и после введения аптамера к TNF- α

Следующим этапом нашего исследования были поиск и оценка уровней экспрессии генов – возможных мишеней TNF- α – при развитии ЛПС-индуцированного ОПЛ и при его коррекции аптамером к TNF- α для подтверждения влияния использованных конструкций на способность целевого секретируемого белка связываться со своим рецептором и активировать сигналинг. Выбор генов, а именно *Usp18*, *Traf1* и *Tnfaip3*, сделан на основе опубликованных данных, согласно которым уровни их экспрессии повышаются под действием TNF- α при широком спектре биологических и патологических процессов, таких, как ЛПС-индуцированный сепсис [30], повреждение миокарда по типу ишемия-реперфузия [31], церебральная ишемия [32], активация сигнальных путей NF- κ B и интерферонов типа I [33–36], а также гемопоэз и регенерация миелоидного ростка кроветворения [37].

Уровни экспрессии *Usp18*, *Traf1* и *Tnfaip3* были оценены в ткани легких мышей с помощью ОТ-ПЦР

(рис. 3). Легкие здоровых животных характеризовались низким уровнем экспрессии исследуемых генов (принятым за 1), в то время как введение ЛПС приводило к значительному увеличению уровней их экспрессии (контроль): *Usp18* в 7 раз, *Traf1* в 2 раза и *Tnfaip3* в 61 раз по сравнению со здоровыми животными.

В ходе оценки влияния аптамеров на экспрессию исследуемых генов в ткани легких мышей с ОПЛ были выявлены следующие закономерности. Введение PEG-aptTNF- α в дозе 1 мг/кг приводило к статистически значимому снижению уровня экспрессии гена *Usp18* до уровня у здоровых животных: в 5.9 раза по сравнению с контролем и в 2.6 раза по сравнению с PEG-Scr. PEG-aptTNF- α в дозе 5 мг/кг также приводил к снижению уровня экспрессии *Usp18* в 2.6 и 3 раза по сравнению с контролем и PEG-Scr соответственно. Однако статистически значимые отличия выявлены только между аптамером и скамблированным олигонуклеотидом (рис. 3). Введение PEG-aptTNF- α в дозах 1 и 5 мг/кг приводило к снижению экспрессии гена *Traf1* в 3.5 и 2.6 раза по сравнению с контролем и в 1.8 и 1.7 раза по сравнению с PEG-Scr соответственно. Однако статистически значимой разницы в эффектах PEG-aptTNF- α и PEG-Scr в дозе 5 мг/кг не наблюдали (рис. 3). В случае гена *Tnfaip3* единственным статистически значимым было снижение в 1.6 раза уровня экспрессии под действием PEG-aptTNF- α в дозе 1 мг/кг по сравнению с группой PEG-Scr (рис. 3). Введение PEG-Scr в дозах 1 и 5 мг/кг не оказывало статистически значимого влияния на экспрессию всех исследуемых генов. Введение aptTNF- α в дозе 1 мг/кг приводило к статистически недостоверному снижению уровней экспрессии *Usp18* и *Traf1* в 1.7–2.4 раза, а в случае *Tnfaip3* – к повышению его экспрессии (в 1.3 раза) по сравнению с контролем (рис. 3).

Таким образом, наиболее эффективное снижение уровней экспрессии потенциальных генов-мишеней зафиксировано при введении PEG-aptTNF- α в дозе 1 мг/кг, тогда как значимые противовоспалительные эффекты выявлены при использовании данного аптамера в дозе 5 мг/кг, что может быть связано с выбором времени определения уровней экспрессии этих генов, когда максимальное действие более высокой дозы аптамера на экспрессию TNF- α ассоциированных генов уже прошло.

ОБСУЖДЕНИЕ

TNF- α – плейотропный цитокин, продуцируемый активированными макрофагами, Т-лимфоцитами и натуральными киллерами – является одним из важнейших регуляторов иммунного ответа, поэ-

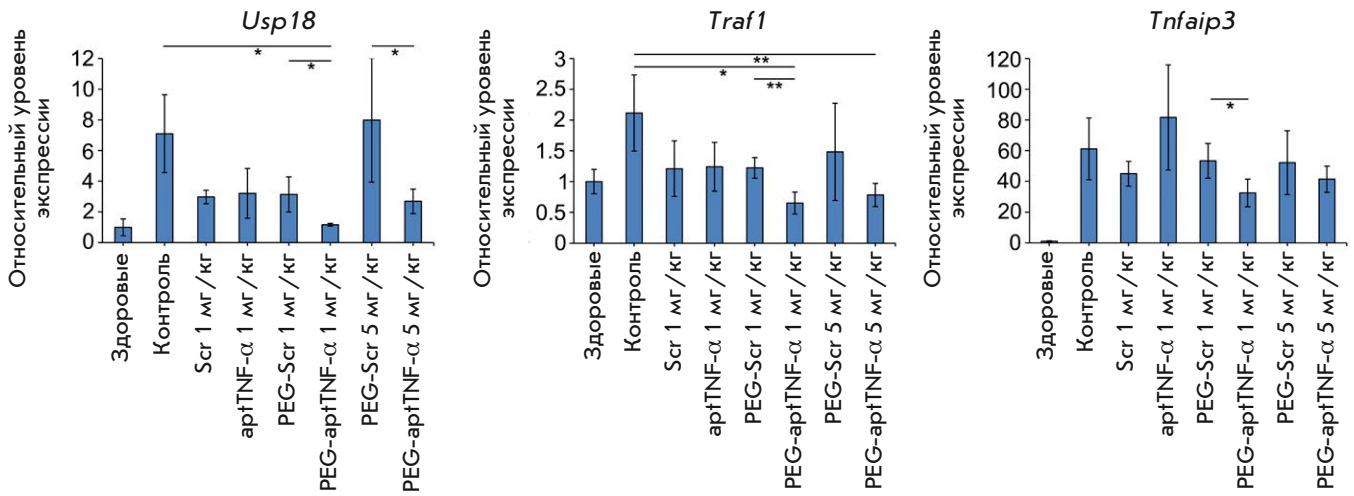


Рис. 3. Уровни экспрессии генов – возможных мишеней TNF-α (*Usp18*, *Traf1* и *Tnfaip3*) в ткани легких мышей с ЛПС-индуцированным острым повреждением легких без лечения и после введения аптамеров. Уровни экспрессии генов нормированы по уровню экспрессии *Hprt*, который использовали в качестве внутреннего стандарта. Три образца из каждой группы проанализированы в трех повторностях. Данные представлены как среднее ± стандартное отклонение; * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$

тому воздействие на уровень этого цитокина может быть эффективной стратегией коррекции иммунных нарушений, ассоциированных с опухолевыми, воспалительными, обменными и инфекционными заболеваниями [38, 39]. Учитывая многообразие заболеваний и биологических процессов, в которых TNF-α принимает участие, количество генов и сигнальных путей, регулирующих и регулируемых TNF-α, исчисляется десятками [40, 41].

В настоящее время основными анти-TNF-α препаратами, одобренными к применению в клинике, являются моноклональные антитела, которые, однако, вызывают такие побочные эффекты, как повышение чувствительности к инфекциям, развитие демиелинизирующих заболеваний и злокачественных новообразований [41]. Использование анти-TNF-α-средств другой природы, таких, как аптамеры, возможно, позволит сократить количество и тяжесть осложнений.

В данной работе противовоспалительная активность аптамера к TNF-α, а также влияние химических модификаций на эффективность его действия изучены на мышинной модели ЛПС-индуцированного ОПЛ. Следует отметить, что выбор способа введения аптамера обоснован и аргументирован данными профилирования уровня цитокинов в БАЛЖ и сыворотке крови при развитии ОПЛ у мышей в динамике. Показано, что уровень TNF-α в БАЛЖ значительно выше, чем в сыворотке крови, что свидетельствует о перспективности топического интраназального введения аптамера по сравнению с системным. Что касается доз аптамера, исполь-

зованных в эксперименте, нами были выбраны концентрации, которые с высокой вероятностью должны обеспечивать целевой эффект, принимая во внимание, что концентрации пегилированных аптамеров в диапазоне 1–10 мг/кг являются оптимальными для *in vivo* экспериментов и клинических исследований [42].

Обнаружено, что PEG-aptTNF-α обладает более выраженным противовоспалительным действием, чем немодифицированный аналог, что может быть связано с его более длительным временем жизни в организме животных. PEG-aptTNF-α демонстрирует определенную дозозависимость: в дозе 5 мг/кг он был более эффективен, чем в дозе 1 мг/кг. Однако, несмотря на противовоспалительную активность, наблюдаемую в БАЛЖ и ткани легких, значимое снижение количества самого TNF-α в БАЛЖ не зафиксировано. Подобное расхождение может быть следствием того, что аптамер и анти-TNF-α-антитела, используемые в ИФА, могут связываться с разными пространственно удаленными эпитопами TNF-α, при этом взаимодействие с аптамером не влияет на связывание антител. Однако в отсутствие данных структурных исследований или молекулярного моделирования, которые бы указали, с каким именно эпитопом TNF-α происходит связывание анти-TNF-α-аптамера, эта гипотеза нуждается в дальнейшем подтверждении.

Поскольку прямое измерение уровня TNF-α не привело к ожидаемым результатам, было решено оценить эффект аптамера к TNF-α с помощью анализа количества мРНК генов, которые участву-

ют в регуляции и передаче сигнала TNF- α . В качестве потенциальных генов-мишеней TNF- α были выбраны гены, которые напрямую задействованы в регуляторном каскаде TNF- α и уровень которых повышается при развитии ОПЛ.

В начале сигналинга растворимая форма TNF- α связывается с рецептором TNF1 типа (TNFR1), вызывая тримеризацию рецептора и вовлечение в процесс белка домена смерти (TRADD) и серин-треониновой протеинкиназы 1 (RIPK1) (рис. 4). Далее TRADD взаимодействует с гетеродимером TRAF1/TRAF2, образуя комплекс I, который активирует сигнальный путь NF- κ B и запускает синтез провоспалительных цитокинов, в том числе IFN-I [33]. В дальнейшем IFN-I воздействует через рецепторы IFNAR1/2 и сигнальный путь JAK/STAT на следующее важное звено в развитии воспалительного ответа – ось ISG15/USP18, которая регулирует активность иммунной системы [36] и снижает интенсивность воспалительного ответа, подавляя сигнальный путь JAK/STAT, что указывает на возможную петлю отрицательной обратной связи между USP18, IFN-I и, как следствие, TNF- α [43, 44].

Другая ключевая молекула механизма обратной регуляции – белок 3, индуцируемый TNF- α (TNFAIP3), также известный как A20. Базальный уровень экспрессии TNFAIP3 низок в большинстве клеток, однако быстро возрастает при развитии воспалительного ответа [45]. TNFAIP3 рекрутируется в сигнальный комплекс TNFR1, где дубиквитирует RIPK1, что приводит к потере стабильности комплекса I и блокированию дальнейшей активации NF- κ B. Диссоциировавший из комплекса I TRADD образует комплексы с Fas-ассоциированным белком домена смерти (FADD) и каспазой-8 (комплекс IIa) или с RIPK1, FADD и каспазой-8 (комплекс IIb), которые в дальнейшем приводят к апоптозу или некроптозу [46].

Учитывая вовлечение описанных генов в сигналинг и регуляцию TNF- α , введение аптамера к TNF- α , как и ожидалось, приводило к снижению уровня экспрессии генов-мишеней, выбранных для валидации, а именно: *Traf1* как компонента гетеродимерного комплекса, непосредственно участвующего в передаче сигнала TNF- α ; *Tnfaip3*, блокирующего активацию провоспалительного сигнального пути NF- κ B; и *Usp18*, регулирующего интенсивность воспалительного ответа после активации NF- κ B по механизму отрицательной обратной связи, что говорит о правомерности использования генов-мишеней TNF- α для оценки биологического действия анти-TNF- α -аптамера. Как и в случае морфологических изменений в дыхательной системе мышей, PEG-aptTNF- α обладал более выраженным

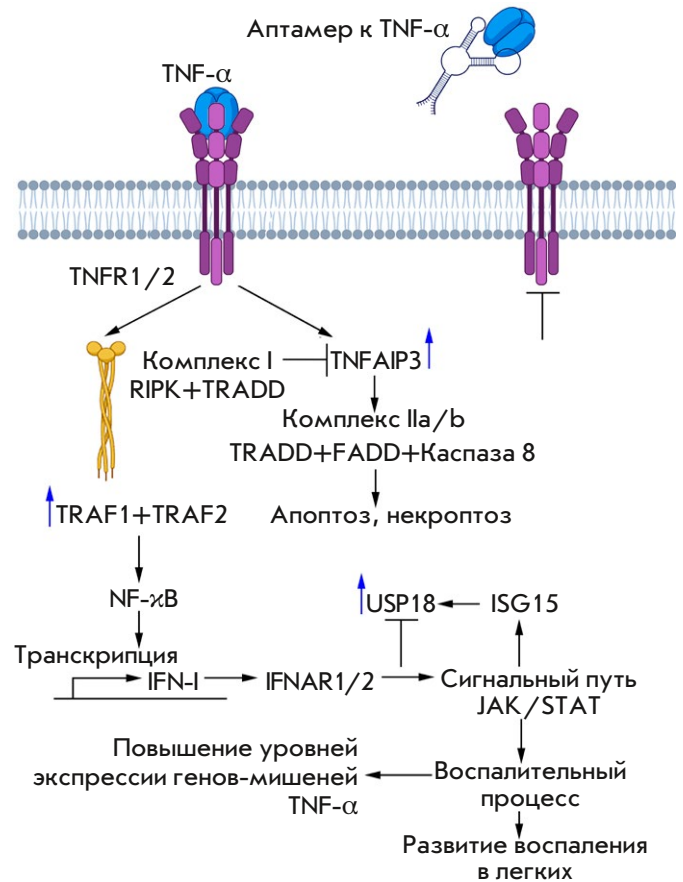


Рис. 4. Общая схема сигналинга TNF- α

эффектом на уровень экспрессии генов, чем немодифицированные аптамеры.

