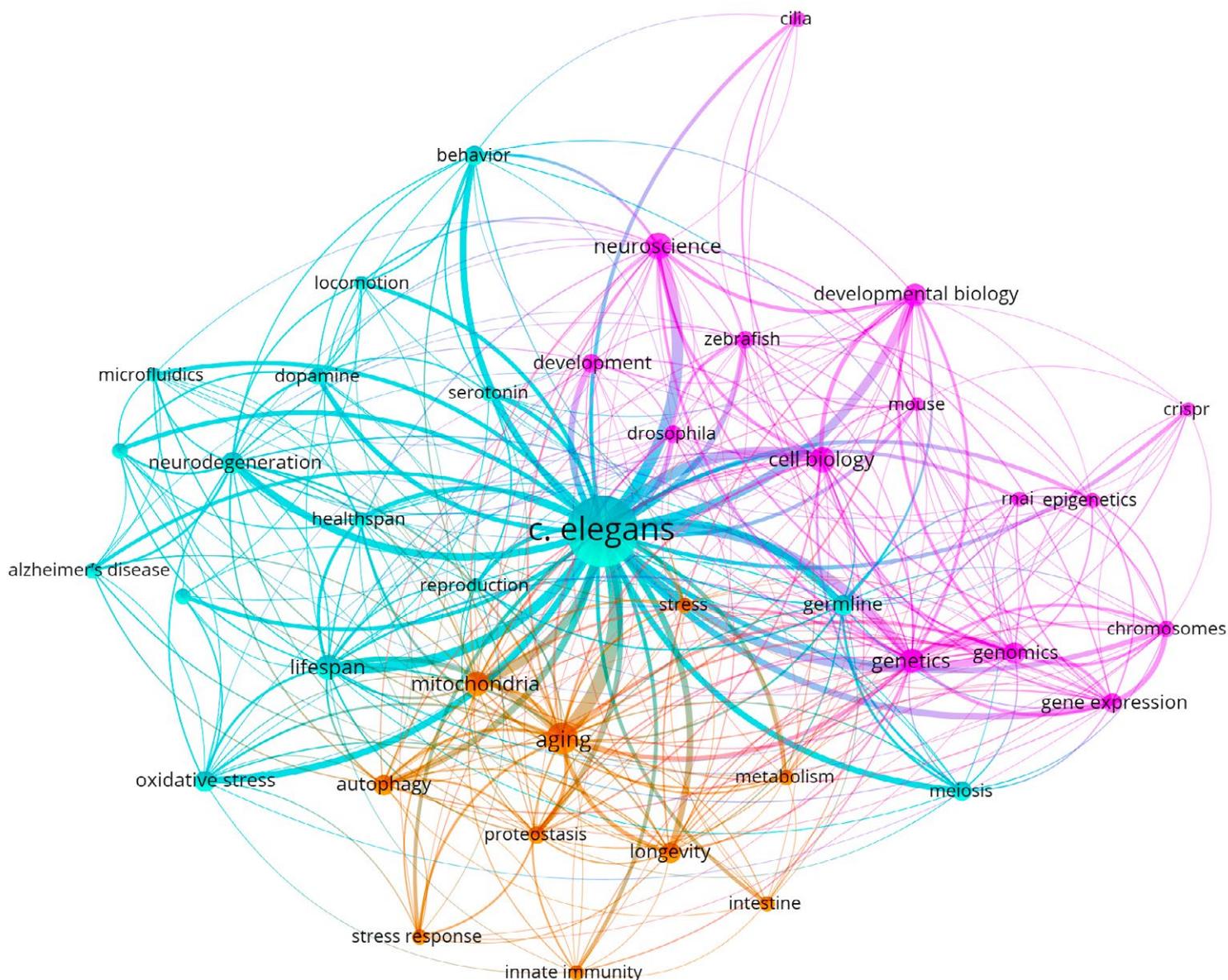


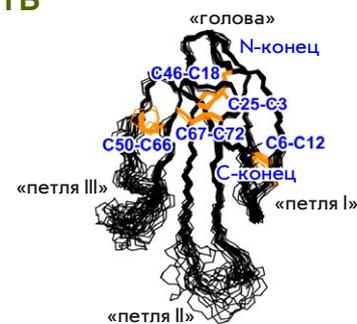
Acta Naturae

Платформы для поиска новых антимикробных препаратов с использованием *in vivo* моделей *Caenorhabditis elegans*

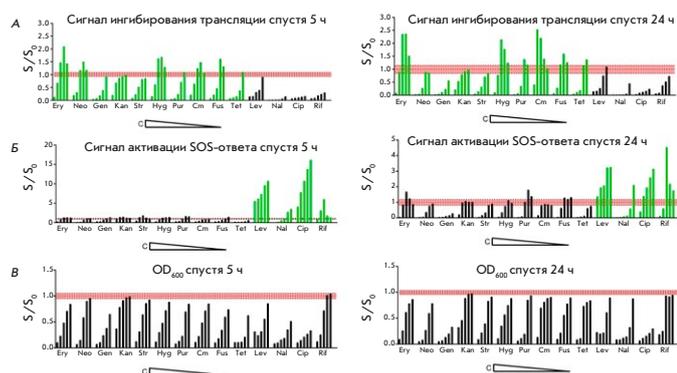


Пептид, имитирующий петлю II эпителиального белка человека SLURP-2, повышает жизнеспособность и стимулирует миграцию кератиноцитов кожи

О. В. Шлепова, Т. Я. Горностаева, И. Д. Кукушкин, В. Н. Азев, М. Л. Бычков, З. О. Шенкарев, М. П. Кирпичников, Е. Н. Люкманова
Секретируемый белок человека SLURP-2 является регулятором гомеостаза эпителия, повышает жизнеспособность и стимулирует миграцию кератиноцитов. Данная работа посвящена поиску функциональных участков молекулы SLURP-2, отвечающих за повышение жизнеспособности и стимуляцию миграции кератиноцитов. Получены синтетические пептиды, соответствующие петлевым участкам белка SLURP-2, изучено их влияние на жизнеспособность кератиноцитов кожи HaCaT с помощью теста WST-8 и их миграцию с помощью scratch-теста.



Пространственная структура белка SLURP-2



Валидация репортерной системы с помощью набора известных антибиотиков

Антибактериальная активность дрожжей из уникальных биоценозов

О. В. Шульгина, Е. А. Суханова, Б. Ф. Яровой, Е. А. Толстыко, А. Л. Коневега, Е. В. Полесскова
Представлены результаты изучения уникальной коллекции, содержащей более 3000 образцов дрожжей, обнаруженных на полуострове Камчатка, Курильских островах и острове Сахалин. Показано, что Сахалинские штаммы преимущественно стимулируют рост бактерий, в то время как большинство штаммов с полуострова Камчатка демонстрируют ингибирующие свойства.

Бактериоцин микробиоты ротовой полости енотовидной собаки подавляет рост метициллинрезистентного патогена *Staphylococcus aureus*

М. Н. Баранова, Е. А. Соболева, М. А. Корниенко, М. В. Малахова, Ю. А. Мокрушина, А. Г. Габиров, С. С. Терехов, И. В. Смирнов

Микробиом диких животных можно рассматривать как естественный резервуар биоразнообразия для поиска новых антибиотиков. В данной работе с использованием микрофлюидной технологии ультравысокопроизводительного скрининга из микробиома ротовой полости енотовидной собаки (*Nyctereutes procyonoides*) выделен штамм бактерии *Staphylococcus pseudintermedius* E18, с высокой эффективностью подавляющий рост метициллинрезистентного патогена *S. aureus* (MRSA). Показано, что основным действующим веществом штамма *S. pseudintermedius* E18 является бактериоцин.

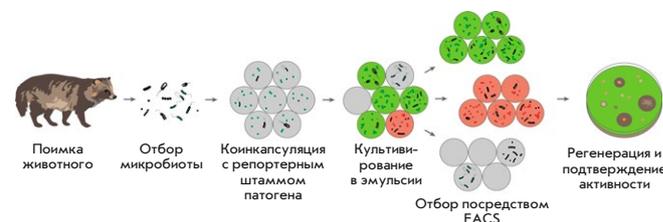


Схема ультравысокопроизводительного скрининга для отбора микроорганизмов, ингибирующих рост бактерии-мишени

Acta Naturae

ТОМ 16, № 4 (63), ОКТЯБРЬ—ДЕКАБРЬ 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

Корректура: 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 декабря 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

К. А. Ворона, В. Д. Мороз, Н. Б. Гасанов,
А. В. Карабельский

Рекомбинантные VSV как перспективный
инструмент виротерапии 4

А. И. Калганова, И. Е. Елисеев, И. В. Смирнов,
С. С. Терехов

Платформы для поиска новых антимикробных
препаратов с использованием *in vivo* моделей
Caenorhabditis elegans 15

Е. В. Предтеченская, А. Д. Рогачев,
П. М. Мельникова

Особенности метаболомного профиля
при болезни Паркинсона и сосудистом
паркинсонизме 27

О. С. Соколова, Т. С. Трифонова,
Н. И. Деркачева, А. В. Моисеенко
**Визуализация нуклеиновых кислот
в микро- и нанометровых биологических
объектах с помощью аналитической
электронной микроскопии** 38

Е. И. Шарова, С. С. Медведев
**Химически активные побочные продукты
редокс-метаболизма растений
и функции белков.** 48

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ СТАТЬИ

М. Н. Гордеев, А. С. Зиновьева, Е. Е. Петренко,
Е. В. Ломерт, Н. Д. Аксёнов, А. Н. Томилин,
Е. И. Бахмет
**Дифференцировка эмбриональных
стволовых клеток в направлении
дефинитивной энтодермы как модель
возникновения гетерогенности во время
спецификации зародышевых листков** 62

А. В. Ставровская, Д. Н. Воронков,
А. К. Павлова, А. С. Ольшанский,
Б. В. Белугин, М. В. Иванова,
М. Н. Захарова, С. Н. Иллариошкин
**Интравентрикулярное введение экзосом
от пациентов с боковым амиотрофическим
склерозом вызывает болезнь двигательного
нейрона у мышей** 73

А. А. Фаткулин, Т. А. Чуксина, Н. П. Сорокина,
И. Т. Смыков, Е. В. Кураева, Е. С. Масежная,
К. А. Смагина, М. Ю. Шкурников
**Сравнительный анализ мишеней спейсеров
CRISPR-Cas заквасочных культур** 81

О. В. Шлепова, Т. Я. Горностаева,
И. Д. Кукушкин, В. Н. Азев, М. Л. Бычков,
З. О. Шенкарев, М. П. Кирпичников,
Е. Н. Люкманова
**Пептид, имитирующий петлю II эпителиального
белка человека SLURP-2, повышает
жизнеспособность и стимулирует миграцию
кератиноцитов кожи** 86

О. В. Шуленина, Е. А. Суханова,
Б. Ф. Яровой, Е. А. Толстыко,
А. Л. Коневега, Е. В. Полесскова
**Антибактериальная активность дрожжей
из уникальных биоценозов** 95

КРАТКИЕ СООБЩЕНИЯ

М. Н. Баранова, Е. А. Соболева,
М. А. Корниенко, М. В. Малахова,
Ю. А. Мокрушина, А. Г. Габиров,
С. С. Терехов, И. В. Смирнов
**Бактериоцин микробиоты ротовой
полости енотовидной собаки подавляет
рост метициллинрезистентного
патогена *Staphylococcus aureus*** 105

Правила для авторов 109

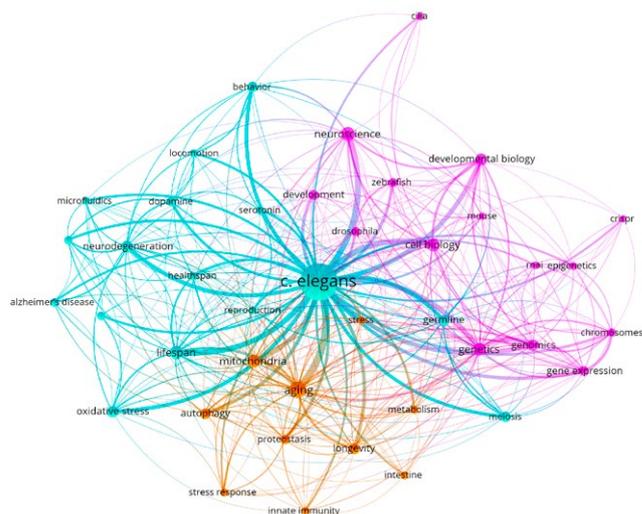


РИСУНОК НА ОБЛОЖКЕ
(см. статью Калгановой и др.)

УДК 577.21

Рекомбинантные VSV как перспективный инструмент виротерапии

К. А. Ворона, В. Д. Мороз*, Н. Б. Гасанов, А. В. Карабельский

Научно-технологический университет «Сириус», Краснодарский край, федеральная территория «Сириус», 354340 Россия

*E-mail: moroz.vd@talantiuspeh.ru

Поступила в редакцию 23.08.2024

Принята к печати 18.10.2024

DOI: 10.32607/actanaturae.27501

РЕФЕРАТ Онкологические заболевания являются одной из основных причин смертности в мире. Классические методы, применяемые при онкологических заболеваниях, включают хирургию, лучевую терапию и химиотерапию, а также комбинации этих методов. Несмотря на значительные достижения в этой области, актуальным остается поиск инновационных методов лечения злокачественных опухолей, в том числе с использованием онколитических вирусов. Одним из таких вирусов является вирус везикулярного стоматита (VSV), который обладает рядом полезных свойств в качестве онколитика. Однако лекарственные препараты на основе VSV находятся только на стадии разработки и не одобрены для клинического применения. В данной работе обсуждаются механизмы онкогенеза, противовирусный ответ опухолевых и нормальных клеток, а также маркеры устойчивости опухолевых клеток к виротерапии VSV. Кроме того, в обзоре рассмотрены способы получения и армирования рекомбинантных VSV, приведены примеры клинических исследований. Представленные данные позволят лучше оценить перспективы использования VSV в роли онколитика.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА онколитические вирусы, вирус везикулярного стоматита, иммунотерапия опухолей, интерферон-стимулируемый ген, биомаркеры устойчивости.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ VSV – вирус везикулярного стоматита; rVSV – рекомбинантный вирус везикулярного стоматита; ISG – интерферон-индуцируемый ген; IFN – интерферон; PAMP – патогенассоциированные молекулярные паттерны; MHC – главный комплекс гистосовместимости; IFNAR – рецептор IFN I; PKR – протеинкиназа R.

ВВЕДЕНИЕ

Онкологические заболевания являются одной из главных причин смертности в развитых странах. В последние годы внедрение в клиническую практику методов иммунотерапии позволило повысить эффективность лечения многих видов рака. Однако, к сожалению, положительный результат наблюдается только при определенных видах злокачественных опухолей, которые составляют примерно треть от всех случаев заболевших. Кроме того, ответ на терапию развивается не у всех пациентов [1, 2].

Предполагается, что обойти препятствия для лечения злокачественных опухолей можно с помощью онколитических вирусов (онколитики). Эти вирусы способны специфически размножаться в опухолевых клетках, оставаясь безопасными для организма [3]. Возможность размножения вирусов в раковых клетках обусловлена нарушением противовирусного ответа, связанного с дисфункцией продукции ин-

терферона (IFN). Интерфероны препятствуют размножению вирусов, образованию вирусных частиц и их распространению, активируя сигнальные пути, замедляющие обмен веществ в инфицированных и соседних клетках. Онколитические вирусы проявляют высокую специфичность к раковым клеткам, в которых ограничен ответ на IFN, они вызывают воспалительную реакцию в опухоли и настраивают иммунную систему организма на очаг воспаления, тогда как в здоровых клетках вирусы уничтожаются благодаря IFN-опосредованным реакциям.

Одним из перспективных онколитиков является вирус везикулярного стоматита (VSV, англ. Vesicular stomatitis virus) – РНК(-)-вирус из семейства *Rhabdoviridae* [4]. VSV обладает рядом преимуществ: он не интегрируется в геном хозяина, имеет широкий тропизм, его геном можно относительно легко модифицировать, кроме того, очень небольшой процент людей серопозитивен к VSV [5].

Препараты на основе рекомбинантного VSV (rVSV) исследуют *in vitro* и *in vivo* [6–10], проводятся клинические испытания эффективности этих препаратов при колоректальном раке, меланоме, раке легкого, раке молочной железы, злокачественных лимфомах и др. видах опухолей (NCT02923466, NCT04046445, NCT04291105, NCT03017820, NCT03865212, NCT04291105, NCT03120624, NCT03456908, NCT05846516, NCT05644509, NCT01042379).

Изучение механизмов онколиза, маркеров и сигнальных путей, обуславливающих устойчивость раковых и здоровых клеток к вирусу, может объяснить вариативность ответа различных опухолей на виротерапию и позволит найти способы оптимизации рекомбинантных терапевтических VSV [11].

ПРОБЛЕМА ОНКОЛОГИЧЕСКИХ ЗАБОЛЕВАНИЙ И ОНКОГЕНЕЗ

Примерно у каждого пятого человека в течение жизни развиваются опухолевые заболевания, а смертность от рака зарегистрирована почти у каждого девятого мужчины и каждой двенадцатой женщины. В число наиболее распространенных онкологических заболеваний (более 60% от общего числа случаев онкопатологии) входят рак легкого, молочной железы, колоректальный рак, рак предстательной железы, желудка, печени, щитовидной железы, рак шейки матки, мочевого пузыря и неходжкинская лимфома [12, 13].

Основные характеристики злокачественных опухолей были описаны D. Hanahan. В их число входят восемь ключевых признаков: способность уходить от действия онкосупрессоров, сопротивление клеточной гибели, способность поддерживать передачу пролиферативных сигналов, способность к индукции ангиогенеза, инвазия и метастазирование, репликативное бессмертие, а также уклонение от иммунного ответа и изменение клеточного метаболизма. Возникновение опухолевых клеток связано с геномной нестабильностью и накоплением мутаций, приводящих к изменению морфологии и функции клеток, а также с эпигенетическим перепрограммированием клеток и хроническим воспалением [14].

На молекулярном уровне причиной канцерогенеза являются мутации в онкогенах и опухолевых генах-супрессорах. Мутации в протоонкогенах могут приводить к превращению их в онкогены, что, в свою очередь, вызывает синтез онкобелков, которые способствуют усиленной пролиферации клеток и уходу от апоптоза [15, 16]. С другой стороны, гены-супрессоры кодируют функциональные белки, которые ингибируют онкотрансформацию клеток, включая факторы, контролирующие деление и гибель кле-

ток, репарацию ДНК. Мутации в генах-супрессорах опухолей приводят к инактивации их продуктов и, следовательно, к развитию опухоли [15–17]. Помимо этого, растет количество данных, указывающих и на другие возможные причины развития онкологических заболеваний. Так, развитию основных характеристик опухоли могут способствовать эпигенетические изменения. Изменение эпигенетического профиля ДНК клеток опухоли связывают с гипоксией, вызванной недостаточной васкуляризацией тканей и клеток, в связи с чем снижается активность ТЕТ-деметилаз, что приводит к существенным изменениям в метиломе, в частности к гиперметилированию ДНК [14, 18]. Еще одной причиной индукции опухолевого роста могут быть хронические воспалительные процессы [19]. Вызывать хроническое воспаление и увеличивать риск развития рака или его прогрессирование могут *Helicobacter pylori* при раке желудка и лимфоме слизистой оболочки, вирусы папилломы и гепатита при раке шейки матки и печени соответственно; аутоиммунные заболевания, например, воспалительные заболевания кишечника при раке толстой кишки и воспалительные состояния неопределенного происхождения, например простатит, при раке предстательной железы [20].

ВИРОТЕРАПИЯ ОНКОЛОГИЧЕСКИХ ЗАБОЛЕВАНИЙ

Основными методами, применяемыми при онкологических заболеваниях, все еще остаются хирургические методы, лучевая терапия и химиотерапия, а также их комбинации. Однако низкая эффективность лечения на поздних стадиях развития заболевания, а также высокая вероятность рецидивов делают необходимым поиск инновационных методов. Так, в иммунотерапии опухолей используют цитокины, активирующие работу иммунных клеток [21, 22], адаптивную Т-клеточную терапию (CAR-T) [23–25], иммунотерапию антителами (ингибиторы иммунных контрольных точек или конъюгаты антител с противоопухолевыми лекарственными средствами) [26, 27], противоопухолевые вакцины и др. [28–30]. В последние годы в клиническую практику внедряются методы иммунотерапии, которые позволяют увеличить эффективность лечения некоторых видов рака, однако ответ на терапию наблюдается далеко не у всех пациентов [1].

К основным причинам отсутствия эффективности иммунотерапии можно отнести недостаточную иммуногенность опухолевых клеток, сложность доставки иммунокомпетентных клеток и иммунотерапевтических агентов к их мишеням [2]. Обойти подобного рода препятствия можно с использованием онколитических вирусов, которые представ-

ляют собой новый класс противоопухолевых агентов, способствующих регрессии опухоли за счет преимущественной репликации вирусов в раковых клетках, индукции иммуногенной клеточной гибели и стимуляции противоопухолевого иммунитета [3]. Онколитические вирусы проявляют повышенный тропизм к опухолям, дисфункция факторов противовирусного ответа в которых позволяет вирусам преимущественно размножаться в раковых клетках [31].

Во всем мире одобрено применение нескольких препаратов на основе онколитических вирусов при онкологических заболеваниях. В 2004 г. Государственным агентством лекарственных средств Латвийской Республики было одобрено использование препарата Rigvir для лечения меланомы. Rigvir – это препарат из нативного штамма эховируса серотипа 7 (ECHO-7) – непатогенного кишечного-цитопатического РНК-содержащего энтеровируса из семейства *Picornaviridae*. Однако в 2019 г. производство Rigvir было приостановлено из-за нарушения стандартов производства и контроля качества [3, 32]. В 2006 г. в Китае было одобрено применение онколитического вируса H101 – генетически модифицированного аденовируса – при раке головы и шеи в комбинации с цитотоксической химиотерапией [3, 33]. В 2015 г. Управление по санитарному надзору за качеством пищевых продуктов и медикаментов США одобрило Talimogene Laherparepvec (T-VEC), аттенуированный вирус простого герпеса 1-го типа (ВПГ-1), кодирующий гранулоцитарно-макрофагальный колониестимулирующий фактор (GM-CSF) для местного лечения неоперабельных кожных, подкожных и узловых поражений у пациентов с рецидивирующей меланомой после первичной операции [3, 32, 34]. Эффективность и безопасность T-VEC изучали в рамках многоцентрового рандомизированного клинического исследования, после чего препарат получил одобрение в Европе, Австралии и Израиле. Недавние клинические испытания показали, что сочетание онколитических вирусов и блокады контрольных точек иммунитета улучшает терапевтический ответ [35, 36].

Противовирусный ответ нормальных и опухолевых клеток

Врожденный иммунитет представляет собой систему защиты организма от чужеродных и потенциально опасных патогенов, которая существует до первоначального попадания патогенов в организм [37, 38]. В здоровых клетках в ответ на заражение вирусами активируются различные сигнальные пути (рис. 1), которые могут стимулироваться местным высвобождением интерферона I типа (IFN

I) или активацией внутриклеточных Toll-подобных рецепторов (TLR). TLR распознают эволюционно консервативные патогенассоциированные молекулярные паттерны (PAMP, англ. pathogen associated molecular patterns), в число которых могут входить элементы вирусного происхождения (капсиды, ДНК, РНК и белки). Передача сигналов TLR активирует противовирусные реакции клетки-хозяина и системный врожденный иммунитет. Обнаружено, что несколько факторов клетки-хозяина, таких как TRAF3 (TNF-ассоциированный фактор 3), IRF3 (IFN-связанный фактор 3), IRF7 (IFN-связанный фактор 7) и RIG-1 (ген I, индуцируемый ретиноевой кислотой), играют важную роль в остановке репликации и снижении инфекционности вирусов. Данные факторы активируют путь JAK-STAT, координирующий противовирусный ответ в инфицированных клетках [39].

В ответ на проникновение вируса в клетках активируется также продукция интерферонов. Существуют три типа интерферонов: интерфероны I типа (IFN I) – IFN- α , IFN- β , IFN- ω ; интерфероны II типа (IFN II) – IFN- γ ; и интерфероны III типа (IFN III) – IFN- λ 1, IFN- λ 2, IFN- λ 3 (также известные как IL29, IL28A и IL28B соответственно) и IFN- λ 4 [40, 41]. Интерфероны препятствуют размножению вируса, образованию вирусных частиц и распространению вирионов как в инфицированной клетке, так и в соседних клетках путем активации сигнальных каскадов, замедляющих обмен веществ. Интерфероны усиливают синтез молекул главного комплекса гистосовместимости классов I и II (MHC I, MHC II, англ. major histocompatibility complex I и II), а также стимулируют деятельность иммунных протеасом. Повышенное содержание MHC I способствует эффективной презентации вирусных пептидов цитотоксическими Т-лимфоцитами и клетками-киллерами. Иммунная протеасома осуществляет протеолиз пептидов вирусов, которые затем транспортируются в компартмент эндоплазматического ретикулума, после чего презентуются в составе комплекса MHC I. Высокий уровень MHC II гарантирует презентацию вирусных антигенов Т-хелперами, которые в ответ секретируют цитокины, регулирующие работу остальных элементов иммунной системы. Вместе с тем, интерфероны снижают клеточную пролиферацию и активируют проапоптотический белок p53 [42].

IFN I активируют комплекс IFNAR (рецептор IFN I), который включает субъединицы IFNAR1 и IFNAR2. IFN I необходим для надежного противовирусного ответа. Показано, что у мышей с дефицитом IFNAR повышена восприимчивость ко многим вирусам, но сохранена устойчивость к таким патогене-

нам, как *Listeria monocytogenes* [43, 44]. Кроме того, генетические дефекты компонентов пути передачи сигналов интерферона приводят к тяжелым формам иммунодефицита [45–48]. Связывание IFN I с IFNAR инициирует сигнальный каскад, который приводит к индукции группы стимулируемых интерфероном генов (ISG, англ. interferon-stimulated gene) [42, 49]. Однако лишь немногие из генов ISG непосредственно участвуют в развитии противовирусного состояния. Многие из них кодируют паттернраспознающие рецепторы (PRR, англ. pattern recognition receptor), которые обнаруживают вирусные молекулы и модулируют сигнальные пути, либо факторы транскрипции, увеличивающие продукцию IFN.

Некоторые ISG кодируют белки, обладающие потенциальной противовирусной активностью, включая белки, участвующие в ремоделировании цитоскелета, индукции апоптоза, регуляции посттранскрипционных событий (сплайсинг, редактирование мРНК, деградация РНК и различные этапы синтеза белка), и белки, участвующие в посттрансляционной модификации [42], например, протеинкиназа R (PKR, англ. protein kinase R, также известная как EIF2 α K2), 2'-5'-олигоденилатсинтаза (2'-5'-OAS) и GTPазы Mx (динамин-подобные GTPазы семейства Mx), рибонуклеаза L (РНКаза L), ISG15 (стимулируемый IFN белок 15 кДа) имеют хорошо описанные противовирусные функции. Мыши

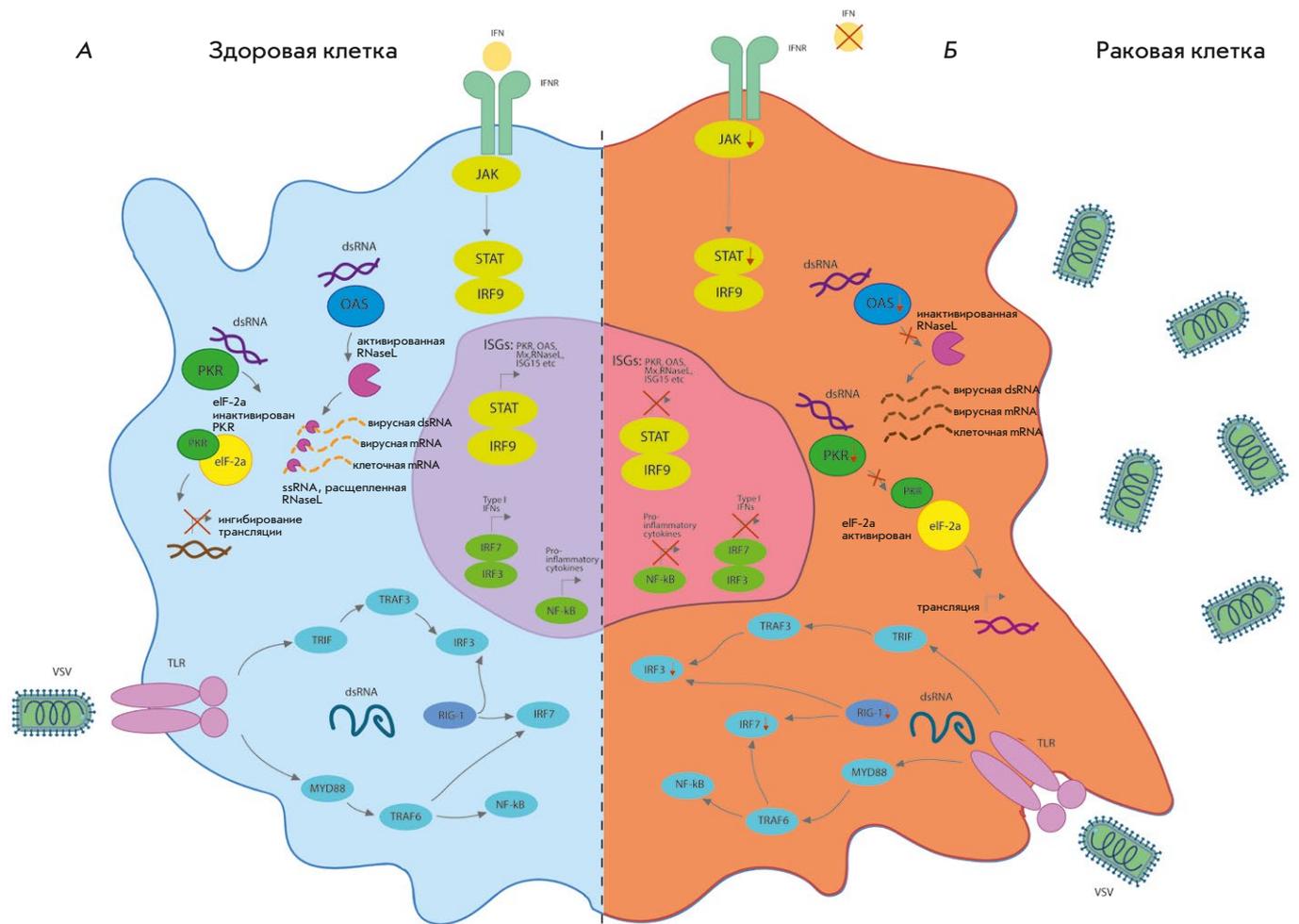


Рис. 1. Онколитические вирусы в опухолевых клетках с нарушенными противовирусными ответами. А — после вирусной инфекции в большинстве нормальных клеток активируется противовирусный механизм, который может запускаться PAMP или путем обнаружения вирусных нуклеиновых кислот. TLR передают сигналы через MYD88, индуцируя продукцию провоспалительных цитокинов и интерферонов, которые активируют сигнальный путь JAK-STAT; Б — изменение ответа раковой клетки на вирусную инфекцию. В раковых клетках может подавляться активность ключевых компонентов врожденного сигнального пути, включая RIG-1, IRF7 и IRF3, что ограничивает обнаружение вирусных частиц и делает раковые клетки более чувствительными к репликации вируса. Кроме того, в раковых клетках могут подавляться ключевые компоненты сигнального пути IFN [39]

с мутациями или нарушениями ключевых этапов сигнальных путей, активируемых этими белками, отличаются повышенной восприимчивостью к вирусным инфекциям [42].

PKR представляет собой внутриклеточную протеинкиназу, которая распознает вирусную дцРНК, фосфорилирует eIF2a (фактор инициации трансляции 2a) и ингибирует трансляцию [39, 42, 50, 51]. При активации PKR прекращается синтез белка в клетках, зараженных вирусом, что способствует быстрой гибели таких клеток и предотвращает таким образом распространение инфекции.

2'-5'-OAS и рибонуклеаза L являются частью противовирусного иммунного ответа клетки. 2'-5'-OAS образует короткие олигоаденилаты из АТФ, которые активируют рибонуклеазу L, что приводит к разрушению вирусной РНК. Этот процесс препятствует репликации вируса и способствует уничтожению инфицированных клеток [42, 52].

ISG15 – это белок, который модифицирует многие клеточные и вирусные мишени путем процесса, называемого ISGилирование (англ. ISGylation). ISGилирование с помощью ISG15 предотвращает деградацию IRF3, который является важным фактором транскрипции, вовлеченным в противовирусный иммунный ответ [53]. Кроме того, ISG15 косвенно предотвращает высвобождение вириона. ISG15 ингибирует убиквитинирование Gag (англ. group specific antigen) ВИЧ и Tsg101 (англ. tumor susceptibility gene 101 protein), что предотвращает высвобождение вирусных частиц из клетки-хозяина. Взаимодействие N-концевого участка белка Tsg101 с вирусным белком Gag критично для формирования новых вирусных частиц [52–54].

Семейство GTPаз Mx играет важную роль в противовирусном иммунном ответе. MxA человека взаимодействует с вирусным нуклеокапсидом, предотвращает транспортировку вирусных частиц, блокируя репликацию. Кроме того, MxA ингибирует вирусную транскрипцию, так показано, что MxA связывается с субъединицей PB2 РНК-полимеразы вируса гриппа и предотвращает транскрипцию вирусного генома. Это препятствует репликации вируса и способствует уничтожению инфицированных клеток [52, 55, 56].