Таким образом, проведенное исследование еще раз продемонстрировало важность TNF- α как терапевтической мишени при ОПЛ, а также преимущество использования химически модифицированных аптамеров для блокирования его функции. Секреторный белок является крайне привлекательной мишенью для аптамера, поскольку для связывания с ним не требуется доставка препарата в клетку, вместо этого терапевтический аптамер может вводиться системно или локально в те органы и ткани, где повышен уровень белка-мишени. Возможность введения аптамера после начала развития патологии и блокирование действия антитодом также представляются крайне привлекательными и делают терапевтические аптамеры практически «идеальными лекарствами».

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В результате проведенного исследования установлено, что TNF- α является одним из ключевых игроков цитокинового сигналинга при развитии ЛПС-индуцированного ОПЛ, а интраназальное введение

аптамеров к TNF- α эффективно снижает воспалительные изменения в дыхательной системе мышцей, вызванные ЛПС, влияет на ассоциированные с TNF- α гены-мишени и может рассматриваться в качестве инструмента для терапии ОПЛ различной этиологии и других заболеваний легких, сопровождающихся иммунными нарушениями. ●

Финансирование.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда (грант № 19-74-30011) и государственного задания ИХБФМ СО РАН № 121031300042-1.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Mowery N.T., Terzian W.T.H., Nelson A.C. // *Curr. Probl. Surg.* 2020. V. 57. № 5. P. 100777.
2. Chen X., Tang J., Shuai W., Meng J., Feng J., Han Z. // *Inflamm. Res.* 2020. V. 69. № 9. P. 883–895.
3. Lucas R., Hadizamani Y., Gonzales J., Gorshkov B., Bodmer T., Berthiaume Y., Moehrlen U., Lode H., Huwer H., Hudel M., et al. // *Toxins (Basel)*. 2020. V. 12. № 4. P. 223.
4. Shah R.D., Wunderink R.G. // *Clin. Chest Med.* 2017. V. 38. № 1. P. 113.
5. Goligher E.C., Douflé G., Fan E. // *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 2015. V. 191. № 12. P. 1367–1373.
6. Agrawal D.K., Smith B.J., Sottile P.D., Albers D.J. // *Front. Physiol.* 2021. V. 12.
7. Pauluhn J. // *Toxicology*. 2021. V. 450.
8. Laskin D.L., Malaviya R., Laskin J.D. // *Toxicol. Sci.* 2019. V. 168. № 2. P. 287–301.
9. Zhang C.N., Li F.J., Zhao Z.L., Zhang J.N. // *Am. J. Physiol. - Lung Cell. Mol. Physiol.* 2021. V. 321. № 5. P. 885–891.
10. Sever I.H., Ozkul B., Erisik Tanriover D., Ozkul O., Elgormus C.S., Gur S.G., Sogut I., Uyanikgil Y., Cetin E.O., Erbas O. // *Exp. Lung Res.* 2021. P. 1–10.
11. Jiao Y., Zhang T., Zhang C., Ji H., Tong X., Xia R., Wang W., Ma Z., Shi X. // *Crit. Care*. 2021. V. 25. № 1. P. 356.
12. Kong L., Deng J., Zhou X., Cai B., Zhang B., Chen X., Chen Z., Wang W. // *Cell Death Dis.* 2021. V. 12. № 10. P. 928.
13. Jamal M., Bangash H.I., Habiba M., Lei Y., Xie T., Sun J., Wei Z., Hong Z., Shao L., Zhang Q. // *Virulence*. 2021. V. 12. № 1. P. 918–936.
14. Ramasamy S., Subbian S. // *Clin. Microbiol. Rev.* 2021. V. 34. № 3. P. e0029920
15. Dharra R., Kumar Sharma A., Datta S. // *Cytokine*. 2023. V. 169. P. 156287.
16. Gao Y., Zhou A., Chen K., Zhou X., Xu Y., Wu S., Ning X. // *Chem. Sci.* 2024. V. 15. № 6. P. 2243.
17. Attiq A., Yao L.J., Afzal S., Khan M.A. // *Int. Immunopharmacol.* 2021. V. 101. P. 108255.
18. Patel S., Saxena B., Mehta P. // *Heliyon*. 2021. V. 7. № 2. P. e06158.
19. Adachi T., Nakamura Y. // *Mol.* 2019. V. 24. № 23. P. 4229.
20. Ji D., Feng H., Liew S.W., Kwok C.K. // *Trends Biotechnol.* 2023. V. 41. № 11. P. 1360–1384.
21. Stoll H., Steinle H., Wilhelm N., Hann L., Kunnakattu S.J., Narita M., Schlensak C., Wendel H.P., Avci-Adali M. // *Molecules*. 2017. V. 22. № 6. P. 954.
22. Yu H., Frederiksen J., Sullenger B.A. // *RNA*. 2023. V. 29. № 4. P. rna.079503.122.
23. Stephens M. // *Pharmacol. Ther.* 2022. V. 238. P. 108173.
24. Luo Z., Chen S., Zhou J., Wang C., Li K., Liu J., Tang Y., Wang L. // *Front. Bioeng. Biotechnol.* 2022. V. 10. P. 976960.
25. Shatunova E.A., Korolev M.A., Omelchenko V.O., Kurochkina Y.D., Davydova A.S., Venyaminova A.G., Vorobyeva M.A. // *Biomedicines*. 2020. V. 8. № 11. P. 1–44.
26. Lai W.Y., Wang J.W., Huang B.T., Lin E.P.Y., Yang P.C. // *Theranostics*. 2019. V. 9. № 6. P. 1741–1751.
27. Qi S., Duan N., Khan I.M., Dong X., Zhang Y., Wu S., Wang Z. // *Biotechnol. Adv.* 2022. V. 55. P. 107902.
28. Zhang Y., Zhang H., Chan D.W.H., Ma Y., Lu A., Yu S., Zhang B., Zhang G. // *Front. Cell Dev. Biol.* 2022. V. 10. P. 104–108.
29. Daub H., Traxler L., Ismajli F., Groitl B., Itzen A., Rant U. // *Sci. Rep.* 2020. V. 10. № 1. P. 9265.
30. Hu B., Ge C., Zhu C. // *Int. Immunol.* 2021. V. 33. № 9. P. 461–468.
31. Xu W., Zhang L., Zhang Y., Zhang K., Wu Y., Jin D. // *J. Am. Heart Assoc.* 2019. V. 8. № 21. P. e012575.
32. Xiang J., Zhang X., Fu J., Wang H., Zhao Y. // *Neuroscience*. 2019. V. 419. P. 121–128.
33. Courtois G., Fauvarque M.O. // *Biomed.* 2018. V. 6. № 2. P. 43.
34. Catrysse L., Vereecke L., Beyaert R., van Loo G. // *Trends Immunol.* 2014. V. 35. № 1. P. 22–31.
35. MacParland S.A., Ma X.-Z., Chen L., Khattar R., Cherepanov V., Selzner M., Feld J.J., Selzner N., McGilvray I.D. // *J. Virol.* 2016. V. 90. № 12. P. 5549–5560.
36. Sarasin-Filipowicz M., Wang X., Yan M., Duong F.H.T., Poli V., Hilton D.J., Zhang D.-E., Heim M.H. // *Mol. Cell. Biol.* 2009. V. 29. № 17. P. 4841–4851.
37. Yamashita M., Passegué E. // *Cell Stem Cell*. 2019. V. 25. № 3. P. 357–372.
38. Savenkova D.A., Gudymo A.S., Korablev A.N., Taranov O.S., Bazovkina D.V., Danilchenko N.V., Perfilyeva O.N., Ivleva E.K., Moiseeva A.A., Bulanovich Y.A., et al. // *Int. J. Mol. Sci.* 2024. V. 25. № 2. P. 1156.
39. Wong M., Ziring D., Korin Y., Desai S., Kim S., Lin J., Gjertson D., Braun J., Reed E., Singh R.R. // *Clin. Immunol.* 2008. V. 126. № 2. P. 121–136.
40. Falvo J.V., Tsytsykova A.V., Goldfeld A.E. // *Curr. Dir. Autoimmun.* 2010. V. 11. № 1. P. 27–60.
41. Leone G.M., Mangano K., Petralia M.C., Nicoletti F., Fagone P. // *J. Clin. Med.* 2023. V. 12. № 4. P. 1630.
42. Kovacevic K.D., Gilbert J.C., Jilma B. // *Adv. Drug Deliv. Rev.* 2018. V. 134. P. 36–50.
43. Malakhova O.A., Kim K. Il, Luo J.K., Zou W., Kumar K.G.S., Fuchs S.Y., Shuai K., Zhang D.E. // *EMBO J.* 2006. V. 25. № 11. P. 2358–2367.
44. François-Newton V., de Freitas Almeida G.M., Payelle-Brogard B., Monneron D., Pichard-Garcia L., Piehler J., Pellegrini S., Uzé G. // *PLoS One*. 2011. V. 6. № 7. P. e22200.
45. Devos M., Mogilenko D.A., Fleury S., Gilbert B., Becquart C., Quemener S., Dehondt H., Tougaard P., Staels B., Bachert C., et al. // *J. Invest. Dermatol.* 2019. V. 139. № 1. P. 135–145.
46. Martens A., van Loo G. // *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* 2020. V. 12. № 1. P. a036418.

УДК 577.35

Векторная наноплатформа для прижизненной визуализации глубинных опухолей

Е. И. Шрамова¹, С. М. Деев¹⁻³, Г. М. Прошкина^{1*}¹Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, Москва, 117997 Россия²Первый Московский государственный медицинский университет имени Сеченова (Сеченовский университет), Москва, 119991 Россия³Национальный исследовательский центр «Курчатовский институт», Москва, 123098 Россия

*E-mail: gmb@ibch.ru

Поступила в редакцию 12.05.2024

Принята к печати 16.05.2024

DOI: 10.32607/actanaturae.27425

РЕФЕРАТ Оптический биоимиджинг на основе люминесценции и флуоресценции в доклинических исследованиях на сегодняшний день является незаменимым подходом при оценке развития неопластических трансформаций, изучения пролиферативной активности опухоли, ее метастатического потенциала, а также при оценке терапевтического эффекта противоопухолевых агентов. В рамках расширения возможностей оптической визуализации интерес представляет создание сенсоров, основанных на биолюминесцентной резонансной передаче энергии (BRET) и не зависящих от внешнего источника облучения. Для визуализации глубинных опухолей, характеризующихся сверхэкспрессией рецептора второго типа эпидермального фактора роста человека (HER2), в данной работе разработана адресная наноплатформа на основе HER2-специфичных липосом, внутренняя среда которых содержит генетически кодируемый BRET-сенсор. BRET-сенсор представлен гибридным белком, функциональные модули которого включают высококаталитическую люциферазу NanoLuc (донор энергии) и красный флуоресцентный белок с большим стоксовым сдвигом LSSmKate1 (акцептор энергии). В опытах *in vivo* по визуализации внутрибрюшинных диссеминированных опухолей, сформированных клетками серозной цистаденокарциномы яичников SKOV3.ip1 и характеризующихся сверхэкспрессией HER2, установлено, что разработанная система применима для детекции глубоко расположенных опухолей определенного молекулярного профиля. Разработанная адресная система может стать эффективной платформой для оптимизации доклинических исследований новых таргетных препаратов.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА биолюминесцентный резонансный перенос энергии, DARPins-белки, белок с большим стоксовым сдвигом LSSmKate1, рецептор второго типа эпидермального фактора роста HER2, люцифераза NanoLuc, молекулярно-таргетный биоимиджинг.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ BRET (bioluminescence resonance energy transfer) – биолюминесцентный резонансный перенос энергии; DARPIn (Designed Ankyrin Repeat Proteins) – искусственные белки с анкириновыми повторами; HER2 (human epidermal growth factor receptor 2) – рецептор второго типа эпидермального фактора роста человека; LSS protein (large Stokes shift) – белок с большим стоксовым сдвигом.

ВВЕДЕНИЕ

Несмотря на колоссальный прогресс терапии опухолей, обусловленный ранней диагностикой и инновационными методами лечения, рак по-прежнему остается одной из основных причин смертности во всем мире. Так, по данным Всемирной организации здравоохранения, в 2022 году было зарегистрировано 20 миллионов новых случаев рака, почти половина из которых – 9.7 миллиона, за-

кончились летальным исходом (<https://www.who.int/news/item/01-02-2024-global-cancer-burden-growing--amidst-mounting-need-for-services>). Поскольку метастазирование является основной причиной смерти онкологических больных, актуальна разработка новых модельных систем и технологий для проведения доклинических исследований, позволяющих оценивать как процесс развития опухоли, так и отклик опухоли на терапию.

Современные знания о молекулярных основах онкогенеза, позволяющие проводить профилирование (или типирование) опухоли, определяют развитие таргетной терапии, строго селективно воздействующей на конкретные молекулярные мишени, специфичные для данного типа или подтипа рака, такие, как антигены клеточной поверхности, факторы роста, рецепторы или пути передачи сигналов, регулирующие клеточный цикл, пролиферацию, метастазирование и ангиогенез.

Вместе с развитием методов молекулярного профилирования опухоли в экспериментальной онкологии интенсивно развивается направление доклинических методов неинвазивной молекулярно-таргетной визуализации опухолей и метастазов [1–3]. Мониторинг в живом организме распространения клеточных популяций, экзогенно введенных в модельный организм, исключительно важен для понимания онкогенеза, а также для оценки терапевтического эффекта противоопухолевых агентов в доклинических фармакологических исследованиях [2, 4].

Оптический биоимиджинг в режиме реального времени на уровне целого организма на основе флуоресцентных и люминесцентных систем является незаменимым инструментом современных доклинических исследований [1, 3, 5].

Биолюминесцентная визуализация основана на детекции видимого света, выделяемого в результате реакции окисления люциферазой своего специфического субстрата [6]. Для мониторинга роста или регрессии опухоли, а также для оценки эффективности противоопухолевого препарата *in vivo* ген люциферазы конститутивно или индуцибельно экспрессируется в опухолевых клетках, на основе которых потом формируется модель рака у животного [7, 8]. Биолюминесцентная визуализация широко используется в доклинических исследованиях, однако внедрению данного метода в клинику препятствует необходимость получения клеточной линии, трансфицированной геном люциферазы.

Флуоресцентная визуализация позволяет получать изображения опухолей путем детекции света, генерируемого флуоресцентными белками, квантовыми точками или флуоресцентными красителями [1]. Однако необходимость использования внешнего источника света для возбуждения флуоресцентной метки накладывает существенные ограничения на применение этого метода для детекции глубоких опухолей: при прохождении через ткани интенсивность возбуждающего света резко падает вследствие дифракции, снижающей пространственное разрешение флуоресцентных изображений, диффузии, обуславливающей рассеяние света тканями,

а также вследствие поглощения фотонов биологическими хромофорами (меланином, гемоглобином, оксигемоглобином) [1, 9, 10].

Преодолеть описанные ограничения позволяют методы оптического биоимиджинга, основанные на механизме резонансной передачи энергии – биолюминесцентной (BRET, bioluminescence resonance energy transfer) или флуоресцентной (FRET, fluorescence resonance energy transfer), которые все чаще используются в доклинических исследованиях [11]. И хотя в основе BRET- и FRET-систем лежит один и тот же механизм – Фёрстеровский резонансный перенос энергии от донора к акцептору [12], BRET-системы являются более предпочтительными, поскольку отсутствие автофлуоресценции и фотообесцвечивания, связанных с возбуждением флуорофора, обеспечивает повышенную чувствительность детекции на уровне организма.

Стандартные системы BRET состоят из люциферазы, которая в присутствии своего биолюминесцентного субстрата действует как донор резонансной энергии, и акцептора, представленного флуоресцентным белком, красителем или квантовыми точками. Для эффективного оптического биоимиджинга на животных BRET-система должна обладать высокой передачей энергии от донора к акцептору, отличным спектральным разрешением, и акцептором, излучающим в красном диапазоне спектра. Для визуализации глубоких тканей и всего тела предпочтителен именно красный и ближний инфракрасный диапазон из-за отсутствия поглощения света гемоглобином, меланином и водой в этой области спектра.

На сегодняшний день разработано порядка двух десятков высокочувствительных BRET-систем [11], использующих в качестве донора энергии люциферазы кораллов *Renilla reniformis* (RLuc), североамериканского светлячка *Photinus pyralis* (Fluc), генно-инженерную люциферазу NanoLuc из глубоководной креветки *Oplophorus gracilirostris* и белки различной цветовой палитры, в том числе с максимумом эмиссии в красном диапазоне спектра [13–19], в качестве акцепторов.

Во всех перечисленных работах по созданию BRET-сенсоров на основе флуоресцентных белков для мониторинга раковых клеток в организме животного использовали опухолевые модели на основе генно-модифицированных клеток, стабильно экспрессирующих ген BRET-сенсора. В своей работе мы предлагаем другой подход, предполагающий детекцию опухолей, глубоко расположенных в организме животного, с помощью BRET-сенсора, введенного в организм экзогенно и обладающего тропностью к опухоли определенного молекулярного профиля.

В качестве мишени нами выбран такой опухолю-ассоциированный антиген, как рецептор второго типа эпидермального фактора роста человека HER2 (Human epidermal growth factor receptor type 2). Известно, что 15–20% опухолей молочной железы и рака яичника человека характеризуются повышенным уровнем экспрессии гена *HER2* [20, 21]. В современной медицинской практике онкомаркер HER2 служит терапевтической мишенью для моноклональных антител (Пертузумаб, Трастузумаб) и ингибиторов киназ (Лапатиниб) при HER2-положительных опухолях молочной железы [22].

В данной работе разработана платформа для детекции HER2-положительных опухолей на основе опухолю-специфичных липосом, загруженных генетически кодируемым BRET-сенсором (рис. 1). BRET-сенсор представлен гибридным белком на основе высокочастотной люциферазы NanoLuc и красного белка с большим стоксовым сдвигом LSSmKate1 ($\lambda_{ex}/\lambda_{em} = 463/624$ нм) [23] – NanoLuc-LSSmKate1. Люцифераза NanoLuc в присутствии субстрата фуримазина служит источником эндогенной биолюминесценции, будучи тем самым источником энергии для возбуждения красного флуоресцентного белка LSSmKate1. Тропность липосом к HER2-антигену на поверхности раковой клетки определяется HER2-специфичным белком DARPin_9-29 [24]. Функциональность разработанной системы *in vivo* показана в опытах на модели глубоких диссеминированных опухолей.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Клонирование гена *NanoLuc-LSSmKate1* и наработка белков NanoLuc-LSSmKate1, NanoLuc и DARPin_9-29

Нуклеотидная последовательность, кодирующая *LSSmKate1*, получена введением мутаций K69Y/P131T/S148G/M167E/T183S/M196V в кодирующую последовательность *mKate2* (плазмида pmKate2-N, «Евроген», Россия). Затем последовательности, кодирующие люциферазу NanoLuc и красный флуоресцентный белок LSSmKate1, объединяли в одной рамке считывания и клонировали в вектор pET22b. Между кодирующими последовательностями генов *NanoLuc* и *LSSmKate1* находится линкер, кодирующий полипептид GGGGS. Пептидный линкер предусмотрен для того, чтобы два функциональных домена (люцифераза NanoLuc и флуоресцентный модуль LSSmKate1) в гибридном белке не испытывали стерических затруднений в пространстве, имея возможность сохранить свои функциональные свойства, но при этом быть сближенными для эффективного протекания BRET.

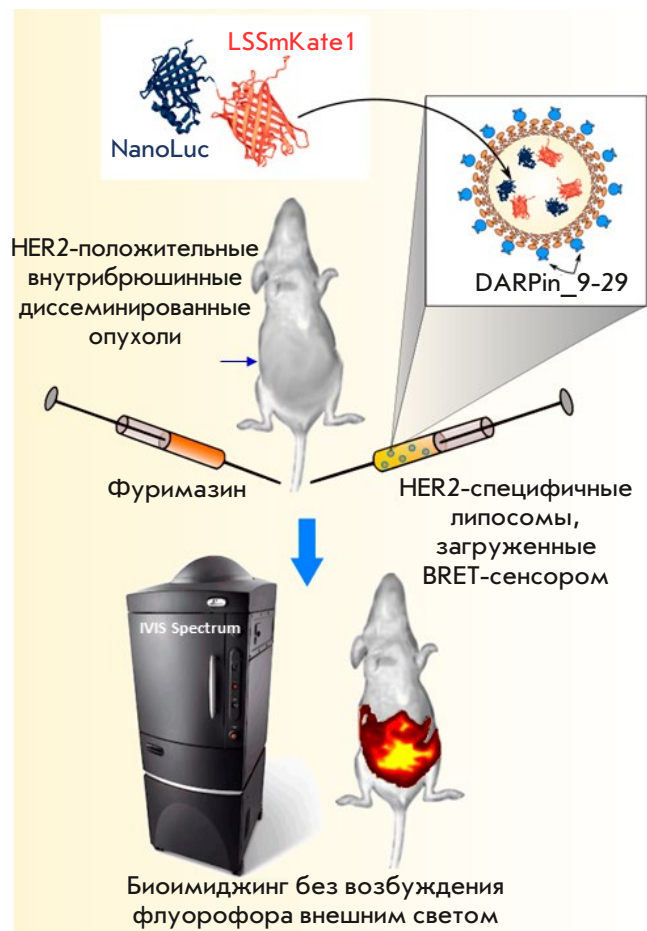


Рис. 1. Адресная наноплатформа на основе BRET-сенсора NanoLuc-LSSmKate1 и HER2-специфичных липосом для неинвазивной диагностики глубоких опухолей. Концептуальная схема эксперимента: генетически кодируемый BRET-сенсор NanoLuc-LSSmKate1 включен в липосомы, модифицированные по внешней поверхности HER2-специфичным модулем DARPin_9-29. В присутствии люциферазного субстрата в организме животного происходит активация красного флуоресцентного белка без внешнего источника света, позволяя прижизненно в режиме реального времени детектировать глубоко расположенные опухоли в организме животного

Правильность финальной конструкции доказывали секвенированием. Кодирующая последовательность гена *NanoLuc-LSSmKate1* соответствует белку с первичной структурой: MVFTLEDVFGDWRQTAGYNLDQVLEQGGVSSLFQNLGVSVTPIQRIVLSGENGLKIDIHVIIPYEGLSGDQMGQIEKIFKVVYPVDDH HFKVILHYGTLVIDGVTNPMIDYFGRPYEGIAVFDGKKITVTGTLWNGNKIIDERLINPDGSLFRVTINGVTGWRLCERILAGGGGSMVSELKENMHMKLYMEGTVNHHFKCTSEGEKPYEGTQTMRIKVVVEGGPL

PFAFDILATSFMYGSYTFINHTQGIPDFFKQSFPEG
FTWERVTTYEDGGVLTATQDTSIQDGLIYNVKIR
GVNFTSNGPVMQKKTGWEAGTEMLYPADGGLE
GRSDEALKLVGGGHLICNLKSTYRSKPKAKNLKV
PGVYYVDRRLRIKEADKETVEQNEVAVARYCDL
PSKLGHKLNAALENNNNNN.

Для получения белков (NanoLuc-LSSmKate1, NanoLuc и DARPIn_9-29), использованных в этом исследовании, применяли метод автоиндукции [25]. Колонии *E. coli* BL21(DE3), трансформированные рЕТ22-NanoLuc-LSSmKate1, рЕТ22-NanoLuc или рЕТ22-DARF, культивировали в автоиндукционной среде ZYM-5052 в присутствии ампициллина (100 мкг/мл) при 25°C и 200 об/мин в течение ночи. Автоиндукционная среда, содержащая эквивалентные концентрации гидрофосфата натрия и дигидрофосфата калия, препятствует закислению культуральной среды продуктами метаболизма бактерий и обеспечивает поддержание нейтральных значений pH даже при достижении культурой высоких плотностей ($OD_{600} \sim 10$). Сбалансированные концентрации глюкозы, лактозы и глицерина, а также высокая интенсивность перемешивания культуры (200 об/мин) позволяют индуцировать экспрессию гена целевого белка автоматически (при истощении в среде глюкозы), не прибегая к контролю плотности культуры. Биомассу осаждали центрифугированием при 6000 *g* в течение 15 мин, ресуспендировали в 20 мМ NaPi, pH 8.0, 150 мМ NaCl, лизоцим (30 мкг/мл). Клетки разрушали ультразвуком, дебрис удаляли высокоскоростным центрифугированием (25000 *g*). К осветленному лизату добавляли имидазол до конечной концентрации 30 мМ. Лизат фильтровали через мембрану с диаметром пор 0.2 мкм и наносили на колонку HisTrap, 1 мл (Cytiva). Белок выделяли согласно протоколу производителя. Концентрации белков определяли спектрофотометрически (по закону Бугера–Ламберта–Бера) с использованием следующих коэффициентов экстинкции: NanoLuc-LSSmKate1: $\epsilon_{280} = 54570 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$; NanoLuc: $\epsilon_{280} = 25400 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$; DARPIn: $\epsilon_{280} = 4470 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$. Коэффициенты экстинкции определяли с помощью программы ProtParam tool (<https://web.expasy.org>).

Определение величины BRET в системе NanoLuc-LSSmKate1

Для оценки эффективности BRET в системе NanoLuc-LSSmKate1 проводили регистрацию спектров люминесценции NanoLuc-LSSmKate1 и NanoLuc в присутствии 5 мкМ фуримазина. Измерения проводили через 10 с после добавления люциферазного субстрата на приборе IVIS Spectrum CT (PerkinElmer, США) в режиме Excitation block,

спектр эмиссии регистрировали в диапазоне длин волн 500–740 нм с шагом 20 нм. Значение BRET рассчитывали как отношение энергии, излучаемой акцептором (NanoLuc-LSSmKate1), к энергии, излучаемой донором (NanoLuc) [26, 27].

Получение HER2-специфичных липосом, загруженных NanoLuc-LSSmKate1

Инкапсулирование NanoLuc-LSSmKate1 в липосомы проводили согласно [28]. Суспензию фосфолипидов (0.3 мл, конечная концентрация 4 г/л), приготовленную из гранул L- α -фосфатидилхолина (Avanti Polar Lipids, Soy 40%), смешивали с 0.2 мл NanoLuc-LSSmKate1 (конечная концентрация 150 мкМ в 20 мМ NaPi, pH 6.0). Инкапсуляция основана на электростатическом взаимодействии положительно заряженной полигистидиновой метки белка (pK_a имидазола гистидина ~ 6) и отрицательно заряженной внутренней липосомной мембраны при нейтральном значении pH. Суспензию фосфолипидов и NanoLuc-LSSmKate1 подвергали пятикратной процедуре быстрого замораживания (-150°C) и быстрого оттаивания ($+30^\circ\text{C}$), после чего с помощью экструдера продавливали через фильтр с размером пор 100 нм. Липосомы отделяли от свободного белка и липидов с использованием гелепроникающей хроматографии на колонке, упакованной сорбентом сефароза CL-2B.

Функционализацию внешней поверхности липосом HER-2-специфичным DARPIn_9-29 проводили по аминокруппам фосфотидилэтаноламина. Для этого липосомы, загруженные NanoLuc-LSSmKate1, инкубировали с 10-кратным молярным избытком сульфо-EMCS (эфир N- ϵ -maleимидокапроилоксисульфосукцинимид). Параллельно DARPIn_9-29 (100 мкМ в 20 мМ NaPi, pH 7.5) инкубировали с 2-иминотиолоном (6 мМ, реагент Траута, позволяющий ввести SH-группу по первичным аминам белка). Обе реакции проводили при комнатной температуре в течение 40 мин, после чего продукты отделяли от несвязавшихся модифицирующих агентов на колонке NAP5 (Cytiva). Конъюгацию сульфо-EMCS-протеолипосом с DARPIn-SH проводили в течение 40 мин при комнатной температуре; DARPIn-Lip(NanoLuc-LSSmKate1) отделяли от несвязанного DARPIn_9-29 с помощью гелепроникающей хроматографии на колонке, упакованной сефарозой CL-2B.