Противовирусные функции описаны также и у других ISG – аденозин-дезаминазы (ADAR1) и белков APOBEC; экзонуклеазы ISG20; белков TRIM (англ. tripartite motif-containing proteins), таких как TRIM19 (он же PML), TRIM5a [57]; Viperin (Cig5) [58]; и высокоиндуцируемых IFN-регуляторов трансляции – IFIT1, IFIT2 и IFIT3 [42, 59, 60]. Однако на данный момент функции большинства из этих ISG охарактеризованы плохо,

а механизмы их противовирусного ответа остаются неизвестными.

Снижение экспрессии IFN или передачи сигналов этого цитокина посредством снижения экспрессии рецептора, или изменения последующей передачи сигналов могут приводить к подавлению противовирусных сигнальных путей в опухолях разного типа. Кроме того, противовирусный ответ в раковых клетках может быть снижен за счет деактивации ISG, например, снижение экспрессии PKR в опухолевых клетках приводит к усилению репликации вирусов. В других случаях, например в низкоккачественных опухолях, PKR может оставаться активной и это может влиять на эффективность терапии онколитическими вирусами [39]. Онколитические вирусы обладают повышенной специфичностью к раковым клеткам, в которых ограничен ответ на IFN, поскольку в здоровых клетках вирусы элиминируются посредством IFN-опосредованных ответов [39].

Вирус везикулярного стоматита как онколитик

VSV представляет собой вирус с РНК(-) несегментированным геномом, относящийся к семейству *Rhabdoviridae*. В семействе *Rhabdoviridae* насчитывается более 100 вирусов, которые инфицируют как позвоночных и беспозвоночных животных, так и растения [4]. Известны восемь основных серотипов VSV: Индиана (VSVInd), Нью-Джерси (VSVNJ), вирус Cocal (COCV), Alagoas VSV (VSVAla), Isfahan (ISFV), Chandipura (CHAV), Maraba и вирус Piry (PIRYV) [61–64]. VSV в основном поражает домашний скот, передается при прямом контакте через аэрозоли и fomиты. Инфекции VSV у людей обычно протекают бессимптомно. Однако в некоторых случаях наблюдалась лихорадка, озноб, боль в мышцах и тошнота [65]. Рекомбинантный VSV (rVSV) является многообещающим вакцинным вектором, поскольку его простой геном может вмещать множество чужеродных генов, он не подвергается ни рекомбинации, ни интеграции в ДНК клетки-хозяина и достигает высоких титров ($>10^9$ бляшкообразующих единиц, БОЕ/мл [66]) в различных типах клеток, что облегчает производство вирусных препаратов. Более того, вакцины на основе VSV вызывают мощные клеточные и гуморальные иммунные ответы на обильно экспрессируемые чужеродные антигены [67]. Кроме того, очень небольшой процент людей серопозитивен к VSV [66].

Известно несколько протоколов сборки рекомбинантных VSV [68–71], большинство из которых предполагает трансфекцию клеток млекопитающих плазмидами, экспрессирующими белки N, P, G и L VSV, и последующую коинфекцию клеток вирусами, экспрессирующими ДНК-зависимую РНК-

полимеразу T7 (T7-РНК-полимеразу). Помимо этого, опубликованы протоколы, в которых при трансфекции клеток используют дополнительную плазмиду, также кодирующую T7-РНК-полимеразу [72], либо сборка VSV осуществляется в генетически модифицированных клеточных линиях [71].

В большей части протоколов описаны способы получения VSV с использованием вирусов осповакцины (VACV или VV) как дикого типа, так и модифицированных [70] для более эффективной трансляции генов VSV [68]. Однако схема сборки, предполагающая трансфекцию клеток пятью плазмидами (плазида, экспрессирующая геном вируса, и четыре дополнительные, экспрессирующие белки N, P, G и L VSV) и дополнительную трансдукцию VV, создает большую нагрузку на клетки и снижает эффективность сборки вирусов. Кроме того, необходимо учитывать, что лекарственные вирусные препараты, используемые *in vivo*, не должны содержать остатков VV или других вирусов, что требует дополнительного этапа очистки готового вирусного препарата [71]. В связи с этим, для производства препаратов, требующих высокой степени чистоты и отсутствия вирусной контаминации, рекомендуется использовать другие методы сборки.

Использование дополнительной пятой плазмиды, экспрессирующей T7-РНК-полимеразу, помогает избежать загрязнения препарата, однако может существенно снизить эффективность трансфекции клеток. Успешная сборка вируса предполагает одновременную экспрессию сразу шести плазмид (плазида, экспрессирующая геном вируса; плазида, экспрессирующая T7-РНК-полимеразу; и четыре дополнительные, экспрессирующие белки N, P, G и L VSV). Однако не все эти плазмиды могут проникнуть в клетки в необходимом для сборки вируса количестве, а кроме того, они создают метаболическую нагрузку на клетки.

Генетическая модификация клеточных линий для сборки рекомбинантных VSV представляется наиболее мягким способом сборки вируса, не требующим дополнительных этапов очистки. Так, Мороз и соавт. показали, что VSV эффективно собирается в экспрессирующей ген T7-РНК-полимеразы клеточной линии HEK293TN-T7, трансфицированной плазмидой, экспрессирующей геном вируса, и четырьмя дополнительными плазмидами, экспрессирующими белки N, P, G и L VSV.

Несмотря на существование рабочих протоколов сборки VSV, необходимо продолжать поиски наиболее эффективных схем сборки, более простых и позволяющих получать вирусные препараты высокого качества.

Рассматривается возможность использования rVSV при многих типах онкологических заболеваний, в том числе рака предстательной железы [6], кожи [7], толстой кишки [8], поджелудочной железы [9] и других [10]. VSV является мощным индуктором апоптоза многих типов опухолевых клеток, он очень чувствителен к противовирусным эффектам IFN, а следовательно, избирательно реплицируется в опухолевых клетках с дефектами в пути IFN [73]. Сконструированы ослабленные штаммы VSV для экспрессии гетерологичных генов, повышения селективности в отношении опухолевых клеток, лучшего уничтожения опухолевых клеток или повышения противоопухолевого иммунитета. В доклинических исследованиях рекомбинантные штаммы VSV показали высокую эффективность в отношении широкого спектра опухолей [74–76]. В настоящее время проводятся 13 клинических исследований эффективности VSV при различных видах рака (<https://www.clinicaltrials.gov/>). Так, rVSV, экспрессирующий ген бета-интерферона человека (IFN- β), и rVSV, экспрессирующий два дополнительных гена: ген *IFN- β* и ген *TYRP1*, кодирующий тирозиназа-зависимый белок 1 и экспрессирующийся в меланоцитах, в настоящее время проходят фазу I клинического испытания для лечения гепатоцеллюлярной карциномы (NCT01628640) и меланомы III–IV стадии соответственно (NCT03865212).

Способы армирования (редактирования) VSV для увеличения эффективности препаратов на их основе

Следует отметить, что разработка новых безопасных штаммов VSV представляет крайне важную задачу, поскольку этот вирус обладает широким тропизмом. С целью повышения безопасности и клинической эффективности в геном VSV вносятся различные изменения. Существует несколько стратегий ослабления VSV: ограничение репликации, например, использование псевдотипированных вирусов с делецией гена *G* [77]; снижение экспрессии вирусных генов, например, перемещение гена *N* с позиции 1 на 4 в геноме [78, 79]; ингибирование созревания вируса, например, посредством укорачивания С-конца *G*-белка [80]; обеспечение более быстрого противовирусного ответа хозяина для ослабления репликации, продукции и распространения вируса путем мутации в *M*-белке, например, с помощью делеции или замены аминокислоты в положении 51 [81, 82].

Для повышения эффективности препаратов на основе VSV в геном вируса интегрируют дополнительные вставки [83]. Многие гены вносятся в геном для стимуляции иммунного ответа на опухоль,

например, в геном rVSV вводят гены, кодирующие IL-12, GM-CSF, тирозинкиназу, CD40L, IL-15 и др. [5, 84–86]. Так, Shin и соавт. экспериментально показали прямое цитотоксическое действие VSV-IL12, экспрессирующего провоспалительный цитокин IL-12, при плоскоклеточном раке головы и шеи (SCC) у мышей: они наблюдали уменьшение объема опухоли и повышение выживаемости животных [30, 86, 87]. Также для модификации VSV с целью повышения селективности и эффективности используют микроРНК, короткие некодирующие РНК, которые регулируют экспрессию генов путем ингибирования трансляции транскриптов-мишеней. Профили экспрессии микроРНК различаются в разных тканях и меняются по мере развития заболеваний, включая онкологические [88].

Рекомбинантные VSV в клинических исследованиях

Вирус везикулярного стоматита показал высокую эффективность в качестве онколитика для лечения широкого спектра видов злокачественных опухолей в большом количестве доклинических исследований [30, 83, 89]. В большей части проводимых на данное время клинических исследованиях оцениваются эффективность и безопасность VSV-hIFN β -NIS, несущего ген интерферона-бета (IFN β) человека, для повышения селективности онколитика и симпортера йодида натрия (NIS) для контроля биораспределения вируса. Проводятся клинические исследования вирусов VSV-GP154 и VSV-GP128, в которых ген G заменен на GP вируса лимфоцитарного хориоменингита (LCMV), для снижения возможной нейротоксичности VSV. Вариант VSV-hIFN β -TYRП1 использовали в клинических исследованиях в качестве средства против меланомы III–IV стадии. Для повышения онколитической селективности VSV-hIFN β -TYRП1 в его геном помимо гена, кодирующего IFN β человека, встроили также ген TYRП1, экспрессирующийся в меланоцитах. Большинство клинических исследований препаратов на основе VSV проводят в сочетании с различными иммунотерапевтическими подходами.

VSV применяют при широком спектре злокачественных опухолей, при этом чаще всего выбирают пациентов с рецидивирующими и метастазирующими солидными опухолями, такими как: колоректальный рак (NCT02923466, NCT04046445, NCT04291105), меланома (NCT03017820, NCT03865212, NCT04291105), рак эндометрия (NCT03120624, NCT03456908), рак головы и шеи (NCT04291105), рак поджелудочной железы (NCT05846516) и другие опухоли (NCT05644509, NCT01042379). Клинические испытания также

проводятся с пациентами со злокачественными лимфомами (NCT06508463, NCT04046445). К сожалению, результаты указанных клинических исследований еще не опубликованы.

Преграды на пути к применению виротерапии

Несмотря на большой терапевтический потенциал онколитических вирусов, существует и множество ограничений, затрудняющих их применение, таких как риск возникновения выраженного системного иммунного ответа организма; физические барьеры в опухоли и барьеры в иммуносупрессивном микроокружении опухоли (ТМЕ), сложность доставки вирусных частиц и их репликации в опухолевых клетках; выбор оптимальной комбинации онколитических вирусов и других препаратов, схемы и формата введения; сложность производства вирусных препаратов и поддержания высокого титра вирусных частиц.

Для минимизации риска системного иммунного ответа организма необходимо тщательно выбирать вирусную платформу. С этой целью изучаются онколитические свойства наиболее безопасных для человека вирусов, в число которых входят: *Adenoviridae*, *Herpesviridae*, *Poxviridae*, *Picornaviridae*, *Paramyxoviridae*, *Rhabdoviridae*, *Parvoviridae* и *Reoviridae* [30]. Для решения проблем с доставкой онколитических вирусов к опухолевым клеткам и недостаточной специфичности доставки используют модификацию капсида, которая позволяет усилить связывание вирусных частиц с рецепторами, отвечающими за проникновение в клетки-мишени [90], удаление вирусных генов, необходимых для репликации вируса в нормальных клетках. Например, ONYX-015, онколитический аденовирус с удаленным геном белка E1B обладает повышенной способностью к селективной репликации в опухоли, поскольку измененный вирус не может инактивировать р53 белок в нормальных клетках [91, 92]. Для модификации онколитических вирусов используют также полиэтиленгликоль (PEG), поли-N-(2-гидроксипропил)метакриламид, тиоловые группы для присоединения трансферрина к белкам капсида и др. [91–95]. Также для улучшения эффективности применения VSV для лечения злокачественных опухолей проводится поиск маркеров чувствительности опухолевых клеток к данному вирусу [96], что будет более подробно рассмотрено в следующих разделах.

Биомаркеры устойчивости опухолевых клеток к терапии rVSV

Дефекты передачи сигналов интерферона, характерные для раковых клеток [97], делают онколитические вирусы перспективными терапевтическими агентами, однако опухоли сильно отличаются друг

Таблица 1. Изменение экспрессии генов *EGFR* и *HER2* в клеточных линиях с различной чувствительностью к VSV

Клеточная линия	Уровень экспрессии <i>EGFR</i> и <i>HER2</i>	Чувствительность к терапии рекомбинантными VSV	Вариант VSV
HOS (остеосаркома)	Повышена [96]	Высокая [96]	VSV штамм Indiana
DBTRG-05MG (глиобластома)	Понижена [96]	Низкая [96]	VSV штамм Indiana
U251MG (глиобластома)	Повышена [96]	Высокая [96]	VSV штамм Indiana
A172 (глиобластома)	Повышена [96]	Высокая [96]	VSV штамм Indiana
U87MG (глиобластома)	Повышена [101]	Высокая [102]	rVSV-ΔM51
A375 (меланома)	Понижена [99]	Высокая [103]	VSV дикого типа
A549	Повышена [104]	Низкая [105]	VSV штамм Indiana
HerG2	Повышена [106]	Высокая [107]	rVSV-GFP
SW982 (синовиальная саркома)	Повышена [108]	Низкая [109]	rVSV-G/GFP
VxPC-3	Средняя [110]	Высокая [111]	rVSV-ΔM51-GFP
AsPC-1	Понижена [112]	Низкая [9, 111]	rVSV-ΔM51-GFP
Sarpan-1	Понижена [113]	Низкая [9, 111]	rVSV-ΔM51-GFP
Panc-1	Понижена [112]	Низкая [9, 111]	rVSV-ΔM51-GFP
MIA PaCa2	Средняя [112]	Низкая [9, 111]	rVSV-ΔM51-GFP
Sarpan-2	Высокая [113]	Низкая [9, 111]	rVSV-ΔM51-GFP
T3M4	Средняя [114]	Низкая [9, 111]	rVSV-ΔM51-GFP
CFPAC	Повышена [110]	Высокая [9, 111]	rVSV-ΔM51-GFP
HPAC	Повышена [110]	Высокая [9, 111]	rVSV-ΔM51-GFP
HPDE	Высокая [115]	Высокая [9, 111]	rVSV-ΔM51-GFP
Hs766T	Высокая [113]	Высокая [9, 111]	rVSV-ΔM51-GFP

от друга по чувствительности к вирусам. Например, в экспериментах *in vitro* некоторые линии раковых клеток после инкубации с IFN I становятся устойчивыми к VSV, в то время как другие остаются чувствительными к цитопатическому действию вируса [11]. J. Noser и соавт. показали, что активированный путь RAS/Raf1/MEK/ERK играет критическую роль в возникновении дефектов противовирусного ответа в раковых клетках. В частности, показана быстрая гибель линии клеток NIH 3T3, стабильно экспрессирующих активный RAS или Raf1, при инфицировании вирусом VSV [98].

Поиск биомаркеров чувствительности опухолевых клеток к онколитическим вирусам, в частности, к вирусу VSV показал, что гены *EGFR* и *HER2* обычно сверхэкспрессируются на чувствительных к VSV клеточных линиях, в отличие от резистентных [96, 99] (табл. 1). Эти наблюдения предполагают, что активация пути EGFR/HER2 и сверхэкспрессия гена *HER2* может быть потенциальным биомаркером уязвимости опухоли для онколитической терапии VSV [100].

Нарушения противовирусного ответа в раковых клетках, такие как изменение путей продукции IFN и деактивации пути JAK-STAT, снижение продукции ISG (Mx GTPаза, OAS, TRIM, IFIT, Irf7,

STING, APOBEC, viperin и др.) [116, 117], могут влиять на чувствительность к онколитическим вирусам. Возможными маркерами чувствительности могут быть и молекулы, включенные в другие механизмы. Например, вирус гепатита C (HCV) активирует деление митохондрий в клетке-хозяине, что приводит к угнетению апоптоза и размножению вируса [118]. Ингибирование деления митохондрий и митофагии путем подавления Drp1 (англ. Dynamin-Related Protein 1) приводило при этом к снижению репликации HCV, а также к повышению устойчивости клеток к вирусной инфекции [119]. Показано, что ингибирование некроптоза в клетках приводит к усиленной репликации вируса Зика (ZIKV) [120]. При этом снижение экспрессии RIPK3 может приводить к повышению чувствительности клеток к вирусной инфекции [121] (рис. 2).

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Препараты на основе VSV являются перспективными противоопухолевыми средствами, но при этом остается необходимость в поиске новых молекул, которые в составе VSV будут усиливать литические и иммуностимулирующие свойства вируса и тем самым повышать эффективность и безопасность препаратов на их основе.

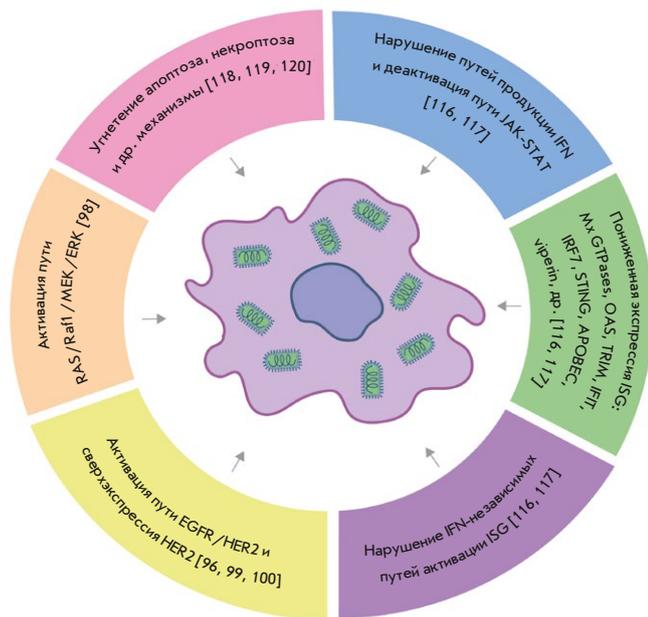


Рис. 2. Чувствительная к терапии VSV клетка. Знание молекулярных механизмов, лежащих в основе различий в чувствительности опухолевых клеток к вирусам, имеет важное значение для разработки подходов к терапии рака, выявления биомаркеров чувствительности к специфическим онколитическим вирусам, прогнозирования эффективности вирусной терапии у каждого отдельного пациента [96] и повышения эффективности терапии злокачественных новообразований.

Создание эффективного препарата на основе VSV затруднено тем, что некоторые раковые клетки нечувствительны к вирусу, что может привести к низкой эффективности терапии этих типов злокачественных опухолей. Внесение мутаций в геном вируса, способствующих повышению чувствительности вируса к опухолевым клеткам [81, 82], может улучшить эффективность и безопасность препаратов на основе VSV, также при их сочетании с другими онколитическими вирусами, иммуномодуляторами, CAR-T-терапией и традиционными методами, такими как химиотерапия, хирургическое вмешательство, лучевая терапия [5, 122, 123]. На данный момент не найдены универсальные маркеры чувствительности к терапии препаратами VSV, которые позволяли бы оценивать эффективность онколитика при конкретном виде опухоли и определять, подходит ли виротерапия с помощью VSV данному пациенту [96]. В связи с этим, необходимо более детальное изучение молекулярных механизмов, лежащих в основе различий в чувствительности раковых клеток к вирусам, а также особенностей противовирусной защиты клеток в ответ на инфицирование VSV.

Результаты получены при финансовой поддержке проекта, реализуемого в рамках государственной программы федеральной территории «Сириус» «Научно-технологическое развитие федеральной территории «Сириус» (Соглашение № 18-03 от 10 сентября 2024 года).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Khoshandam M., Soltaninejad H., Hamidieh A.A., Hosseinkhani S. // *Genes Dis.* 2024. V. 11. № 4. P. 101121.
2. Kroemer G., Chan T.A., Eggermont A.M.M., Galluzzi L. // *CA Cancer J. Clin.* 2024. V. 74. № 2. P. 187–202.
3. Macedo N., Miller D.M., Haq R., Kaufman H.L. // *J. Immunother. Cancer.* 2020. V. 8. № 2. P. e001486.
4. Dietzgen R.G., Kondo H., Goodin M.M., Kurath G., Vasilakis N. // *Virus Res.* 2017. V. 227. P. 158–170.
5. Gao Y. // *DNA Cell. Biol.* 2024. V. 43. № 2. P. 57–60.
6. Ahmed M., Cramer S.D., Lyles D.S. // *Virology.* 2004. V. 330. № 1. P. 34–49.
7. Wollmann G., Davis J.N., Bosenberg M.W., van den Pol A.N. // *J. Virol.* 2013. V. 87. № 12. P. 6644–6659.
8. Huang T.-G., Ebert O., Shinozaki K., García-Sastre A., Woo S.L.C. // *Mol. Ther.* 2003. V. 8. № 3. P. 434–440.
9. Murphy A.M., Besmer D.M., Moerdyk-Schauwecker M., Moestl N., Ornelles D.A., Mukherjee P., Grdzlishvili V.Z. // *J. Virol.* 2012. V. 86. № 6. P. 3073–3087.
10. Cary Z.D., Willingham M.C., Lyles D.S. // *J. Virol.* 2011. V. 85. № 12. P. 5708–5717.
11. Tarasova I.A., Tereshkova A.V., Lobas A.A., Solovyeva E.M., Sidorenko A.S., Gorshkov V., Kjeldsen F., Bubis J.A., Ivanov M.V., Iliny I.Y., et al. // *Oncotarget.* 2018. V. 9. № 2. P. 1785–1802.
12. Bray F., Laversanne M., Sung H., Ferlay J., Siegel R.L., Soerjomataram I., Jemal A. // *CA Cancer J. Clin.* 2024. V. 74. № 3. P. 229–263.
13. Santucci C., Mignozzi S., Malvezzi M., Boffetta P., Collatuzzo G., Levi F., La Vecchia C., Negri E. // *Ann. Oncol.* 2024. V. 35. № 3. P. 308–316.
14. Hanahan D. // *Cancer Discov.* 2022. V. 12. № 1. P. 31–46.
15. Lee E.Y.H.P., Muller W.J. // *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* 2010. V. 2. № 10. P. a003236.
16. Bertram J.S. // *Mol. Aspects Med.* 2000. V. 21. № 6. P. 167–223.
17. Bastos I.M., Rebelo S., Silva V.L.M. // *Biochem. Pharmacol.* 2024. V. 221. P. 116045.
18. Thienpont B., van Dyck L., Lambrechts D. // *Mol. Cell. Oncol.* 2016. V. 3. № 6. P. e1240549.
19. Zhao H., Wu L., Yan G., Chen Y., Zhou M., Wu Y., Li Y. // *Signal Transduct. Target Ther.* 2021. V. 6. № 1. P. 263.
20. Colotta F., Allavena P., Sica A., Garlanda C., Mantovani A. // *Carcinogenesis.* 2009. V. 30. № 7. P. 1073–1081.
21. Singh M., Overwijk W.W. // *Cancer Immunol. Immunother.* 2015. V. 64. № 7. P. 911–921.
22. Boisgerault N., Tangy F., Gregoire M. // *Immunotherapy.* 2010. V. 2. № 2. P. 185–199.
23. Ahmad A., Uddin S., Steinhoff M. // *Int. J. Mol. Sci.* 2020. V. 21. № 11. P. 3906.

24. Gershovich P.M., Karabelskii A.V., Ulitin A.B., Ivanov R.A. // *Biochemistry (Moscow)*. 2019. V. 84. № 7. P. 695–710.
25. Petukhov A.V., Markova V.A., Motorin D.V., Titov A.K., Belozerova N.S., Gershovich P.M., Karabelsky A., Ivanov R.A., Zaikova E., Smirnov E.Y., et al. // *Klinicheskaya Onkogematologiya/Clinical Oncohematology*. 2018. V. 11. № 1. P. 1–9.
26. Hoos A. // *Nat. Rev. Drug Discov.* 2016. V. 15. № 4. P. 235–247.
27. Karabelskii A.V., Nemankin T.A., Ulitin A.B., Vaganov A.S., Mosina E.A., Ivanov R.A. // *Biotekhnologiya*. 2017. № 1. P. 10–29.
28. de Gruijl T.D., Janssen A.B., van Beusechem V.W. // *Expert Opin. Biol. Ther.* 2015. V. 15. № 7. P. 959–971.
29. Puduvali V.K. // *Oncology (Williston Park)*. 2016. V. 30. № 3. P. 222–223.
30. Malogolovkin A., Gasanov N., Egorov A., Weener M., Ivanov R., Karabelsky A. // *Viruses*. 2021. V. 13. № 7. P. 1271.
31. Kiaheyrafi N., Babaei A., Ranji R., Bahadoran E., Taheri S., Farokhpour Z. // *Life Sci.* 2024. V. 349. P. 122734.
32. Babiker H.M., Riaz I.B., Husnain M., Borad M.J. // *Oncolytic Virother.* 2017. V. 6. P. 11–18.
33. Liang M. // *Curr. Cancer Drug Targets*. 2018. V. 18. № 2. P. 171–176.
34. Andtbacka R.H.I., Kaufman H.L., Collichio F., Amatruda T., Senzer N., Chesney J., Delman K.A., Spidler L.E., Puzanov I., Agarwala S.S., et al. // *J. Clin. Oncol.* 2015. V. 33. № 25. P. 2780–2788.
35. Puzanov I., Milhem M.M., Minor D., Hamid O., Li A., Chen L., Chastain M., Gorski K.S., Anderson A., Chou J., et al. // *J. Clin. Oncol.* 2016. V. 34. № 22. P. 2619–2626.
36. Ribas A., Dummer R., Puzanov I., VanderWalde A., Andtbacka R.H.I., Michielin O., Olszanski A.J., Malvehy J., Cebon J., Fernandez E., et al. // *Cell*. 2017. V. 170. № 6. P. 1109–1119.e10.
37. Kumar H., Kawai T., Akira S. // *Int. Rev. Immunol.* 2011. V. 30. № 1. P. 16–34.
38. Olive C. // *Expert Rev. Vaccines*. 2012. V. 11. № 2. P. 237–256.
39. Kaufman H.L., Kohlhapp F.J., Zloza A. // *Nat. Rev. Drug Discov.* 2015. V. 14. № 9. P. 642–662.
40. Wack A., Terczyńska-Dyla E., Hartmann R. // *Nat. Immunol.* 2015. V. 16. № 8. P. 802–809.
41. Vilcek J. // *Nat. Immunol.* 2003. V. 4. № 1. P. 8–9.
42. Sadler A.J., Williams B.R.G. // *Nat. Rev. Immunol.* 2008. V. 8. № 7. P. 559–568.
43. O'Connell R.M., Saha S.K., Vaidya S.A., Bruhn K.W., Miranda G.A., Zarnegar B., Perry A.K., Nguyen B.O., Lane T.F., Taniguchi T., et al. // *J. Exp. Med.* 2004. V. 200. № 4. P. 437–445.
44. Müller U., Steinhoff U., Reis L.F., Hemmi S., Pavlovic J., Zinkernagel R.M., Aguet M. // *Science*. 1994. V. 264. № 5167. P. 1918–1921.
45. Casrouge A., Zhang S.-Y., Eidenschenk C., Jouanguy E., Puel A., Yang K., Alcais A., Picard C., Mahfoufi N., Nicolas N., et al. // *Science*. 2006. V. 314. № 5797. P. 308–312.
46. Dupuis S., Jouanguy E., Al-Hajjar S., Fieschi C., Al-Mohsen I.Z., Al-Jumaah S., Yang K., Chappier A., Eidenschenk C., Eid P., et al. // *Nat. Genet.* 2003. V. 33. № 3. P. 388–391.
47. Jouanguy E., Zhang S.-Y., Chappier A., Sancho-Shimizu V., Puel A., Picard C., Boisson-Dupuis S., Abel L., Casanova J.-L. // *Biochimie*. 2007. V. 89. № 6–7. P. 878–883.
48. Minegishi Y., Saito M., Morio T., Watanabe K., Agematsu K., Tsuchiya S., Takada H., Hara T., Kawamura N., Ariga T., et al. // *Immunity*. 2006. V. 25. № 5. P. 745–755.
49. Der S.D., Zhou A., Williams B.R., Silverman R.H. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 1998. V. 95. № 26. P. 15623–15628.
50. Meurs E., Chong K., Galabru J., Thomas N.S., Kerr I.M., Williams B.R., Hovanessian A.G. // *Cell*. 1990. V. 62. № 2. P. 379–390.
51. Elde N.C., Child S.J., Geballe A.P., Malik H.S. // *Nature*. 2009. V. 457. № 7228. P. 485–489.
52. Liu S.-Y., Sanchez D.J., Cheng G. // *Curr. Opin. Immunol.* 2011. V. 23. № 1. P. 57–64.
53. Shi H.-X., Yang K., Liu X., Liu X.-Y., Wei B., Shan Y.-F., Zhu L.-H., Wang C. // *Mol. Cell. Biol.* 2010. V. 30. № 10. P. 2424–2436.
54. Okumura A., Lu G., Pitha-Rowe I., Pitha P.M. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2006. V. 103. № 5. P. 1440–1445.
55. Haller O., Staeheli P., Kochs G. // *Biochimie*. 2007. V. 89. № 6–7. P. 812–818.
56. Haller O., Stertz S., Kochs G. // *Microbes Infect.* 2007. V. 9. № 14–15. P. 1636–1643.
57. Berthoux L., Sebastian S., Sokolskaja E., Luban J. // *J. Virol.* 2004. V. 78. № 21. P. 11739–11750.
58. Wang X., Hinson E.R., Cresswell P. // *Cell Host Microbe*. 2007. V. 2. № 2. P. 96–105.
59. Brass A.L., Huang I.-C., Benita Y., John S.P., Krishnan M.N., Feeley E.M., Ryan B.J., Weyer J.L., van der Weyden L., Fikrig E., et al. // *Cell*. 2009. V. 139. № 7. P. 1243–1254.
60. Pindel A., Sadler A. // *J. Interferon Cytokine Res.* 2011. V. 31. № 1. P. 59–70.
61. Kim G.N., Kang C.Y. // *Virology*. 2007. V. 357. № 1. P. 41–53.
62. Nunamaker R.A., Lockwood J.A., Stith C.E., Campbell C.L., Schell S.P., Drolet B.S., Wilson W.C., White D.M., Letchworth G.J. // *J. Med. Entomol.* 2003. V. 40. № 6. P. 957–963.
63. Rodriguez L.L. // *Virus Res.* 2002. V. 85. № 2. P. 211–219.
64. Letchworth G.J., Rodriguez L.L., Del Cbarrera J. // *Vet. J.* 1999. V. 157. № 3. P. 239–260.
65. Roberts A., Kretzschmar E., Perkins A.S., Forman J., Price R., Buonocore L., Kawaoka Y., Rose J.K. // *J. Virol.* 1998. V. 72. № 6. P. 4704–4711.
66. Geisbert T.W., Feldmann H. // *J. Infect. Dis.* 2011. V. 204 Suppl 3. P. S1075–1081.
67. Johnson J.E., Nasar F., Coleman J.W., Price R.E., Javadian A., Draper K., Lee M., Reilly P.A., Clarke D.K., Hendry R.M., et al. // *Virology*. 2007. V. 360. № 1. P. 36–49.
68. Whelan S.P., Ball L.A., Barr J.N., Wertz G.T. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 1995. V. 92. № 18. P. 8388–8392.
69. Slough M.M., Chandran K., Jangra R.K. // *mBio*. 2019. V. 10. № 1. P. e02372–18.
70. Whitt M.A. // *J. Virol. Meth.* 2010. V. 169. № 2. P. 365–374.
71. Moroz V.D., Gasanov N.B., Egorov A.D., Malogolovkin A.S., Nagornykh M.O., Subcheva E.N., Kolosova E.S., Fizikova A.Y., Ivanov R.A., Karabelsky A.V. // *Acta Naturae*. 2024. V. 16. № 1. P. 59–66.
72. Li H., Zhao C., Zhang Y., Yuan F., Zhang Q., Shi X., Zhang L., Qin C., Zheng A. // *Emerg Microbes Infect.* 2020. V. 9. № 1. P. 2269–2277.
73. Stewart J.H., Ahmed M., Northrup S.A., Willingham M., Lyles D.S. // *Cancer Gene Ther.* 2011. V. 18. № 12. P. 837–849.
74. Kurisetty V.V.S., Heiber J., Myers R., Pereira G.S., Goodwin J.W., Federspiel M.J., Russell S.J., Peng K.W., Barber G., Merchan J.R. // *Head Neck*. 2014. V. 36. № 11. P. 1619–1627.
75. Obuchi M., Fernandez M., Barber G.N. // *J. Virol.* 2003. V. 77. № 16. P. 8843–8856.
76. Porosnicu M., Mian A., Barber G.N. // *Cancer Res.* 2003. V. 63. № 23. P. 8366–8376.
77. Publicover J., Ramsburg E., Rose J.K. // *J. Virol.* 2005.

- V. 79. № 21. P. 13231–13238.
78. Ball L.A., Pringle C.R., Flanagan B., Perepelitsa V.P., Wertz G.W. // *J. Virol.* 1999. V. 73. № 6. P. 4705–4712.
79. Wertz G.W., Perepelitsa V.P., Ball L.A. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1998. V. 95. № 7. P. 3501–3506.
80. Publicover J., Ramsburg E., Rose J.K. // *J. Virol.* 2004. V. 78. № 17. P. 9317–9324.
81. Stojdl D.F., Lichty B.D., tenOever B.R., Paterson J.M., Power A.T., Knowles S., Marius R., Reynard J., Poliquin L., Atkins H., et al. // *Cancer Cell.* 2003. V. 4. № 4. P. 263–275.
82. Zemp F., Rajwani J., Mahoney D.J. // *Biotechnol. Genet. Eng. Rev.* 2018. V. 34. № 1. P. 122–138.
83. Bishnoi S., Tiwari R., Gupta S., Byrareddy S.N., Nayak D. // *Viruses.* 2018. V. 10. № 2. P. 90.
84. Fernandez M., Porosnicu M., Markovic D., Barber G.N. // *J. Virol.* 2002. V. 76. № 2. P. 895–904.
85. Gao Y., Whitaker-Dowling P., Watkins S.C., Griffin J.A., Bergman I. // *J. Virol.* 2006. V. 80. № 17. P. 8603–8612.
86. Shin E.J., Wanna G.B., Choi B., Aguila D., Ebert O., Genden E.M., Woo S.L. // *Laryngoscope.* 2007. V. 117. № 2. P. 210–214.
87. Ryapolova A., Minskaia E., Gasanov N., Moroz V., Krapivin B., Egorov A.D., Laktyushkin V., Zhuravleva S., Nagornych M., Subcheva E., et al. // *Int. J. Mol. Sci.* 2023. V. 25. № 1. P. 211.
88. Toropko M., Chuvpilo S., Karabelsky A. // *Pharmaceutics.* 2024. V. 16. № 8. P. 986.
89. Felt S.A., Grdzlishvili V.Z. // *J. Gen. Virol.* 2017. V. 98. № 12. P. 2895–2911.
90. Hagedorn C., Kreppel F. // *Hum. Gene Ther.* 2017. V. 28. № 10. P. 820–832.
91. Zheng M., Huang J., Tong A., Yang H. // *Mol. Ther. Oncolytics.* 2019. V. 15. P. 234–247.
92. Hamid O., Hoffner B., Gasal E., Hong J., Carvajal R.D. // *Cancer Immunol. Immunother.* 2017. V. 66. № 10. P. 1249–1264.
93. Kreppel F., Gackowski J., Schmidt E., Kochanek S. // *Mol. Ther.* 2005. V. 12. № 1. P. 107–117.
94. Fisher K.D., Stallwood Y., Green N.K., Ulbrich K., Mautner V., Seymour L.W. // *Gene Ther.* 2001. V. 8. № 5. P. 341–348.
95. Choi J.-W., Lee Y.S., Yun C.-O., Kim S.W. // *J. Control Release.* 2015. V. 219. P. 181–191.
96. Nikitina A.S., Lipatova A.V., Goncharov A.O., Kliuchnikova A.A., Pyatnitskiy M.A., Kuznetsova K.G., Hamad A., Vorobyev P.O., Alekseeva O.N., Mahmoud M., et al. // *Int. J. Mol. Sci.* 2022. V. 23. № 9. P. 5244.
97. Stojdl D.F., Lichty B., Knowles S., Marius R., Atkins H., Sonenberg N., Bell J.C. // *Nat. Med.* 2000. V. 6. № 7. P. 821–825.
98. Noser J.A., Mael A.A., Sakuma R., Ohmine S., Marcato P., Lee P.W., Ikeda Y. // *Mol. Ther.* 2007. V. 15. № 8. P. 1531–1536.
99. Yang F., Yang Y., Zeng W. // *Natural Prod. Comm.* 2020. V. 15. P. 1934578X2091286.
100. Wu S., Zhang Q., Zhang F., Meng F., Liu S., Zhou R., Wu Q., Li X., Shen L., Huang J., et al. // *Nat. Cell. Biol.* 2019. V. 21. № 8. P. 1027–1040.
101. Zhu H.-J., Ogawa M., Magata Y., Hirata M., Ohmomo Y., Namba H., Sakahara H. // *Asia Ocean J. Nucl. Med. Biol.* 2013. V. 1. № 2. P. 47–52.
102. Lun X., Senger D.L., Alain T., Oprea A., Parato K., Stojdl D., Lichty B., Power A., Johnston R.N., Hamilton M., et al. // *J. Natl. Cancer Inst.* 2006. V. 98. № 21. P. 1546–1557.
103. Kimpel J., Urbiola C., Koske I., Tober R., Banki Z., Wollmann G., von Laer D. // *Viruses.* 2018. V. 10. № 3. P. 108.
104. Bunn P.A., Helfrich B., Soriano A.F., Franklin W.A., Varella-Garcia M., Hirsch F.R., Baron A., Zeng C., Chan D.C. // *Clin. Cancer Res.* 2001. V. 7. № 10. P. 3239–3250.
105. Malilas W., Koh S.S., Lee S., Srisuttee R., Cho I.-R., Moon J., Kaowinn S., Johnston R.N., Chung Y.-H. // *Int. J. Oncol.* 2014. V. 44. № 4. P. 1177–1184.
106. Shi J.-H., Guo W.-Z., Jin Y., Zhang H.-P., Pang C., Li J., Line P.-D., Zhang S.-J. // *Cancer Med.* 2019. V. 8. № 3. P. 1269–1278.
107. Li X., Sun X., Wang B., Li Y., Tong J. // *Asian J. Pharm. Sci.* 2023. V. 18. № 1. P. 100771.
108. Nuciforo P.G., Pellegrini C., Fasani R., Maggioni M., Coggi G., Parafioriti A., Bosari S. // *Hum. Pathol.* 2003. V. 34. № 7. P. 639–645.
109. Paglino J.C., van den Pol A.N. // *J. Virol.* 2011. V. 85. № 18. P. 9346–9358.
110. Thomas G., Chardès T., Gaborit N., Mollevi C., Leconet W., Robert B., Radosevic-Robin N., Penault-Llorca F., Gongora C., Colombo P.-E., et al. // *Oncotarget.* 2014. V. 5. № 16. P. 7138–7148.
111. Moerdyk-Schauwecker M., Shah N.R., Murphy A.M., Hastie E., Mukherjee P., Grdzlishvili V.Z. // *Virology.* 2013. V. 436. № 1. P. 221–234.
112. Walsh N., Kennedy S., Larkin A., Corkery B., O'Driscoll L., Clynes M., Crown J., O'Donovan N. // *Invest. New Drugs.* 2013. V. 31. № 3. P. 558–566.
113. Shibata W., Kinoshita H., Hikiba Y., Sato T., Ishii Y., Sue S., Sugimori M., Suzuki N., Sakitani K., Ijichi H., et al. // *Sci. Rep.* 2018. V. 8. № 1. P. 6150.
114. Kimple R.J., Vaseva A.V., Cox A.D., Baerman K.M., Calvo B.F., Tepper J.E., Shields J.M., Sartor C.I. // *Clin. Cancer Res.* 2010. V. 16. № 3. P. 912–923.
115. Chang Z., Li Z., Wang X., Kang Y., Yuan Y., Niu J., Wang H., Chatterjee D., Fleming J.B., Li M., et al. // *Clin. Cancer Res.* 2013. V. 19. № 3. P. 549–559.
116. Goad D.W., Bressy C., Holbrook M.C., Grdzlishvili V.Z. // *Mol. Ther. Oncolytics.* 2022. V. 24. P. 59–76.
117. Larrioux A., Sanjuán R. // *iScience.* 2023. V. 26. № 1. P. 105749.
118. Lee J., Ou J.-H.J. // *Curr. Opin. Virol.* 2022. V. 52. P. 244–249.
119. Kim S.-J., Syed G.H., Khan M., Chiu W.-W., Sohail M.A., Gish R.G., Siddiqui A. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2014. V. 111. № 17. P. 6413–6418.
120. Wen C., Yu Y., Gao C., Qi X., Cardona C.J., Xing Z. // *Front Cell Infect. Microbiol.* 2021. V. 11. P. 637710.
121. Pan Y., Cai W., Cheng A., Wang M., Yin Z., Jia R. // *Front. Immunol.* 2022. V. 13. P. 829433.
122. Evgin L., Kottke T., Tonne J., Thompson J., Huff A.L., van Vloten J., Moore M., Michael J., Driscoll C., Pulido J., et al. // *Sci. Transl. Med.* 2022. V. 14. № 640. P. eabn2231.
123. Martin N.T., Bell J.C. // *Mol. Ther.* 2018. V. 26. № 6. P. 1414–1422.

УДК 577.29

Платформы для поиска новых антимикробных препаратов с использованием *in vivo* моделей *Caenorhabditis elegans*

А. И. Калганова¹, И. Е. Елисеев¹, И. В. Смирнов^{1,2,3*}, С. С. Терехов¹¹Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Государственный научный центр Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова Российской академии наук, Москва, 117997 Россия²Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова», Москва, 119991 Россия³Федеральное государственное бюджетное учреждение «НМИЦ эндокринологии» Минздрава России, Москва, 117292 Россия

*E-mail: ivansmr@inbox.ru

Поступила в редакцию 11.12.2023

Принята к печати 19.11.2024

DOI: 10.32607/actanaturae.27348

РЕФЕРАТ Несмотря на развитие высокопроизводительных технологий скрининга, существует немного эффективных платформ для скрининга новых антимикробных препаратов. Антимикробную активность соединений преимущественно оценивают на культурах патогенов *in vitro*, что затрудняет или делает невозможным более глубокое изучение молекулярных механизмов взаимодействий между хозяином и патогеном. Тестирование перспективных соединений на *in vivo* моделях с использованием хордовых является весьма трудоемким и затратным, поэтому оно используется в доклинических исследованиях уже отобранных кандидатов, но не для первичного скрининга. Такой подход не способствует отбору молекул с низкой органной токсичностью и не позволяет идентифицировать терапевтические молекулы, воздействующие на факторы вирулентности. Использование микроскопических нематод *Caenorhabditis elegans* для моделирования человеческих инфекций позволяет исследовать взаимодействие хозяин–патоген и идентифицировать антиинфекционные молекулы с новыми механизмами действия.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА *Caenorhabditis elegans*, микрофлюидика, модель инфекции, возбудители, открытие лекарств, противомикробные препараты.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ АМП – антимикробные пептиды; QS – чувство кворума (Quorum Sensing).

ВВЕДЕНИЕ

Кризис антибиотикорезистентности связан с проблемой поиска и разработки новых антибиотиков. Первые антибиотики были открыты с использованием принципа скрининга небольших библиотек химических соединений *in vivo* на животных – инфицированных мышах и кроликах [1]. От этого подхода вскоре отказались в пользу более производительного, этичного и удобного тестирования антибиотиков на культурах патогенов *in vitro* [2]. Почти через столетие после открытия первых классов антибиотиков распространение резистентности и острая нехватка новых антибиотиков вынудили искать новые высокопроизводительные платформы и вернуться к скринингу *in vivo* [3].

В настоящее время существует ряд эффективных платформ для скрининга антибактериальных препаратов, активных в отношении полирезистентных патогенов, биопленок и внутриклеточных патогенов [3]. Однако резистентность микроорганизмов возникает быстрее, чем внедрение современных подходов к поиску и тестированию новых терапевтических молекул. Антимикробную активность преимущественно оценивают в культурах возбудителей *in vitro*, что не позволяет детально изучать молекулярные механизмы, опосредующие взаимодействие хозяин–патоген.

Новой стратегией является поиск молекул с альтернативными механизмами действия, например, блокирующих вирулентность, стимулирующих им-

мунный ответ или являющихся пролекарствами. Такие соединения, названные «антиинфекционными» в противоположность антибактериальным, невозможно идентифицировать в обычных экспериментах на культурах патогенов *in vitro*. Для их поиска в настоящее время инфекции моделируют на целых организмах: нематодах *Caenorhabditis elegans*, плодовых мушках *Drosophila melanogaster* и рыбах *Danio rerio* [4]. Задача состоит в том, чтобы путем скрининга больших библиотек соединений идентифицировать как вещества, ингибирующие активность регуляторов продукции факторов вирулентности определенных возбудителей, так и вещества, активирующие врожденный иммунитет [5].

Скрининг на уровне организма имеет ряд преимуществ, главное из которых – одновременное получение данных об активности и токсичности, что делает переход к другим моделям более линейным. Также расставить приоритеты при отборе потенциальных кандидатов помогают нецелевые эффекты, полная абсорбция, физиологичное распределение, общий метаболизм и учет ранней токсичности *in vivo* [6]. Решением стало использование мелких животных, которые имеют простую биологическую систему, позволяющую реализовывать естественные механизмы заражения в лабораторных условиях. Модельный организм нематода *C. elegans* подходит для высокопроизводительного скрининга благодаря небольшому размеру тела, короткому жизненному циклу и простоте в поддержании культуры.

C. elegans является популярной моделью для генетических и физиологических исследований (рис. 1), однако в последнее время этот организм приобретает все большую значимость в качестве модели для изучения механизмов взаимодействий хозяин–патоген на системном уровне [3, 4].

Впервые микроскопические нематоды *C. elegans* использовали для скрининга антибиотиков в модели инфекции в 2006 году [7]. В первом же исследовании нашли несколько соединений, блокирующих развитие инфекции, но при этом не убивающих патогенные бактерии. Это свидетельствует о способности такой *in vivo* модели выявлять молекулы с альтернативными механизмами действия. Вскоре показали, что *C. elegans* хорошо подходит для моделирования многих инфекций человека как бактериальных, так и грибковых [8], а также может использоваться для изучения внутриклеточных инфекций [9] и биопленок [10].

Опубликованы результаты скрининга и идентификации антимикробных соединений с использованием *C. elegans* [11, 12]. Несколько научных групп, развивающих *in vivo* модели инфекций и технологии скрининга химических библиотек в *C. elegans*,

идентифицировали при помощи этой системы ряд перспективных антимикробных молекул. В частности, обнаружено низкомолекулярное соединение, обеспечивающее защиту нематоды от инфекции *Pseudomonas aeruginosa* за счет активации врожденного иммунитета [13]. В модели инфекции резистентного *Staphylococcus aureus* был открыт новый класс ретиноидных антибиотиков (CD437 и аналоги), эффективных в том числе против бактериальных клеток–персистеров [14].

Нематода *C. elegans* является простой моделью-хозяином для изучения взаимоотношений между врожденной иммунной системой животных и различными патогенами [15]. Для *C. elegans* доступны обширные генетические и молекулярные инструменты, облегчающие углубленный анализ компонентов систем защиты хозяина, общих с млекопитающими, и факторов вирулентности возбудителей.

Изучение ответа *C. elegans* на бактериальные инфекции показало, что иммунная система этого организма использует эволюционно консервативные сигнальные пути и синтезирует ряд эффекторных молекул, часть из которых также консервативна (например, сигнальный путь p38 MAPK) [16]. Несмотря на демонстрацию иммунных ответов на инфекцию, точные паттерн-распознающие рецепторы у *C. elegans* до сих пор не обнаружены.

C. elegans – первый многоклеточный организм, геном которого полностью секвенирован. С помощью биоинформатических подходов выявлена высокая степень сходства (60–80%) многих генов нематоды с генами человека [17], что делает *C. elegans* ценным модельным тест-объектом для изучения токсичности [6]. В результате нематода *C. elegans* стала инструментальной моделью для понимания механизмов молекулярного патогенеза многих заболеваний человека. Врожденный иммунитет *C. elegans* стал предметом для изучения иммунной защиты и роли клеточного стресса в реакции организма на инфекцию, в том числе моделирования активации генов в ответ на инфекцию [18].

МОДЕЛИ БАКТЕРИАЛЬНОЙ ИНФЕКЦИИ В *C. elegans*

C. elegans можно заразить выбранным патогеном, просто заменив им обычный источник пищи, которым в лабораторных условиях может быть, например, штамм *Escherichia coli* OP50, условно непатогенный для этой нематоды. Бактериальное окружение является естественным для нематод [19]. Использование убитых нагреванием бактерий *E. coli* не дает никаких преимуществ перед использованием живых бактерий, так как термодеструкция делает такое питание непривлекательным для нематод, а также не содержит всех питательных ве-

Таблица 1. Основные протоколы заражения нематод

Протокол	Основные характеристики
Slow killing «Медленное уничтожение»	Механизм уничтожения, основанный на инфекционно-подобном процессе, включает установление и пролиферацию возбудителя в кишечнике с образованием биопленок, изучение торможения бактериального патогенеза
Fast killing «Быстрое уничтожение»	Главную роль играет феназин-1-карбоновая кислота, которая в кислой среде крайне токсична для клеток
Liquid killing «Жидкостный протокол»	Создаются условия гипоксии из-за выделяемых эндотоксинов

ненный цикл нематоды (затрудненная дефекация, долгое удерживание яиц, а вследствие этого формирование фенотипа bag of worms – «мешок с червями»). Например, при инфицировании *P. aeruginosa* наблюдается секреция пиовердина, необходимого для пополнения внутриклеточных запасов железа бактерии. Этот сидерофор поглощается *C. elegans* вместе с другими веществами в жидкой среде [29, 30]. Попав в организм хозяина, пиовердин получает доступ к трехвалентному железу и удаляет его [31, 32], что приводит к быстрой клеточной смерти нематоды. Большинство протоколов фиксируют общую токсическую нагрузку, при этом уровень бактериальной нагрузки в пищеварительном тракте нематоды часто не анализируется.

Анализ выживаемости *C. elegans*

Для оценки воздействия патогена или тестируемого вещества используется множество признаков и характеристик нематоды: продолжительность жизни, изгиб тела и его длина, активность глоточного насоса, количество бактерий внутри организма, накопление жировой ткани, изменение целостности вульвы, количество потомков. Проводят также стресс-анализы: анализируют действие теплового, акустического, окислительного стресса, изменения экспрессии генов хозяина и флуоресценции, как результата запуска определенного сигнального пути, измеряют накопление определенных белков [33, 34]. Оценка «средней выживаемости» червей, подвергшихся воздействию определенного бактериального изолята, соответствует показателю бактериальной вирулентности [35]. В ходе таких экспериментов определяют 50% летальное время (LT50) [34].

Продолжительность жизни можно определять как в твердых, так и в жидких средах. Типичный протокол включает подсчет живых и мертвых червей из первоначальной синхронизированной популяции за определенный период времени [6]. Живых и мертвых червей регистрируют по реакции на прикосновение платиновой проволокой, встряхивание или воздействие света, или по сигналу флуоресценции витального красителя (в случае жидких сред).

При недостатке питательных веществ бактерии могут выделять в среду токсичные метаболиты и непосредственно эндотоксины. Анализ выживаемости в данном случае будет иметь многофакторный характер.

В первой работе по использованию *C. elegans* для моделирования инфекций было показано, что рассеянные в лунки планшета с культуральной средой нематоды сохраняют жизнеспособность на протяжении как минимум 14 дней [7]. Что же позволяет нематодам сохранять жизнеспособность? По-видимому, этот эффект достигается за счет одновременного переноса с нематодами бактерий, которыми они питаются, а также достаточного количества питательной среды для поддержания популяции бактерий.

Работа с *C. elegans* начиналась с детального генетического типирования, что позднее, в совокупности с относительной простотой и удобством экспериментальной работы с этой нематодой, привело к тому, что этот объект стал модельным [35]. Изучение взаимодействия хозяина с микроорганизмами на модели *C. elegans* может в конечном итоге дать информацию о том, как микробы влияют на функцию нервной системы у более сложных животных [36], так как неоднократно было продемонстрировано весьма значительное сходство данных, полученных на мышах и нематодах [37, 38].

Результаты, полученные к настоящему времени, указывают на важность накопления большого массива однородных данных. Существует методология массового одновременного наблюдения нематод, которая может помочь в проведении сложных генетических и поведенческих исследований, увеличивая количество фенотипов, которые обнаруживают в настоящее время, используя большие количества наблюдаемых одновременно организмов [39]. Однако данный подход, повышая достоверность результатов, не интенсифицирует процесс тестирования.

Социальное поведение

У нематод, питающихся бактериями на агаре, часто возникает совместное питание, что тоже влияет

на количество и скорость потребляемой бактериальной пищи [21]. Изоляты *C. elegans* дикого типа при выращивании в лаборатории объединяются и питаются группами, в то время как лабораторный штамм N2 питается индивидуально. Наиболее часто встречаемая гипотеза, объясняющая, почему дикие изоляты агрегируют, заключается в том, что агрегация позволяет избежать среды с высоким содержанием кислорода. Патогенные бактерии могут заразить *C. elegans*, прикрепляясь к кутикуле, а коллективное кормление может снизить риск инфекций за счет уменьшения воздействия бактерий на поверхность [40]. Помимо того, на формируемый фенотип влияет наличие и концентрация аскаротидов, важных низкомолекулярных сигналов нематод. Различные комбинации аскаротидов опосредуют разные фенотипы и даже небольшие различия в их химической структуре часто связаны с сильно измененными профилями активности нематод [41].

Пробиотики

C. elegans стала полезной модельной системой для изучения врожденного иммунитета с точки зрения взаимодействия микробиота–хозяин [42]. Молекулярные пути, первоначально запускаемые патогенами, высоко консервативны у самых разных организмов, от насекомых и нематод до млекопитающих [43].

Пробиотиками животных могут быть разнообразные представители микробиома, включая *Bacillus subtilis*, *Lactobacillus* spp., *Pseudoalteromonas* spp. и т.д. [44–46]. Механизмы контроля заболеваний с помощью пробиотиков включают усиление иммунного ответа, конкурентную адгезию, антагонизм к патогенам и нарушение системы QS. Важным способом, с помощью которого пробиотики могут защитить хозяина от патогенных бактерий, является снижение колонизации бактериями кишечника хозяина и ингибирование последующего размножения бактерий, поддерживающее общий баланс состава микробиома кишечника хозяина [47]. Хотя многие исследования показали, что пробиотики обладают антибактериальной и противогрибковой активностью, основной механизм их действия состоит в снижении токсичности, вызванной инфекцией зоонозных патогенов, либо за счет вытеснения патогенов, либо нейтрализации токсичных молекул [48].

Модель *C. elegans* может быть использована не только для тестирования антимикробных препаратов, но и при поиске новых пробиотиков [49–51]. Релевантность *C. elegans* как модельного организма в исследованиях пробиотиков и при выяснении различных молекулярных механизмов связана с высо-

коконсервативными сигнальными путями, аналогичными системам высших млекопитающих [51, 52].

Бактерии, используемые для заражения *C. elegans*

На нематодах хорошо изучены эффекты, оказываемые грамотрицательными *P. aeruginosa* и грамположительными *Staphylococcus aureus* [53, 54], но в последнее время изучение патогенеза и формирования биопленок позволило применить существующие подходы и к другим видам патогенов (табл. 2).

C. elegans способна формировать специфичный ответ на бактериальные патогены на уровне транскриптома. Однако различные бактериальные патогены, включая *Enterococcus faecalis*, *Enterococcus faecium*, *Staphylococcus aureus*, *Serratia marcescens*, *Photobacterium luminescens*, также активируют экспрессию одних и тех же генов врожденного иммунитета [55]. Все упомянутые бактериальные патогены вызывают колонизацию и вздутие просвета кишечника *C. elegans*. Колонизация *P. aeruginosa* приводит к активации генов иммунного ответа и реакции избегания патогенов у *C. elegans*. Раздувание просвета кишечника из-за микробной колонизации активирует гены иммунного ответа и нейроэндокринные пути, вызывая реакцию избегания [56]. Способность выявлять специфично регулируемые гены и метаболические пути у хозяина или патогена может идентифицировать новые метаболиты, продуцируемые бактериями, влияющими на физиологию хозяина [57].

Колонизация несколькими видами бактерий

Микробиота желудочно-кишечного тракта представляет собой сложную микробную экосистему. Влияние конкретных микроорганизмов на сигнальные пути хозяина может быть различным. Все больше данных подтверждают представление о том, что генетически обусловленная изменчивость хозяина определяет обилие конкретных таксонов, проживающих в организме [58]. Так, показана возможность сокультивирования нескольких патогенов в кишечнике нематоды [59]: двух [60] или трех [58] видов бактерий и даже перенести кишечный микробиом человека [61]. Такого рода эксперименты проводят, чтобы выяснить роль межвидовых взаимодействий в формировании микробных сообществ, связанных с хозяином. Экспериментальная микробная экология «снизу вверх» является инструментом для изучения динамики бактериальных сообществ кишечника модельного организма *C. elegans*, позволяя выяснить роль межвидовых взаимодействий в объединенной системе микробиом–хозяин, а также бактериальную конкуренцию в среде *in vivo* [62].

Таблица 2. Примеры работ за последние 10 лет с тестированием различных бактериальных возбудителей в модели инфекции *C. elegans*

Бактериальный патоген	Антибактериальное тестируемое вещество	Тип протокола	Примеры работ
<i>E. coli</i>	-	Liquid killing	[104]
	Бактериофаги		[87]
<i>A. baumannii</i>	Куркумин, флавоноиды	Liquid killing	[105]
	-	Slow killing	[106]
	Библиотека АМП	Liquid killing	[86]
<i>M. nematophilum</i>	-	Формирование фенотипа Dar	[107], [108]
<i>S. typhimurium</i>	-	Liquid killing	[109]
<i>S. aureus</i>	Амоксициклин	Liquid killing	[110]
	Экстракт листьев <i>P. guajava</i>	Liquid killing	[111]
	Ресвератрол, эконозол, параква	Slow killing	[74]
	Библиотека АМП	Liquid killing	[86]
	Panchgavya	Liquid killing	[50]
	<i>Lactobacillus curvatus</i> BGМК2-41	Slow killing	[43]
<i>S. gordonii</i>	-	Slow killing	[112]
<i>L. monocytogenes</i>	-	Slow killing	[113], [114]
<i>P. aeruginosa</i>	Экстракт листьев <i>P. guajava</i>	Liquid killing	[111]
	Комбинация линезолида и полимиксина Б	Liquid killing	[73]
	Пеонол	Liquid killing	[115]
	Библиотека АМП	Liquid killing	[86]
	Бактериофаги	Liquid killing	[87]
	<i>B. megaterium</i> и <i>P. mendocina</i>	Slow killing	[52]
	Гентамицин	Slow killing	[116]
	<i>Holothuria atra</i>	Liquid killing	[117]
<i>Lactobacillus curvatus</i> BGМК2-41	Slow killing	[43]	
<i>S. marcescens</i>	Экстракт листьев <i>P. guajava</i>	Liquid killing	[111]
<i>S. pyogenes</i>	Экстракт листьев <i>P. guajava</i>	Liquid killing	[73]
<i>C. violaceum</i>	Экстракт листьев <i>P. guajava</i>	Liquid killing	[73]
<i>B. thuringiensis</i>	-	Liquid killing	[118]
	Липопептид тумолицин		[119]
<i>B. anthracis</i>	-	Slow killing	[120]
<i>E. faecalis</i>	Библиотека АМП	Liquid killing	[86]
	-	Slow killing	[55]
<i>E. faecium</i>	-	Slow killing	[55]
<i>B. cereacia</i>	-	Slow killing	[121]
<i>E. cloacae</i>	-	Slow killing	[122]
	Бактериофаги	Liquid killing	[87]
<i>B. cereus</i>	Карвакрол	Slow killing	[123]
<i>H. pylori</i>	Экстракт фукоидан	Slow killing	[124]
<i>S. pyogenes</i>	Фукугизид бифлавоноид	Liquid killing	[125]
<i>C. diphtheriae</i>	-	Формирование фенотипа Dar	[126]
<i>C. violaceum</i>	Пеонол	Liquid killing	[115]
<i>K. pneumoniae</i>	Бактериофаги	Liquid killing	[87]
	Линейка антибиотиков		[127]

ДОСТАВКА ЛЕКАРСТВ

Токсикологические тесты

Одним из первых направлений по тестированию веществ с использованием *C. elegans* в качестве модели стала проверка токсичности в жидкой культуре. Такого рода тесты проводили сначала через анализ «живой/мертвый», построение кривых выживаемости «доза–эффект» [63], а затем с помощью поведенческих тестов [63, 64] и оценки конкретных фенотипов [65–67]. В последующих исследованиях было показано, что нематода является подходящим организмом для изучения токсичности, а также для оценки эффективности некоторых лекарственных соединений.

Экспресс-исследования токсичности проводят и в настоящее время [68–70]. Часто использование такой модели позволяет проверить наличие токсической активности у бактерицидных препаратов, эффективность которых уже показана *in vitro* [71]. При этом тестируют не только растворы синтетических соединений [72], но и натуральные экстракты [73], наночастицы [73, 74] и природные изоляты [75, 76]. При помощи данной модели удалось найти способ снижения токсичности криопротектора, используемого в трансплантологии [77].

Скрининг соединений с использованием *C. elegans* позволяет предварительно оценить токсичность препарата, что позволяет исключить соединения, токсичные для хозяина, на ранних стадиях в то время как исследование *in vitro* идентифицирует только бактерицидные или бактериостатические соединения [78]. Нематод использовали в высокопроизводительном скрининге лекарств с целью оценки как токсичности, так и эффективности, этот подход к скринингу был коммерциализирован несколькими компаниями (Nagi Bioscience, *InVivo* Biosystems, Magnitude Biosciences) [79].

Скрининг лекарств

В модели инфекции нематоды существует ограниченный список вариантов доставки тестируемых веществ: доставка смешиванием раствора активного вещества с нематодами в жидкой питательной среде [80] или добавление в твердую среду [81]; доставка смешиванием раствора активного вещества с бактериальным источником питания (в том числе меченые бактерии) [82, 83].

Если рассмотреть такой способ доставки активного вещества, как упаковка его в микро- или наночастицы, то доставка станет одной из самых простых, но эффективных стратегий, которая будет имитировать естественное питание нематод путем

заглатывания частичек микронного размера, похожих на бактерии. При низком содержании пищи в среде нематоды могут снижать уровень накачки глотки, чтобы избежать поглощения непищевых частиц, но при их избытке большое количество инородных частиц все же попадает внутрь [84]. Данный метод позволит адресно доставлять активное вещество к возбудителю без токсического воздействия на ткани. Подобные методы будут полезны и для оценки фармакокинетики природных соединений [32]. Хотя нематоды являются многообещающей модельной системой для скрининга антимикробных соединений, они все же не могут полностью воспроизвести биологию млекопитающих. Например, нематоды обладают эффективной системой детоксикации, которая может ограничивать потенциальную идентификацию соединений, действующих путем модификации защитных систем хозяина [85].

Большое количество разных классов веществ проверяли на токсичность и эффективность в модели *C. elegans* [23–27]. Наиболее широкий спектр разнообразия представлен антимикробными соединениями, так как возможность вызвать инфекционный процесс с помощью разнообразных микроорганизмов у *C. elegans* позволяет получать большое количество тестируемых комбинаций патоген–антимикробный агент даже без учета возможности использования нескольких лекарственных средств одновременно.

C. elegans не имеет профессиональных иммунных клеток. Из-за отсутствия адаптивной иммунной системы эта нематода полагается исключительно на свою врожденную иммунную защиту, чтобы справиться с атакой патогена. В ответ на внешние раздражители запускается каскад реакций, который приводит к выделению антимикробных пептидов (АМП). АМП представляют собой биологически активные молекулы, вырабатываемые самыми разными организмами и являющиеся важным компонентом их врожденного иммунного ответа. Так, проверили действие небольшой библиотеки АМП и получили согласующиеся с общепринятыми данные об эффективности цекропиновых производных [86].

Впервые этот подход применили на модели *C. elegans* в сравнительно низкопроизводительном скрининге 7136 синтетических соединений и экстрактов натуральных продуктов на наличие активности против условного патогена человека *Enterococcus faecalis* [7] и показали, что 12 из них обеспечивали защиту хозяина *in vivo* в значительное более низких концентрациях, чем минимальные ингибирующие концентрации *in vitro*.

Модели заражения *C. elegans* позволяют проводить высокопроизводительный скрининг новых противомикробных молекул. Такого рода молекулы можно использовать в качестве зондов для определения новых механизмов бактериального патогенеза [12]. Показано также, что на этих моделях можно проверять антимикробную активность бактериофагов перед крупномасштабными доклиническими исследованиями на мышах [87]. Перспективным представляется также получение нематод-биосенсоров, реагирующих на изменение состава кишечного микробиома. Создан и биосенсор для анализа взаимодействия хозяина и микробиома в пищеварительном тракте [62].

Существуют работы, посвященные поиску новых веществ биоинформатическими методами в модели *C. elegans*. Например, с помощью базы данных DrugAge получен прогноз влияния некоторых веществ на продолжительность жизни нематод [88]. Такой подход может быть транслирован в предсказание влияния веществ и патогенов на нематоду путем создания базы данных о механизмах их действия. Еще одним способом анализа отклика нематод является оптогенетика. Применение оптических методов позволяет количественно контролировать метаболизм кишечных бактерий для оценки локального и системного влияния тестируемых веществ на здоровье нематод [89].

Микрофлюидные технологии как вариант перехода к персонализированному лечению

Возможность манипулирования одиночными живыми нематодами *C. elegans* при помощи микрофлюидики [76] широко используется в поведенческих исследованиях и микроскопии. Исследования в данной области сконцентрированы на поиске антибиотиков с использованием химических библиотек среднего размера, для чего подходят 384-луночные планшеты. Развитие и поведение *C. elegans* изучают с помощью разнообразных микрофлюидных технологий [78].

Использование любого микрофлюидного чипа обеспечивает низкий расход синтезируемых биоактивных молекул, таких как АМП, а также адресную доставку потенциальных лекарственных средств в небольшом объеме жидкости. Использование технологий микрофлюидных ловушек позволяет исключить влияние нематод друг на друга, поэтому естественным развитием разработанных подходов было бы использование высокопроизводительных микрофлюидных технологий скрининга, позволяющее перейти к анализу больших библиотек активных соединений.

Существующие платформы делятся главным образом на четыре типа: (1) платформы для на-

блюдения времени жизни и старения [90]; (2) платформы для скрининга токсичности и патогенеза; (3) платформы для изучения нейробиологических явлений и поведенческих тестов [91]; (4) платформы для поиска новых лекарственных препаратов. Большинство разработанных микрофлюидных чипов направлено на решение задач сортировки и исследования личиночных стадий нематоды.