Клеточные линии

В работе использовали линию клеток серозной цистаденокарциномы яичников SKOV3.ip1, полученную из внутрибрюшинного асцита иммунодефицитной мыши, которой интраперитонеально

были введены клетки аденокарциномы яичника человека SKOV3 [29], а также клеточную линию SKOV3.ip1-NanoLuc, стабильно экспрессирующую ген люциферазы NanoLuc (коллекция клеточных линий лаборатории молекулярной иммунологии ИБХ РАН). SKOV3.ip1 и SKOV3.ip1-NanoLuc характеризуются сверхэкспрессией рецептора HER2 (10^6 рецептор/клетка). Клетки культивировали в стандартных условиях (37°C во влажной атмосфере с $5\% \text{CO}_2$) в среде RPMI 1640 («ПанЭко», Россия), содержащей 2 мМ L-глутамин («ПанЭко»), 10% фетальной бычьей сыворотки (Gibco) и антибиотик (10 ЕД/мл пенициллина, 10 мкг/мл стрептомицина, «ПанЭко»).

Проточная цитометрия

Для изучения функциональной активности адресного модуля DARPIn₉₋₂₉ в составе липосом оценивали взаимодействие DARP-Lip(NanoLuc-LSSmKate1) с HER2-положительными клетками SKOV3.ip1 методом проточной цитометрии. Клетки (100 000 в 200 мкл полной ростовой среды) инкубировали в течение 10 мин при 37°C с 300 нМ DARP-Lip(NanoLuc-LSSmKate1) (концентрация указана по NanoLuc-LSSmKate1). Клетки трижды промывали фосфатно-солевым буфером и анализировали на приборе NovoCyte 3000. Флуоресценцию LSSmKate1 возбуждали лазером с длиной волны 488 нм и детектировали в канале 615 ± 20 нм (канал PerCP-H).

Конфокальная микроскопия

Изучение связывания адресного модуля в составе DARP-Lip(NanoLuc-LSSmKate1) с рецептором HER2 на поверхности клеток SKOV3.ip1 проводили методом конфокальной микроскопии. Для этого 4000 клеток линии SKOV3.ip1 высевали в лунки 96-луночного планшета со стеклянным дном (Eppendorf) и культивировали в течение ночи. На следующий день к клеткам добавляли 300 нМ DARP-Lip(NanoLuc-LSSmKate1) (концентрация указана по NanoLuc-LSSmKate1). Инкубацию клеток с конъюгатом проводили в течение 20 и 90 мин. Ядра окрашивали 10 нМ Hoechst 33342 в течение 10 мин при 37°C . Клетки трижды промывали фосфатно-солевым буфером, добавляли среду FluoroBright (Gibco) и анализировали с помощью конфокального микроскопа LSM 980 (Carl Zeiss), используя масляный иммерсионный объектив $63\times$ Plan-Apochromat. Флуоресценцию Hoechst 33342 возбуждали лазером с длиной волны 405 нм, детекцию проводили при 410–520 нм; LSSmKate1 возбуждали лазером с длиной волны 488 нм, флуоресценцию детектировали в диапазоне 600–755 нм.

Биолюминесцентная визуализация животных

Исследования *in vivo* проводили на мышах линии Balb/c nude/nude. Эксперименты на лабораторных животных проведены с соблюдением принципов гуманного обращения с животными, изложенных в директивах Европейского сообщества (86/609/ECC) и Хельсинкской декларации, в соответствии с «Правилами проведения работ с использованием экспериментальных животных» (протокол Комиссии ИБХ РАН по контролю за содержанием и использованием животных № 368/2022 от 19.12.2022 г.). Модель диссеминированных внутрибрюшинных метастазов получали внутрибрюшинной инокуляцией 2×10^6 клеток линии SKOV3.ip1-NanoLuc в 100 мкл культуральной среды без сыворотки и антибиотиков. Рост внутрибрюшинных опухолей оценивали по люминесцентному сигналу. Для этого через 10 дней после прививки мышам в ретроорбитальный синус вводили 7 мкг фуримазина (Nano-Glo, Promega) в 100 мкл PBS и проводили биоимиджинг на приборе IVIS Spectrum CT (Perkin Elmer) в режиме «Люминесценция». Флуоресцентный биоимиджинг внутрибрюшинных опухолей проводили в режиме «Эпи-флуоресценция» в диапазоне 600–740 нм (с шагом 20 нм) без возбуждающего света (режим excitation block), при этом мышам в разные ретроорбитальные синусы вводили: за 60 мин до анестезии – 2 мкМ DARP-Lip(NanoLuc-LSSmKate1) (концентрация указана по NanoLuc-LSSmKate1), за 30 с до анестезии – 7 мкг фуримазина. Съёмку осуществляли сразу после засыпания животных.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Среди люцифераз, используемых в настоящее время в BRET-сенсорах, идеальным донором энергии является NanoLuc, поскольку выделяется своей необычайной яркостью (мощностью люминесценции) и малым размером [30]. В качестве акцептора энергии нами был выбран красный белок с большим стоксовым сдвигом LSSmKate1 с максимумом эмиссии при 624 нм [23]. Этот белок удовлетворяет двум важным условиям: 1) спектр возбуждения LSSmKate1 (максимум возбуждения 463 нм) совпадает со спектром эмиссии окисленной формы люциферазного субстрата (максимум эмиссии 460 нм) (рис. 2А); 2) спектр эмиссии LSSmKate1 находится в окне прозрачности биоткани (600–1000 нм), где коэффициент поглощения ткани минимален [31].

Известно, что эффективность BRET зависит от расстояния: чтобы процесс безызлучательного переноса энергии был эффективен, донор и акцептор должны находиться друг от друга на расстоянии, не превышающем 10 нм [32]. Именно поэтому

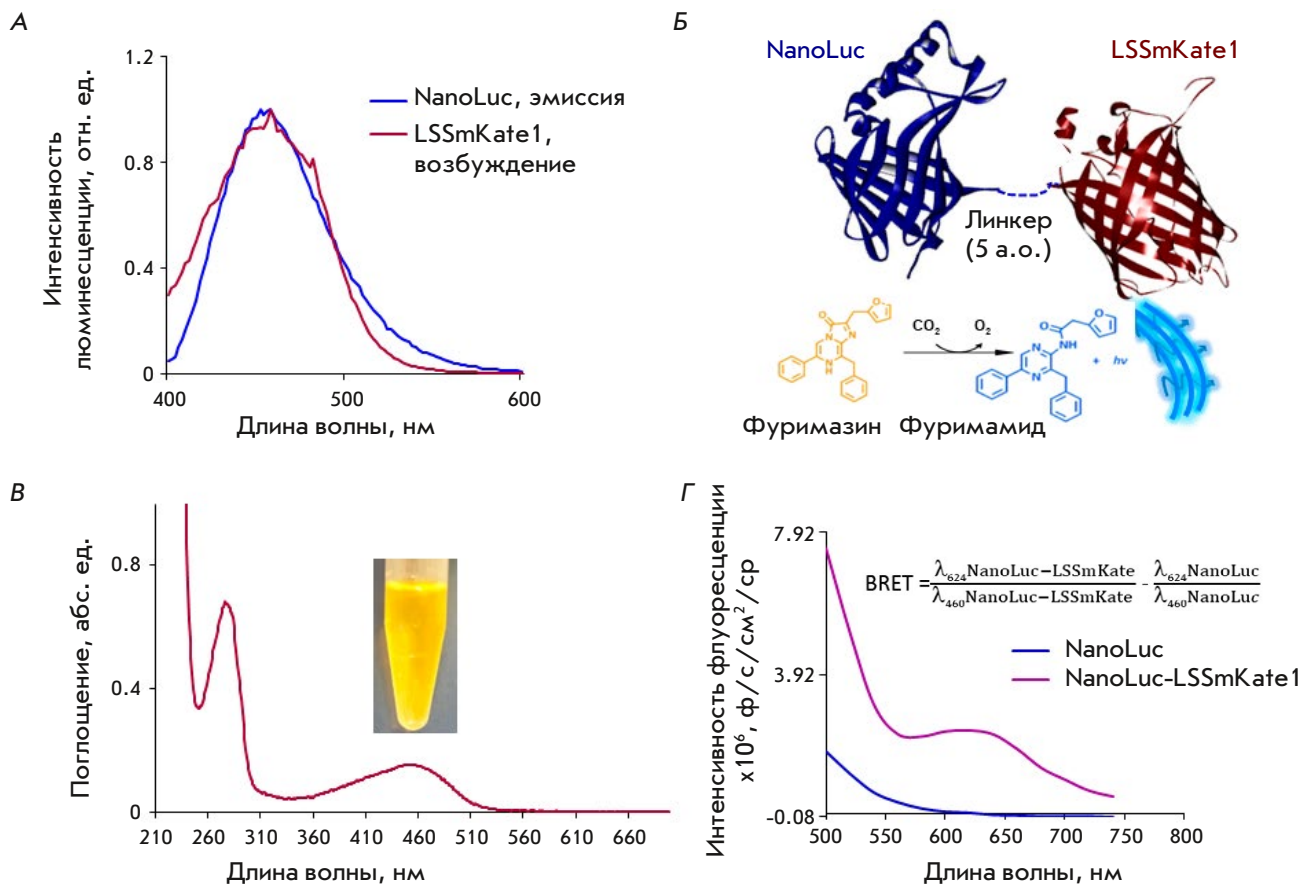


Рис. 2. Характеристика BRET-сенсора NanoLuc-LSSmKate1. **А** – нормированные спектры люминесценции люциферазы NanoLuc в присутствии 30 мкМ фуримазина (синяя кривая) и флуоресценции LSSmKate1 (бордовая кривая). **Б** – схема BRET-сенсора NanoLuc-LSSmKate1 и принцип работы: люцифераза NanoLuc высокоспецифично окисляет свой субстрат фуримазин, окисленная форма которого, фуримамид, излучает в синем диапазоне спектра. Часть этой энергии безызлучательно переносится на LSSmKate1, находящийся в одной полипептидной цепи с люциферазой NanoLuc. LSSmKate1 начинает флуоресцировать. **В** – спектр поглощения очищенного белка NanoLuc-LSSmKate1 и образец белка в пробирке. **Г** – спектры флуоресценции NanoLuc-LSSmKate1 (сиреневая кривая) и NanoLuc (синяя кривая), зарегистрированные на приборе IVIS Spectrum CT без возбуждения внешним светом (режим excitation block) в присутствии люциферазного субстрата. Приведена формула для расчета эффективности резонансного переноса энергии в системе NanoLuc-LSSmKate1

представлялось целесообразным получить гибридный белок NanoLuc-LSSmKate1 с максимально сближенными функциональными модулями (люцифераза и флуоресцентный белок). Схема работы BRET-сенсора представлена на рис. 2Б: люцифераза NanoLuc окисляет субстрат фуримазин, который при переходе в окисленную форму, фуримамид, испускает фотоны в видимой области спектра. Частично эта энергия поглощается акцептором – флуоресцентным белком LSSmKate1, который при этом переходит в возбужденное состояние и флуоресцирует.

Конструкцию NanoLuc-LSSmKate1 и соответствующий ей белок получали как описано

в «Экспериментальной части». Спектр поглощения очищенного белка NanoLuc-LSSmKate1 характеризуется сильным поглощением в видимой области спектра, о чем говорит наличие пика при 460 нм и ярко-желтый цвет очищенного белка (рис. 2В).

Эффективность резонансного переноса энергии в системе NanoLuc-LSSmKate1, рассчитанная как отношение величины эмиссии системы «донор-акцептор» (NanoLuc-LSSmKate1) на длине волны максимума испускания акцептора (624 нм) к величине эмиссии этой системы на длине волны максимума испускания донора (NanoLuc, 460 нм) за вычетом этого же отношения, детектированного только для донора [8, 33], составила 0.3 (рис. 2Г).

Для селективной доставки BRET-сенсора к HER2-положительным опухолям использовали липосомы, модифицированные по внешней поверхности HER2-специфичным модулем DARPin₉₋₂₉ (Designed Ankyrin Repeat Proteins), который взаимодействует с субдоменом I рецептора HER2 с высокой аффинностью ($K_D = 3.8$ нМ) [24]. DARPin-белки являются новым классом адресных молекул неиммуноглобулиновой природы. Эти молекулы отличаются от антител высоким уровнем экспрессии, мономерностью в растворе, небольшими размерами, устойчивостью к протеазам и высокой растворимостью [34, 35]. Перечисленные особенности позволяют DARPins конкурировать с антителами в качестве альтернативных адресных компонентов в составе мультифункциональных соединений, предназначенных для терапии онкозаболеваний.

Метод загрузки BRET-сенсора в липосомы основан на электростатическом взаимодействии положительно заряженной полигистидиновой метки белка (pK_a имидазола гистидина ~6) и отрицательно заряженной внутренней липосомной мембраны при нейтральном значении pH [28]. Концентрацию липосом, загруженных NanoLuc-LSSmKate1, оценивали спектрофотометрически, сравнивая спектр поглощения пустых липосом со спектром протеолипосом. Как видно из *рис. 3А*, спектр протеолипосом (синяя кривая) совпадает со спектром пустых липосом с концентрацией 4.25 г/л (зеленая кривая), полученных 15-кратным продавливанием суспензии фосфолипидов через фильтр с диаметром пор 100 нм. Ранее с использованием гидрофильного мембранонепроницаемого красителя фталоцианин-3,4',4'',4'''-тетрасульфоната меди (CPTS) мы установили, что концентрация липидных везикул в 1 мг/мл суспензии соответствует 1.2 нМ [28]. Таким образом, молярная концентрация суспензии липосом 4.25 г/л составляет 5.1 нМ. Вычитание спектра пустых липосом (зеленая кривая на *рис. 3А*) из спектра липосом, нагруженных NanoLuc-LSSmKate1 (синяя кривая на *рис. 3А*), дает спектр NanoLuc-LSSmKate1, включенного в липосому (сиреневая кривая на *рис. 3А*). Концентрация белка, включенного в липосомы, составляет ~5.42 мкМ ($OD_{280}/\epsilon_{280} = 0.296/54570$). Следовательно, одна протеолипосома содержит ~1063 молекул BRET-сенсора.

Функционализацию протеолипосом адресным модулем DARPin проводили с использованием реагента Траута (2-иминотиолана) и гидрофильного аминокислотного агента сульфгидрильного сшивающего агента сульфо-EMCS как описано в «Экспериментальной части».