Значительные преимущества микрофлюидики привели к разработке устройств для измерения кривых выживания. Показано, что процесс микрофлюидной инкапсуляции нематод в единичных компартаментах не влияет на продолжительность жизни нематод [92]. Аналогичные разработки в сфере микрофлюидных технологий позволяют обеспечить переход от трудоемких экспериментов на чашках Петри к автоматизированным и производительным платформам отбора кандидатов. Побочные продукты метаболизма накапливаются у червей и бактерий, а биологическое состояние бактерий изменяется в ответ на воздействие стрессовых факторов, которое может оказывать вторичное воздействие на червей. Хотя этот эффект можно свести к минимуму за счет периодического перевода животных на новые чашки, физические манипуляции могут привести к дополнительному стрессу и потере части популяции. Возможность точно и быстро контролировать окружающую среду – одно из многих преимуществ микрофлюидных устройств [93]. Также существует ряд ответов на голодание как на фактор стресса. Одной из таких реакций является прекращение яйцекладки во взрослом возрасте. Прекращение яйцекладки приводит к матрицидному внутреннему вылуплению потомства, которое впоследствии мать использует в качестве источника пищи. Такие данные обычно цензурируются при статистической обработке [94].

Применение микрофлюидных технологий решает такие задачи автоматизации, как: (1) программный контроль потоков жидкости, оперирование малыми объемами активных веществ; (2) равномерное дозирование нематод по объему; (3) компарментализация, в том числе путем сортировки, и фенотипическое профилирование отдельных особей; (4) долгосрочное культивирование в относительно постоянных условиях внешней среды; (5) мониторинг в режиме реального времени, отслеживание нескольких контрольных точек.

С помощью микрофлюидного чипа с фильтрацией от потомства можно также обеспечить исследование состаренной популяции без использования стерилизации химическими способами (FUDR) или часто-

го переноса с чашки на чашку, что позволяет избежать использования стерильных штаммов [95]. Имобилизация единичных нематод в канале может служить отличным способом получения изображений высокого разрешения в режиме реального времени [96].

Основным недостатком многих созданных устройств является то, что *C. elegans* плавает в специально спроектированных камерах, подобно жидким культурам в многоруночных планшетах. Физиологически плавание в жидкой культуре более энергозатратно, чем ползание, а также увеличивает период сна, что усложняет процедуру фенотипирования [97]. В то время как личинки *C. elegans* демонстрируют покой во время летаргуса, у взрослых червей покой наблюдается только в нескольких ситуациях, например, после нескольких часов плавания или после воздействия экстремальных условий окружающей среды. В более широком контексте, сон, вызванный потоковыми явлениями, определен как поведение, при котором экспериментально контролируемые внешние воздействия сильно влияют на то, как часто животное переходит между поведенческими состояниями.

Плавающие и ползающие черви демонстрируют существенно разные профили экспрессии генов и продолжительность жизни [98]. Поэтому предполагается, что результаты, полученные с помощью устройств, в которых черви ползают, а не плавают, будут более сопоставимы с результатами, полученными на твердой среде. Проблему отсутствия подвижности у многих особей можно решить, используя свет, стимулирующий к пробуждению и движению [99].

Внедрение микрофлюидных подходов к расширенной визуализации динамики бактериальных колоний и кинетики пищеварения *in vivo* открывает путь к повышению информативности, пропускной способности и универсальности способов, направленных на оценку взаимодействия микробиоты с кишечником *C. elegans*. Микрофлюидные платформы для параллельных исследований на чипе основаны на кормлении червей различными бактериальными штаммами и/или применении противомикробных соединений [100]. Иммунный ответ измеряли по экспрессии гена иммунного ответа *irg-1* и использовали для наблюдения изменений экспрессии при воздействии патогенного бактериального штамма *P. aeruginosa* [101]. Наиболее общим в платформах данного типа является фенотипический анализ особей в режиме реального времени и построение кривых выживаемости по полученным данным [102].

Микрофлюидная технология, позволяющая исследовать бактериальный патогенез, продемонстрирована в системе Celab [102]. Технология совмещает возможности других устройств для проведения высокопроизводительного мониторинга, долгосрочной микрофлюидной инкубации червей, индивидуального отслеживания и полуавтоматических измерений с промывкой потомства и пополнением запасов пищи.

Таким образом, микрофлюидика позволяет проводить «персонализированное» фенотипирование, поскольку микрофлюидные чипы позволяют собирать индивидуальные реакции на протяжении всей жизни червей [103]. Современные микрофлюидные системы включают устранение необходимости повторного перемещения взрослых особей вручную во время тестов на выживаемость, сортировки потомства, а также избегание стресса, вызванного плаванием, на протяжении всей жизни животных, выращенных в жидкости. Таким образом, сокращается общее количество подвергнутых цензуре червей [93].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Модель инфекции в *C. elegans* можно эмпирически использовать как систему хозяин–патоген для определения вирулентности нового патогена при исследовании врожденного иммунного ответа. Большинство работ по изучению кишечной инфекции в *C. elegans* были выполнены с использованием монобактериальной культуры, однако в естественных условиях микробиом представлен сложным консорциумом микроорганизмов. Таким образом, необходимы дальнейшие исследования по сокультивированию нескольких видов.

Логичным продолжением развития рассмотренных в настоящем обзоре технологий станет создание микрофлюидного устройства, обеспечивающего стадию заражения нематод, с последующим тестированием библиотек потенциальных антиинфекционных соединений на уже инфицированных особях. Для создания такого устройства необходимо иметь возможность формирования стабильной инвазивной инфекции в кишечнике нематоды, а также персонализированной доставки тестируемых соединений и наблюдения их действий. Поскольку микрофлюидика масштабируема и адаптируема, микрофлюидное устройство можно использовать не только для фундаментальных исследований патогенеза, но и для высокопроизводительного скрининга молекул-кандидатов.

Перспективным направлением является объединение использования предлагаемой платформы инфицирования и скрининга на *C. elegans* с техно-

логией синтетических библиотек биоразнообразия антимикробных пептидов. Область разработки антимикробных пептидов страдает от отсутствия высокотехнологичной системы высокопроизводительного синтеза и тестирования пептидов-кандидатов. Формирование в *C. elegans* синтетической микро-

биоты продуцентов антимикробных пептидов позволит заполнить этот пробел.

Работа выполнена при поддержке гранта РНФ № 19-14-00331.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Gensini GF, Conti AA, Lippi D. // *Journal of Infection*. 2007. V. 54(3). P. 221-224.
- <https://www.mdpi.com/2075-1729/13/5/1073>. (Accessed August 14, 2024)
- Lewis K. // *Biochemistry (Mosc.)*. 2020. V. 85. № 12. P. 1469-1483.
- Clatworthy A.E., Romano K.P., Hung D.T. // *Nat. Chem. Biol.* 2018. V. 14. № 4. P. 331-341.
- Pujol N., Cypowyj S., Ziegler K., Millet A., Astrain A., Goncharov A., Jin Y., Chisholm A.D., Ewbank J.J. // *Curr. Biol.* 2008. V. 18. № 7. P. 481-489.
- Nass R., Hamza I. // *Current Protocols in Toxicology*. 2007. V. 31. № 1. P. 1.9. 1-1.9. 18.
- Moy T.I., Ball A.R., Anklesaria Z., Casadei G., Lewis K., Ausubel F.M. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2006. V. 103. № 27. P. 10414-10419.
- Powell J.R., Ausubel F.M. // *Methods Mol. Biol.* 2008. V. 415. P. 403-427.
- Balla K.M., Troemel E.R. // *Cell Microbiol.* 2013. V. 15. № 8. P. 1313-1322.
- Desai S.K., Padmanabhan A., Harshe S., Zaidel-Bar R., Kenney L.J. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2019. V. 116. № 25. P. 12462-12467.
- Kim W., Hendricks G.L., Lee K., Mylonakis E. // *Expert Opin. Drug Discov.* 2017. V. 12. № 6. P. 625-633.
- Peterson N.D., Pukkila-Worley R. // *Curr Opin Immunol.* 2018. V. 54. P. 59-65.
- Pukkila-Worley R., Feinbaum R., Kirienko N.V., Larkins-Ford J., Conery A.L., Ausubel F.M. // *PLoS Genet.* 2012. V. 8. № 6. P. e1002733.
- Kim W., Zhu W., Hendricks G.L., van Tyne D., Steele A.D., Keohane C.E., Fricke N., Conery A.L., Shen S., Pan W., et al. // *Nature*. 2018. V. 556. № 7699. P. 103-107.
- Siddhardha B., Dyavaiah M., Syed A., Model organisms for microbial pathogenesis, biofilm formation and antimicrobial drug discovery. Springer Nature, 2020. P. 684.
- Ausubel F.M. // *Nat. Immunol.* 2005. V. 6. № 10. P. 973-979.
- Helmcke K.J., Avila D.S., Aschner M. // *Neurotoxicol. Teratol.* 2010. V. 32. № 1. P. 62-67.
- Kim D.H., Ausubel F.M. // *Curr. Opin. Immunol.* 2005. V. 17. № 1. P. 4-10.
- Khan F., Jain S., Oloketuyi S.F. // *Microbiol. Res.* 2018. V. 215. P. 102-113.
- Stuhr N.L., Curran S.P. // *MicroPubl. Biol.* V. 2023.
- Shtonda B.B., Avery L. // *J. Exp. Biol.* 2006. V. 209. Pt 1. P. 89-102.
- Lee Y.-T., Wang M.C. // *Dev. Cell.* 2019. V. 49. № 1. P. 7-9.
- Walker A.C., Bhargava R., Vaziriyani-Sani A.S., Brust A.S., Czyz D.M. // *Bio Protoc.* 2022. V. 12. № 2. P. e4291.
- Höss S., Römbke J. // *Environ. Sci. Pollut. Res. Int.* 2019. V. 26. № 25. P. 26304-26312.
- Wang L., Graziano B., Bianchi L. // *STAR Protoc.* 2023. V. 4. № 2. P. 102241.
- Wibisono P., Sun J. // *STAR Protoc.* 2022. V. 3. № 3. P. 101558.
- Moore R.S., Kaletsky R., Murphy C.T. // *STAR Protoc.* 2021. V. 2. № 1. P. 100384.
- Manan A., Bazai Z.A., Fan J., Yu H., Li L. // *Int. J. Mol. Sci.* 2018. V. 19. № 12. P. 3915.
- Kang D., Kirienko D.R., Webster P., Fisher A.L., Kirienko N.V. // *Virulence.* 2018. V. 9. № 1. P. 804-817.
- Qi B., Han M. // *Cell.* 2018. V. 175. № 2. P. 571-582.e11.
- Yang Z.-Z., Yu Y.-T., Lin H.-R., Liao D.-C., Cui X.-H., Wang H.-B. // *Free Radic. Biol. Med.* 2018. V. 129. P. 310-322.
- Ha N.M., Tran S.H., Shim Y.-H., Kang K. // *Appl. Biol. Chem.* 2022. V. 65. № 1. P. 18.
- Fayolle M., Morsli M., Gelis A., Chateauraynaud M., Yahiaoui-Martinez A., Sotto A., Lavigne J.-P., Dunyach-Remy C. // *Genes (Basel)*. 2021. V. 12. № 12. P. 1883.
- Caldwell G.A. // *Dis. Model. Mech.* 2023. V. 16. № 6. P. dmm050333.
- Vasquez-Rifo A., Veksler-Lublinsky I., Cheng Z., Ausubel F.M., Ambros V. // *Genome Biol.* 2019. V. 20. № 1. P. 270.
- Caldwell G.A. // *Dis. Model. Mech.* 2023. V. 16. № 6. P. dmm050333.
- Kim D.H., Flavell S.W. // *J. Neurogenet.* 2020. V. 34. № 3-4. P. 500-509.
- Feigman M.S., Kim S., Pidgeon S.E., Yu Y., Ongwae G.M., Patel D.S., Regen S., Im W., Pires M.M. // *Cell Chem. Biol.* 2018. V. 25. № 10. P. 1185-1194.e5.
- Kaito C., Murakami K., Imai L., Furuta K. // *Microbiol. Immunol.* 2020. V. 64. № 9. P. 585-592.
- Perni M., Casford S., Aprile F.A., Nollen E.A., Knowles T.P.J., Vendruscolo M., Dobson C.M. // *J. Vis. Exp.* 2018. № 141. P. 1352-1362.
- Ding S.S., Romenskyy M., Sarkisyan K.S., Brown A.E.X. // *Genetics.* 2020. V. 214. № 3. P. 577-587.
- <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK153595/>. (Accessed December 6, 2024) Kumar A., Baruah A., Tomioka M., Iino Y., Kalita M.C., Khan M. // *Cell Mol. Life Sci.* 2020. V. 77. № 7. P. 1229-1249.
- Dinić M., Jakovljević S., Đokić J., Popović N., Radojević D., Strahinić I., Golić N. // *Sci. Rep.* 2021. V. 11. № 1. P. 21258.
- Roselli M., Schifano E., Guantario B., Zinno P., Uccelletti D., Devirgiliis C. // *Int. J. Mol. Sci.* 2019. V. 20. № 20. P. 5020.
- Sugawara T., Sakamoto K. // *Br. J. Nutr.* 2018. V. 120. № 8. P. 872-880.
- <https://www.mdpi.com/1422-0067/25/1/537>. (Accessed August 14, 2024)
- Li Y.-X., Wang N.-N., Zhou Y.-X., Lin C.-G., Wu J.-S., Chen X.-Q., Chen G.-J., Du Z.-J. // *Mar. Drugs.* 2021. V. 19. № 3. P. 150.
- Wang B., Zhou Y., Wang Q., Xu S., Wang F., Yue M., Zeng Z., Li W. // *Cells.* 2023. V. 12. № 10. P. 1438.
- Wu-Chuang A., Bates K.A., Obregon D., Estrada-Peña A., King K.C., Cabezas-Cruz A. // *Sci. Rep.* 2022. V. 12. № 1. P. 14045.
- Patel P., Joshi C., Funde S., Palep H., Kothari V. // *F1000Res.* 2018. V. 7. P. 1612.

51. Sharma K., Pooranachithra M., Balamurugan K., Goel G. // *Microb. Pathog.* 2019. V. 127. P. 39–47.
52. Mahesh R., Ilangovan P., Nongbri D., Suchiang K. // *Indian J. Microbiol.* 2021. V. 61. № 4. P. 404–416.
53. Matsunami K. // *Front Nutr.* 2018. V. 5. P. 111.
54. Schifano E., Marazzato M., Ammendolia M.G., Zanni E., Ricci M., Comanducci A., Goldoni P., Conte M.P., Uccelletti D., Longhi C. // *Microbiologyopen.* 2019. V. 8. № 6. P. e00756.
55. Yuen G.-J., Ausubel F.M. // *Virulence.* 2018. V. 9. № 1. P. 683–699.
56. Singh J., Aballay A. // *Dev. Cell.* 2019. V. 49. № 1. P. 89–99. e4.
57. Chan J.P., Wright J.R., Wong H.T., Ardasheva A., Brumbaugh J., McLimans C., Lamendella R. // *Sci. Rep.* 2019. V. 9. № 1. P. 5545.
58. Ortiz A., Vega N.M., Ratzke C., Gore J. // *ISME J.* 2021. V. 15. № 7. P. 2131–2145.
59. Herman M.A., Irazoqui J.E., Samuel B.S., Vega N. // *Front. Cell. Infect. Microbiol.* 2022. V. 12. P. 1035545.
60. Pike V.L., Stevens E.J., Griffin A.S., King K.C. // *Parasitology.* 2023. P. 1–8.
61. Walker A.C., Bhargava R., Vaziriyani-Sani A.S., Pourciau C., Donahue E.T., Dove A.S., Gebhardt M.J., Ellward G.L., Romeo T., Czyż D.M. // *PLoS Pathog.* 2021. V. 17. № 5. P. e1009510.
62. Rutter J.W., Ozdemir T., Galimov E.R., Quintaneiro L.M., Rosa L., Thomas G.M., Cabreiro F., Barnes C.P. // *ACS Synth. Biol.* 2019. V. 8. № 12. P. 2620–2628.
63. Peres T.V., Arantes L.P., Miah M.R., Bornhorst J., Schwerdtle T., Bowman A.B., Leal R.B., Aschner M. // *Neurotox. Res.* 2018. V. 34. № 3. P. 584–596.
64. Kudaska M.M., Lewis A., Ng C.T., Doyle D.A., Holden-Dye L., O'Connor V.M., Walker R.J. // *Invert. Neurosci.* 2018. V. 18. № 4. P. 14.
65. Yan J., Zhao N., Yang Z., Li Y., Bai H., Zou W., Zhang K., Huang X. // *J. Biol. Chem.* 2020. V. 295. № 50. P. 17323–17336.
66. Lenz K.A., Miller T.R., Ma H. // *Chemosphere.* 2019. V. 214. P. 60–69.
67. Kim S., Lee J.-H., Kim Y.-G., Tan Y., Lee J. // *Int. J. Mol. Sci.* 2022. V. 23. № 18. P. 10683.
68. Yu Z., Yin D., Hou M., Zhang J. // *Chemosphere.* 2018. V. 211. P. 278–285.
69. Schultz C.L., Lahive E., Lawlor A., Crossley A., Puentes V., Unrine J.M., Svendsen C., Spurgeon D.J. // *Environ. Toxicol. Chem.* 2018. V. 37. № 10. P. 2609–2618.
70. Moyson S., Town R.M., Joosen S., Husson S.J., Blust R. // *J. Appl. Toxicol.* 2019. V. 39. № 2. P. 282–293.
71. Pormohammad A., Firrincieli A., Salazar-Alemán D.A., Mohammadi M., Hansen D., Cappelletti M., Zannoni D., Zarei M., Turner R.J. // *Microbiol. Spectr.* 2023. P. e0062823.
72. Zhou D. // *Environ. Toxicol. Chem.* 2018. V. 37. № 10. P. 2560–2565.
73. Huang T., Zeng M., Fu H., Zhao K., Song T., Guo Y., Zhou J., Zhai L., Liu C., Prithviraj B., et al. // *Ann. Clin. Microbiol. Antimicrob.* 2022. V. 21. № 1. P. 38.
74. Mizdal C.R., Stefanello S.T., da Costa Flores V., Agertt V.A., Bonez P.C., Rossi G.G., da Silva T.C., Antunes Soares F.A., de Lourenço Marques L., de Campos M.M.A. // *Microb. Pathog.* 2018. V. 123. P. 440–448.
75. Moon J., Kwak J.I., An Y.-J. // *Chemosphere.* 2019. V. 215. P. 50–56.
76. Lee S., Kim Y., Choi J. // *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 2020. V. 187. P. 109777.
77. Tedesco P.M., Schumacher G.J., Johnson T.E. // *Cryobiology.* 2019. V. 86. P. 71–76.
78. Mir D.A., Balamurugan K. // *Biofouling.* 2019. V. 35. № 8. P. 900–921.
79. Kukhtar D., Fussenegger M. // *Biotechnol. Bioeng.* 2023. V. 120. № 8. P. 2056–2071.
80. Gemeinder J.L.P., Barros N.R. de, Pegorin G.S., Singulani J. L., Borges F.A., Arco M.C.G.D., Giannini M.J.S.M., Almeida A.M.F., Salvador S.L. S., Herculano R.D. // *J. Biomater. Sci. Polym. Ed.* 2021. V. 32. № 1. P. 93–111.
81. Li J., Chotiko A., Chouljenko A., Gao C., Zheng J., Sathivel S. // *Int. J. Food Sci. Nutr.* 2019. V. 70. № 2. P. 172–181.
82. Qu M., Xu K., Li Y., Wong G., Wang D. // *Sci. Total Environ.* 2018. V. 643. P. 119–126.
83. Yang Y., Xu G., Xu S., Chen S., Xu A., Wu L. // *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 2018. V. 165. P. 291–298.
84. Fueser H., Rauchschwalbe M.-T., Höss S., Traunspurger W. // *Aquat. Toxicol.* 2021. V. 235. P. 105827.
85. Chen J., Yang Y., Yao H., Bu S., Li L., Wang F., Chen F., Yao H. // *Front. Cell Infect. Microbiol.* 2021. V. 11. P. 818308.
86. Jayamani E., Rajamuthiah R., Larkins-Ford J., Fuchs B.B., Conery A.L., Vilcinskis A., Ausubel F.M., Mylonakis E. // *Antimicrob. Agents Chemother.* 2015. V. 59. № 3. P. 1728–1737.
87. Manohar P., Loh B., Elangovan N., Loganathan A., Nachimuthu R., Leptihn S. // *Microbiol. Spectr.* 2022. V. 10. № 1. P. e0139321.
88. Ribeiro C., Farmer C.K., de Magalhães J.P., Freitas A.A. // *Aging (Albany NY).* 2023. V. 15. № 13. P. 6073–6099.
89. Hartsough L.A., Park M., Kotlajich M.V., Lazar J.T., Han B., Lin C.-C.J., Musteata E., Gambill L., Wang M.C., Tabor J.J. // *Elife.* 2020. V. 9. P. e56849.
90. Rezaeianaran F., Gijs M.A.M. // *RSC Adv.* 2023. V. 13. № 25. P. 17230–17243.
91. Katzen A., Chung H.-K., Harbaugh W.T., Della Iacono C., Jackson N., Glater E.E., Taylor C.J., Yu S.K., Flavell S.W., Glimcher P.W., et al. // *Elife.* 2023. V. 12. P. e69779.
92. Wu J., Gao Y., Xi J., You X., Zhang X., Zhang X., Cao Y., Liu P., Chen X., Luan Y. // *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 2022. V. 245. P. 114089.
93. Lee K.S., Lee L.E., Levine E. // *Sci. Rep.* 2016. V. 6. № 1. P. 35862.
94. Banse S.A., Blue B.W., Robinson K.J., Jarrett C.M., Phillips P.C. // *PLoS One.* 2019. V. 14. № 5. P. e0216283.
95. Saberi-Bosari S., Huayta J., San-Miguel A. // *Lab. Chip.* 2018. V. 18. № 20. P. 3090–3100.
96. Levine E., Lee K.S. // *Anim. Cells Syst (Seoul).* 2020. V. 24. № 6. P. 311–320.
97. Rahman M., Edwards H., Birze N., Gabrilka R., Rumbaugh K.P., Blawdziewicz J., Szewczyk N.J., Driscoll M., Vanapalli S.A. // *Sci. Rep.* 2020. V. 10. № 1. P. 16190.
98. Laranjeiro R., Harinath G., Hewitt J.E., Hartman J.H., Royal M.A., Meyer J.N., Vanapalli S.A., Driscoll M. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2019. V. 116. № 47. P. 23829–23839.
99. Gonzales D.L., Zhou J., Fan B., Robinson J.T. // *Nat. Commun.* 2019. V. 10. P. 5035.
100. Viri V., Arweiler M., Lehnert T., Gijs M.A.M. // *Micromachines (Basel).* 2021. V. 12. № 7. P. 832.
101. Midkiff D., San-Miguel A. // *Molecules.* 2019. V. 24. № 23. P. 4292.
102. Sohrabi S., Cota V., Murphy C.T. // *Lab on a Chip.* 2023. V. 12. P. 2738–2757.
103. Atakan H.B., Xiang R., Cornaglia M., Mouchiroud L., Katsyuba E., Auwerx J., Gijs M.A.M. // *Sci. Rep.* 2019. V. 9. № 1. P. 14340.
104. Zhou M., Liu X., Yu H., Yin X., Nie S.-P., Xie M.-Y., Chen W., Gong J. // *Front. Immunol.* 2018. V. 9. P. 1745.

105. Raorane C.J., Lee J.-H., Kim Y.-G., Rajasekharan S.K., García-Contreras R., Lee J. // *Front. Microbiol.* 2019. V. 10. P. 990.
106. Espinal P., Pantel A., Rolo D., Marti S., López-Rojas R., Smani Y., Pachón J., Vila J., Lavigne J.-P. // *Microb. Drug Resist.* 2019. V. 25. № 5. P. 752–760.
107. Gravato-Nobre M.J., Nicholas H.R., Nijland R., O'Rourke D., Whittington D.E., Yook K.J., Hodgkin J. // *Genetics.* 2005. V. 171. № 3. P. 1033.
108. Hodgkin J., Kuwabara P.E., Corneliussen B. // *Curr. Biol.* 2000. V. 10. № 24. P. 1615–1618.
109. Aballay A., Ausubel F.M. // *Curr. Opin. Microbiol.* 2002. V. 5. № 1. P. 97–101.
110. Kong C., Tan M.-W., Nathan S. // *Biol. Open.* 2014. V. 3. № 7. P. 644–655.
111. Patel P., Joshi C., Birdi T., Kothari V. // *F1000Res.* 2019. V. 8. P. 12.
112. Naji A., Houston IV J., Skalley Rog C., Al Hatem A., Rizvi S., van der Hoeven R. // *PLoS One.* 2018. V. 13. № 8. P. e0202233.
113. Ke T., Santamaría A., Tinkov A.A., Bornhorst J., Aschner M. // *Curr. Protoc. Toxicol.* 2020. V. 84. № 1. P. e94.
114. Yang K.H., Yun B., Choi H.J., Ryu S., Lee W.J., Oh M.-H., Song M.-H., Kim J.N., Oh S., Kim Y., et al. // *Food Sci. Anim. Resour.* 2019. V. 39. № 1. P. 84–92.
115. Yang D., Hao S., Zhao L., Shi F., Ye G., Zou Y., Song X., Li L., Yin Z., He X., et al. // *Front. Microbiol.* 2021. V. 12. P. 692474.
116. Chadha J., Ravi, Singh J., Chhibber S., Harjai K. // *Front. Cell Infect. Microbiol.* 2022. V. 12. P. 899566.
117. Wang H., Chu W., Ye C., Gaeta B., Tao H., Wang M., Qiu Z. // *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 2019. V. 103. № 2. P. 903–915.
118. Wan L., Lin J., Du H., Zhang Y., Bravo A., Soberón M., Sun M., Peng D. // *Environ. Microbiol.* 2019. V. 21. № 3. P. 1086–1098.
119. Zheng D., Zeng Z., Xue B., Deng Y., Sun M., Tang Y.-J., Ruan L. // *Microbiol. Res.* 2018. V. 215. P. 22–28.
120. Turner M.J., Cox J.K., Spellman A.C., Stahl C., Bavari S. // *Dev. Comp. Immunol.* 2020. V. 102. P. 103453.
121. Pande A., Veale T.C., Grove A. // *Infect. Immun.* 2018. V. 86. № 9. P. e00322-18.
122. Khan S., Paravastu P., Jha P.N., Marathe S.A. // *Microb. Pathog.* 2020. V. 148. P. 104449.
123. Rajabli N., Williamson L., Nimmer P.S., Kelly-Worden M., Bange J.S., Ho Y., McKillip J.L. // *Int. J. Biochem. Mol. Biol.* 2018. V. 9. № 2. P. 11–21.
124. Palacios-Gorba C., Pina R., Tortajada-Girbés M., Jiménez-Belenguer A., Siguemoto É., Ferrús M.A., Rodrigo D., Pina-Pérez M.C. // *Food Funct.* 2020. V. 11. № 5. P. 4525–4534.
125. Nandu T.G., Subramenium G.A., Shiburaj S., Viszwapriya D., Iyer P.M., Balamurugan K., Rameshkumar K.B., Karutha Pandian S. // *J. Med. Microbiol.* 2018. V. 67. № 9. P. 1391–1401.
126. Chen Y.-W., Ton-That H. // *Curr. Protoc. Microbiol.* 2020. V. 58. № 1. P. e109.
127. Yao H., Xu A., Liu J., Wang F., Yao H., Chen J. // *Front. Pharmacol.* 2022. V. 13. P. 973551.

УДК 616.858-008.6

Особенности метаболомного профиля при болезни Паркинсона и сосудистом паркинсонизме

Е. В. Предтеченская, А. Д. Рогачев*, П. М. Мельникова

Новосибирский национальный исследовательский государственный университет,
Министерство науки и высшего образования Российской Федерации, Новосибирск, 630090
Россия

*E-mail: artrogachev@yandex.ru

Поступила в редакцию 04.09.2024

Принята к печати 21.11.2024

DOI: 10.32607/actanaturae.27511

РЕФЕРАТ Постепенное повышение возраста населения мира подразумевает увеличение распространенности нейродегенеративных заболеваний. Такие заболевания характеризуются прогрессирующей потерей когнитивной и двигательной функций. Ярким примером нейродегенеративного процесса является болезнь Паркинсона, при которой происходит постепенная гибель специализированной нейрональной ткани. Патоморфологически хроническое ишемическое поражение мозга сопровождается обширным процессом комплексной дегенерации, и в 20–30% случаев ее клинической манифестацией является синдром паркинсонизма. При сходстве двух патологий – болезни Паркинсона и сосудистого паркинсонизма – их этиопатогенез принципиально различается, но набор дифференциально-диагностических признаков ограничен лишь некоторыми особенностями неврологического статуса. На настоящий момент не существует диагностического маркера как отдельных нейродегенеративных патологий, так и явления нейродегенерации в целом. Перспективным методом поиска уникального «отпечатка» заболевания может быть определение метаболомного профиля. Нахождение биомаркеров различных нейродегенеративных заболеваний поможет сократить время постановки диагноза, спрогнозировать течение заболевания, персонализировать терапевтическую тактику. В представленном обзоре суммированы и сопоставлены современные представления о метаболомных исследованиях болезни Паркинсона и синдрома сосудистого паркинсонизма, а также соответствующих животных моделей.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА метаболомика, масс-спектрометрия, биомаркер, болезнь Паркинсона, сосудистый паркинсонизм.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ БП – болезнь Паркинсона; ВЭЖХ/МС – высокоэффективная жидкостная хроматография–масс-спектрометрия; ГЭБ – гематоэнцефалический барьер; ЖХ/МС – жидкостная хроматография–масс-спектрометрия; МРТ – магнитно-резонансная томография; СМЖ – спинномозговая жидкость; СП – сосудистый паркинсонизм; ЦНС – центральная нервная система; ЦВЗ – цереброваскулярные заболевания.

ВВЕДЕНИЕ

Нейродегенеративные заболевания – одна из наиболее частых причин инвалидизации населения в развитых странах. С ростом благосостояния населения планеты увеличивается и продолжительность жизни человека, при этом также растут и требования к качеству жизни. Нейродегенерация также является неотъемлемой частью процессов старения, виновником функциональной несостоятельности человека, утраты когнитивных способностей. Болезнь Паркинсона (БП) – мультисистемное нейродегенеративное заболевание, при котором развиваются моторные (гипокинезия, тремор и мышечная ригидность) и немоторные нарушения (брадипсихия).

Патогенетический процесс БП характеризуется разрушением преимущественно дофаминергических нейронов черной субстанции, однако в процесс повреждения также включено множество разнообразных структур центральной нервной системы. Такое масштабное нейродегенеративное поражение приводит к выраженному неврологическому дефициту, что проявляется существенной социальной и бытовой дезадаптацией пациентов [1–3].

Синдром сосудистого паркинсонизма (СП) клинически описывается как симметричный паркинсонизм нижней части тела с постуральной неустойчивостью, замираниями и высокой частотой падений [4]. При этом не существует клиническо-

го симптома, патогномоничного именно для СП. Патолофизиологической основой СП являются длительно существующие различные цереброваскулярные заболевания (ЦВЗ), наиболее частые из которых – микроангиопатии на фоне длительного анамнеза артериальной гипертензии [5]. При визуализации головного мозга СП ассоциируется с наличием гиперинтенсивности белого вещества или мультиинфарктов в базальных ганглиях и подкорковых областях [6, 7]. ЦВЗ характеризуются вовлечением в дегенеративный процесс всего вещества головного мозга – нейронной и ненейронной ткани, что на уровне патологических процессов означает формирование комплексной постишемической нейродегенерации [8].

Таким образом, при значительной актуальности влияния нейродегенеративных процессов на жизнь современного человека диагностика таких заболеваний зачастую вызывает затруднения. В настоящее время не существует ни одного специфического диагностического лабораторного маркера как для нейродегенерации в целом, так и для нейродегенеративных заболеваний в частности. Так, в неврологической практике дифференциальная диагностика БП и СП происходит на основании только клинической картины, что часто недостаточно.

В данном обзоре рассмотрены особенности изменений метаболомного профиля при БП и СП. Метаболомный анализ – перспективный метод исследования, позволяющий как получить данные о биохимических изменениях, происходящих при патологическом процессе, так и выявить возможные биомаркеры заболевания. Такие данные могут не только углубить фундаментальное представление о патогенезе паркинсонических расстройств, но и предложить вероятные диагностические инструменты для практического применения.

МЕТАБОЛОМНЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ В ПОИСКЕ БИОМАРКЕРОВ

Метаболомика – это систематическое исследование всех метаболитов, присутствующих в биологической системе, которая состоит из массы молекул, обладающих различными физическими и химическими свойствами и существующих в обширном динамическом диапазоне. Благодаря общему анализу метаболитов можно углубить знания о физиологическом, патологическом и биохимическом статусе, которые затем можно комбинировать с химическими и информатическими методами [9].

Метаболиты – это не только эндогенные вещества организма, к ним можно отнести также продукты метаболизма фармацевтических препаратов, химических веществ окружающей среды, а также,

например, продукты взаимодействия хозяйского организма и микробиоты его кишечника. Даже незначительные изменения эндогенных и экзогенных факторов могут отражаться на уровне метаболитов. Таким образом, метаболомика имеет огромный потенциал для выявления связи генетических, экологических и физиологических элементов с конкретными патологическими состояниями [10].

Метаболомные исследования могут помочь улучшить понимание механизмов заболевания и эффектов терапии, а также позволяют прогнозировать индивидуальное прогрессирование заболевания.

ПАТОГЕНЕТИЧЕСКИЕ ПУТИ БОЛЕЗНИ ПАРКИНСОНА

В основе БП лежит прогрессирующая дегенерация нигростриарного дофаминергического пути с существенной потерей нейронов компактной части черной субстанции (*substantia nigra pars compacta*) и истощением запасов дофамина. Помимо расстройств, возникающих в нигростриарной системе, нейродегенеративный процесс при БП поражает множество отдельных групп нейронов, расположенных в определенных частях коры головного мозга, таламусе, стволе, спинном мозге, а также в симпатических и парасимпатических ганглиях. Таким образом, вырождаются и погибают не только нигральные нейроны, но и нейроны, расположенные в экстраингидральном участке [11]. Нейродегенерация, по мнению Braak и соавт., развивается по определенным морфологическим стадиям: от первичного поражения ядер блуждающего нерва и обонятельной луковицы до постепенной гибели нейронов компактной зоны черной субстанции. Эта последовательность согласуется и с развитием клинических симптомов БП от вегетативных расстройств до моторных и когнитивных нарушений [12]. При этом необходимо отметить, что ранние клинические признаки заболевания возникают лишь после потери 60–80% нейронов черной субстанции [13], что обуславливает тяжесть дальнейшего протекания патологического процесса.

Этиология и патогенез БП еще требуют детального изучения, однако известно, что в них вовлечено множество предрасполагающих факторов (прежде всего, генетических) и патогенных путей. К последним относятся:

- 1) формирование патологического специфического α -синуклеина в форме телец Леви или нейритов Леви;
- 2) окислительный стресс, связанный с дисфункцией митохондрий;
- 3) протеолитический стресс, обусловленный дисфункцией убиквитин-протеасомной системы;
- 4) местное воспаление [11, 14].

Вероятно, ни один из перечисленных механизмов не действует сам по себе, а напротив, они усиливают действие друг друга. Более того, каждый из названных путей может привести к активации внутриклеточного аппарата апоптоза, что является последним общим механизмом потери нейронов при БП.

Молекула нативного α -синуклеина в головном мозге в основном развернута и не имеет определенной третичной структуры. При взаимодействии с отрицательно заряженными липидами, такими как фосфолипиды (компоненты клеточных мембран), α -синуклеин (α -Syn) приобретает богатую β -слоями амилоидоподобную структуру, которая склонна к агрегации [15]. В свою очередь, образование α -Syn приводит к ингибированию процессов потенциации в митохондриях, что вызывает их дисфункцию, связанную с I-комплексом, компонентом цепи переноса электронов [16]. По этой и, вероятно, другим причинам у пациентов с БП в области черной субстанции наблюдаются многочисленные признаки окислительного стресса. В частности, это проявляется снижением уровня внутренних антиоксидантов (например, глутатиона), в то время как содержание продуктов окисления белков, липидов и ДНК значительно увеличивается. Таким образом, теории накопления α -синуклеина и митохондриального стресса оказываются связанными [17].

Другой важный ключ, открывающий значимость митохондрий в патогенезе болезни, заключается в том, что многие из известных генов, вызывающих семейную БП, участвуют в митохондриальном гомеостазе. К таким генам относятся известные гены *PINK1/Parkin*, участвующие в пути регуляции дисфункциональных митохондрий – процессе, называемом митофагией [18].

Помимо митохондриальной дисфункции, при БП также наблюдается аномалия системы выведения белков. Внутри клеток есть две центральные системы, ответственные за удаление дисфункциональных белков: убиквитин-протеасомная система и аутофагия-лизосомный путь. Мономерный α -Syn обычно очищается обеими системами, и повреждение любого из данных механизмов вовлечено в патогенез БП, так как способствует накоплению дефектных белков, к которым относятся и неправильно свернутый α -Syn [19].

МЕТАБОЛОМНЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ БОЛЕЗНИ ПАРКИНСОНА

Метаболом БП изучают с использованием как не-таргетированных, так и таргетированных аналитических подходов. Подходы первого типа заключаются в широкомасштабном скрининге метаболитов с последующим поиском биомаркеров среди зара-

нее неизвестных метаболитов, тогда как подходы второго типа основаны на анализе и оценке ряда представляющих интерес метаболитов, например, катехоламинов, аминокислот, пуринов и уратов. Большинство метаболомных исследований основано на анализе спинномозговой жидкости (СМЖ) и крови, хотя в некоторых исследованиях изучали другие биологические образцы, такие как моча, кал пациентов или ткань головного мозга.

Метаболомные исследования спинномозговой жидкости при болезни Паркинсона

Нарушение состава СМЖ напрямую связано с патологическими изменениями в головном мозге, что делает СМЖ одним из предпочтительных образцов для нейропатологических исследований. Учитывая заметное истощение нигростриарной дофаминергической нейротрансмиссии у пациентов с БП, измерение уровней дофамина и его метаболитов могло бы установить потенциальные маркеры стадии патофизиологического процесса болезни. Однако необходимо учитывать, что такие соединения могут быть достоверно обнаружены только у пациентов, не принимающих препараты L-дофы. Так, одним из маркеров изменения метаболизма дофамина при БП является снижение уровня дигидроксифенилуксусной кислоты (ДФУ) [20]. Кроме того, показана возможность определения ДФУ как маркера ранних стадий заболевания [21]. В качестве биомаркера БП рассматривается не только ДФУ, но и гомованилиновая кислота (ГВК, основной катаболит дофамина), однако на данный момент она считается менее надежным маркером обмена центрального дофамина по сравнению с ДФУ [22]. В исследовании Trupp M. и соавт. описано снижение уровня 3-гидроксиизовалериановой кислоты в СМЖ пациентов с БП [23]. Интересно, что 3-гидроксиизовалериановая кислота подвергается деградации при помощи того же фермента, что и тирозин (предшественник L-дофы). В этом же исследовании дополнительно описано снижение уровней триптофана и креатинина при БП.

Интерес представляют также пурины, циркулирующие в СМЖ пациентов с БП. LeWitt P. и соавт. рассматривали изменение уровней ксантина (предшественника уратов) при БП и показали, что соотношение ксантина и гомованилиновой кислоты в СМЖ может быть и признаком самого заболевания, и биомаркером тяжести состояния пациента [24].

Анализ метаболома СМЖ пациентов с БП показал изменение метаболизма аминокислот глицина, серина и треонина [25]. Обнаружены различия в содержании таких метаболитов, как саркозин и альфа-N-фенилацетил-L-глутамин, в плазме крови и СМЖ при БП и у здоровых доноров. Эти со-

единения участвуют в ответе на окислительный стресс в метаболических путях сфинголипидов, глицерофосфолипидов и аминокислот и могут помочь в диагностике ранней стадии БП. Связь метаболических путей окислительного стресса с БП подтверждается также изменением профиля трикарбоновых кислот, что указывает на развитие митохондриальной дисфункции при данном заболевании [26]. В этом же исследовании обнаружено изменение липидного профиля у пациентов с БП: повышение уровня средне- и длинноцепочечных жирных кислот, а также изменение обмена диацилглицерола, фосфатидилхолина и фосфатидилэтаноламина.

Метаболомные исследования плазмы крови при болезни Паркинсона

Метаболомные исследования плазмы крови становятся все более предпочтительными из-за их минимальной инвазивности отбора и относительно легкой доступности образцов крови. В качестве потенциальных биомаркеров плазмы крови при БП рассматривают различные аминокислоты, жирные кислоты, ацилкарнитины, липиды, пурины, органические кислоты, которые являются компонентами пути энергетического метаболизма, реакций окислительного стресса, а также путей метаболизма, специфичных только для БП.

Изменение метаболитов кинуренина при БП описано Chang К.Н. и соавт., которые не только рассматривают данные соединения в качестве потенциального пула биомаркеров заболевания, но и открывают новую стратегию терапии с добавлением кинуреновой кислоты или снижением содержания хинолиновой кислоты при помощи ингибиторов кинуренин-3-монооксигеназы [27]. Кроме того, Havelund J.F. и соавт. показано, что метаболизм кинуренина также связан с развитием L-дофа-индуцированной дискинезии, а повышенное соотношение 3-гидроксикинуридина и кинуреновой кислоты в плазме крови может предсказывать возможное прогрессирование дискинезии [28].

Существуют исследования, указывающие на ураты как на многообещающий биомаркер риска, диагностики и прогноза БП. Сообщалось о значительном снижении их содержания как в СМЖ, так и в крови при БП по сравнению с контролем, а высокий уровень уратов может указывать на более низкий риск и более медленное развитие заболевания. Повышенный уровень этих метаболитов, являющихся важными биогенными антиоксидантами, может способствовать борьбе с окислительным стрессом в патогенезе БП. Предложены различные механизмы, объясняющие парадоксальные эффекты мочевой кислоты, но ее значение как причинного, ком-

пенсаторного или случайного фактора риска все еще не ясно. Показано, что высокий уровень мочевой кислоты играет важную роль в предотвращении включения дофаминергических клеток в патофизиологию БП благодаря функции эндогенного антиоксиданта [29]. LeWitt P.A. и соавт. обнаружили изменение профиля метаболитов кофеина при прогрессии БП, а также снижение уровня инозина в плазме пациентов с БП [24]. Выявлены различия в уровне мочевой кислоты и профиле пуринов при БП с мутацией в гене *LRRK2* и у здоровых доноров [30].

Потенциальным метаболомным маркером БП может быть изменение профиля желчных кислот. Например, Shao Y. и соавт. обнаружили повышение содержания ряда желчных кислот (в том числе ассоциированных с микробиотой) у пациентов с БП [31]. Изменение профиля желчных кислот показано и при мутации в гене *LRRK2*, и при идиопатической БП наряду с изменением профиля пуриновых оснований [32].

Как упоминалось ранее, БП является многофакторным заболеванием с убедительными эпидемиологическими данными, которые предполагают возможную связь между черепно-мозговой травмой (ЧМТ) и возникновением паркинсонического синдрома. С использованием метода ВЭЖХ/МС наблюдали изменение уровня глутамата в образцах плазмы крови как при ЧМТ, так и при БП, что указывает на возможную «эксайтотоксическую» связь глутамата в их патогенезе [33].

Благодаря метаболомному подходу можно также выявить биомолекулярные и метаболические изменения, влияющие на возникновение и прогрессирование заболевания. Например, изменения в метаболизме спермидина и уровень N1,N8-ацетилспермидина может быть прогностическим маркером прогрессирования БП, что может обеспечить новую стратегию для отсрочки или замедления ее прогрессирования [34]. Показана высокая корреляция между содержанием аланина, метионина, серина, пурина, ряда жирных кислот, полиаминов, метаболитов триптофана и прогрессированием БП [23, 35, 36].

Потенциальными маркерами окислительного стресса и митохондриальной дисфункции при БП могут быть ацилкарнитины. Так, изменение профиля ацилкарнитинов может указывать на ранние стадии БП [37]. Кроме того, обнаружены различия в профиле ацилкарнитинов у пациентов с БП и с эссенциальным тремором [38].

Метаболомные исследования болезни Паркинсона на экспериментальных моделях

Для изучения БП созданы различные типы животных моделей, однако только некоторые из них

использовались в метаболомных исследованиях. Например, такие модели включают нокаут α -Syn, трансгенные α -Syn, сверхэкспрессию α -Syn, нокаут *Park2*, а также токсикологические модели. Метаболический профиль экспериментального заболевания изучали в основном на ткани головного мозга животных, что лучше отражает патофизиологические изменения, но имеет понятные ограничения в интерпретации аналогичных процессов при БП у людей.

Farmer K. и соавт. показали значительное изменение уровня липидов (классов фосфатидилхолина и лизофосфатидилхолина) в тканях мозга на токсически индуцированной введением 6-гидроксидопамина модели БП. Полученные данные могут быть объяснены повышенным окислительным повреждением липидов, а также указывают на важную структурную и нейрофункциональную роль данных молекул [39].

Другое исследование тканевого метаболома мозга, проведенное на модели БП, полученной путем односторонней инъекции предварительно сформированных фибрилл α -синуклеина в обонятельную луковицу, показало дисрегуляцию метаболизма таурина и гипотаурина, биосинтеза желчных кислот, метаболизма глицина, серина и треонина и цикла трикарбоновых кислот, которая коррелировала с возникновением и прогрессированием патологического α -Syn [40]. Теоретически, с возникновением данных агрегатов α -Syn подавляются метаболические пути глицина, серина и треонина (в нормальной нервной ткани данные вещества могут превращаться в креатин, являющийся донором фосфатных групп для АТФ).

В работе А. Ким и соавт. показано снижение концентрации L-3,4-дигидроксифенилаланина (L-DOPA) и дигидроксифенилуксусной кислоты (ДФУ) у мышей при доклинической продромальной стадии БП, индуцированной 1-метил-4-фенил-1,2,3,6-тетрагидропиридином (МФТП) [41]. Теоретически такие изменения могут выступать в роли биомаркеров «пресимптоматической» стадии БП. Другими потенциальными маркерами БП могут быть 5'-метилтиоаденозин, тетрадеканойлкарнитин, фитосфингозин-1-Р, церамид d18:0/18:0, лизофосфатидилхолин 20:4(5Z,8Z,11Z,14Z), L-пальмитойлкарнитин, тетракозаноилглицин, морфицептин и стеаройлкарнитин, изменение в содержании которых обнаружено при изучении среднего мозга в мышечной модели, также индуцированной МФТП [42].

Методом ЯМР Z. Lu и соавт. выявили у золотых рыбок с МФТП-индуцированной БП метаболиты, участвующие в процессах окислительного стресса, энергетической недостаточности, повреждении

нейронов [43]. Характерным для этой модели оказалось повышение уровня аминокислот лейцина, изолейцина, валина, аланина, а также аланилаланина, креатинина, мио-инозитола, жирной кислоты 18:2 и общего количества жирных кислот с одновременным снижением уровня N-ацетиласпартата, фосфокреатина, фосфохолина, бетаина, глутамина, 3-гексендиоата, ацетамида, малоната, изоцитрата, сциллоинозитола, фосфатидилхолинов, холестерина, омега-3-жирных кислот и полиненасыщенных жирных кислот в мозге золотых рыбок. При помощи метода ЯМР показано чрезмерное повышение активности глутамат-глутаминового цикла в стриатуме мышей, обработанных МФТП [44]. В работе D. Pedro Amorim Neto и соавт. на аналогичной мышечной модели при использовании ЯМР показано изменение метаболического профиля не только в тканях, связанных с мозгом, но и в периферических структурах, таких как кишечник [45]. Экспрессия метаболитов в образцах крови, мозга, толстого кишечника и фекалий в основном отражала воспалительные аспекты, цитотоксичность и митохондриальные нарушения (окислительный стресс и энергетический метаболизм). Изучение мышей с симптомами БП и дисбиозом кишечника, вызванными МФТП, показало, что биомаркерами, характерными для такого поражения, являются 67 молекул, связанных с метаболизмом липидов и аминокислот [46].

Необходимо также отметить возможность контроля фармакологического эффекта различных лекарственных средств против БП на животных моделях при помощи методов метаболомики. Так, например, на МФТП-индуцированных моделях БП показано влияние различных терапевтических средств на регуляцию метаболизма аминокислот, ненасыщенных жирных кислот [47], пуринов, глицерофосфолипидов [48], а также нейропротекторное влияние лекарственных средств посредством модуляции оси микробиота – метаболиты кишечника [49–52].

ПАТОГЕНЕТИЧЕСКИЕ ПУТИ СОСУДИСТОГО ПАРКИНСОНИЗМА

Патогенетические нарушения, приводящие к СП, связаны, прежде всего, с кардиоцереброваскулярными факторами риска, к которым относятся: гипертоническая болезнь, гиперхолестеринемия, сердечно-сосудистые заболевания, сахарный диабет типа 2, пожилой возраст [7]. Эти факторы вызывают цереброваскулярные нарушения и влияют на работу сосудов головного мозга (болезнь малых сосудов). Так, артериальная окклюзия, развивающаяся на фоне перечисленных причин, будет вызывать различные поражения в базальных ганглиях,

Таблица 1. Потенциальные метаболомные маркеры болезни Паркинсона

Исучаемая среда	Клиническая стадия заболевания	Получение пациентами специализированной терапии	Найденные биомаркеры	Ссылка
СМЖ	н/у	Нет	ДФУ, ГВК	[20]
СМЖ	н/у	Нет	ДФУ	[21]
СМЖ	н/у	н/у	3-гидроксиизовалериановая кислота, триптофан	[23]
СМЖ, плазма крови	Ранние стадии (1–2 по Хену и Яру)	Нет	Отношение ксантин/гомованилиновая кислота (СМЖ), метаболиты кофеина и инозин (плазма)	[24]
СМЖ	Различные стадии (1–4 по Хену и Яру)	Да	Глицин, серин, треонин	[25]
СМЖ	н/у	Да	Профиль трикарбонных кислот, средне- и длинноцепочечных жирных кислот, диацилглицерол, фосфатидилхолин, фосфатидилэтанолламин	[26]
Плазма крови	Различные стадии (1–4 по Хену и Яру)	Да	Кинурениновая кислота; отношение кинурениновая кислота/кинуренин, хинолиновая кислота (поздние стадии)	[27]
Плазма крови	н/у	Да	Соотношение 3-гидроксикинуренин / кинуреновая кислота, 5-гидроксириптофан	[28]
Плазма крови	н/у	Да	Мочевая кислота (БП, LRKK), гипоксантин (БП)	[30]

Примечание: н/у – не указано в оригинальной статье.

в мосте, лакунарные инфаркты в белом веществе, церебральную микроангиопатию, нарушение эндотелиальных плотных контактов и разрушение ГЭБ. Такие нарушения будут ключевыми в патогенезе сосудистой ишемии [53]. Кроме того, на аутопсиях при СП наблюдались такие изменения мелких сосудов, как глиоз, периваскулярная бледность, гиалиновый артериолосклероз и, особенно, увеличенные периваскулярные пространства [54].

Появляется все больше доказательств того, что сосудистые факторы риска способствуют развитию нейродегенерации. Под их влиянием нарушаются структура и функция церебральных сосудов и связанных с ними клеток, так называемой нейроваскулярной единицы. Нейроваскулярная единица включает в себя нейроны, глию, периваскулярные и сосудистые клетки, которые работают в тесной взаимосвязи для поддержания гомеостаза микроокружения головного мозга. Эта структура регулирует кровоток, контролирует обмен через ГЭБ, способствует иммунному надзору в мозге и обеспечивает трофическую поддержку. Гемодинамические изменения влияют на структуру нейрососудистого аппарата, что приводит к его дисфункции [53]. Патоморфологически данное явление будет характеризоваться утолщением матрикса сосудистой стенки, нежелательным накоплением коллагена,

коллапсом гладких мышц и сужением просвета сосуда [55]. Повреждение нейрососудистой системы изменяет регуляцию мозгового кровотока, истощает резервы кровоснабжения, нарушает ГЭБ и снижает восстановительный потенциал мозга – данные эффекты вторично усиливают ишемию и сопутствующую нейродегенерацию, замыкая патологический порочный круг [56]. Таким образом, нейродегенерация при СП будет иметь вторичный характер вследствие влияния гипоксии на всю нервную ткань: не только на нейроны, но и на глиальные клетки.

Влияние хронической ишемии на нервную ткань характеризуется прежде всего возникновением окислительного стресса и воспаления. Нарушения в окислительно-восстановительном состоянии клеток, возникающие вследствие ишемии, могут вызывать токсические эффекты за счет образования пероксидов и свободных радикалов, которые повреждают почти все компоненты клетки, включая белки, липиды и ДНК [8]. Хроническая ишемия также вызывает дисфункцию митохондрий и ингибирование синтеза белка, что может нарушить баланс антиоксидантов и активных форм кислорода. Такое окислительное повреждение эндотелиальных клеток сосудов, глии и нейронов может привести к дальнейшему нарушению функций сосудов и межклеточных взаимодействий между нейронами,

астроцитами и микрососудами с последующим снижением церебральной перфузии [57].

Экспериментальной моделью хронической ишемии на лабораторных животных является постоянный двусторонний стеноз сонных артерий. Так, на крысиной модели показано возникновение синаптической дисфункции в гиппокампе, связанной с нарушением когнитивных способностей [58]. Показано также снижение уровня пируватдегидрогеназы и увеличение окислительного стресса, что говорит о влиянии дефицита митохондриальной энергетики на память [59].

Обширное повреждение белого вещества головного мозга наблюдается также при хронической артериальной окклюзии. Степень ишемического поражения положительно коррелирует с вовлечением в патологический процесс белого вещества, причем его наибольшее структурное повреждение отмечается в области мозолистого тела [60]. Дисфункция белого вещества связана с активацией глиальных клеток – с одной стороны, глиальные клетки активируются сразу же в ответ на повреждение белого вещества окислительным стрессом, а с другой, повреждение ГЭБ облегчает проникновение клеток иммунной системы и высвобождение огромного числа провоспалительных цитокинов, а также сериновых протеаз, матриксной металлопротеиназы 2, эластазы, коллагеназы [55]. Эти высвобождающиеся компоненты повреждают внеклеточный матрикс, вызывают ремоделирование стенок сосудов, что в конечном итоге приводит к повреждению и еще большему разрушению ГЭБ и белого вещества. Отметим, что после аксонального повреждения (белого вещества), вызванного разрушением афферентных связей нервных клеток, или их ретроградного повреждения будет происходить апоптоз самих нейронов. Кроме того, проникающие в белое вещество провоспалительные цитокины нарушают сигнализацию факторов роста, вызывая состояние «резистентности к нейротрофинам». Потеря трофической поддержки может препятствовать пролиферации, миграции и дифференцировке клеток-предшественников олигодендроцитов и нарушать восстановление белого вещества. На месте повреждений будут возникать глиальные рубцы [61]. Таким образом, для хронической ишемии характерны атрофия корковых нейронов и уменьшение объема коры всего мозга, а также отек и повреждение белого вещества в виде демиелинизации, апоптоза олигодендроцитов и атрофии, пролиферации глии в виде астроцитоглиоза [62].

В других исследованиях ведущая роль в патофизиологии хронической ишемии отдается эндотелиальной дисфункции, которая снижает способность сосудов реагировать на изменения церебральной

гемодинамики. Обусловленное этим нарушение нейрососудистой связи приводит к преходящей или хронической гипоперфузии головного мозга [63]. Эндотелиальные клетки способны распознавать иммунные сигналы и экспрессировать молекулы адгезии (Р- и Е-селектин, молекулы межклеточной адгезии, адгезии сосудистых клеток и т.д.), которые узнают определенные молекулы на циркулирующих иммунных клетках, что приводит к трансмиграции этих клеток в мозг [64]. Цитокины, вырабатываемые периваскулярными макрофагами, эндотелием и глией, регулируют экспрессию молекул адгезии, других цитокинов и хемокинов и способствуют перемещению лейкоцитов через ГЭБ [65]. Этот процесс важен как для иммунного надзора в нормальном мозге, так и для иммунного ответа мозга на травму. Кроме того, эндотелиальная дисфункция, вызванная окислительным стрессом, может привести к высвобождению фактора роста сосудистого эндотелия (vascular endothelial derived growth factor, VEGF) и простаноидов, которые способствуют утечке активных веществ через эндотелий и воспалению [66]. Экстравазация белков плазмы также вызывает воспаление сосудов, окислительный стресс, периваскулярный отек и аксональную демиелинизацию. Однако наиболее вероятно, что описанные процессы – артериальная окклюзия, нарушение микроциркуляции головного мозга, повреждение ГЭБ и эндотелиальная дисфункция – это параллельно идущие процессы, усугубляющие действие друг друга.

Вероятные маркеры сосудистого паркинсонизма в рамках метаболомных исследований различных цереброваскулярных заболеваний

Метаболомные исследования сосудистого паркинсонизма весьма ограничены, поэтому в обзоре обсуждаются данные о метаболомном профиле при цереброваскулярных заболеваниях как основы для развития СП. В качестве биомаркеров ЦВЗ в экспериментах рассматриваются многочисленные метаболиты – от низкомолекулярных (аминокислот, нуклеотидов и других продуктов нарушенных метаболических путей) до групп белков, ответственных за целый ряд функций организма.

Многие метаболомные исследования направлены на поиск связи известных структурных изменений при ЦВЗ и приводящих к ним метаболических путей. Так, частым признаком ЦВЗ на изображениях МРТ является гиперинтенсивность белого вещества. В одном из исследований метаболитов плазмы крови пациентов с гиперинтенсивностью белого вещества по данным МРТ, но не имеющих диагностированного ишемического инсульта или транзиторных ишемических атак, показана связь сфинголипидов

с выраженностью изменений на МРТ [67]. С помощью метода ВЭЖХ/МС найдены два таких метаболита – сфингомиелин 38:1 (SM 38:1) и церамид 34:1 (Cer 34:1). И церамиды, и сфингомиелины являются компонентами липидных оболочек, которые играют ключевую роль в поддержании структуры миелина. Предполагается, что данные молекулы могут быть специфическими биомаркерами повреждения белого вещества головного мозга, а также могут отражать прогрессию ЦВЗ по степени вовлечения белого вещества в патологический процесс.

Данные другого исследования, объединившего методы ВЭЖХ/МС и ЯМР, показали более высокие уровни креатина, ненасыщенной кислоты 18:2(ОН) и сфингомиелина (d18:2/24:1), связанные с большим количеством лакун, повреждением белого вещества на МРТ и ухудшением когнитивных способностей [68]. Повышенный уровень семи аминокислот и нуклеотидов (N1-ацетилспермидин, N-ацетилпутресцин, изолейцин, креатинин, креатин, цитозин и 5'-метилтиоаденозин) был ассоциирован с возникновением схожих повреждений. Низкие уровни ряда сфингомиелинов и глицерофосфолипидов в сыворотке крови были маркерами большего повреждения белого вещества, большей атрофии мозга и ухудшения познавательных способностей.

You Q. и соавт. обнаружили в плазме крови пациентов 276 сфинголипидов, включая 39 церамидов (Cer), 3 церамидфосфата, 72 гликоцилинголипида и 162 сфингомиелина (SM), уровень которых отличался от уровня в группе контроля [69]: Cer (d36:3), Cer (d34:2), Cer (d38:6) и др. повышались при атеросклерозе крупных артерий; SM (d34:1), Cer (d34:2), Cer (d36:4) и др. повышались при возрастной болезни малых сосудов. Уровень Cer (d36:4) и SM (d34:1) при возрастной болезни малых сосудов увеличивался по сравнению с атеросклерозом крупных артерий.

Свою роль в патогенезе ЦВЗ, возможно, играет изменение липидного профиля. Так, сообщается о том, что снижение концентрации холестерина в сыворотке крови связано с появлением нейровизуализационных маркеров сосудистой деменции, а фармакологическое снижение уровня холестерина, обусловленное приемом статинов, может быть связано с повышенным риском развития сосудистой деменции у мужчин [70]. Низкий уровень 7 α -гидроксихолестерина и первичных желчных кислот в сыворотке крови связан с более высоким уровнем отложения амилоида в мозге, существенным повреждением белого вещества и более быстрой атрофией мозга. Данное исследование объединило таргетированный метаболомный анализ плазмы крови, позитронно-эмиссионную томографию, МРТ головного мозга и фармакоэпидемиологический анализ.

Показано изменение пути *L*-аргинин/NO при деменции [71]. Так, с использованием таргетированного метаболомного скрининга методом ВЭЖХ-МС была исследована плазма крови пациентов с сосудистой деменцией, болезнью Альцгеймера и деменцией смешанного типа. Оказалось, что при всех видах деменции наблюдается снижение уровня *L*-аргинина, асимметричного диметиларгинина, соотношения *L*-аргинина и асимметричного диметиларгинина и *L*-цитруллина. При этом уровень *L*-аргинина и отношение *L*-аргинина к асимметричному диметиларгинину дифференцировали сосудистую деменцию и болезнь Альцгеймера. Изменения уровней данных веществ отражали структурные изменения мозга, а также коррелировали со степенью тяжести когнитивных нарушений.

Изучение метаболомного профиля позволяет также предсказать развитие сосудистой деменции. Так, показана роль дигидроксипутановой, докозапентаеновой и мочевой кислот в 5-летней прогрессии заболевания [72]. В проспективном исследовании методом ВЭЖХ-МС анализировали плазму крови пациентов с сосудистой деменцией и болезнью Альцгеймера, а также участников без диагностированной деменции, но с возможным ее развитием в связи с возрастным фактором. Уровень указанных веществ был повышен как у группы пациентов с деменцией обоих типов, так и в инцидентных случаях, в течение пяти лет до начала деменции.

В дополнение к анализу низкомолекулярных метаболитов проведены также метаболомные исследования профиля белков плазмы крови пациентов с ЦВЗ. Так, обнаружена группа из 44 белков, вовлеченных в каскад свертывания крови: SERPINF2, HRG, KNG1 и др. (10 белков), в активацию врожденного иммунного ответа: APCS, C1R, C5 и др. (13 белков), в регуляцию активности гидролаз AGT, PROS1, ITIH1 и др. [73]. Сдвиг, наблюдаемый в весе функциональных кластеров белков, предположительно, можно объяснить активацией компенсаторных механизмов, направленных на поддержание гомеостаза в организме.

В другом исследовании было показано увеличение содержания белков SOD1 и NCAM и снижение белка АТР5А при сосудистой деменции, что свидетельствовало о состоянии гипометаболизма нервной ткани и сосудистой недостаточности наряду с воспалительным процессом [74]. Повышение SOD1, а также тенденция к увеличению белков-аккумуляторов железа (FTL, FTH1) может говорить об окислительном дисбалансе, который сопровождается нарушением обмена железа.

Метаболомные исследования цереброваскулярных заболеваний на экспериментальных моделях

Метаболомные исследования ЦВЗ проводятся также на экспериментальных моделях. Методом десорбционной ионизации с электрораспылением, совмещенным с масс-спектрометрией, представлено распределение липидов в мозге крыс на схожей модели. В экспериментальных образцах отмечено снижение содержания дигомо- γ -линоленовой, стеариновой, арахидоновой, докозагексаеновой, гидроксипальмитиновой кислот и глицерофосфатэтаноламина во всем мозге, особенно, в гиппокампе. Снижение перечисленных веществ при ЦВЗ может объясняться противовоспалительными свойствами некоторых из них (например, дигомо- γ -линоленовой кислоты), а также непосредственно потерей нейрональной ткани. В мозолистом теле наблюдалось снижение интенсивности сигнала трех глицерофосфолипидов (LMGP06010075, LMGP00000053 и LMGP06010168) и сульфатида, являющихся компонентами миелина [75].

В этом разделе мы также хотели бы обозначить некоторые результаты протеомного анализа, или высокопроизводительного анализа белков. В области протеомики Tuckas V. и соавт. показано изменение профиля белков у крыс с поэтапной двусторонней окклюзией общей сонной артерии. Найдено большое количество белков, регуляция которых в затылочной доле коры отличается от регуляции в лобной коре и гиппокампе [76]. Измененные белки выполняют функции, связанные с организацией цитоскелета

и энергетическим метаболизмом. Так, обнаружено снижение экспрессии белков, связанных с цитратным циклом и цепью переноса электронов: фруктозобисфосфатальдозазы С, АТФ-синтазы альфа, изоцитратдегидрогеназы, NADH-дегидрогеназы и др.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Очевидно, что общность понятия нейродегенерации имеет не только клинический смысл, но и общие метаболические пути и метаболомные мишени. Поиск же маркеров отдельных нейродегенеративных процессов, таких как БП и ишемическая нейродегенерация, представляет более предметный интерес, охватывающий такие клинические понятия, как ранние проявления, прогнозирование течения, диагностические критерии и персонализация терапевтической тактики. Для БП такими маркерами являются метаболиты аминокислот, ацилкарнитинов, жирных кислот, желчных кислот, а для ЦВЗ – белки, вовлеченные в каскад свертывания или регуляцию иммунного ответа.

Возможности метаболомного анализа открывают перспективы *клинической* диагностики нейродегенераций, сокращая время от момента обращения до постановки диагноза, которое в настоящее время исчисляется 10 годами.

Анализ литературных данных, посвященных поиску метаболомных маркеров болезни Паркинсона (БП) и сосудистого паркинсонизма (СП), дает противоречивые результаты. Все имеющиеся сведения указывают на то, что изучение метаболомных

Таблица 2. Метаболомные маркеры различных цереброваскулярных заболеваний, имеющих отношение к развитию сосудистого паркинсонизма

Исследуемая среда	Цереброваскулярное заболевание/ состояние	Найденные метаболиты	Ссылка
Плазма крови	Гиперинтенсивность белого вещества по данным МРТ	Сфингомиелин 38:1 (SM 38:1), церамид 34:1 (Cer 34:1)	[67]
Сыворотка крови	Болезнь малых сосудов	Креатин, жирная кислота 18:2(ОН), сфингомиелин (d18:2/24:1), N1-ацетилспермидин, N-ацетилпутресцин, изолейцин, креатинин, креатин, цитозин, 5'-метилтиоаденозин	[68]
Плазма крови	Атеросклероз крупных артерий (АС), болезнь малых сосудов (БМС)	Cer (d36:3), Cer (d34:2), Cer (d38:6) (для АС); SM (d34:1), Cer (d34:2), Cer (d36:4) (для БМС)	[69]
Сыворотка крови	Сосудистая деменция	7 α -гидроксихолестерин, первичные желчные кислоты	[70]
Сыворотка крови	Сосудистая деменция, деменция смешанного типа	L-аргинин, отношение L-аргинина к асимметричному диметиларгинину, L-аргинин/NO-путь	[71]
Сыворотка крови	Сосудистая деменция	Дигидроксибутановая, докозапентаеновая и мочевиная кислоты	[72]
Плазма крови	Хроническая ишемия головного мозга	Белки SERPINF2, HRG, KNG1, APCS, C1R, C5, AGT, PROS1, ITIH1 и др.	[73]
Кора головного мозга	Сосудистая деменция	Белки SOD1, NCAM, ATP5A	[74]

нарушений исключительно в одной гуморальной среде не представляет большого практического интереса. Для выявления как общих признаков первичной нейродегенерации (характерной для БП), так и ишемической природы (как в случае СП), а также их дифференциальных маркеров необходимо одновременно исследовать плазму крови и ликвор. Различия в нейромедиаторной активности подкорковых структур, связанных с БП и СП, приводят к выводу о значительных различиях в метаболических процессах, характерных для каждого из этих состояний. При БП основное поражение затрагивает нейроны черной субстанции, которые производят дофамин. В то же время для СП характерно поражение блед-

ного шара и скорлупы, которые функционируют за счет других медиаторов, таких как ГАМК, глутамат, холин и др. Дальнейшие исследования должны иметь перспективу широкого использования доступных диагностических тестов, таких как анализ суточных пятен цельной крови или сыворотки.