Способность липосом, загруженных BRET-сенсором и функционализированных адресным модулем DARPin, взаимодействовать с рецептором

HER2 *in vitro* изучена методами проточной цитометрии и конфокальной микроскопии (*рис. 3Б,В*). Данные проточной цитометрии подтверждают специфическое взаимодействие DARPin-модифицированных липосом с рецептором HER2 на поверхности клеток SKOV3.ip1. Как видно из *рис. 3Б*, средняя интенсивность флуоресценции (MFI, median fluorescence intensity) HER2-положительных клеток SKOV3.ip1, обработанных DARP-Lip(NanoLuc-LSSmKate1), составляет 102279 (зеленая кривая на *рис. 3Б*), что примерно в 25 раз выше автофлуоресценции этих клеток (синяя кривая на *рис. 3Б*).

С помощью конфокальной микроскопии установлено, что в течение 20 мин инкубации клеток SKOV3.ip1 с 300-нМ суспензией DARP-Lip(NanoLuc-LSSmKate1) происходит эффективное связывание адресных протеолипосом с мембраной клетки (красная корона по мембране клеток на левом фото *рис. 3В*). Дальнейшая инкубация в течение 1.5 ч приводит к интернализации DARP-Lip(NanoLuc-LSSmKate1), о чем свидетельствуют красные пиксели в цитоплазме (*рис. 3В*, правое фото).

Таким образом, как видно из приведенных данных (*рис. 3*), разработанная система характеризуется высокой степенью загрузки BRET-сенсора в липосомы и высокой специфичностью к HER2-мишени.

Применимость DARPin-модифицированных липосом, загруженных BRET-сенсором, для неинвазивной детекции *in vivo* HER2-положительных глубоко расположенных опухолей в режиме реального времени оценивали на мышинной модели диссеминированных внутрибрюшинных метастазов, сформированной на основе клеток карциномы яичника человека SKOV3.ip1, стабильно экспрессирующих репортерный ген *NanoLuc*. Клетки SKOV3.ip1 характеризуются высоким потенциалом метастазирования, имитируя при внутрибрюшинном введении позднюю стадию рака яичников с обширным распространением опухолевых клеток на стенку брюшины и поверхность органов [29]. Мониторинг роста внутрибрюшинных опухолей проводили по детекции люминесцентного сигнала через 10 дней после прививки животным опухолевых клеток, экспрессирующих *NanoLuc* (*рис. 4*, верхние фото). Мониторинг биораспределения липосом DARP-Lip(NanoLuc-LSSmKate1), введенных в организм животного системно, осуществляли по детекции флуоресцентного сигнала, который регистрировали в режиме отсутствия возбуждения внешним светом (*рис. 4*, нижние фото). Как видно из *рис. 4*, интенсивность и топография люминесцентного сигнала, детектируемого после введения мышам фуримази-

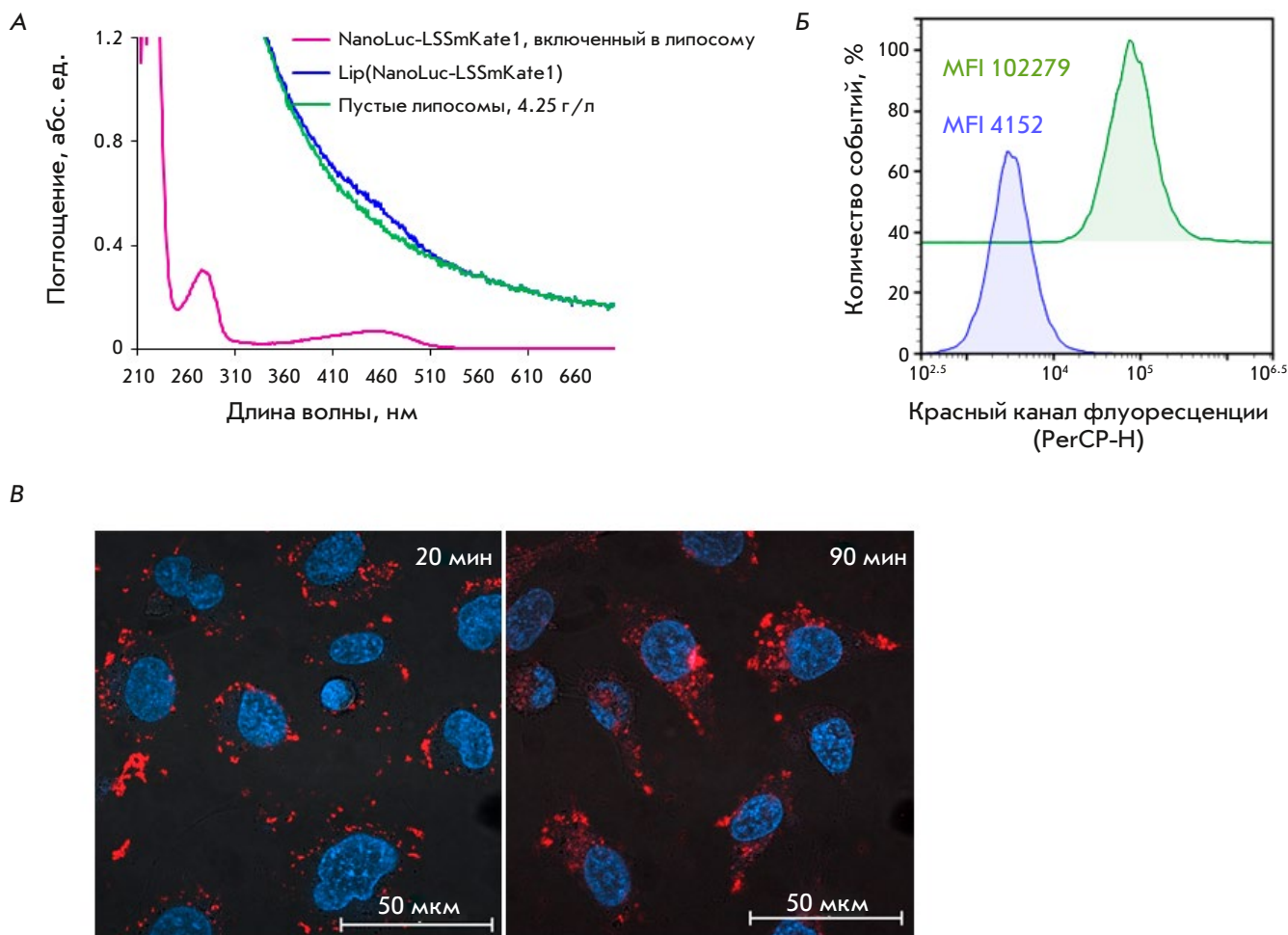


Рис. 3. Характеристика HER2-специфических липосом, загруженных BRET-сенсором NanoLuc-LSSmKate1. **А** – спектры поглощения пустых липосом (зеленая кривая) и липосом, содержащих NanoLuc-LSSmKate1 (синяя кривая). Сиреневая кривая соответствует белку NanoLuc-LSSmKate1, загруженному в липосомы. **Б** – данные проточной цитометрии по рецептор-специфическому взаимодействию DARP-Lip(NanoLuc-LSSmKate1) с HER2-положительными SKOV3ip-клетками. Синяя кривая соответствует флуоресцентно немеченым клеткам (контроль), зеленая кривая – клеткам, обработанным DARP-Lip(NanoLuc-LSSmKate1). На пиктограмме указаны значения средней интенсивности флуоресценции (MFI). Детекцию сигнала вели в красном канале флуоресценции (PerCP-H, $\lambda_{em} = 615 \pm 20$ нм) при возбуждении лазером 488 нм. **В** – наложенные конфокальные изображения в синем (λ_{ex} 405 нм, детекция 410–520 нм) и красном (λ_{ex} 488 нм, детекция 600–755 нм) каналах флуоресценции клеток SKOV3.ip1 после 20 мин (левое фото) и 90 мин (правое изображение) инкубации с DARP-Lip(NanoLuc-LSSmKate1). Ядра окрашены Hoechst 33342

на, полностью совпадают с интенсивностью и топографией флуоресцентного сигнала, детектируемого в режиме без возбуждения флуорофора (excitation block) после введения мышам DARP-Lip(NanoLuc-LSSmKate1) и фуримазина. Таким образом, разработанные HER2-специфические липосомы, несущие BRET-сенсор, могут использоваться в прижизненном оптическом биоимиджинге для детекции глубоко расположенных опухолей определенного молекулярного профиля.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Число противоопухолевых препаратов, не эффективных в клинике, намного превышает количество препаратов, эффективных в доклинических исследованиях [2, 36]. Этот факт указывает на необходимость разработки новых моделей и новых технологий доклинического мониторинга отклика опухоли на лечение [36, 37]. Широко используемые в современных экспериментальных исследованиях модели ксенотрансплантатов подкожных опухолей *in vivo*

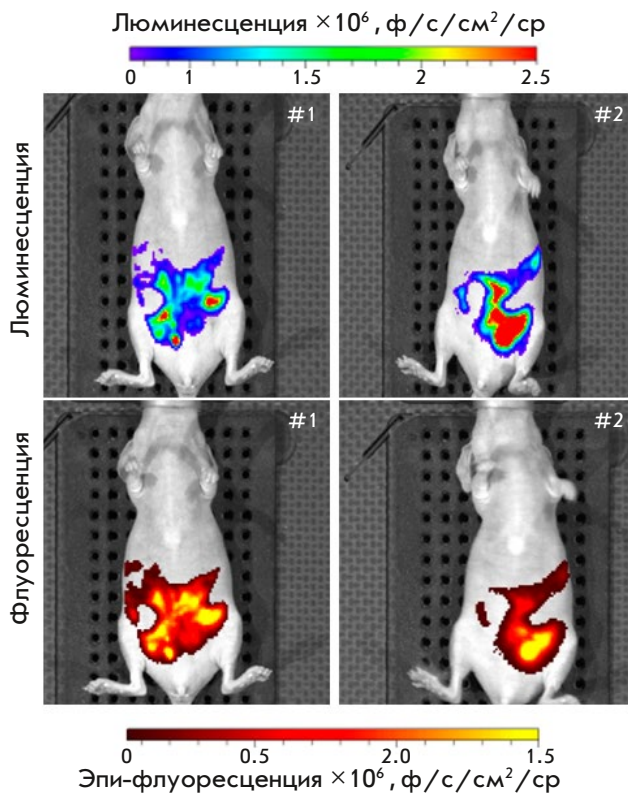


Рис. 4. Оптический биоимиджинг внутрибрюшинных диссеминированных опухолей с использованием HER2-специфичных липосом, загруженных BRET-сенсором NanoLuc-LSSmKate1. Прижизненные люминесцентные (верхние фото) и флуоресцентные (нижние фото) изображения животных, полученные в режиме реального времени на приборе IVIS Spectrum CT в двух разных режимах детекции сигнала: верхние фото – режим биолюминесценции; нижние фото – режим флуоресценции без возбуждения флуорофора

позволяют проводить целенаправленный скрининг лекарственных средств и могут предоставить данные об эффективности препарата, фармакокинетики и фармакодинамике, однако не позволяют оценить метастатический потенциал опухоли. Применение ортотопических моделей позволяет создать релевантную модель заболевания, однако встает проблема определения опухолевой нагрузки на ор-

ганизм: как быть, если опухоль нельзя измерить штангенциркулем? Очевидно, что ценность любой доклинической модели для оценки эффективности противоопухолевых соединений определяется, в конечном итоге, ее способностью максимально близко прогнозировать клинический ответ у человека. Потребность в прижизненной визуализации событий, происходящих в организме животного на стадии доклинических исследований противоопухолевых препаратов, обусловила бурное развитие оптического биоимиджинга, а развитие методов молекулярного профилирования опухоли заложило основу для создания молекулярно-таргетной визуализации опухолей.

В данной работе разработана система, позволяющая в режиме реального времени проводить неинвазивную детекцию HER2-положительных внутрибрюшинных диссеминированных опухолей с помощью адресных липосом, загруженных BRET-сенсором NanoLuc-LSSmKate1. Система характеризуется высокой степенью загрузки BRET-сенсора в липосому (рис. 3), специфичностью протеолипосом к HER2-рецептору *in vitro* и *in vivo* (рис. 3, 4), а также позволяет проводить неинвазивную визуализацию опухолевых процессов на уровне целого организма (рис. 4).