Кроме того, изучение спектра низкомолекулярных маркеров должно помочь расшифровать каскад метаболических нарушений, стадийность их вовлечения, отражение на клинической картине двигательных и когнитивно-мнестических расстройств с учетом гендерной принадлежности. Этот подход позволит оценить значимость метаболомных сбоев в патогенезе двух разных нейродегенераций.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Tolosa E., Garrido A., Scholz S.W., Poewe W. // *Lancet Neurol.* 2021. V. 20. № 5. P. 385–397. DOI: 10.1016/S1474-4422(21)00030-2
- Massano J., Bhatia K.P. // *Cold Spring Harb. Perspect. Med.* 2012. V. 2. № 6. P. a008870. DOI: 10.1101/cshperspect.a008870
- DeMaagd G., Philip A. // *P&T.* 2015. V. 40. № 8. P. 504.
- Kalra S., Grosset D.G., Benamer H.T. // *Mov. Disord.* 2010. V. 25. № 2. P. 149–156. DOI: 10.1002/mds.22937
- Thanvi B., Lo N., Robinson T. // *Age Ageing.* 2005. V. 34. № 2. P. 114–119. DOI: 10.1093/ageing/afi025
- Korczyn A.D. // *Nat. Rev. Neurol.* 2015. V. 11. № 6. P. 319–326. DOI: 10.1038/nrneurol.2015.61
- Che Mohd Nassir C.M.N., Damodaran T., Yusof S.R., Nora-zit A., Chilla G., Huen I., Bhanu Prakash K.N., Mohamed Ibrahim N., Mustapha M. // *Pharmaceutics.* 2021. V. 13. № 8. P. 1207. DOI: 10.3390/pharmaceutics13081207
- Iadecola C. // *Acta Neuropathol.* 2010. V. 120. P. 287–296. DOI: 10.1007/s00401-010-0718-6
- Ren J.L., Zhang A.H., Kong L., Wang X.J. // *RSC Adv.* 2018. V. 8. № 40. P. 22335–22350. DOI: 10.1039/c8ra01574k
- Luan H., Wang X., Cai Z. // *Mass Spectrom. Rev.* 2019. V. 38. № 1. P. 22–33. DOI: 10.1002/mas.21553
- Alexander G.E. // *Dialogues Clin. Neurosci.* 2004. T. 6. № 3. P. 259–280. DOI: 10.31887/DCNS.2004.6.3/galexander
- Braak H., Del Tredici K., Rüb U., De Vos R.A., Steur E.N.J., Braak E. // *Neurobiol. Aging.* 2003. V. 24. № 2. P. 197–211. DOI: 10.1016/s0197-4580(02)00065-9
- Baziyan B.K. // *Bull. Exp. Biol. Med.* 2012. V. 154. № 2. P. 186–188. DOI: 10.1007/s10517-012-1907-1
- Shao Y., Le W. // *Mol. Neurodegener.* 2019. V. 14. № 1. P. 1–12. DOI: 10.1186/s13024-018-0304-2
- Kouli A., Torsney K.M., Kuan W.L. // *Exon Publ.* 2018. P. 3–26. DOI: 10.15586/codonpublications.parkinsonsdisease.2018.ch1
- Grassi D., Diaz-Perez N., Volpicelli-Daley L.A., Lasmézas C.I. // *Neurobiol. Dis.* 2019. V. 124. P. 248–262. DOI: 10.1016/j.nbd.2018.11.015
- Murgia F., Atzori L., Carboni E., Santoru M.L., Hendren A., Pisanu A., Caboni P., Boi L., Fusco G., Carta A.R. // *Int. J. Mol. Sci.* 2020. V. 21. № 18. P. 6745. DOI: 10.3390/ijms21186745
- Quinn P.M.J., Moreira P.I., Ambrósio A.F., Alves C.H. // *Acta Neuropathol. Commun.* 2020. V. 8. № 1. P. 1–20. DOI: 10.1186/s40478-020-01062-w
- Minakaki G., Krainc D., Burbulla L.F. // *Front. Cell. Dev. Biol.* 2020. V. 8. P. 580634. DOI: 10.3389/fcell.2020.580634
- Andersen A.D., Blaabjerg M., Binzer M., Kamal A., Thag-esen H., Kjaer T.W., Stenager E., Gramsbergen J.B.P. // *J. Neurochem.* 2017. V. 141. № 4. P. 614–625. DOI: 10.1111/jnc.13997
- Goldstein D.S., Holmes C., Sharabi Y. // *Brain.* 2012. V. 135. № 6. P. 1900–1913. DOI: 10.1093/brain/aws055
- Havelund J.F., Heegaard N.H.H., Færgeman N.J.K., Gramsbergen J.B. // *Metabolites.* 2017. V. 7. № 3. P. 42. DOI: 10.3390/metabo7030042
- Trupp M., Jonsson P., Ohrfelt A., Zetterberg H., Obudulu O., Malm L., Wuolikainen A., Linder J., Moritz T., Blennow K. // *J. Parkinsons Dis.* 2014. V. 4. № 3. P. 549–560. DOI: 10.3233/JPD-140389
- LeWitt P., Schultz L., Auinger P., Lu M., Parkinson Study Group DATATOP Investigators. // *Brain Res.* 2011. V. 1408. P. 88–97. DOI: 10.1016/j.brainres.2011.06.057
- Stoessel D., Schulte C., Teixeira Dos Santos M.C., Scheller D., Rebollo-Mesa I., Deuschle C., Walther D., Schauer N., Berg D., Nogueira da Costa A. // *Front. Aging Neurosci.* 2018. V. 10. P. 51. DOI: 10.3389/fnagi.2018.00051
- Willkommen D., Lucio M., Moritz F., Forcisi S., Kanawati B., Smirnov K.S., Schroeter M., Sigaroudi A., Schmitt-Kopplin P., Michalke B. // *PLoS One.* 2018. V. 13. № 12. P. e0208752. DOI: 10.1371/journal.pone.0208752
- Chang K.H., Cheng M.L., Tang H.Y., Huang C.Y., Wu Y.R., Chen C.M. // *Mol. Neurobiol.* 2018. V. 55. № 8. P. 6319–6328. DOI: 10.1007/s12035-017-0845-3
- Havelund J.F., Andersen A.D., Binzer M., Blaabjerg M., Heegaard N.H.H., Stenager E., Faergeman N.J., Gramsbergen J.B. // *J. Neurochem.* 2017. V. 142. № 5. P. 756–766. DOI: 10.1111/jnc.14104
- Çelık R.G.G., Köksal A., Şahın B., Şen A., Sakallı N.K., Nalbantoğlu M. // *Noro. Psikiyat. Ars.* 2020. V. 57. № 1. P. 33. DOI: 10.29399/npa.24761
- Johansen K.K., Wang L., Aasly J.O., White L.R., Matson W.R., Henchcliffe C., Beal M.F., Bogdanov M. // *PLoS One.* 2009. V. 4. № 10. P. e7551. DOI: 10.1371/journal.pone.0007551
- Shao Y., Li T., Liu Z., Wang X., Xu X., Li S., Xu G., Le W. // *Mol. Neurodegener.* 2021. V. 16. P. 1–15. DOI: 10.1186/s13024-021-00425-8
- Yakhine-Diop S.M.S., Morales-García J.A., Niso-Santano M., González-Polo R.A., Uribe-Carretero E., Martínez-Chacon G., Durand S., Maiuri M.C., Aiastui A., Zulaica M. // *Aging (Albany NY).* 2020. V. 12. № 17. P. 16690. DOI: 10.18632/aging.103992
- Fiandaca M.S., Gross T.J., Johnson T.M., Hu M.T., Evetts S., Wade-Martins R., Merchant-Borna K., Bazarian J., Cheema A.K., Mapstone M. // *Metabolites.* 2018. V. 8. № 3. P. 50. DOI: 10.3390/metabo8030050

34. Saiki S., Sasazawa Y., Fujimaki M., Kamagata K., Kaga N., Taka H., Li Y., Souma S., Hatano T., Imamichi Y. // *Ann. Neurol.* 2019. V. 86. № 2. P. 251–263. DOI: 10.1002/ana.25516
35. Roede J.R., Uppal K., Park Y., Lee K., Tran V., Walker D., Strobel F.H., Rhodes S.L., Ritz B., Jones D.P. // *PLoS One.* 2013. V. 8. № 10. P. e77629. DOI: 10.1371/journal.pone.0077629
36. Hatano T., Saiki S., Okuzumi A., Mohny R.P., Hattori N. // *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry.* 2016. V. 87. № 3. P. 295–301. DOI: 10.1136/jnnp-2014-309676
37. Saiki S., Hatano T., Fujimaki M., Ishikawa K.I., Mori A., Oji Y., Okuzumi A., Fukuhara T., Koinuma T., Imamichi Y. // *Sci. Rep.* 2017. V. 7. № 1. P. 1–15. DOI: 10.1038/s41598-017-06767-y
38. Albillos S.M., Montero O., Calvo S., Solano-Vila B., Trejo J.M., Cubo E. // *Parkinsonism Relat. Disord.* 2021. V. 91. P. 167–172. DOI: 10.1016/j.parkreldis.2021.09.014
39. Farmer K., Smith C.A., Hayley S., Smith J. // *Int. J. Mol. Sci.* 2015. V. 16. № 8. P. 18865–18877. DOI: 10.3390/ijms160818865
40. Graham S.F., Rey N.L., Yilmaz A., Kumar P., Madaj Z., Maddens M., Bahado-Singh R.O., Becker K., Schulz E., Meyerdirk L.K. // *J. Proteome Res.* 2018. V. 17. № 7. P. 2460–2469. DOI: 10.1021/acs.jproteome.8b00224
41. Kim A., Nigmatullina R., Zalyalova Z., Soshnikova N., Krasnov A., Vorobyeva N., Georgieva S., Kudrin V., Narkevich V., Ugrumov M. // *Mol. Neurobiol.* 2019. V. 56. P. 3437–3450. DOI: 10.1007/s12035-018-1315-2
42. Li X.Z., Zhang S.N., Lu F., Wang Y., Bai Y., Wang N., Liu S.M. // *Phytomedicine.* 2013. V. 20. № 13. P. 1219–1229. DOI: 10.1016/j.phymed.2013.06.002
43. Lu Z., Wang J., Li M., Liu Q., Wei D., Yang M., Kong L. // *Chem. Biol. Interact.* 2014. V. 223. P. 18–26. DOI: 10.1016/j.cbi.2014.09.006
44. Lu Y., Zhang X., Zhao L., Yang C., Pan L., Li C., Liu K., Bai G., Gao H., Yan Z. // *Front. Neurosci.* 2018. V. 12. P. 90. DOI: 10.3389/fnins.2018.00090
45. Neto D.P.A., Vitor Pereira de Godoy J., Tostes K., Pelegrini Bosque B., Vieira Rodrigues P., Aparecida Rocco S., Luis Sforça M., de Castro Fonseca M. // *Neuroscience.* 2023. V. 526. P. 21–34. DOI: 10.1016/j.neuroscience.2023.06.010
46. Wang W., Zhu G., Wang Y., Li W., Yi S., Wang K., Fan L., Tang J., Chen R. // *Front. Aging Neurosci.* 2022. V. 14. P. 877078. DOI: 10.3389/fnagi.2022.877078
47. Wang X., Zhu X., Li X., Li Z., Mao Y., Zhang S., Liu X., Liu X., Liu Y., Cao F., et al. // *Food Funct.* 2023. V. 14. № 1. P. 277–291. DOI: 10.1039/d2fo02595g
48. Zhang C., Xue Z., Zhu L., Zhou J., Zhuo L., Zhang J., Zhang X., Liu W., Han L., Liao W. // *Food Funct.* 2023. V. 14. № 7. P. 3208–3219. DOI: 10.1039/d2fo02939a
49. Mi N., Ma L., Li X., Fu J., Bu X., Liu F., Yang F., Zhang Y., Yao L. // *Open Med. (Wars).* 2023. V. 18. № 1. P. 20230849. DOI: 10.1515/med-2023-0849
50. Zhang W., Chen S., Huang X., Tong H., Niu H., Lu L. // *Cell Death Discov.* 2023. V. 9. № 1. P. 251. DOI: 10.1038/s41420-023-01549-0
51. Jiang Z., Wang X., Zhang H., Yin J., Zhao P., Yin Q., Wang Z. // *MedComm.* 2023. V. 4. № 3. P. e268. DOI: 10.1002/mco2.268
52. Cui C., Han Y., Li H., Yu H., Zhang B., Li G. // *Front. Cell Infect. Microbiol.* 2022. V. 12. P. 887407. DOI: 10.3389/fcimb.2022.887407
53. Wardlaw J.M., Smith C., Dichgans M. // *Lancet Neurol.* 2013. V. 12. № 5. P. 483–497. DOI: 10.1016/S1474-4422(13)70060-7
54. Hughes A.J., Daniel S.E., Kilford L., Lees A.J. // *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry.* 1992. V. 55. № 3. P. 181–184. DOI: 10.1136/jnnp.55.3.181
55. Wang F., Cao Y., Ma L., Pei H., Rausch W.D., Li H. // *Front. Aging Neurosci.* 2018. V. 10. P. 376. DOI: 10.3389/fnagi.2018.00376
56. Enciu A.M., Popescu B.O. // *Biomed. Res. Int.* 2013. V. 2013. P. 316495. DOI: 10.1155/2013/316495
57. Zhao Y., Gong C.X. // *Cell. Mol. Neurobiol.* 2015. V. 35. № 1. P. 101–110. DOI: 10.1007/s10571-014-0127-9
58. Hai J., Yu F., Lin Q., Su S.H. // *Brain Res.* 2012. V. 1429. P. 9–17. DOI: 10.1016/j.brainres.2011.10.023
59. Du J., Ma M., Zhao Q., Fang L., Chang J., Wang Y., Fei R., Song X. // *Neuroscience.* 2013. V. 231. P. 345–352. DOI: 10.1016/j.neuroscience.2012.11.062
60. Yoshizaki K., Adachi K., Kataoka S., Watanabe A., Tabira T., Takahashi K., Wakita H. // *Exp. Neurol.* 2008. V. 210. № 2. P. 585–591. DOI: 10.1016/j.expneurol.2007.12.005
61. Viswanathan A., Gray F., Bousser M.G., Baudrimont M., Chabriet H. // *Stroke.* 2006. V. 37. № 11. P. 2690–2695. DOI: 10.1161/01.STR.0000245091.28429.6a
62. Alber J., Alladi S., Bae H.J., Barton D.A., Beckett L.A., Bell J.M., Berman S.E., Biessels G.J., Black S.E., Bos I. // *Alzheimer's Dement.* 2019. V. 5. P. 107–117. DOI: 10.1016/j.jtrci.2019.02.001
63. Duncombe J., Kitamura A., Hase Y., Ihara M., Kalaria R.N., Horsburgh K. // *Clin. Sci.* 2017. V. 131. № 19. P. 2451–2468. DOI: 10.1042/CS20160727
64. Weber C., Fraemohs L., Dejana E. // *Nat. Rev. Immunol.* 2007. V. 7. № 6. P. 467–477. DOI: 10.1038/nri2096
65. Konsman J.P., Drukarch B., Van Dam A.M. // *Clin. Sci.* 2007. V. 112. № 1. P. 1–25. DOI: 10.1042/CS20060043
66. Cotman C.W., Berchtold N.C., Christie L.A. // *Trends Neurosci.* 2007. V. 30. № 9. P. 464–472. DOI: 10.1016/j.tins.2007.06.011
67. Azizkhanian I., Sheth S.A., Iavarone A.T., Lee S., Kakarla V., Hinman J.D. // *Front. Neurosci.* 2019. V. 10. P. 474611. DOI: 10.3389/fneur.2019.00950
68. Harshfield E.L., Sands C.J., Tuladhar A.M., de Leeuw F.E., Lewis M.R., Markus H.S. // *Brain.* 2022. V. 145. № 7. P. 2461–2471. DOI: 10.1093/brain/awac041
69. You Q., Peng Q., Yu Z., Jin H., Zhang J., Sun W., Huang Y. // *Biosci. Rep.* 2020. V. 40. № 9. P. BSR20201519. DOI: 10.1042/BSR20201519
70. Varma V.R., Wang Y., An Y., Varma S., Bilgel M., Doshi J., Legido-Quigley C., Delgado J.C., Oommen A.M. // *PLoS Med.* 2021. V. 18. № 5. P. e1003615. DOI: 10.1371/journal.pmed.1003615
71. Fleszar M.G., Wiśniewski J., Zboch M., Diakowska D., Gamian A., Krzystek-Korpacka M. // *Sci. Rep.* 2019. V. 9. № 1. P. 13764. DOI: 10.1038/s41598-019-50205-0
72. Mousavi M., Jonsson P., Antti H., Adolfsson R., Nordin A., Bergdahl J., Eriksson K., Moritz T., Nilsson L.G., Nyberg L. // *Dement. Geriatr. Cogn. Dis. Extra.* 2014. V. 4. № 2. P. 252–262. DOI: 10.1159/000364816
73. Kaysheva A.L., Kopylov A.T., Ponomarenko E.A., Kiseleva O.I., Teryaeva N.B., Potapov A.A., Izotov A.A., Morozov S.G., Kudryavtseva V.Y., Archakov A.I. // *J. Mol. Neurosci.* 2018. V. 64. P. 440–448. DOI: 10.1007/s12031-018-1040-3
74. Datta A., Qian J., Chong R., Kalaria R.N., Francis P., Lai M.K., Chen C.P., Sze S.K. // *J. Proteomics.* 2014. V. 99. P. 54–67. DOI: 10.1016/j.jpro.2014.01.011
75. Severiano D.L.R., Oliveira-Lima O.C., Vasconcelos G.A., Lemes Marques B., Almeida de Carvalho G., Freitas E.M.M., Xavier C.H., Gomez M.V., Pinheiro A.C.O., Gomez R.S. // *Neuroscience.* 2020. V. 426. P. 1–12. DOI: 10.1016/j.neuroscience.2019.11.014
76. Tukacs V., Mittli D., Györfy B.A., Hunyady-Gulyás É., Hlatky D., Tóth V., Ravasz L., Medzihradský F.K., Nyitrai G., Czurkó A. // *Sci. Rep.* 2020. V. 10. № 1. P. 15999. DOI: 10.1038/s41598-020-72868-w

УДК 620.187.3+578.347

Визуализация нуклеиновых кислот в микро- и нанометровых биологических объектах с помощью аналитической электронной микроскопии

О. С. Соколова¹, Т. С. Трифонова¹, Н. И. Деркачева², А. В. Моисеенко¹¹Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, биологический факультет, Москва, 119234 Россия²Российский университет медицины, кафедра биохимии, Москва, 127473 Россия

*E-mail: sokolova@mail.bio.msu.ru

Поступила в редакцию 06.08.2024

Принята к печати 21.10.2024

DOI: 10.32607/actanaturae.27483

РЕФЕРАТ Методы аналитической электронной микроскопии, включая метод энергодисперсионной рентгеновской спектроскопии (ЭДРС) и метод спектроскопии характеристических потерь энергии электронов (СХПЭЭ), используются для визуализации и картирования различных химических элементов в материаловедении и биологии. В данном обзоре представлены примеры успешной идентификации нуклеиновых кислот в клетках, а также в ДНК- и РНК-содержащих вирусах с использованием химического элемента фосфора в качестве маркера.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА энергодисперсионная рентгеновская спектроскопия, спектроскопии характеристических потерь энергии электронов, элементное картирование фосфора, бактериофаг, *P. aeruginosa*, SARS-CoV-2, вирус клещевого энцефалита

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ ЭДРС – энергодисперсионная рентгеновская спектроскопия; СХПЭЭ – спектроскопии характеристических потерь энергии электронов; ПЭМ – просвечивающая электронная микроскопия; ЭФПЭМ – энергофильтрующая просвечивающая электронная микроскопия; СПЭМ – сканирующая просвечивающая электронная микроскопия; HAADF – темнопольное изображение в высокоугловых рассеянных электронах (high-angle annular dark-field); ВКЭ – вирус клещевого энцефалита; криоЭМ – криоэлектронная микроскопия; GFP – зеленый флуоресцентный белок.

ВВЕДЕНИЕ

Точная идентификация и ультраструктурная локализация молекул, органелл, клеток и других биологических структур являются ключевым шагом к определению их функций. Локализация макромолекул с помощью иммуномечения на срезах позволяет обнаружить специфические мишени [1]. Криотомография дает возможность визуализировать структуру тканей [2] и криоЭМ-структуру макромолекул белка с атомным разрешением [3, 4]

Нобелевские премии, присужденные за достижения в области микроскопии, подчеркивают важность визуализации молекул с высоким разрешением: GFP для живых клеток [5], преодоление дифракционного предела с помощью световой флуоресцентной микроскопии сверхразрешения [6] и криоЭМ [7].

Трансмиссионная (просвечивающая) электронная микроскопия (ПЭМ) – распространенный метод изучения структуры тканей, клеток, органелл и белковых молекул, который, в свою очередь, помогает понять механизмы, лежащие в основе функционирования клеток в норме и патологии. В связи со значительным улучшением методик электронной микроскопии белковых молекул и повышением возможностей компьютеров, применяемых для расчетов трехмерных структур белков, в последнее десятилетие ПЭМ превратилась в полноправный метод, применяемый в структурной биологии. КриоЭМ позволяет визуализировать не только трехмерную структуру, но и динамику самых разнообразных биологических нанообъектов с разрешением от 2–5 нм до атомного [3, 4]. В то же время метод

криоЭМ лишен многих недостатков, присущих другим структурным методам: размер частиц не лимитирован, наличие кристаллов не обязательно, используется небольшое количество материала. Более того, крио-модификация метода ПЭМ позволяет наблюдать молекулы в нативном водном окружении в состоянии, близком к физиологическому, что особенно важно для изучения их функциональных особенностей.

Принцип работы просвечивающего электронного микроскопа основан на рассеянии пучка электронов в тонком слое исследуемого объекта (рис. 1А). Рассеяние электронов на атомах объекта приводит к многочисленным явлениям, таким, как упругое рассеяние электронов на большие углы, частичная потеря энергии неупругорассеянными электронами, ионизация атомов объекта и генерация вторичных электронов, генерация характеристического рентгеновского излучения и др. (рис. 1Б). Характер наблюдаемых явлений будет зависеть от конкретной структуры объекта под электронным пучком, от распределения рассеивающего потенциала, среднего атомного номера, толщины объекта и пр. Используя методы просвечивающей электронной микроскопии, можно детектировать соответствующие сигналы и использовать их для определения структуры объекта.

АНАЛИТИЧЕСКАЯ ЭЛЕКТРОННАЯ МИКРОСКОПИЯ

В биологии и науках о материалах часто возникает необходимость в качественных и количественных измерениях, а также составить карту распределения химических элементов в микроскопических областях образца. Для этого используются аналитические электронные микроскопы (сканирующие и просвечивающие). В аналитической ПЭМ детектируются неупругорассеянные электроны, то есть электроны, которые при прохождении через образец в колонне просвечивающего электронного микроскопа теряют часть своей энергии (рис. 1Б).

Аналитический электронный микроскоп оснащен специальными детекторами, которые позволяют анализировать химическое состояние образца с помощью ЭДРС (энергодисперсионной рентгеновской спектроскопии) или СХПЭЭ (спектроскопии потерь энергии электронов). Использование методов аналитической ПЭМ предоставляет уникальную возможность получать информацию об элементном составе изучаемых объектов с нанометровым разрешением [8, 9]. Среди методов аналитической ПЭМ широкое применение в элементном анализе биологических объектов нашли метод энергодисперсионной рентгеновской спектроскопии (ЭДРС) [10], метод спектроскопии характеристических потерь энергии электронов (СХПЭЭ) и основанное на СХПЭЭ эле-

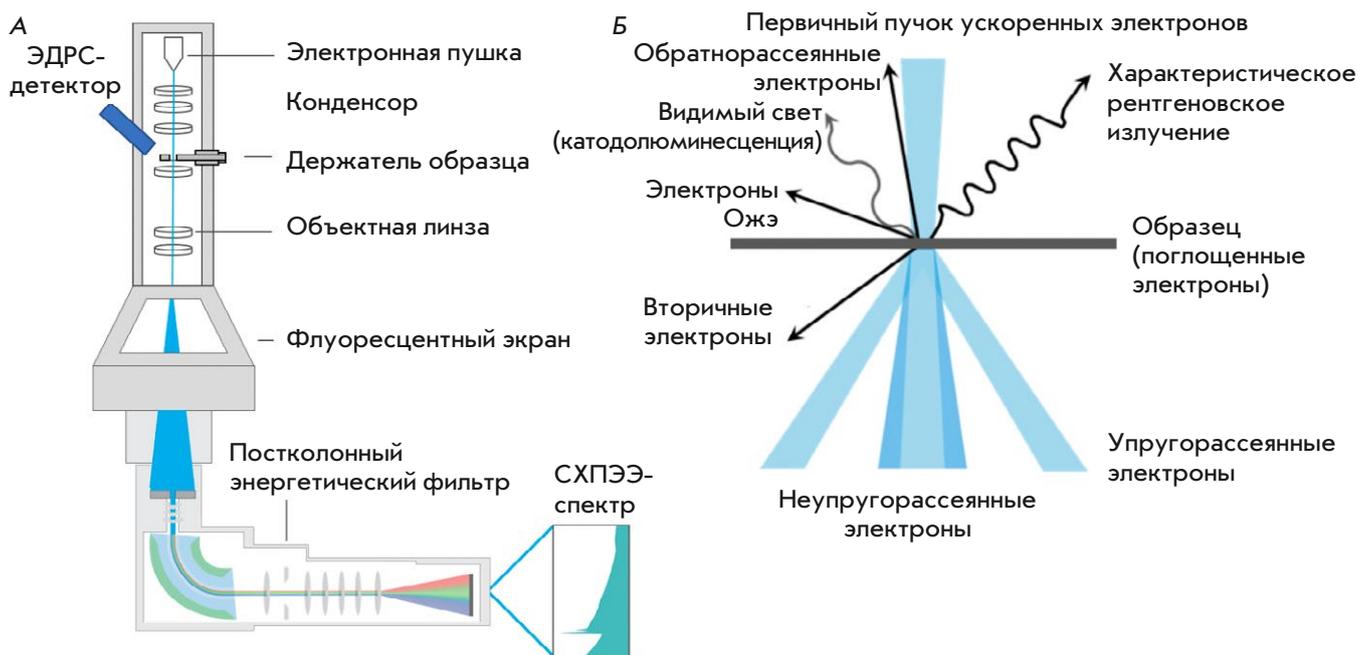


Рис. 1. А – строение электронного просвечивающего аналитического микроскопа. Б – распределение энергии пучка ускоренных электронов, прошедшего сквозь тонкий объект, и возникающие при этом вторичные излучения (с использованием Biorender.com)

ментное картирование методом энергофильтрующей ПЭМ (ЭФПЭМ).

МЕТОД СПЕКТРОМЕТРИИ ХАРАКТЕРИСТИЧЕСКОГО РЕНТГЕНОВСКОГО ИЗЛУЧЕНИЯ (ЭДРС)

Метод ЭДРС основан на регистрации рентгеновских фотонов, испускаемых образцами при электронном облучении (рис. 2В), и измерении их энергий. Поскольку каждый вид атомов (химический элемент) имеет свои строго определенные (квантованные) значения энергий, рентгеновские спектры имеют линейчатый характер и могут служить «визитными карточками» элементов. Расположение пиков на оси абсцисс типичного спектра ЭДРС соответствует значениям энергии поглощенных детектором рентгеновских фотонов: чем выше энергия, тем правее отображается пик (рис. 2Д). Высота каждого пика определяется количеством импульсов, поступивших в данный канал.

Элементный анализ методом ЭДРС проводят с использованием энергодисперсионных спектро-

метров (например, X-Max, Oxford Instruments, Великобритания). Спектрометры характеристических потерь энергии электронов устанавливаются на колонну ПЭМ в качестве аналитической приставки и применяются для построения карт распределения элементов.

Энергодисперсионные рентгеновские спектры от выбранных участков образца регистрируют, как правило, в режиме сканирующей просвечивающей электронной микроскопии (СПЭМ). В отличие от ПЭМ, пучок электронов в СПЭМ фокусируется с помощью электронной оптики, образуя небольшой зонд, который сканирует тонкий образец. В диапазон энергий рентгеновского излучения 0.15–4 кэВ входят наиболее интенсивные пики биологически значимых элементов: P, N, O, K, Ca, Mg, Na, Cl и S (рис. 2Д). Метод ЭДРС в целом считается качественным, то есть основная цель – это идентификация специфического $K\alpha$ -пика. Характеристические рентгеновские пики могут быть определены с использованием специальных таблиц и баз данных.

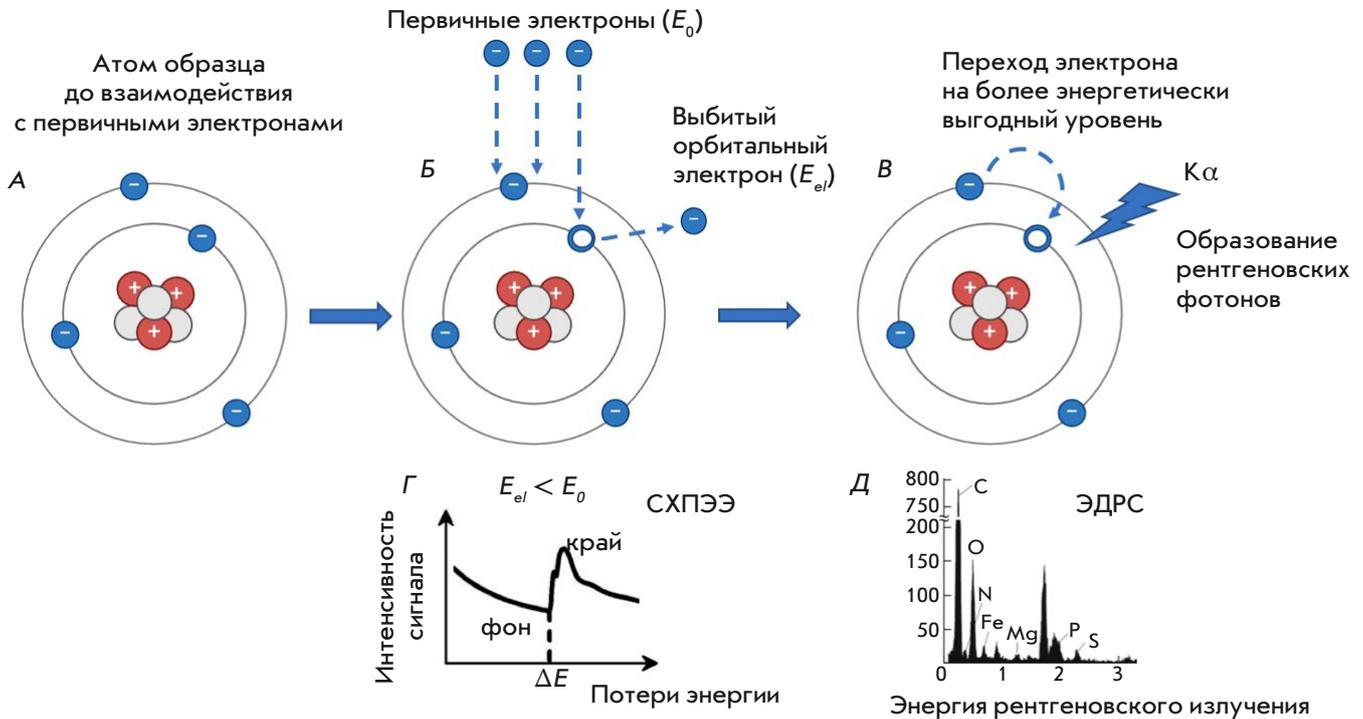


Рис. 2. Возбуждение внутренних оболочек атома образца в колонне просвечивающего электронного микроскопа и получающиеся в результате этого процесса спектр потерь энергии электронов (СХПЭЭ) и энергодисперсионный спектр (ЭДРС). А – атом образца до взаимодействия с первичным электроном; В – потери энергии, детектируемые методом СХПЭЭ. E_0 – энергия первичного электрона до взаимодействия с атомом образца; E_{el} – энергия первичного электрона после прохождения через образец; В – генерация кванта рентгеновского излучения, детектируемого методом ЭДРС. $K\alpha$ – рентгеновский фотон, образовавшийся в результате перехода атома образца из возбужденного; Г – спектр потерь энергии электронами (СХПЭЭ); Д – энергодисперсионный спектр (ЭДРС). (с использованием Biorender.com)

Большинство программ рентгеновского анализа оснащены автоматизированным программным обеспечением для идентификации пиков.

Результаты количественного рентгеновского анализа могут быть достигнуты с точностью до 1%. Они позволяют сравнить содержание искомого элемента в различных клетках и тканях при нормировании на пик углерода и наложении полученных графиков друг на друга (см. далее). В этой связи следует упомянуть, что некоторые трудности количественного определения могут быть обусловлены тем, что разные химические элементы могут иметь близкие значения энергий связи. Например, пик $K\alpha$ (2.013 кэВ) фосфора (P) находится очень близко к M-линии (1.914 кэВ) осмия (Os), который обычно используется для фиксации клеточных мембран. В таком случае сложно разделить мечение мембран осмием и содержание фосфолипидов в тех же мембранах. Для того, чтобы избежать подобных перекрытий пиков, рекомендуется использовать для контрастирования соединения других тяжелых металлов, например марганца, соответствующий пик которого располагается в другом месте.

ДЕТЕКЦИЯ ФОСФОРА НА СРЕЗАХ КЛЕТОК И ТКАНЕЙ С ПОМОЩЬЮ ЭДРС

Фосфор является одним из ключевых макроэлементов, необходимых для функционирования живых организмов: он входит в состав важнейших соединений, таких, как нуклеиновые кислоты, АТФ и фосфолипиды, и играет ключевую роль в энергетических процессах клетки [11]. Для многих видов микроводорослей и цианобактерий характерно запасание фосфора в виде полифосфатных внутриклеточных включений [12].

Особый интерес представляет картирование ДНК путем регистрации распределения фосфора, один атом которого связан с каждым основанием нуклеиновой кислоты [13]. В последние годы появился также интерес к визуализации ДНК в составе наночастиц и оригами [14].

Впервые визуализация изолированной ДНК в электронном просвечивающем микроскопе состоялась более 75 лет назад [15]. Для этого была разработана методика кругового напыления образца тяжелыми металлами. Негативное контрастирование ацетатом урана широко используется для электронно-микроскопической визуализации ДНК и хроматина с 1960-х годов. Однако для идентификации фосфора в составе клеток чаще используют аналитическую ПЭМ. Распределение эндогенных элементов, таких, как фосфор, содержащийся в мембранах и ДНК, азот в полипептидах и сера в богатых метионином и цистеином белках, может быть качествен-

но измерено в точке или по площади с помощью ЭДРС и наложено на карту. Этот подход позволил локализовать расположение гранул, содержащих азот и фосфор, в эукариотических клетках (рис. 3А) [16], определить сложный элементный состав вакуолярных включений зеленых микроводорослей [17], картировать фосфор и другие элементы на срезах личинок дрозофилы [18] и миелиновой оболочки периферического нерва человека [19], а также в ДНК-оригами [14] (рис. 3Б–Д).

Картирование на срезах по всей площади поля зрения, в том числе получение суммарных карт

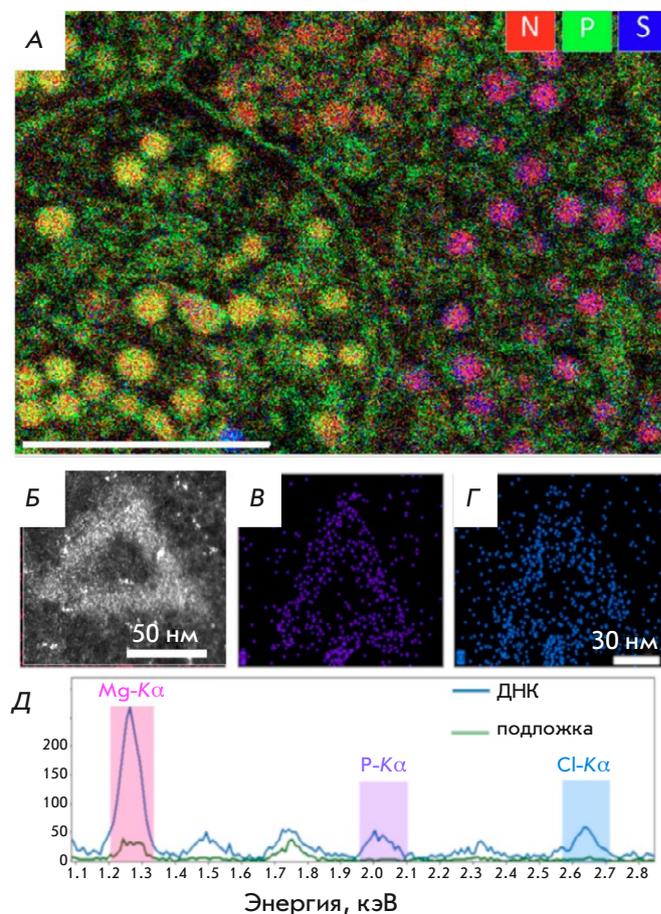


Рис. 3. Элементное картирование на срезах клеток с помощью ЭДРС. А – клетки островка Лангерганса крысы (из [16], открытый источник). Наложение карт азота (красный), фосфора (зеленый) и серы (синий) позволяет идентифицировать мембраны и гранулы в зависимости от элементного содержания. Длина масштабного отрезка 2 мкм. Картирование ЭДРС треугольника ДНК-оригами (Б): распределение сигналов фосфора (В) и хлора (Г). Д – два суммированных ЭДРС-спектра: синяя линия суммирована по ДНК, а зеленая линия суммирована по подложке. Оба спектра представляют собой необработанные данные без вычитания фона (из [14], воспроизведено с разрешением)

с последующим цветовым кодированием каждого из интересующих исследователя химических элементов (рис 3А), предоставляет ценную информацию об элементном составе и концентрационных составляющих в различных областях образца, позволяет идентифицировать субклеточное распределение, выявить мембраны и цитоплазматические гранулы.

В работах последних лет метод ЭДРС позволил выявить взаимодействие ДНК с белками Dps в бактериальных клетках [20]. ДНК-связывающий белок Dps является главным фактором, определяющим архитектуру бактериального нуклеоида [21]. Dps это ферритин-подобный белок, который состоит из 12 мономеров, каждый из которых содержит четыре альфа-спиральных субдомена, собранные в додекаэдр с тетраэдрической симметрией (рис. 4А). Одним из универсальных механизмов ответа бактерий на стресс является повышение синтеза Dps [22]. В результате в цитоплазме голодающих клеток могут наблюдаться двух- и трехмерные кристаллические решетки, образованные Dps, перемежающимися спиралями ДНК (рис. 4Б). Кристаллизация обеспечивает физическую защиту ДНК от неблагоприятных факторов.

С использованием аналитической электронной микроскопии был разработан оригинальный метод для доказательства образования комплекса ДНК

с Dps. Авторы метода постулировали, что пик К α (2.307 кэВ) серы отражает существование связывающего ДНК белка Dps (каждый белок Dps содержит 48 остатков метионина), а пик К α (2.013 кэВ) соответствует фосфору в ДНК. Одновременное присутствие обоих пиков на ЭДРС-спектрах показывает образование комплекса ДНК–Dps (рис. 4Г). Полученные результаты свидетельствуют о том, что в нанокристалле большая часть белка Dps плотно связана с нуклеоидной ДНК, формируя компактную структуру, что согласуется с данными предыдущих исследований [23, 24]. В контрольных областях ни сера, ни фосфор не обнаружены (рис. 4Г). Ярко выраженный сигнал меди (Cu) во всех образцах исходит от медных сеток-подложек.

Аналогичный подход был использован для изучения воздействия стресса, вызванного инфекцией бактериофагами болезнетворных бактерий *Pseudomonas aeruginosa* [25]. Для того, чтобы исключить перекрывание пиков К α (2.013 кэВ) фосфора (P) и M-линии (1.914 кэВ) осмия (Os), использующегося для фиксации, образцы были контрастированы 2% молибдатом аммония. Все ЭДРС-спектры были нормированы на пик С и наложены друг на друга (рис. 5А).

Пик фосфора, отражающий содержание ДНК, увеличился после заражения, что, видимо, может свидетельствовать об одновременном существова-

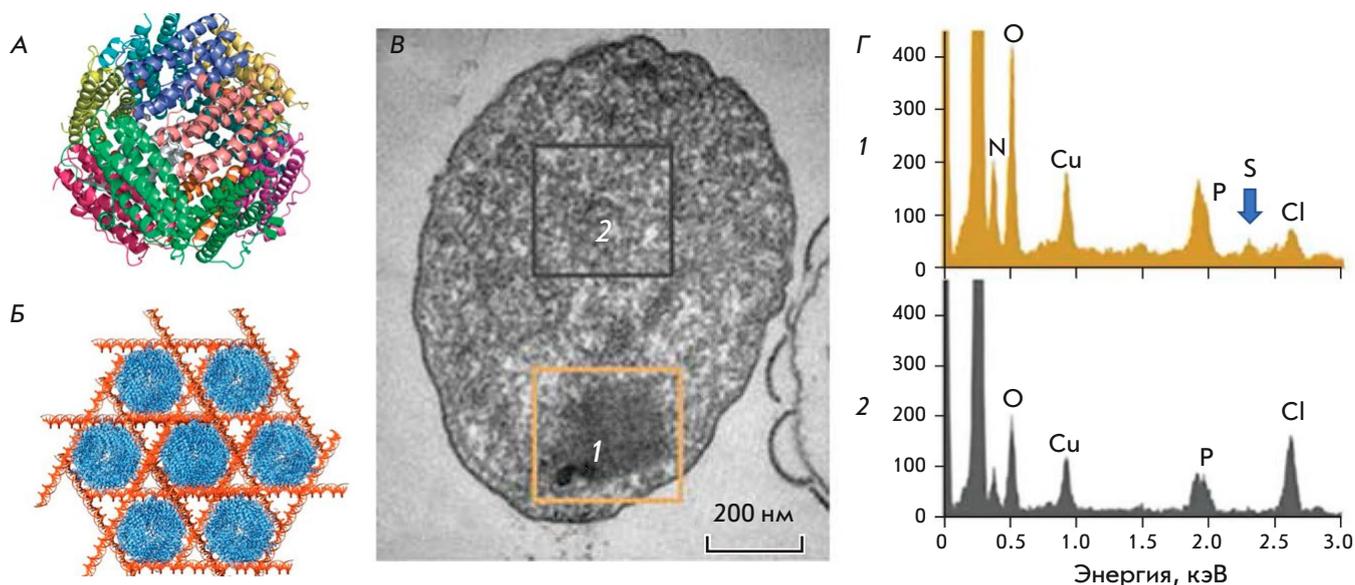


Рис. 4. А – структура белка Dps; Б – модель нанокристаллического массива при образовании комплекса ДНК–Dps, построенная на основе криотомографии из [23], (открытый источник); В – ПЭМ-изображение нанокристаллической конденсированной структуры ДНК–Dps в покоящейся клетке *E. coli*, голодающей в течение 7 мес. (из [20], открытый источник): 1 – нанокристаллический тип конденсации; 2 – контрольная область нуклеоида. Г – спектры ЭДРС из выбранных областей 1 (конденсированный нуклеоид) и 2 (контроль) на предыдущем изображении. Синей стрелкой отмечено положение пика серы в спектре области 1.

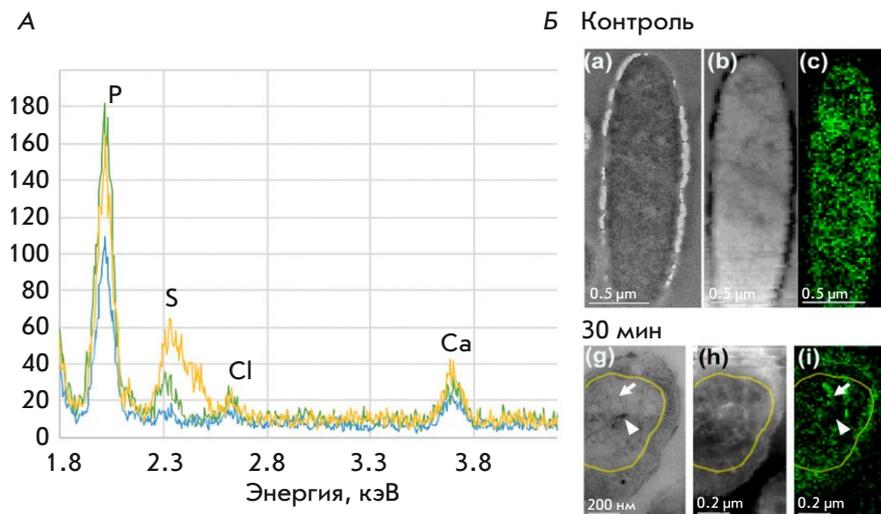


Рис. 5. Изучение элементного строения клеток *P. aeruginosa*, зараженных бактериофагом PhiKZ, методом аналитической микроскопии. А – ЭДРС-спектры контрольных клеток (синий) и через 15 (зеленый) и 30 мин (желтый) после заражения фагом PhiKZ. Наложенные ЭДРС-спектры нормированы по пику углерода (не показан на графике). Пики обозначены следующим образом: P – фосфор; S – сера; Cl – хлор; Ca – кальций. Б – распределение фаговой и бактериальной ДНК в контрольных и инфицированных клетках *P. aeruginosa*. ПЭМ-изображение (a, d, g, j); HAADF-изображение (b, e, h, k) и спектроскопия потерь энергии электронов (СХПЭЭ) фосфора в псевдоядре (c, f, i, l). Сигнал фосфора (P) отображен после вычитания фона и коррекции многократного рассеяния с помощью деконволюции Фурье-спектров. Стрелки указывают на ДНК, треугольники – на участки, не содержащие P; желтой линией отмечена граница псевдоядра (из [25], открытый источник)

нии в клетке как фаговой ДНК, содержание которой увеличивается в процессе заражения, так и ДНК хозяина. Исследование методом ПЦР показало, что значительный уровень бактериальной ДНК сохраняется даже через 40 мин после заражения фагом [25]. Авторы отметили, что через 15 мин после заражения бактериофагом на ЭДРС-спектре появился небольшой пик серы (рис. 5А). Этот пик увеличился через 30 мин после заражения, что может свидетельствовать о реакции бактериальной клетки на стресс повышением синтеза антистрессового белка Dps.

МЕТОД СПЕКТРОСКОПИИ ХАРАКТЕРИСТИЧЕСКИХ ПОТЕРЬ ЭНЕРГИИ ЭЛЕКТРОНОВ (СХПЭЭ)

Метод СХПЭЭ основан на детектировании первичного сигнала, а именно, на измерении энергии, которая теряется частью прошедших через образец электронов в результате возбуждения атомов образца [8]. При регистрации спектров измеряются потери энергии неупругорассеянных электронов, прошедших через образец (рис 2Б). Соответственно, метод СХПЭЭ учитывает все процессы неупругого рассеяния электронов, включающие коллективные возбуждения валентных электронов (плазмонные возбуждения), возбуждение внутренних оболочек атомов, эмиссию тормозного рентгеновского излуче-

ния с непрерывным спектром (тормозное излучение) и др. [26].

Первичный электрон в колонне просвечивающего электронного микроскопа при прохождении через образец вступает во взаимодействие с электроном внутренней К-оболочки атома образца и отдает ему часть своей энергии (рис. 2Б). При этом электрон, получивший энергию, переходит в возбужденное состояние. Поскольку все энергетические уровни ниже уровня Ферми заняты электронами в основном состоянии, электрон в возбужденном состоянии может перейти только на один из незанятых энергетических уровней выше уровня Ферми [26] (рис. 2). Таким образом, когда падающий электрон, проходя через образец, теряет количество энергии, большее чем ΔE , которое соответствует разнице энергий между К-оболочкой и уровнем Ферми, то вероятность перехода электрона с К-оболочки атома образца на незанятый энергетический уровень выше уровня Ферми резко возрастает. В результате при построении спектра потерь энергии электронов (графика зависимости количества прошедших через образец электронов (интенсивности сигнала) от величины потери энергии) в спектре потерь энергии возникает острый пик, начинающийся со значения ΔE (рис. 2Г). При этом у данного пика имеется «хвост» в области более высоких энер-

гий. Благодаря такой форме, пик в спектре потерь энергии называют краем (поглощения). Поскольку пороговая энергия края является определенной для каждого химического элемента, то по значению ΔE в спектре потерь можно проводить идентификацию элементов в образце [8], а также элементный анализ и отслеживать состояние химической связи и расстояние между атомами образца, измеряя интенсивность характерных потерь энергии электронов (рис. 2Г). Метод СХПЭЭ, как правило, предназначен для работы со спектрами тонкой структуры элементов, определения природы химических связей и полосы проводимости веществ.

Элементный анализ методом СХПЭЭ обычно проводят с использованием постколлоидного энергетического фильтра (рис. 1А) (например, GIF Quantum ER, Gatan, США). В таком случае можно говорить об энергетически фильтруемой просвечивающей электронной микроскопии (ЭФПЭМ). Ввиду ограничения по толщине образцов, анализируемых этим методом [26], при проведении элементного анализа методом СХПЭЭ чаще всего используют ультратонкие срезы образцов. Спектры СХПЭЭ регистрируют от выбранных участков образца в диапазоне энергий от 100 до 600 эВ в темнопольном сканирующем режиме с использованием HAADF-детектора. В указанный диапазон энергий входят наиболее интенсивные пики биологически значимых элементов P, N, O и Ca, выявляемых в спектрах потерь энергии электронов.

Недавно картирование методом СХПЭЭ использовали для визуализации фаговой ДНК в псевдодрядре, образованном при заражении бактерий гигантским бактериофагом phiKZ [25]. Распределение ДНК в цитоплазме бактерий оценивали, используя сигнал фосфора, который был наложен на HAADF-изображение клетки (рис. 5Б). Все исследуемые клетки содержат сигнал фосфора, но его пространственное распределение различается в зависимости от времени после заражения. В неинфицированных клетках сигнал фосфора был равномерно распределен по всей цитоплазме, что отражает диффузное расположение нуклеоида (рис. 5Б (с)). Такое же равномерное распределение фосфора (положение нуклеоида) обнаружено в цитоплазме на 15-й мин после заражения; но при этом общая интенсивность сигнала была выше, чем в контрольных клетках. Через 30 мин после заражения, псевдодрядра становились почти сферическими и перемещались ближе к центру клетки, что показано и в ряде других работ [27, 28]. При этом паттерн распределения фосфора значительно изменялся и выявлялась сложная структура сети фаговой ДНК внутри псевдодрядра (рис. 5Б (i)).

ИДЕНТИФИКАЦИЯ И КАРТИРОВАНИЕ НУКЛЕИНОВЫХ КИСЛОТ В ВИРУСАХ

В настоящее время особый интерес вызывает проверка возможности картирования нуклеиновых кислот на примере значительно более мелких объектов – вирусов и бактериофагов. Ранее были опубликованы результаты нескольких исследований, в которых проведен элементный анализ отдельных вирионов [19, 29, 30]. Первое такое исследование было проведено в 1980 году [19]. Фосфор картировали на срезах залитых в эпоксидную смолу частиц вируса лейкоза мышей (MuLV, murine leukemia virus). Авторам удалось зарегистрировать сигнал фосфора, входящего в состав липидов вирусной мембраны. В 1998 году [29] опубликовали исследование срезов клеток, зараженных коронавирусом трансмиссивного гастроэнтерита. Авторы утверждают, что им удалось зарегистрировать сигнал фосфора от отдельных вирусных частиц внутри клеток, однако качество представленных изображений оставляет желать лучшего, и они допускают неоднозначную интерпретацию. В более поздней работе [30] было описано элементное картирование целых вирионов бактериофага лямбда в составе пленок. Все эти эксперименты выполнены с использованием метода ЭФПЭМ.

В более поздних работах для элементного картирования было предложено использовать сканирующую просвечивающую электронную микроскопию в сочетании с электронной микроскопией с энергетической фильтрацией (СПЭМ-СХПЭЭ) [31]. Эта оригинальная методика позволяет получать изображения при меньшей дозе электронов, чем традиционная ЭФПЭМ. Данный подход значительно повышает чувствительность метода за счет применения комплексного СПЭМ-СХПЭЭ-анализа и использования охлаждающего держателя образцов для минимизации радиационного повреждения. Охлаждающий держатель образцов для ПЭМ может поддерживать наблюдаемый образец при температуре жидкого азота, что уменьшает повреждение образца электронным пучком и позволяет изучать структуру при низких температурах. Это особенно важно для биологических образцов [32].

С помощью метода СПЭМ-СХПЭЭ были исследованы различные ДНК- и РНК-содержащие вирусы. Оказалось, что контрастирование образца 2% молибдатом аммония вместо ацетата урана позволяет более точно определить положение пика поглощения фосфора (граница поглощения вблизи 132 эВ), так как пик поглощения урана (граница поглощения 96 эВ) находится вблизи пика поглощения фосфора и мешает вычитанию фона. Пик поглощения молибдена характеризуется границей поглощения около 400 эВ.

При тестировании метода СПЭМ-СХПЭЭ исследовали содержание нуклеиновой кислоты внутри капсида гигантского фага phiEL. Диаметр капсида этого бактериофага равен 145 нм [33], а его геном состоит из 211 т.п.н. [34], то есть он содержит 422 тыс. атомов фосфора в составе двухцепочечной ДНК. В этой работе удалось картировать расположение ДНК в капсиде бактериофага и продемонстрировать наличие в нем внутреннего тела – белкового образования, на которое намотана геномная ДНК (рис. 6В,Г) [31].

Метод СПЭМ-СХПЭЭ использовали также для исследования содержания фосфора в очищенных инактивированных частицах SARS-CoV-2, входящих в состав вакцины КовиВак (производства ФГБНУ «Федеральный научный центр исследований и разработки иммунобиологических препаратов им. М.П. Чумакова РАН») [35]. SARS-CoV-2 – это вирус диаметром около 200 нм, геном которого представлен одноцепочечной РНК длиной примерно 30 т.п.н. Таким образом, содержание фосфора в капсиде SARS-CoV-2 как минимум в 5 раз меньше, чем у гигантского бактериофага (с учетом наличия у вируса липидной оболочки). Использование методики элементного анализа состава предоставленных вирионов (СПЭМ-СХПЭЭ) позволило подтвердить присутствие в них нуклеиновой кислоты. На рис. 7А представлены ПЭМ-изображение вириона и соответствующая ему карта локального распределения фосфора. Сигнал фосфора регистрировался только от внутренней части вириона, но не от подложки вне него (рис. 7Б). Представляется более вероятным, что источником сигнала фосфора является РНК, а не липидная оболочка вируса, так как сигнал неравномерно распределен по вириону, что показано и в предыдущих работах [36].

Наконец, применение метода СПЭМ-СХПЭЭ позволило выявить распределение значительно меньшего количества РНК внутри очищенных инактивированных вирионов клещевого энцефалита (ВКЭ) [37]. Нуклеокапсиды ВКЭ имеют диаметр 50 нм, а геномная одноцепочечная РНК содержит всего лишь около 11 т.п.н. (рис. 8А). Все вирионы, использованные в этом эксперименте, демонстрировали сигнал фосфора (рис. 8Б), максимальный в центральной части вириона, но не на периферии. Это косвенно свидетельствует о том, что источником сигнала в данном случае был фосфор из РНК. Подобное неравномерное распределение фосфорного сигнала наблюдалось также в вирионах SARS-CoV-2 (рис. 7А) и капсидах бактериофагов phiEL (рис. 6). Изученные вирионы ВКЭ отличались по интенсивности сигнала (рис. 8Б). Можно предположить, что вирионы с очень низким сигналом фос-

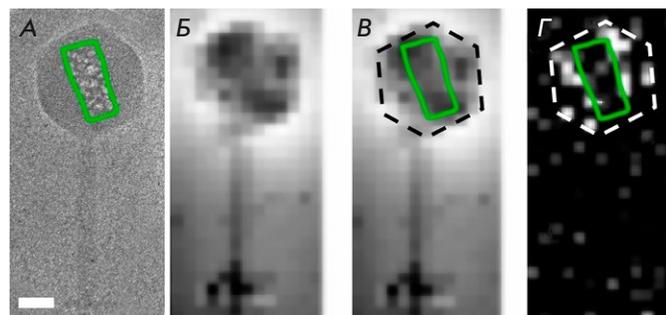


Рис. 6. Расположение внутреннего тела в бактериофаге phiEL показано с помощью картирования фосфора. А – полученное с помощью криоэлектронной микроскопии изображение бактериофага phiEL, облученного высокой дозой электронов. Область внутреннего тела выделена линией зеленого цвета. Масштабный отрезок – 50 нм. Б, В – темнопольное изображение в высокоугловых рассеянных электронах (HAADF) бактериофага phiEL. Границы капсида отмечены пунктирной линией черного цвета, область внутреннего тела выделена линией зеленого цвета (В). Г – карта распределения фосфора. Интенсивность пикселей отражает уровень сигнала элемента в спектрах характеристических потерь энергии электронами. Границы капсида отмечены пунктирной линией белого цвета; внутреннее тело показано линией зеленого цвета (из [31], воспроизведено с разрешением)

фора (рис. 8Б) утратили РНК или структура РНК в них разупорядочена в результате инактивации формальдегидом [38].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Просвечивающая электронная микроскопия (ПЭМ) позволяет раскрыть сложность структуры клеток с нанометровым разрешением, но интерпретация макромолекулярной функциональности затруднена из-за сложности распознавания изображений с неидентифицированным молекулярным содержанием. Если дополнить ПЭМ энергодисперсионным рентгеновским анализом (ЭДРС), позволяющим анализировать данные на основе элементного состава, то эндогенные везикулы, различные метки (наночастицы на основе золота или кадмия), а также нуклеиновые кислоты можно проанализировать с ультраструктурным разрешением. Комплексный СПЭМ-СХПЭЭ-анализ и использование охлаждающего держателя образцов для минимизации радиационного повреждения позволяют картировать содержание фосфора (а, следовательно, расположение нуклеиновых кислот) в нанометровых объектах (50–200 нм), в том числе в инактивированных вирусах. Данный метод успешно применен для визуализации межмолекулярных взаимодействий и де-

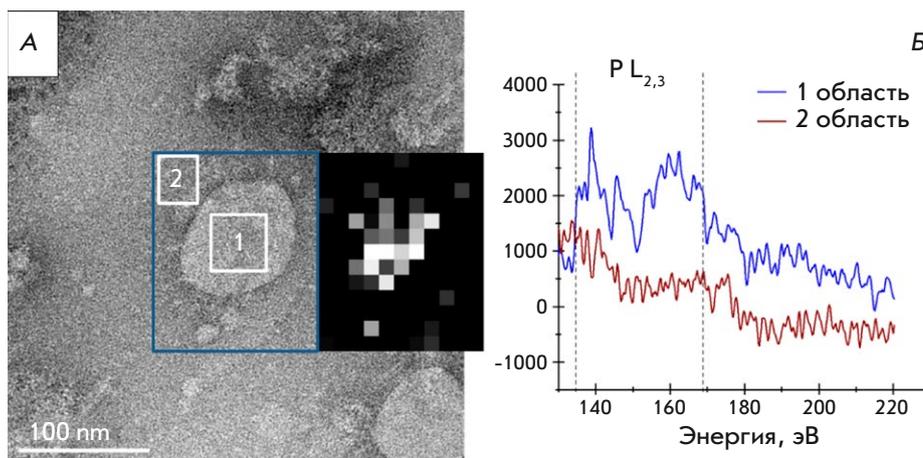


Рис. 7. Изображение инактивированного вириона SARS-CoV-2 и анализ его элементного состава. А – карта распределения фосфора, совмещенная с ПЭМ-изображением. Б – графики СХПЭЭ-спектров, полученные от вириона (область 1 на изображении (7А)) и от участка подложки вне него (область 2 на изображении (7А)) (из [35], воспроизведено с разрешением)

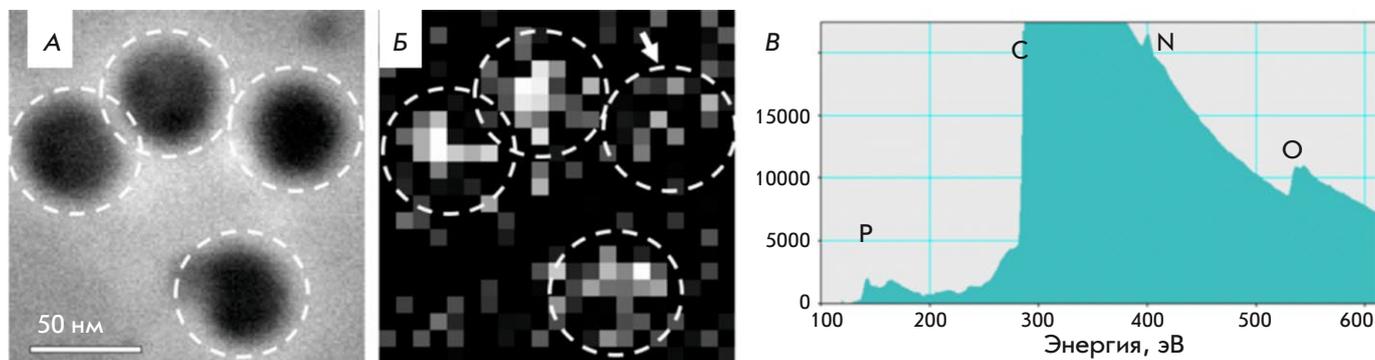


Рис. 8. СПЭМ-СХПЭЭ-анализ ВКЭ. А – СПЭМ-изображение вирионов вируса клещевого энцефалита; Б – карта распределения фосфорных СХПЭЭ-сигналов в том же образце; белые пунктирные линии обозначают границы вирионов, а стрелка указывает на вирион с низким фосфорным сигналом. В – СХПЭЭ-спектр от одного репрезентативного вириона. Буквами обозначены положения краев спектра для соответствующих элементов: Р – фосфор, С – углерод, N – азот и О – кислород (из [37], открытый источник)

текции изменений, происходящих с ДНК в клетке при вирусном заражении. Построение элементных карт фосфора в вирионах наноразмера происходит на пределе обнаружения для метода СХПЭЭ, поэтому получаемые данные, как правило, имеют низкое отношение сигнал/шум. Однако даже в этом случае метод СХПЭЭ подтверждает присутствие РНК в большинстве исследованных частиц и прекрасно согласуется с результатами других работ [38].

Элементное картирование может быть применено для получения объективной биомедицинской информации, так как при исследовании этим методом вирусоподобных частиц, разрабатываемых в качестве компонентов новых вакцин, наличие сигнала фосфора не выявляется. Можно предположить, что применение элементного картирования позволит в дальнейшем проводить экспериментальный анализ вирусов и вирусоподобных частиц и сделает

аналитическую электронную микроскопию перспективным инструментом тестирования биомедицинской продукции.

Авторы приносят благодарности коллегам, без которых ряд цитируемых работ не был бы опубликован: А.М. Егорову, Т.В. Гребенниковой, Ю.Ф. Крупянскому, Д.И. Осолодкину, М.В. Буркальцевой, В.Н. Крылову, М.В. Якуниной.

Аналитическая электронная микроскопия проводилась на базе ЦКП «Электронная микроскопия в науках о жизни» МГУ (УНУ «Трехмерная электронная микроскопия и спектроскопия»).