Полагаем, что разработанная адресная система оптического биоимиджинга в реальном времени на основе BRET-сенсора NanoLuc-LSSmKate1 может стать эффективной платформой для оптимизации доклинических исследований новых таргетных препаратов. Кроме того, разработанный принцип создания адресного BRET-сенсора может стать универсальной платформой для неинвазивного биоимиджинга глубоко расположенных опухолей любого молекулярного профиля путем простой смены векторной молекулы на поверхности липосомы. ●

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда (грант № 24-14-00088 «Таргетированные флуоресцентные липосомы как система для неинвазивной оптической детекции первичных опухолей и удаленных метастазов HER2/EpCAM-положительных карцином»).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Bai J.W., Qiu S.Q., Zhang G.J. // Signal Transduct Target Ther. 2023. V. 8. № 1. P. 89.
- O'Farrell A.C., Shnyder S.D., Marston G., Coletta P.L., Gill J.H. // Br. J. Pharmacol. 2013. V. 169. № 4. P. 719–735.
- Hilderbrand S.A., Weissleder R. // Curr. Opin. Chem. Biol. 2010. V. 14. № 1. P. 71–79.
- Shramova E.I., Kotlyar A.B., Lebedenko E.N., Deyev S.M., Proshkina G.M. // Acta Naturae. 2020. V. 12. № 3. P. 102–113.
- Badr C.E. // Methods Mol. Biol. 2014. V. 1098. P. 1–18.
- Serkova N.J., Glunde K., Haney C.R., Farhoud M., De Lille A., Redente E.F., Simberg D., Westerly D.C., Griffin L., Mason R.P. // Cancer Res. 2021. V. 81. № 5. P. 1189–1200.
- Koessinger A.L., Koessinger D., Stevenson K., Cloix C.,

- Mitchell L., Nixon C., Gomez-Roman N., Chalmers A.J., Norman J.C., Tait S.W.G. // *Sci. Rep.* 2020. V. 10. № 1. P. 15361.
8. Shramova E.I., Chumakov S.P., Shipunova V.O., Ryabova A.V., Telegin G.B., Kabashin A.V., Deyev S.M., Proshkina G.M. // *Light Sci. Appl.* 2022. V. 11. № 1. P. 38.
9. Ozawa T., Yoshimura H., Kim S.B. // *Anal. Chem.* 2013. V. 85. № 2. P. 590–609.
10. Grebenil E.A., Kostyuk A.B., Deyev S.M. // *Russ. Chem. Rev.* 2016. V. 85. № 12. P. 1277–1296.
11. Endo M., Ozawa T. // *Int. J. Mol. Sci.* 2020. V. 21. № 18. P. 6538.
12. Förster T. // *Discuss. Faraday Soc.* 1959. V. 27. P. 7–17.
13. Yeh H.W., Karmach O., Ji A., Carter D., Martins-Green M.M., Ai H.W. // *Nat. Methods.* 2017. V. 14. № 10. P. 971–974.
14. Eyre N.S., Aloia A.L., Joyce M.A., Chulanetra M., Tyrrell D.L., Beard M.R. // *Virology.* 2017. V. 507. P. 20–31.
15. Iglesias P., Costoya J.A. // *Biosens. Bioelectron.* 2009. V. 24. № 10. P. 3126–3130.
16. Branchini B.R., Rosenberg J.C., Ablamsky D.M., Taylor K.P., Southworth T.L., Linder S.J. // *Anal. Biochem.* 2011. V. 414. № 2. P. 239–245.
17. Rumyantsev K.A., Turoverov K.K., Verkhusha V.V. // *Sci. Rep.* 2016. V. 6. P. 36588.
18. Su Y., Walker J.R., Park Y., Smith T.P., Liu L.X., Hall M.P., Labanieh L., Hurst R., Wang D.C., Encell L.P., et al. // *Nat. Methods.* 2020. V. 17. № 8. P. 852–860.
19. Nishihara R., Paulmurugan R., Nakajima T., Yamamoto E., Natarajan A., Afjei R., Hiruta Y., Iwasawa N., Nishiyama S., Citterio D., et al. // *Theranostics.* 2019. V. 9. № 9. P. 2646–2661.
20. Ross J.S., Slodkowska E.A., Symmans W.F., Pusztai L., Ravdin P.M., Hortobagyi G.N. // *Oncologist.* 2009. V. 14. № 4. P. 320–368.
21. Polanovski O.L., Lebedenko E.N., Deyev S.M. // *Biochemistry (Moscow).* 2012. V. 77. № 3. P. 227–245.
22. Blumenthal G.M., Scher N.S., Cortazar P., Chattopadhyay S., Tang S., Song P., Liu Q., Ringgold K., Pilaro A.M., Tilley A., et al. // *Clin. Cancer Res.* 2013. V. 19. № 18. P. 4911–4916.
23. Piatkevich K.D., Hult J., Subach O.M., Wu B., Abdulla A., Segall J.E., Verkhusha V.V. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2010. V. 107. № 12. P. 5369–5374.
24. Steiner D., Forrer P., Pluckthun A. // *J. Mol. Biol.* 2008. V. 382. № 5. P. 121–127.
25. Studier F.W. // *Protein Expr. Purif.* 2005. V. 41. № 1. P. 207–234.
26. Dragulescu-Andrasi A., Chan C.T., De A., Massoud T.F., Gambhir S.S. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2011. V. 108. № 29. P. 12060–12065.
27. Shramova E.I., Filimonova V.P., Frolova A.Y., Pichkur E.B., Fedotov V.R., Konevega A.L., Deyev S.M., Proshkina G.M. // *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 2023. V. 193. P. 208–217.
28. Deyev S., Proshkina G., Baryshnikova O., Ryabova A., Avishai G., Katrivas L., Giannini C., Levi-Kalishman Y., Kotlyar A. // *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 2018. V. 130. P. 296–305.
29. Yu D., Wolf J.K., Scanlon M., Price J.E., Hung M.C. // *Cancer Res.* 1993. V. 53. № 4. P. 891–898.
30. Hall M.P., Unch J., Binkowski B.F., Valley M.P., Butler B.L., Wood M.G., Otto P., Zimmerman K., Vidugiris G., Machleidt T., et al. // *ACS Chem. Biol.* 2012. V. 7. № 11. P. 1848–1857.
31. Mahmood U. // *IEEE Eng. Med. Biol. Mag.* 2004. V. 23. № 4. P. 58–66.
32. Carpenter S., Fehr M.J., Kraus G.A., Petrich J.W. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1994. V. 91. № 25. P. 12273–12277.
33. Proshkina G.M., Shramova E.I., Shilova O.N., Ryabova A.V., Deyev S.M. // *J. Photochem. Photobiol. B.* 2018. V. 188. P. 107–115.
34. Interlandi G., Wetzel S.K., Settanni G., Pluckthun A., Cafilisch A. // *J. Mol. Biol.* 2008. V. 375. № 3. P. 837–854.
35. Zahnd C., Kawe M., Stumpp M.T., de Pasquale C., Tamaskovic R., Nagy-Davidescu G., Dreier B., Schibli R., Binz H.K., Waibel R., et al. // *Cancer Res.* 2010. V. 70. № 4. P. 1595–1605.
36. Suggitt M., Bibby M.C. // *Clin. Cancer Res.* 2005. V. 11. № 3. P. 971–981.
37. Tolmachev V.M., Chernov M.I., Deyev S.M. // *Russ. Chem. Rev.* 2023. V. 91. № 3. P. RCR5034.

УДК 578.821

Аттенуированный и высокоиммуногенный вариант вируса осповакцины

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

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

*E-mail: snshchel@rambler.ru

Поступила в редакцию 10.02.2024

Принята к печати 05.04.2024

DOI: 10.32607/actanaturae.27384

РЕФЕРАТ Вирус осповакцины (VACV) многие десятилетия использовался для профилактической иммунизации против оспы. Однако вакцина на его основе была высокоректогенной, поэтому после ликвидации оспы Всемирная организация здравоохранения в 1980 году рекомендовала прекратить вакцинацию против данной инфекции. Это привело к тому, что в последние годы все чаще стали возникать вспышки ортопоксвирусных инфекций среди людей, наибольшей из которых стала эпидемия оспы обезьян 2022 года, распространившаяся на все континенты. Поэтому актуальным остается создание безопасных высокоиммуногенных вакцин новых поколений против ортопоксвирусных инфекций. Ранее на основе штамма ЛИВП (L) VACV, используемого в России в качестве противооспенной вакцины первого поколения, нами получен штамм LAD с мутациями в гене *A34R*, приводящими к увеличенной продукции внеклеточных вирионов, и с делецией гена *A35R*, ингибирующего гуморальный ответ на вирусную инфекцию. В данной работе создан штамм LADA с дополнительной делецией в гене *ati* штамма LAD, направляющего продукцию мажорного невирионного иммуногена. При интраназальном инфицировании мышей линии BALB/c выявлено, что вариант LADA VACV менее реактогенен в сравнении с исходным штаммом L. При внутрикожной иммунизации мышей в дозе 10^5 БОЕ штаммы LAD и LADA индуцируют более выраженный клеточный иммунный ответ по сравнению со штаммом L. При этом максимальный уровень вирусспецифических IFN- γ -продуцирующих клеток для варианта LAD выявлен на 7 день после иммунизации (дни), а для LADA – на 14 дни. Штаммы LAD и LADA индуцировали значительно больший уровень VACV-специфических IgG по сравнению с родительским штаммом L, особенно в период 28–56 дни. Для оценки протективного иммунитета на 62 дни вакцинированных мышей интраназально заражали вирусом оспы коров в дозе 460 ЛД₅₀. Вирус LADA при этом обеспечивал полную защиту мышей, штамм LAD – 70%, а родительский штамм L – лишь 60% животных.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА вирус осповакцины, ортопоксвирусы, направленная делеция генов, вакцинация, внутрикожная инъекция, иммуногенность, протективность.

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

ВВЕДЕНИЕ

Особо опасный для человека вирус оспы (*Variola virus*, VARV) и родственные ему зоонозные вирусы оспы обезьян (*Monkeypox virus*, MPXV), оспы коров (*Cowpox virus*, CPXV), оспы верблюдов (*Camelpox virus*, CMLV) и осповакцины (*Vaccinia virus*, VACV) входят в состав рода *Orthopoxvirus* семейства Poxviridae [1].

Самым надежным способом профилактики любого вирусного заболевания является инфицирование

(иммунизация) человека или животных низковирулентным (аттенуированным) реплицирующимся вариантом/мутантом этого вирусного агента или близкородственным слабопатогенным вирусом. Первым примером такой защиты от инфекционного заболевания стало использование прививок против оспы [2].

Вакцины на основе VACV не имеют выраженной видоспецифичности в отношении ортопоксвирусов, поэтому они могут применяться для иммунизации как людей, так и животных, для профилактики

вспышек инфекционных заболеваний, вызванных любым видом ортопоксвирусов [3].

Живая противооспенная вакцина первого поколения представляла собой препарат VACV, полученный размножением вируса в коже телят или других животных. В современных условиях вакцинные штаммы VACV продуцируют на культурах клеток млекопитающих, такие препараты относят к противооспенным вакцинам второго поколения [4, 5].

Учитывая, что иммунизация против оспы живой вакциной первого поколения приводила в ряде случаев к тяжелым побочным реакциям, включая летальные исходы, Всемирная организация здравоохранения после заключения о глобальной ликвидации оспы в 1980 году настоятельно рекомендовала прекратить такую вакцинацию во всех странах [1].

Прекращение противооспенной вакцинации привело к тому, что за прошедшие годы большая часть человечества (прежде всего, в возрасте до 40–45 лет) не имеет иммунитета против любых зоонозных ортопоксвирусных инфекций. Участвовавшие в последние годы случаи инфицирования людей ортопоксвирусами, в первую очередь вирусом оспы обезьян, заставляют вернуться к рассмотрению вопроса о возможном возврате оспы или подобного заболевания в результате естественной эволюции этих вирусов [6, 7].

Чтобы предотвратить развитие локальных вспышек в распространенные эпидемии и тем самым уменьшить риск возникновения в результате естественной эволюции высокопатогенного для человека ортопоксвируса, усилия исследователей должны быть направлены на создание безопасных живых вакцин новых поколений на основе VACV [3, 8].

Аттенуированные противооспенные вакцины третьего поколения создают в процессе множественных пассажей определенного штамма VACV в культуре клеток гетерологичного хозяина. Например, самая изученная противооспенная вакцина третьего поколения MVA получена в результате большого числа пассажей штамма Ankara VACV на культуре куриных фибробластов. В геноме штамма MVA возникли множественные мутации и протяженные делеции относительно ДНК исходного штамма VACV. MVA характеризуется неспособностью реплицироваться в большинстве клеток млекопитающих, включая клетки человека [9].

Новый подход к получению аттенуированных реплицирующихся противооспенных вакцин четвертого поколения состоит во введении методами генетической инженерии направленных мутаций или делеций/инсерций в гены, контролирующие защитные реакции организма против вирусной инфекции.

Многочисленные работы, посвященные делециям (удалению) генов иммуномодулирующих факторов VACV, позволили выявить некоторые гены, инактивация которых приводила к аттенуации вируса. С разной долей успеха делались попытки получения аттенуированных и одновременно высокоиммуногенных вариантов VACV в результате направленной инактивации отдельных или нескольких вирусных генов, но они не были доведены до клинического применения полученных вариантов VACV [3, 4, 10].

На основе штамма LIVP (L) VACV, используемого в России в качестве противооспенной вакцины первого поколения, нами создан рекомбинантный вариант VACΔ5 с нарушением пяти генов вирулентности, кодирующих гемагглютинин (*A56R*), гамма-интерферонсвязывающий белок (*B8R*), тимидинкиназу (*J2R*), комплементсвязывающий белок (*C3L*) и Bcl-2-подобный ингибитор апоптоза (*N1L*). Показано, что инактивация выбранных генов вирулентности не влияет на репродуктивные свойства VACV на культурах клеток млекопитающих. Полученный штамм VACΔ5 характеризовался значительно меньшей реактогенностью и нейровирулентностью по сравнению с исходным штаммом L [11]. Для увеличения продукции вирусспецифических антител в геноме VACΔ5 дополнительно направленно инактивировали ген *A35R*, белковый продукт которого ингибирует представление антигенов главным комплексом гистосовместимости класса II, иммунное примирование Т-лимфоцитов и последующий синтез хемокинов и цитокинов. Созданный вариант VACΔ6 индуцировал в организме мышей достоверно более высокий уровень вируснейтрализующих антител и обеспечивал большую протективность, чем у исходного штамма L [12]. После доклинических исследований [13] и клинических испытаний вакцина ОртопоксВак (VACΔ6) была зарегистрирована в России в ноябре 2022 года [2] и стала первой в мире вакциной четвертого поколения против ортопоксвирусных инфекций человека.

Поскольку VACV кодирует большой набор генов, контролирующих формирование вирусного потомства и регулирующих развитие иммунного ответа на вирусную инфекцию [10, 14], нами продолжены исследования по созданию методами генетической инженерии новых аттенуированных и высокоиммуногенных вариантов VACV.

Целью данной работы было получение на основе штамма L VACV рекомбинантного варианта LADA с мутациями в гене *A34R*, приводящими к увеличенной продукции внеклеточных вирионов, с делецией гена *A35R*, ингибирующего антительный ответ

на вирусную инфекцию, и с делецией гена *ati*, направляющего продукцию мажорного невирионного иммуногена, а также изучение на мышинной модели реактогенности и динамики развития VACV-специфичного иммунного ответа на вакцинацию этим вирусом.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Вирусы, культура клеток

В работе использовали клон 14 штамма ЛИВП VACV (L) [11], полученный на его основе штамм LIVP-A34R*-dA35R (LAD) [15], и штамм GRI-90 CPXV [16]. Вирусы выращивали и титровали на культуре клеток почки африканской зеленой марышки линии CV-1 из коллекции культур клеток ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора.

Получение рекомбинантного штамма LIVP-A34R*-dA35R-*ati*

Для направленной делеции гена *ati* VACV монослой клеток CV-1 инфицировали штаммом LAD и проводили трансфекцию рекомбинантной плазмидой *pΔati* в условиях *gpt*-селекции рекомбинантов VACV как описано ранее [17]. Искомый вариант вируса LIVP-A34R*-dA35R-*ati* (LADA) выявляли ПЦР-анализом с последующим секвенированием вирусной ДНК.

Животные

В работе использовали мышей линии BALB/c, полученных из питомника ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора. Подопытных животных содержали на стандартном рационе с достаточным количеством воды согласно ветеринарному законодательству и в соответствии с требованиями по гуманному содержанию и использованию животных в экспериментальных исследованиях. Манипуляции на животных проведены с одобрения комитета по биоэтике ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора (Протокол № 02-06.2022 от 28.06.2022 г.).

Иммунизация мышей и взятие образцов на анализы

Мышей линии BALB/c в возрасте 6–7 недель иммунизировали штаммами L, LAD или LADA VACV (28 животных в группе, доза вируса 10^5 бляшкообразующих единиц (БОЕ)/20 мкл/мышь), используя внутрикожную (в/к) инъекцию в дорсальную сторону хвоста (около 1 см от основания) [18]. В качестве отрицательного контроля мышам вводили физиологический раствор.

На 7, 14 и 21 день после иммунизации (дпи) анализировали гуморальный и клеточный иммун-

ные ответы у мышей. В каждой временной точке (указаны выше) в анализ брали по шесть мышей в группе. Кровь у мышей прижизненно забирали из ретроорбитального венозного синуса с помощью иглы 23G × 1.25 in. Из индивидуальных образцов крови животных получали сыворотку путем осаждения форменных элементов с помощью центрифугирования с относительной центробежной силой 1000 *g* в течение 10 мин. Полученные сыворотки выдерживали при температуре 56°C в течение 30 мин и хранили при температуре –20°C.

После взятия крови на 7, 14 и 21 дпи мышей умерщвляли методом цервикальной дислокации и стерильно извлекали селезенки индивидуально у каждой из шести мышей изучаемых групп в анализируемой временной точке.

На 28, 42 и 56 дпи у одних и тех же мышей (по 10 животных в группе) прижизненно забирали кровь из ретроорбитального венозного синуса и получали индивидуальные сыворотки как описано выше.

Выделение спленоцитов

Спленоциты выделяли путем протирания индивидуальной селезенки через клеточные фильтры 70 и 40 мкм (BD Falcon™, США) с использованием поршня шприца. После удаления эритроцитов с помощью буфера для лизиса эритроцитов (Sigma, США), спленоциты промывали и ресуспендировали в питательной среде RPMI-1640 с добавлением 2 мМ *L*-глутамин и гентамицин (50 мкг/мл). Жизнеспособность и концентрацию клеток определяли в тесте с красителем трипановым синим (Bio-Rad, США) на автоматическом счетчике клеток TC20 (Bio-Rad).

Определение количества клеток, продуцирующих IFN- γ

Интенсивность Т-клеточного иммунного ответа у иммунизированных мышей определяли по числу спленоцитов, продуцирующих IFN- γ , с помощью метода IFN- γ ELISpot. Анализ проводили с использованием наборов Murine IFN γ ELISPOT Kit (with precoated plates) (Abcam, США) согласно инструкции производителя. Спленоциты пассивировали (10^5 клеток/лунка) в среде Лимфоген («ПанЭко», Россия). Для стимуляции клеток использовали смесь VACV-специфичных иммунодоминантных для мышей BALB/c пептидов SPYAAGYDL, SPGAAGYDL, VGPSNSPTF, KYGRLFNEI, GFIRSLQTI, KYMWCYSQV, SFIRSLQNI (по 20 мкг/мл каждого) [19, 20]. В качестве митогена использовали конканавалин А, в качестве отрицательного контроля – среду Лимфоген. Подсчет

количества IFN- γ -продуцирующих клеток осуществляли с помощью ELISpot-ридера фирмы Carl Zeiss (Германия).

Иммуноферментный анализ сывороток крови мышей

Иммуноферментный анализ (ИФА) индивидуальных сывороток крови мышей выполняли согласно [18]. В качестве антигена использовали очищенный центрифугированием через сахарозную подушку препарат вирионов штамма L VACV. Все исследуемые образцы сыворотки крови мышей титровали серией двукратных последовательных разведений – от 1:100 до 1:12800. Повтор титрования ИФА проводили на следующий день. Для определения титров IgG использовали растворы с пероксидазными конъюгатами анти-IgG мыши (Sigma, США). Титры IgG для каждого исследуемого образца сыворотки крови определяли для каждого повтора по отдельности, а затем усредняли. Вычисляли средние геометрические значения логарифмов обратного титра VACV-специфических IgG по экспериментальным группам и рассчитывали доверительные интервалы для уровня 95% вероятности совпадения каждой выборки с генеральной совокупностью.

Оценка уровня протективности у иммунизированных мышей

На 62-й дни группы иммунизированных штаммами L, LAD или LADA и контрольных животных заражали интраназально (и/н) CPXV GRI-90 в дозе 460 ЛД₅₀ (2.0×10^6 БОЕ/50 мкл/мышь) (10 животных в каждой группе). За животными наблюдали в течение 14 дней, регистрировали клинические проявления инфекции и гибель.

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

Мышей взвешивали по отдельности каждые 2 дня. Рассчитывали средние арифметические значения массы тела для каждой группы мышей на временную точку и выражали в процентах от начального веса.

Получали данные для групп животных, иммунизированных изучаемыми вариантами VACV, а также для групп неиммунизированных мышей, которых не инфицировали (Отрицательный контроль, О.К.) или заражали CPXV GRI-90 (Положительный контроль, П.К.).

Оценка патогенности штаммов VACV

В исследованиях по изучению патогенности штаммов L и LADA VACV при и/н заражении использовали 3-недельных мышей линии BALB/c массой 10–12 г (по 10 животных в группе). Мышам после ингаляционного наркоза диэтиловым эфиром вводили в полость носа вирусосодержащую жидкость (50 мкл, доза 10^7 БОЕ/мышь) либо физиологический раствор (контрольная группа). За животными наблюдали в течение 14 дней и регистрировали их гибель.

Статистический анализ данных

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

РЕЗУЛЬТАТЫ

Клеточный иммунный ответ на вакцинацию мышей вариантами VACV

Взрослых мышей линии BALB/c в возрасте 6–7 недель вакцинировали методом в/к инъекции, используя штаммы L, LAD или LADA VACV в дозе 10^5 БОЕ/животное. Через 7, 14 и 21 дни мышей (по шесть животных каждой группы после прижизненного забора крови) умерщвляли и извлекали селезенки, выделяли спленоциты и у каждого животного определяли методом ELISpot количество клеток, продуцирующих IFN- γ , в ответ на стимуляцию пулом VACV-специфических пептидов. Результаты выполненных анализов, приведенные на рис. 1, показывают, что три изученных варианта VACV различаются по динамике и уровню развития клеточного иммунного ответа на в/к иммунизацию ими лабораторных мышей.

Гуморальный иммунный ответ на вакцинацию мышей вариантами VACV

У мышей линии BALB/c в возрасте 6–7 недель, в/к иммунизированных штаммами L, LAD или LADA VACV в дозе 10^5 БОЕ, через 7, 14, 21, 28, 42 и 56 дни проводили прижизненный забор индивидуальных проб крови из ретроорбитального венозного синуса и получали сыворотки. На 7, 14 и 21 дни образцы крови брали у 6 животных каждой группы в каждой временной точке; у этих животных извлекали селезенки для тестирования IFN- γ -продуцирующих клеток (см. выше). На 28, 42 и 56 дни прижизненно брали образцы крови у одних и тех же животных (по 10 мышей в группе). Методом ИФА определяли титры VACV-

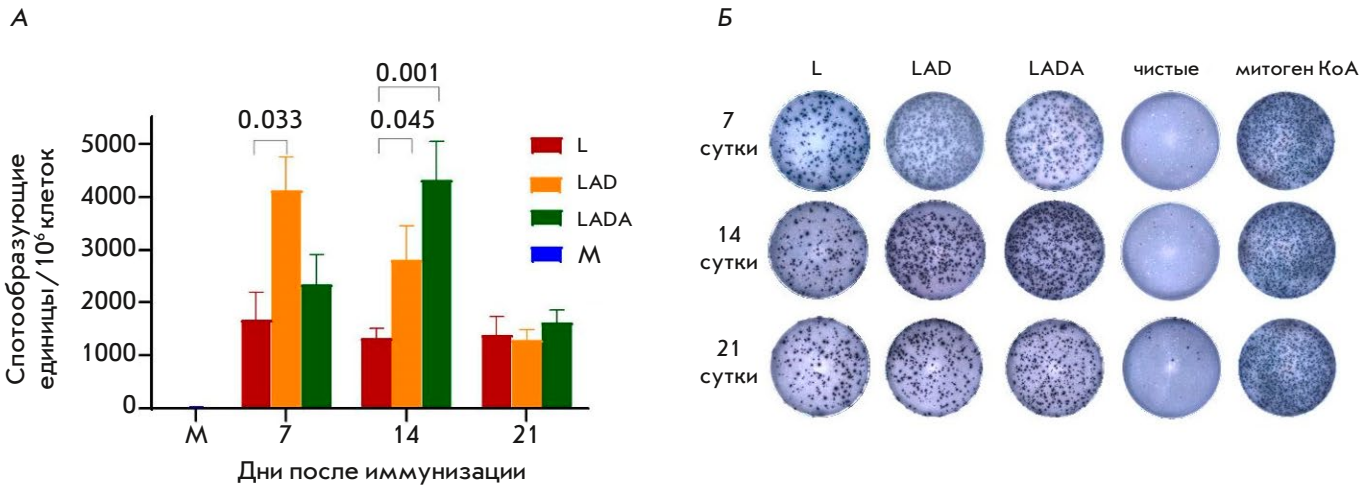


Рис. 1. Результаты анализа VACV-специфического клеточного ответа у мышей линии BALB/c, иммунизированных вирусами L, LAD или LADA, с использованием метода ELISpot. М – мыши контрольные (не иммунизированные). А – количество спленоцитов, экспрессирующих IFN-γ в ответ на стимуляцию пулом VACV-специфических пептидов, на миллион спленоцитов. Данные приведены в виде медиан с диапазоном. Графический и статистический анализ осуществлен с использованием программы GraphPad Prism 9.0; над скобками указаны значения *P*. Б – репрезентативные изображения лунок ELISpot

специфических IgG в каждой индивидуальной сыворотке крови.

Результаты выполненных анализов, представленные на рис. 2, позволяют заключить, что рекомбинантные штаммы LAD и LADA, начиная с 14 дни, индуцируют продукцию существенно большего количества VACV-специфических IgG по сравнению с родительским штаммом L. При этом наибольшим уровень антител был у штамма LADA в интервале 28–56 дни.

Уровни защиты иммунизированных мышей от летальной ортопоксвирусной инфекции

Для оценки того, как изучаемые штаммы L, LAD и LADA влияют на формирование протективного иммунитета против летальной инфекции мышей гетерологичным ортопоксвирусом, на 62 дни группы иммунизированных и контрольных (не иммунизированных) животных и/н заражали CPXV GRI-90 в дозе 460 ЛД₅₀. Во всех экспериментальных группах наблюдали клинические проявления вирусной инфекции (рис. 3), сопровождающиеся изменениями массы тела животных (рис. 4). При этом наименьшим патогенное воздействие CPXV на мышей было в группе животных, вакцинированных штаммом LADA (рис. 3 и 4). Все животные этой группы выжили, в то время как в группах мышей, вакцинированных штаммами LAD или L, выжило 70 и 60% животных соответственно (рис. 5).

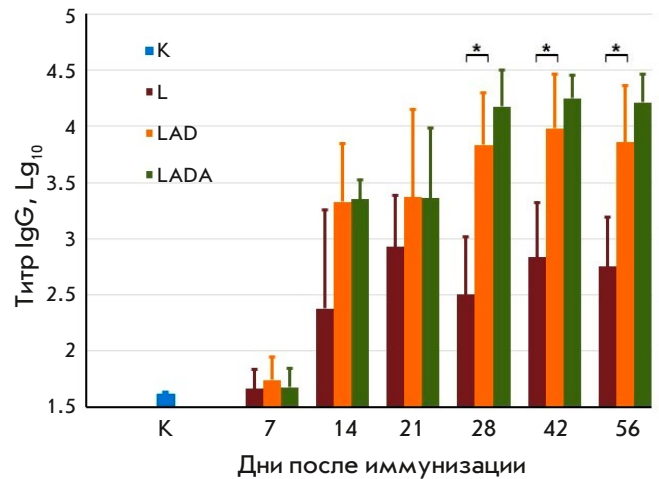


Рис. 2. Титры VACV-специфических IgG в сыворотках крови мышей, иммунизированных вирусами L, LAD или LADA. К – сыворотки крови мышей, которым вводили физиологический раствор. Данные приведены в виде медиан с диапазоном. Графический и статистический анализ осуществлен с использованием программы GraphPad Prism 9.0.

*Статистически значимые различия с *P* < 0.05

Патогенные свойства штаммов L и LADA при интраназальном заражении мышей

При изучении патогенности штаммов L и LADA в данной работе использовали 3-недельных мышей линии BALB/c (по 10 животных в группе).

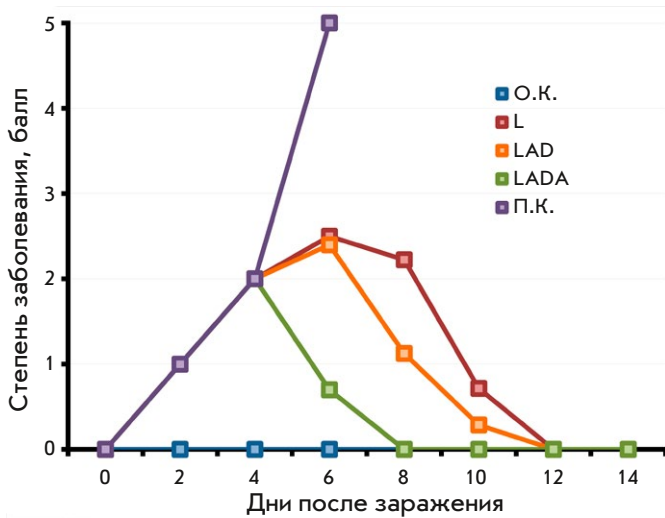


Рис. 3. Динамика клинических проявлений инфекции у мышей, вакцинированных вирусами L, LAD или LADA в дозе 10^5 БОЕ, после интраназального заражения CPXV GRI-90 в дозе 460 ЛД₅₀ на 62 день после иммунизации. Приведены данные для групп из 10 животных, иммунизированных соответствующими вирусами, а также не иммунизированных групп и не инфицированных (О.К.) или зараженных CPXV (П.К.)

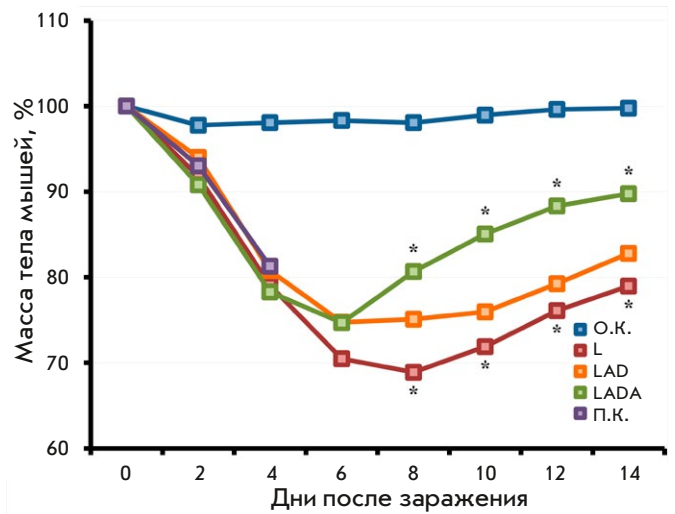


Рис. 4. Динамика изменения массы тела у мышей, вакцинированных вирусами L, LAD или LADA в дозе 10^5 БОЕ, после их интраназального заражения CPXV GRI-90 в дозе 460 ЛД₅₀ на 62 день после иммунизации. Приведены данные для групп из 10 животных, иммунизированных соответствующими вирусами, а также не иммунизированных групп и не инфицированных (О.К.) или зараженных CPXV (П.К.). *Статистически значимые ($P < 0.05$) различия средних значений между группами LADA и L

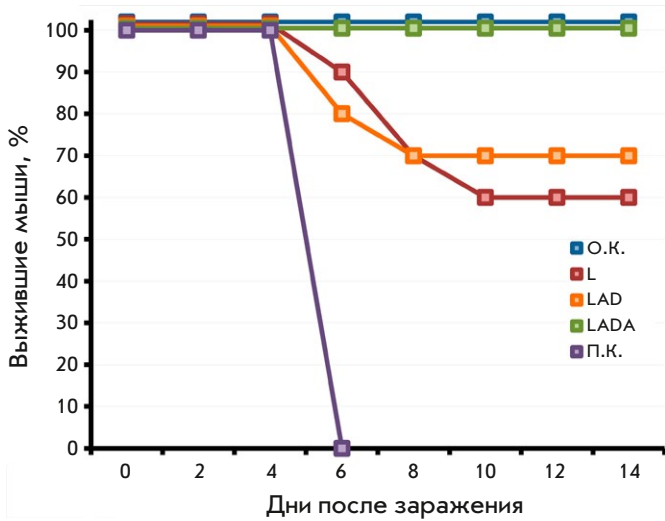


Рис. 5. Динамика гибели мышей, вакцинированных вирусами L, LAD или LADA в дозе 10^5 БОЕ, после их интраназального заражения CPXV GRI-90 в дозе 460 ЛД₅₀ на 62 день после иммунизации. Приведены данные для групп из 10 животных, иммунизированных соответствующими вирусами, а также не иммунизированных групп и не инфицированных (О.К.) или зараженных CPXV (П.К.)

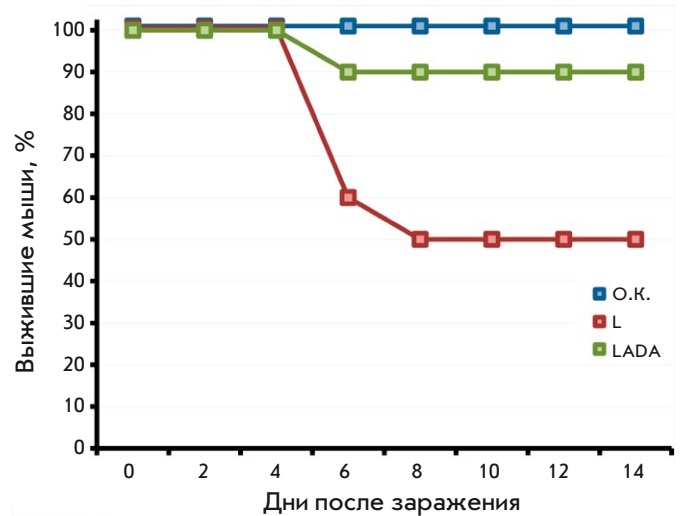


Рис. 6. Динамика гибели мышей интраназально зараженных вирусами L или LADA в дозе 10^7 БОЕ. О.К. – мыши, которым интраназально вводили физиологический раствор. Приведены данные для групп из 10 животных

Осуществляли и/н заражение мышей вирусами в дозе 10^7 БОЕ/животное. За животными наблюдали в течение 14 дней и регистрировали их гибель. В группе мышей, зараженных VACV штамма L, погибло 50% животных, а в группе инфицированных штаммом LADA – только 10% (рис. 6), что указывает на значительную аттенуацию штамма LADA по сравнению с родительским штаммом L.

ОБСУЖДЕНИЕ

Ортопоксвирусы в процессе коэволюции с чувствительными к ним животными выработали различные молекулярные механизмы подавления разных этапов развития врожденного и адаптивного иммунных ответов на инфекцию [10]. Гены, контролирующие иммунный ответ, обычно не являются жизненно важными и не влияют на эффективность размножения вируса в культурах клеток. Поэтому их направленная инактивация или модификация может быть продуктивным направлением получения аттенуированных и высокоиммуногенных вариантов VACV [10, 14, 21–25].

Ранее нами было изучено развитие гуморального и Т-клеточного иммунных ответов, возникающих после иммунизации мышей вариантами VACV с мутантным геном *A34R*, обуславливающим увеличенную продукцию внеклеточных вирионов, или с делетированным геном *A35R*, белковый продукт которого ингибирует представление антигенов главным комплексом гистосовместимости класса II, иммунное примирование Т-лимфоцитов и последующий синтез хемокинов и цитокинов. Одновременная модификация гена *A34R* и делеция гена *A35R* способствовала у штамма LAD VACV синергическому эффекту в отношении повышения иммуногенных свойств вируса по сравнению с родительским штаммом L [15].

Нами также было изучено влияние продукции невирионного мажорного иммуногенного белка, кодируемого геном *ati*, на проявление патогенности и иммуногенности VACV [17]. Направленная делеция гена *ati* обуславливала у полученного варианта вируса LIVPΔ*ati* после в/к иммунизации им мышей увеличение продукции VACV-специфичных IgG по сравнению с вакцинацией родительским штаммом L и большую защиту от повторной ортопоксвирусной инфекции.

В данной работе нами получен вариант LADA, у которого в ген *A34R* введены мутации, приводящие к увеличенной продукции внеклеточных вирионов, делетирован ген *A35R*, ингибирующий антительный ответ на вирусную инфекцию, а также удален ген *ati*, направляющий продукцию ма-

жорного невирионного иммуногена, антитела против которого не обладают вируснейтрализующей активностью. Изучение свойств штамма LADA на мышиной и/н модели показало, что полученный вариант VACV аттенуирован по сравнению с исходным штаммом L (рис. 6).

Штаммы LAD и LADA при в/к иммунизации мышей в дозе 10^5 БОЕ индуцируют более выраженный клеточный иммунный ответ по сравнению со штаммом L (рис. 1). При этом максимальный уровень вирусспецифических IFN- γ -продуцирующих клеток для варианта LAD выявлен на 7 дни, а LADA – на 14 дни. Наблюдаемый для LADA сдвиг в динамике количества IFN- γ -продуцирующих клеток, по-видимому, обусловлен отсутствием синтеза мажорного невирионного иммуногена.

Активную продукцию VACV-специфичных IgG вызывали все изучаемые штаммы, начиная с 14 дни (рис. 2). При этом рекомбинантные варианты LAD и LADA индуцировали значительно больший уровень специфичных антител по сравнению с родительским штаммом L, особенно в период 28–56 дни. Следует отметить, что штамм LADA обуславливал наибольший уровень VACV-специфичных антител в период 28–56 дни.

Для оценки протективного иммунитета, индуцированного вакцинацией вариантами VACV, на 62 дни мышей и/н заражали гетерологичным CPXV в высоко летальной дозе (460 ЛД₅₀). Вирус LADA при этом обеспечивал полную защиту (рис. 5), хотя у животных этой группы на 2–6 сутки отмечались незначительные клинические проявления инфекции (рис. 3) и достоверно меньшее временное снижение массы тела по сравнению с другими экспериментальными группами мышей (рис. 4). Родительский штамм L в этих же условиях обеспечивал защиту лишь 60%, а штамм LAD – 70% животных.

Таким образом, созданный вариант LADA является аттенуированным и более иммуногенным по сравнению со штаммом L, на основе которого получают противооспенную вакцину первого поколения, разрешенную для клинического применения в России.

Учитывая полученные результаты, гены *A35R* и *ati* можно рассматривать в качестве мишеней для встройки целевых генов в ДНК штамма LIVP-*A34R** при создании безопасных эффективных живых поливалентных вакцин на основе VACV. ●

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

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Fenner F., Henderson D.A., Arita I., Jezek Z., Ladnyi I.D. Smallpox and Its Eradication. Geneva: World Health Organization, 1988. 1460 p.
2. Shchelkunova G.A., Shchelkunov S.N. // *Viruses*. 2023. V. 15. P. 103.
3. Moss B. // *Immunol. Rev.* 2011. V. 239. P. 8–26.
4. Sanchez-Sampedro L., Perdiguero B., Mejias-Perez E., Garcia-Arriaza J., Di Pilato M., Esteban M. // *Viruses*. 2015. V. 7. P. 1726–1803.
5. Esparza J., Schrick L., Damaso C.R., Nitsche A. // *Vaccine*. 2017. V. 35. P. 7222–7230.
6. Shchelkunov S.N. // *PLoS Pathog.* 2013. V. 9. e1003756.
7. Harapan H., Ophinni Y., Megawati D., Frediansyah A., Mameda S.S., Salampe M., Bin Emran T., Winardi W., Fathima R., Sirinam S., et al. // *Viruses*. 2022. V. 14. P. 2155.
8. Shchelkunov S.N. // *Vaccine*. 2011. V. 29. P. D49–D53.
9. Volz A., Sutter G. // *Adv. Virus Res.* 2017. V. 97. P. 187–243.
10. Shchelkunov S.N., Shchelkunova G.A. // *Acta Naturae*. 2020. V. 12. P. 33–41.
11. Yakubitskiy S.N., Kolosova I.V., Maksyutov R.A., Shchelkunov S.N. // *Acta Naturae*. 2015. V. 7. P. 113–121.
12. Yakubitskiy S.N., Kolosova I.V., Maksyutov R.A., Shchelkunov S.N. // *Dokl. Biochem. Biophys.* 2016. V. 466. P. 35–38.
13. Щелкунов С.Н., Якубицкий С.Н., Нестеров А.Е., Колосова И.В., Сергеев А.А., Зайковская А.В., Кабанов А.С., Нечаева Е.А., Богрянцева М.П., Усова С.В. и др. // *Эпидемиология и вакцинопрофилактика*. 2022. Т. 21. № 6. С. 34–47.
14. Albarnaz J.D., Torres A.A., Smith G.L. // *Viruses*. 2018. V. 10. P. 101.
15. Shchelkunov S.N., Yakubitskiy S.N., Sergeev A.A., Starostina E.V., Titova K.A., Pyankov S.A., Shchelkunova G.A., Borgoyakova M.B., Zadorozhny A.M., Orlova L.A., et al. // *Viruses*. 2022. V. 14. P. 1453.
16. Shchelkunov S.N., Safronov P.F., Totmenin A.V., Petrov N.A., Ryazankina O.I., Gutorov V.V., Kotwal G.J. // *Virology*. 1998. V. 243. P. 432–460.
17. Yakubitskiy S.N., Sergeev A.A., Titova K.A., Shulgina I.S., Starostina E.V., Borgoyakova M.B., Karpenko L.I., Shchelkunov S.N. // *Acta Naturae*. 2023. V. 15. P. 52–57.
18. Shchelkunov S.N., Yakubitskiy S.N., Sergeev A.A., Kabanov A.S., Bauer T.V., Bulichev L.E., Pyankov S.A. // *Viruses*. 2020. V. 12. P. 795.
19. Oseroff C., Peters B., Pasquetto V., Moutaftsi M., Sidney J., Panchanathan V., Tschärke D.C., Maillere B., Grey H., Sette A. // *J. Immunol.* 2008. V. 180. P. 7193–7202.
20. Russell T.A., Tschärke D.C. // *Immunol. Cell Biol.* 2014. V. 92. P. 466–469.
21. Rehm K.E., Connor R.F., Jones G.J.B., Yimbu K., Roper R.L. // *Virology*. 2010. V. 397. P. 176–186.
22. Garber D., O'Mara L., Gangadhara S., McQuoid M., Zhang X., Zheng R., Gill K., Verma M., Yu T., Johnson B., et al. // *J. Virol.* 2012. V. 86. P. 12605–12615.
23. Benfield C.T.O., Ren H., Lucas S.J., Bahsoun B., Smith G.L. // *J. Gen. Virol.* 2013. V. 94. P. 1647–1657.
24. Summer R.P., Ren H., Smith G.L. // *J. Gen. Virol.* 2013. V. 94. P. 1121–1126.
25. Strnadova P., Ren H., Valentine R., Mazzon M., Sweeney T.R., Brierley I., Smith G.L. // *PLoS Pathog.* 2015. V. 11. e1005151.

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 «×». Знак «×» ставится только в том случае, если справа от него стоит число. Символом «·» 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.