Работа поддержана грантом РФФ № 19-74-30003.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Philimonenko V.V., Philimonenko A.A., Šloufová I., Hrubý M., Novotný F., Halbhuber Z., Krivjanská M., Nebesářová J., Šlouf M., Hozák P. // *Histochem. Cell. Biol.* 2014. V. 141. № 3. P. 229–239. doi: 10.1007/s00418-013-1178-6.
2. Turk M., Baumeister W. // *FEBS Lett.* 2020. V. 594. № 20. P. 3243–3261. doi: 10.1002/1873-3468.13948.
3. Nakane T., Kotecha A., Sente A., McMullan G., Masiulis S., Brown P.M.G.E., Grigoras I.T., Malinauskaite L., Malinauskas T., Miehlung J., et al. // *Nature.* 2020. V. 587. № 7832. P. 152–156. doi: 10.1038/s41586-020-2829-0.
4. Yip K.M., Fischer N., Paknia E., Chari A., Stark H. // *Nature.* 2020. V. 587. № 7832. P. 157–161. doi: 10.1038/s41586-020-2833-4. Epub 2020 Oct 21. PMID: 33087927.
5. Martin J.S., Renshaw S.A. // *Biochem. Soc. Trans.* 2009. V. 37. Pt 4. P. 830–837. doi: 10.1042/BST0370830.
6. Hell S.W. // *Angew. Chem. Int. Ed Engl.* 2015. V. 54. № 28. P. 8054–8066. doi: 10.1002/anie.201504181.
7. Frank J. // *Angew. Chem. Int. Ed Engl.* 2018. V. 57. № 34. P. 10826–10841. doi: 10.1002/anie.201802770.
8. Egerton R.F. // *Rep. Progr. Phys.* 2009. V. 72. № 1. P. 016502.
9. Brydson R., Brown A., Benning L.G., Livi K. // *Rev. Mineral Geochem.* 2014. V. 78. P. 219–269.
10. Warley A. // *J. Microscopy.* 2016. V. 261. № 2. P. 177–184.
11. Bird R.P., Eskin N.A.M. // *Adv. Food. Nutr. Res.* 2021. V. 96. P. 27–88. doi: 10.1016/bs.afnr.2021.02.001.
12. Васильева С.Г., Зайцев П.А., Баулина О.И., Лобакова Е.С., Соловченко А.Е., Горелова О.А. // *Российские нанотехнологии.* 2023. Т. 18. № 1. С. 53–62. doi: 10.56304/S1992722323010168.
13. Bazett-Jones D.P., Hendzel M.J. // *Methods.* 1999. V. 17. № 2. P. 188–200. doi: 10.1006/meth.1998.0729.
14. Brintlinger T.H., Buckhout-White S., Bassim N.D., Mathur D., Samanta A., Robinson J.T., Idrobo J.C., Stroud R.M., Goldman E.R., Ancona M.G. // *ACS Appl. Nano Materials.* 2020. V. 3. № 2. P. 1123–1130.
15. Scott J.F. // *Biochim. Biophys. Acta.* 1948. V. 2. P. 1–6.
16. Scotuzzi M., Kuipers J., Wensveen D.I., de Boer P., Hagen K.C., Hoogenboom J.P., Giepmans B.N. // *Sci. Rep.* 2017. V. 7. P. 45970. doi: 10.1038/srep45970.
17. Shebanova A., Ismagulova T., Solovchenko A., Baulina O., Lobakova E., Ivanova A., Moiseenko A., Shaitan K., Polshakov V., et al. // *Protoplasma.* 2017. V. 254. № 3. P. 1323–1340. doi: 10.1007/s00709-016-1024-5.
18. Aronova M.A., Kim Y.C., Harmon R., Sousa A.A., Zhang G., Leapman R.D. // *J. Struct. Biol.* 2007. V. 160. № 1. P. 35–48. <https://doi.org/10.1016/j.jsb.2007.06.008>
19. Ottensmeyer F.P., Andrew J.W. // *J. Ultrastruct. Res.* 1980. V. 72. № 3. P. 336–348. [https://doi.org/10.1016/s0022-5320\(80\)90069-6](https://doi.org/10.1016/s0022-5320(80)90069-6)
20. Loiko N., Danilova Y., Moiseenko A., Kovalenko V., Tereshkina K., Tutukina M., Galina El-Registan G., Sokolova O., Krupyanskiy Y. // *PLoS One.* 2020. V. 15. № 10. P. e0231562. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0231562>
21. Antipov S.S., Tutukina M.N., Preobrazhenskaya E.V., Kondrashov F.A., Patrushev M.V., Toshchakov S.V., Dominova I., Shvyreva U.S., Vrublevskaya V.V., Morenkov O.S., et al. // *PLoS One.* 2017. V. 12. № 8. P. e0182800.
22. Minsky A., Shimoni E., Frenkiel-Krispin D. // *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 2002. V. 3. № 1. P. 50–60.
23. Kamyshinsky R., Chesnokov Yu., Dadinova L., Mozhaev A., Orlov I., Petoukhov M., Orekhov A., Shtykova E., Vasiliev A. // *Biomolecules.* 2019. V. 10. № 1. P. 39.
24. Frenkiel-Krispin D., Minsky A. // *J. Struct. Biol.* 2006. V. 156. № 2. P. 311–319.
25. Danilova Y.A., Belousova V.V., Moiseenko A.V., Vishnyakov I.E., Yakunina M.V., Sokolova O.S. // *Viruses.* 2020. V. 12. № 10. P. 1197. doi: 10.3390/v12101197.
26. Ойкава Т., Синдо Д. Аналитическая просвечивающая электронная микроскопия. М.: Техносфера, 2006. 256 с.
27. Mendoza S.D., Nieweglowska E.S., Govindarajan S., Leon L.M., Berry J.D., Tiwari A., Chaikerasak V., Pogliano J., Agard D.A., Bondy-Denomy J. // *Nature.* 2020. V. 577. P. 244–248.
28. Chaikerasak V., Nguyen K., Khanna K., Brilot A.F., Erb M.L., Coker J.K.C., Vavilina A., Newton G.L., Buschauer R., Pogliano K., et al. // *Science.* 2017. V. 355. P. 194–197.
29. Quintana C., Marco S., Bonnet N., Risco C., Gutiérrez M.L., Guerrero A., Carrascosa J.L. // *Micron.* 1998. V. 29. № 4. P. 297–307. doi: 10.1016/s0968-4328(98)00011-0.
30. Nevsten P., Evilevitch A., Wallenberg R. // *J. Biol. Phys.* 2012. V. 38. № 2. P. 229–240. doi: 10.1007/s10867-011-9234-8.
31. Трифонова Т.С., Моисеенко А.В., Буркальцева М.В., Шабурова О.В., Шайтан А.К., Крылов В.Н., Соколова О.С. // *Вопросы вирусологии.* 2021. Т. 66. № 6. С. 434–441. doi: <https://doi.org/10.36233/0507-4088-80>.
32. Mishyna M., Volokh O., Danilova Ya., Gerasimova N., Pechnikova E., Sokolova O.S. // *Micron.* 2017. V. 96. P. 57–64.
33. Sokolova O.S., Shaburova O.V., Pechnikova E.V., Shaytan A.K., Krylov S.V., Kiselev N.A., Krylov V.N. // *Virology.* 2014. V. 468–470. P. 472–478. doi: 10.1016/j.virol.2014.09.002.
34. Cornelissen A., Hardies S.C., Shaburova O.V., Krylov V.N., Mattheus W., Kropinski A.M., Lavigne R. // *J. Virol.* 2012. V. 86. № 3. P. 1844–1852. doi: 10.1128/JVI.06330-11.
35. Bagrov D.V., Glukhov G.S., Moiseenko A.V., Karlova M.G., Litvinov D.S., Zaitsev P.A., Kozlovskaya L.I., Shishova A.A., Kovpak A.A., Ivin Y.Y., et al. // *Microscopy Res. Technique.* 2022. V. 85. № 2. P. 562–569.
36. Klein S., Cortese M., Winter S.L., Wachsmuth-Melm M., Neufeldt C.J., Cerikan B., Stanifer M.L., Boulant S., Bartenschlager R., Chlanda P. // *Nat. Commun.* 2020. V. 11. P. 5885. <https://doi.org/10.1038/s41467-020-19619-7>
37. Moiseenko A.V., Bagrov D.V., Vorovitch M.F., Uvarova V.I., Veselov M.M., Kashchenko A.V., Ivanova A.L., Osolodkin D.I., Egorov A.M., Ishmukhametov A.A., et al. // *Biomedicines.* 2022. V. 10. P. 2478. <https://doi.org/10.3390/biomedicines10102478>
38. Moiseenko A., Zhang Y., Vorovitch M.F., Ivanova A.L., Liu Z., Osolodkin D.I., Egorov A.M., Ishmukhametov A.A., Sokolova O.S. // *Emerging Microbes & Infections.* 2024. V. 13. № 1. P. 2290833.

УДК 581.19

Химически активные побочные продукты редокс-метаболизма растений и функции белков

Е. И. Шарова*, С. С. Медведев

Санкт-Петербургский государственный университет, Санкт-Петербург, 199034 Россия

*E-mail: e.sharova@spbu.ru

Поступила в редакцию 02.08.2024

Принята к печати 18.10.2024

DOI: 10.32607/actanaturae.27477

РЕФЕРАТ Живые организмы обладают удивительной способностью значительно расширять базовую информацию о строении и функциях белка, закодированную в геноме. Существует несколько способов увеличения разнообразия и функциональных возможностей белков, главными из которых являются альтернативный сплайсинг мРНК и посттрансляционные модификации белков (ПТМ). Большинство химических реакций, протекающих в живых клетках, контролируется ферментами. Однако в клетках постоянно появляются химически активные побочные продукты редокс-метаболизма растений, которые могут спонтанно реагировать с биомолекулами, в том числе с белками, вызывая их модификации. Активные карбонилы, возникающие в ходе окислительного метаболизма углеводов и липидов, карбонируют белки, приводя к их инактивации и отложению в форме конечных продуктов гликирования и липоксидирования. Нитрозилирование белков, вызываемое активными формами азота, – важный элемент реализации морфогенетических программ и стрессовых реакций растений. Редокс-модификации тиольных групп белков под действием активных форм кислорода контролируются тиоредоксинами и глутаредоксинами и вовлечены в фолдинг белков, регуляцию активности ферментов, кальциевую и гормональную сигнализацию. В обзоре обобщена информация о ПТМ, вызываемых химически активными метаболитами, и о роли этих модификаций в функционировании белков растений. **КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА** посттрансляционные модификации белков (ПТМ); протеоформы; карбонилирование; нитрозилирование; глутатионилирование; сульфенилирование.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ АФК – активные формы кислорода; АБК – абсцизовая кислота; МДА – малоновый диальдегид; ПТМ – посттрансляционные модификации белков; AGE – конечные продукты гликирования; ALE – конечные продукты липоксидирования; GAPDH – глицеральдегид-3-фосфат-дегидрогеназа; GPX – глутатионпероксидаза; Grx – глутаредоксин; GSH – глутатион; GSNO – нитрозоглутатион; GSSG – глутатион-дисульфид; GSNOR – нитрозоглутатионредуктаза; HNE – 4-гидрокси-2-ноненаль; MG – метилглиоксаль; MSR – метионинсульфоксид-редуктаза; PDI – протеин-дисульфидизомераза; PRX – пероксиредоксин; SA – салициловая кислота; Trx – тиоредоксин.

ВВЕДЕНИЕ

Живые организмы обладают удивительной способностью значительно расширять базовую информацию о потенциальных функциях белков, которая закодирована в геноме. Для этого существует несколько способов, главными из которых являются альтернативный сплайсинг мРНК [1–3] и посттрансляционные модификации белков (ПТМ) [4–7]. ПТМ белков – ферментативно катализируемые или спонтанно возникающие модификации их аминокислотных остатков – способны кардинально изменить функции белка или привести к их потере. ПТМ значительно увеличивают разнообразие, функциональ-

ные возможности белков и служат основой многих клеточных сигнальных событий.

В последние годы различные вариации модификаций белка, кодируемого одним и тем же геном, чаще стали называть *протеоформами* (proteoforms) [4, 8–11]. Этот термин относится к белковым продуктам одного гена, различающимся вариантами сплайсинга и ПТМ [8, 9, 11]. Протеоформы охватывают различные механизмы биологической изменчивости (модификации) белковой молекулы, которые определяют ее функциональную специфичность. Характеристики белка на уровне протеоформы имеют решающее значение для полного

понимания биологических процессов, контролируемых белковыми молекулами. Функции белков могут значительно модулироваться фосфорилированием, N- и O-гликозилированием, метилированием, ацилированием, S-глутатионилированием, убиквитинированием, сумоилированием и многими другими ПТМ [7, 8, 11]. Кроме того, каждый белок, как правило, содержит несколько сайтов ПТМ. В результате количество протеоформ может на несколько порядков превышать число генов, кодирующих эти белки [8, 12]. Следовательно, различные комбинации ПТМ одного и того же белка являются мощным источником диверсификации протеоформ [4, 8, 9, 11]. Способность производить несколько протеоформ из одной последовательности генов представляет собой эффективный инструмент, обеспечивающий диверсификацию биологических функций белков, лежащих в основе реакций растений на постоянно меняющиеся условия окружающей среды [11]. Понимание идентичности и функциональной специфичности этих протеоформ также необходимо для выяснения полной картины регуляции многих физиолого-биохимических процессов клетки на уровне белков.

Большинство химических реакций, протекающих в организме, контролируется ферментами. Однако многие метаболиты могут спонтанно реагировать друг с другом и с биомолекулами, от которых зависит гомеостаз. Особое значение имеют метаболиты, которые проявляют высокую химическую активность, вызывая быстрые и зачастую необратимые повреждения нуклеиновых кислот, липидов, углеводов и белков. Наибольшей сложностью и разнообразием отличается их действие на белки [13]. Долгое время считалось, что спонтанные реакции – помеха для строго отрегулированного метаболизма. Сейчас очевидно, что они прочно вплетены в системы регуляции гомеостаза в меняющихся условиях среды. Яркий пример взаимосвязи спонтанных и ферментативных процессов представляют многочисленные ПТМ [13, 14]. Активные формы кислорода, азота, серы, вещества с активными карбонильными группами проявляют себя как сильные окислители, отнимая электроны от атомов углерода, серы и азота, или как сильные электрофилы, присоединяясь к нуклеофильным группам белков [15]. Причем один и тот же активный агент, например, гидроксил-радикал, может выступать и как окислитель, и как электрофил.

Данная область знания очень быстро развивается и нуждается в регулярном обобщении. Многие явления остаются мало изученными и их интерпретации носят спекулятивный характер. В данном обзоре мы попытались выделить из массы фактов те, ко-

торые характеризуют современные представления о протеоформах, порождаемых химически активными побочными продуктами редокс-метаболизма растений.

АКТИВНЫЕ КАРБОНИЛЬНЫЕ СОЕДИНЕНИЯ

Карбонильными называются органические соединения, имеющие в своем составе карбонильную группу (оксогруппу) C=O. Обычно к ним относят только альдегиды и кетоны, однако карбонильная группа содержится также в молекулах сложных эфиров, амидов и других производных карбоновых кислот. Прежде всего это интермедиаты гликолиза, пентозофосфатного пути, цикла Кальвина [16, 17]. В высоких концентрациях они могут вызывать спонтанное гликирование и повреждение белков, как это происходит у человека при диабете [17]. Вместе с тем в клетках есть карбонильные соединения, которые проявляют такую активность даже в микромолярных концентрациях.

У растений известно около 20 активных карбонильных соединений. Среди них наиболее распространены диальдегиды: глиоксаль, метилглиоксаль (MG), малоновый диальдегид (МДА), а также α,β -ненасыщенные альдегиды, из которых чаще других встречается 4-гидрокси-2-ноненаль (HNE) [16, 17]. Эти соединения имеют сильно поляризованные карбонильные группы ($C^+=O^-$) и осуществляют электрофильную атаку на нуклеофильные группы белков. Глиоксаль, МДА и HNE – конечные продукты перекисного окисления липидов под действием активных форм кислорода [18]. MG – продукт спонтанного дефосфатирования триозофосфатов: фосфодиоксиацетона и глицеральдегид-3-фосфата [19]. MG обычно присутствует в клетках растений в концентрации ниже 10 мкМ [20], однако в стрессовых условиях его содержание многократно увеличивается, например, при фосфатном голодании [20], загрязнении тяжелыми металлами [21].

Токсичность активных карбонильных соединений для белков обусловлена их способностью присоединяться к аминогруппам остатков лизина и аргинина, а также к тиольной группе остатков цистеина. Результатом такого присоединения является карбонилирование белков, то есть увеличение числа карбонильных групп в их составе. Если карбонилирование достигается присоединением сахаров и их производных, то его называют гликированием белков [20, 22] – совокупностью неферментативных ПТМ, происходящих при взаимодействии белков с сахарами и карбонильными продуктами их деградации [17].

Механизм гликирования, первоначально изученный более 100 лет назад на примере осахаривания

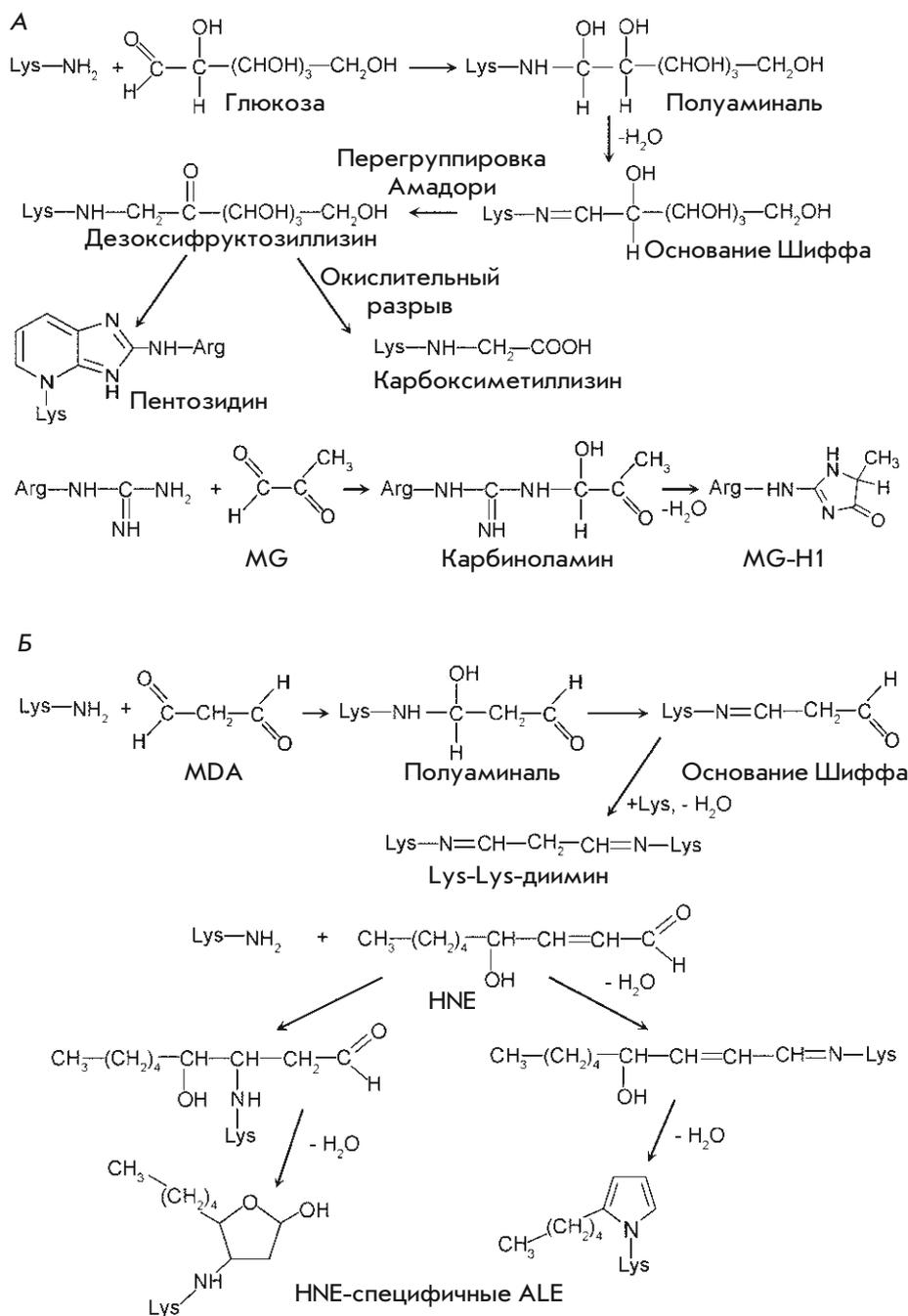


Рис. 1. Карбонилирование белков. А – гликирование глюкозой и метилглиоксалем (MG), Б – липоксидирование малоновым диальдегидом (MDA) и 4-гидрокси-2-ноненалем (HNE)

белков в процессе жарки продуктов питания, получил название реакции Майяра. При высокой температуре продукты спонтанной деградации глюкозы и фруктозы присоединяются к ε-аминогруппе остатков лизина в белках, преобразуются в основание Шиффа, а затем претерпевают перегруппировку Амадори [23].

Подобные процессы наблюдаются и в живых клетках. Глюкоза и продукты ее окисления могут совершать электрофильную атаку на ε-аминогруппу лизина (рис. 1А). В результате образуется неста-

бильный первичный продукт гликирования – полуамираль, и на этом этапе процесс гликирования обратим. Однако полуамираль дегидратируется и превращается в основание Шиффа, которое быстро подвергается перегруппировке Амадори и превращается в дезоксифруктозиллизин. В результате серии спонтанных реакций в клетках накапливаются конечные продукты гликирования белков AGE (advanced glycation end products). Классификация AGE часто основана на их карбонильных предшественниках и/или промежуточных соединениях [24].

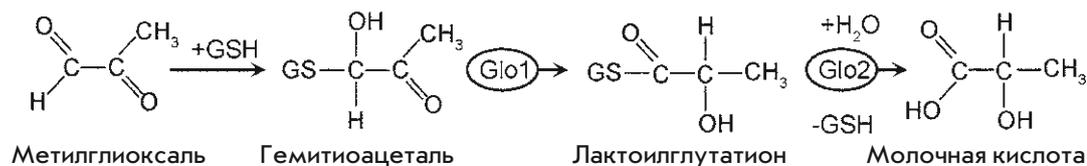


Рис. 2. Детоксикация метилглиоксала (MG) глиоксалазами Glo1 и Glo2

AGE обладают высокой степенью гетерогенности и представлены разнообразными алифатическими, ароматическими и гетероциклическими структурами [17]. Карбоксиметиллизин – наиболее распространенный продукт реакции Майяра. Маркером гликирования также служит пентозидиновая сшивка между модифицированными остатками лизина и аргинина в белках [25].

Глиоксаль и MG тысячекратно активнее глюкозы [20]. Их основная мишень – гуанидиновая группа аргинина, с которой они образуют карбиноламин (рис. 1А), спонтанно преобразующийся в серию производных гидроимидазолон G-H (glyoxal-derived hydroimidazolone) и MG-H (methylglyoxal-derived hydroimidazolone) [26, 27]. У растений MG-H1 – это самый распространенный AGE [20].

Если агентами карбонилирования служат продукты свободнорадикального окисления липидов, то происходит липоксидирование белков [28]. Несмотря на то что эта модификация сама по себе не окислительная, она часто способствует повреждению белков в условиях окислительного стресса. Спонтанные преобразования нестабильных первичных аддуктов приводят к накоплению конечных продуктов липоксидирования ALE (advanced lipoxidation end products), представленных множеством характерных химических структур в составе белков [29]. Белковыми мишенями липоксидирования являются белки основного метаболизма, сигналинга, цитоскелета и факторы транскрипции.

Конечные продукты свободнорадикального окисления липидов активно атакуют остатки лизина [27]. МДА вначале образует с лизином полуаминаль, который быстро преобразуется в основание Шиффа (рис. 1Б). Взаимодействие второй альдегидной группы МДА с остатком лизина того же или другого белка приводит к появлению поперечной сшивки в форме лизин-лизинового диимина – широко распространенного ALE [30]. Присоединение HNE и других α,β-ненасыщенных альдегидов к остаткам лизина в белках происходит посредством реакции Майкла (рис. 1Б) [27, 29]. Конечные гетероциклические производные липоксидирования белков HNE – одни из наиболее характерных маркеров повреждения белков продуктами перекисаации липидов.

У растений гликирование и липоксидирование белков заметно возрастают в условиях стресса [17,

20, 31]. Эти модификации необратимы, поэтому основная стратегия живых организмов направлена на предотвращение таких модификаций посредством антиоксидантного противодействия перекисаации липидов, а также детоксикации MG и глиоксала глиоксалазами.

Глиоксалазы превращают MG в молочную кислоту (рис. 2), а глиоксаль – в гликолевую кислоту [24]. Реакции протекают при участии глутатиона (GSH), который играет роль кофактора. MG спонтанно присоединяется к SH-группе глутатиона с образованием тиополацетала, который сначала изомеризуется в лактоилглутатион под действием глиоксалазы 1 (Glo1), а затем гидролизуется под действием Glo2. Глиоксалазы описаны у многих про- и эукариот. У арабидопсиса выявлены 22 гена, которые кодируют Glo1, и 9 генов – Glo2. Эти ферменты наиболее активны в хлоропластах, но также содержатся в митохондриях, ядре, цитозоле, клеточных стенках, пероксисомах [32].

Необратимое карбонилирование белков наблюдается на всех стадиях жизненного цикла растений и в целом рассматривается как неизбежный процесс повреждения белков, усиливающийся при стрессе. Очевидно, что изучение химизма карбонилирования белков намного опередило понимание функциональных аспектов этого явления. Опубликованные данные косвенно свидетельствуют о том, что карбонилирование белков зависит не только от уровня активных карбонильных соединений, но тонко регулируется и участвует в передаче гормональных сигналов, в процессах прорастания семян, индукции цветения и др. [33].

АКТИВНЫЕ ФОРМЫ АЗОТА

Химически активные формы азота образуются в результате спонтанных редокс-превращений оксида азота NO и ряда других азотсодержащих веществ. В последние годы роль активных форм азота стала вызывать особый интерес в связи с участием в регуляции процессов роста и развития, адаптации к биотическим и абиотическим стрессорам, транскрипции гормональных сигналов растений [34–37].

У млекопитающих NO образуется из аргинина в реакции, катализируемой NO-синтазами – NADPH-зависимыми оксигеназами, имеющими в своем составе флавиновый кофермент, железозависимый гем-кофактор.

порфирин и тетрагидробиоптерин. NO-синтазы не только вырабатывают $\cdot\text{NO}$, но и участвуют в специфическом нитрозилировании белков, вступая в белок-белковые взаимодействия [38].

У растений не обнаружены ферменты, гомологичные NO-синтазам млекопитающих. Тем не менее показана возможность образования $\cdot\text{NO}$ посредством окисления аргинина и полиаминов [39]. Основным источником $\cdot\text{NO}$ у растений является процесс одноэлектронного восстановления нитрита (NO_2^-) цитоплазматическими нитратредуктазами. Эти NADPH-зависимые оксидоредуктазы с молибденовым кофактором проявляют небольшую (1%) нитритредуктазную активность. У арабидопсиса, как и у многих других высших растений, имеются две нитратредуктазы, одна из которых (NR1) обладает высокой способностью продуцировать $\cdot\text{NO}$, тогда как другая (NR2) отвечает за 90% активности, восстанавливающей нитраты до нитритов [39]. В условиях гипоксии значительный вклад в накопление $\cdot\text{NO}$ в клетках вносит процесс восстановления NO_2^- в электрон-транспортной цепи митохондрий [39].

С белками легко взаимодействуют пероксинитрит ONOO^- , нитрозоний-катион NO^+ , азотистый ангидрид $\cdot\text{NO}_2$ и др. (рис. 3А). Биологически значимые NO-зависимые посттрансляционные модификации включают нитрозилирование входящих в состав белков переходных металлов, ковалентную модификацию остатков цистеина (S-нитрозилирование), и нитрирование остатков тирозина [40]. S-нитрозилирование играет важную регуляторную роль. Так, его нарушение в организме человека связано с тяжелыми нейродегенеративными заболеваниями, дисфункцией иммунной и сердечно-сосудистой систем [38]. У растений S-нитрозилирование влияет на ферментативную активность, локализацию, скорость деградации белков, а также на взаимодействие с другими белками и ДНК [34, 41, 42].

Основной агент нитрирования белков – ONOO^- , а основной агент S-нитрозилирования – нитрозоглутатион (GSNO), который образуется в результате атаки глутатиона активными формами азота (N_2O_3 , NO^+) (рис. 3Б). GSNO играет роль резервуара и транспортной формы $\cdot\text{NO}$ в клетках растений [43]. От нитрозоглутатиона $\cdot\text{NO}$ передается на SH-группы белков в спонтанных реакциях транснаитрозилирования (рис. 3В).

Денитрозилирование GSNO зависит от активности нитрозоглутатионредуктаз (GSNOR) – консервативных белков, локализованных в цитоплазме и нуклеоплазме [44]. Денитрозилирование SH-групп белков ($\text{R-SNO} \rightarrow \text{R-SH}$) осуществляется с помощью тиоредоксинов (Trx) или путем транснаитрозилирования GSH (рис. 3В). Кроме GSNOR и Trx

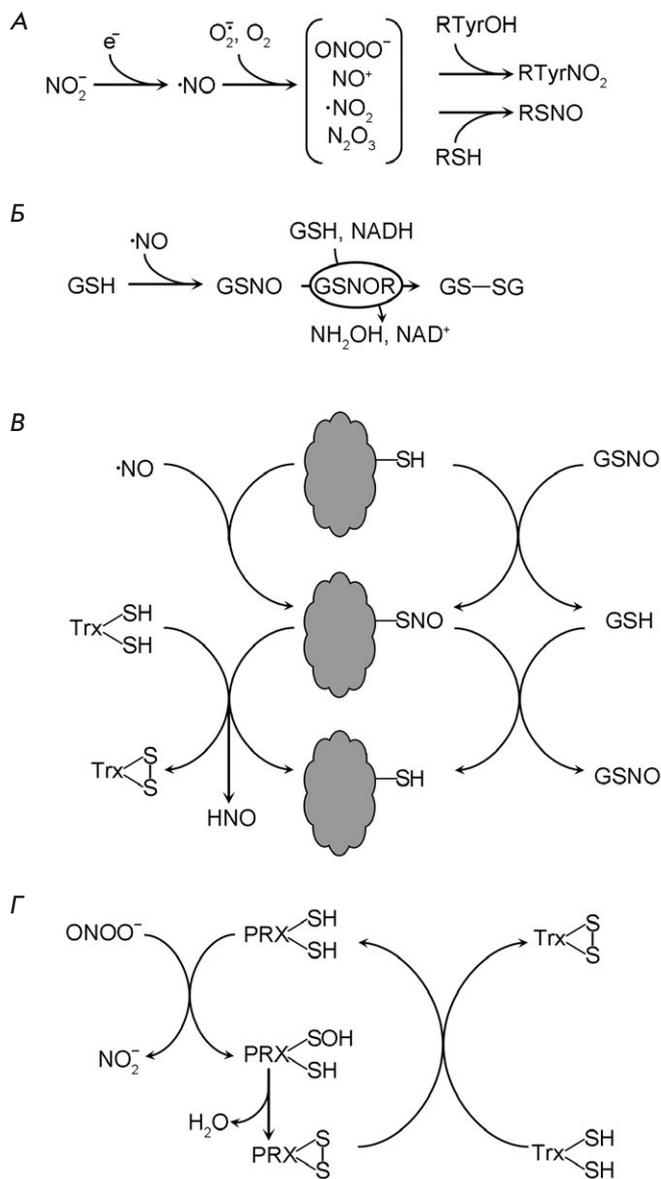


Рис. 3. Влияние активных форм азота на белки. А – общая схема образования оксида азота ($\cdot\text{NO}$), его превращения в химически активные формы и включения в белки; Б – нитрозилирование глутатиона (GSH) и денитрозилирование нитрозоглутатиона (GSNO) нитрозоглутатионредуктазами (GSNOR); В – S-нитрозилирование, транснаитрозилирование и денитрозилирование белков; Г – утилизация пероксинитрита (ONOO^-) пероксиредоксинами (PRX). Trx – тиоредоксины

в детоксикации активных форм азота участвуют пероксиредоксины (PRX), превращающие пероксинитрит в нитрит (рис. 3Г) [34, 45]. В результате образуется восстановленный тиольный белок (R-SH) и окисленный Trx, который впоследствии восстанавливается NADPH-зависимой Trx-редуктазой. Транснаитрозилирование катализируется трансни-

тросилазой, несущей группу SNO, которая переносит фрагмент $\cdot\text{NO}$ на целевой белок [34].

Нитрирование у растений, как и у животных, обычно приводит к ингибированию активности и деградации белков. Нитрированию особенно подвержены каталаза и ферменты аскорбат-глутатионового цикла – основного участника удаления АФК у растений [46].

Липофильный свободный радикал $\cdot\text{NO}$ легко диффундирует через мембраны, что делает его идеальной аутокринной (внутри одной клетки) и паракринной (между соседними клетками) сигнальной молекулой. Сигнальная функция $\cdot\text{NO}$ подробно изучена у млекопитающих и человека [38]. Известно, что одним из важнейших его рецепторов выступает гуанилатциклаза, у которой нитрозилируется гемовое железо Fe^{2+} : FeNO . Активация фермента приводит к синтезу циклического GMP, выступающего в роли вторичного мессенджера [47].

Чувствительность к оксиду азота – древняя особенность, обеспечиваемая гемопротейнами, содержащими домены H-NOX (Heme-nitric oxide/oxygen binding). Такие домены, способные служить сенсорами $\cdot\text{NO}$, найдены в бактериях, грибах и животных, включая человека [48, 49]. Долгое время считалось, что у растений эти белки отсутствуют, однако недавно удалось обнаружить несколько NO-чувствительных гемопротейнов и у растений. Оказалось, что NO-чувствительные гемопротейны растительных организмов также содержат консервативные H-NOX-домены, которые связывают $\cdot\text{NO}$ и O_2 [50, 51]. Выявлен также ряд сигнальных путей, в которых эти белки функционируют в качестве сенсоров $\cdot\text{NO}$ или O_2 . Показано, в частности, что гемопротейны растений, содержащие H-NOX-домены, опосредуют такие ключевые реакции, зависящие от $\cdot\text{NO}$, как рост пыльцевой трубки и закрывание устьиц [51].

Тем не менее, представления об NO-сигналинге у растений остаются неполными. Отсутствуют надежные данные о роли циклического GMP и нитрозилирования гемового и негемового железа белков. Более основательно доказано влияние S-нитрозилирования на ферментативную активность, субклеточную локализацию и скорость протеолиза белков основного метаболизма, а также на белок-белковые взаимодействия [52]. Установлено, что активирующему (+) и ингибирующему (-) действию S-нитрозилирования подвержены ферменты, регулирующие баланс АФК в клетках растений: супероксид-дисмутаза (-), каталаза (-), аскорбатпероксидаза (+), моно- и дидегидроаскорбатредуктазы (-).

S-нитрозилирование затрагивает белки, вовлеченные в гормональный сигналинг [47, 53]. Так, на-

копление $\cdot\text{NO}$ в набухших семенах арабидопсиса приводит к S-нитрозилированию и протеасомной деградации ABI5 – фактора транскрипции, отвечающего за зависимую от абсцизовой кислоты (АБК) экспрессию генов в семенах [42]. Таким способом происходит подавление АБК-сигналинга, что способствует прорастанию семян. При АБК-зависимом закрывании устьиц $\cdot\text{NO}$, по-видимому, контролирует завершение этой реакции, подавляя АБК-сигналинг посредством нитрирования/S-нитрозилирования рецептора гормона PYR1 [54] и протеинкиназы SnRK2.6, необходимой для АБК-сигналинга [55].

Получены данные о влиянии $\cdot\text{NO}$ на проведение гиббереллинового и ауксинового сигналов у арабидопсиса. Показано, что S-нитрозилирование консервативного цистеина у DELLA-белка RGA предотвращает протеасомную деградацию этого негативного регулятора гиббереллинового сигналинга [56]. S-нитрозилирование Aux/IAA17 препятствует его протеолизу, что приводит к подавлению ауксинового сигнала [57].

Можно утверждать, что информация о действии активных форм азота на белки растений в значительной степени описывает механизмы и функции S-нитрозилирования. Сведения о нитрозилировании переходных металлов в составе белков немногочисленны, несмотря на обнаружение у растений белков, содержащих NO-чувствительные H-NOX-домены [50].

АКТИВНЫЕ ФОРМЫ КИСЛОРОДА

Совершающиеся в живых организмах редокс-переходы $\text{O}_2 \rightarrow \text{H}_2\text{O}$ неизбежно порождают серию химически активных промежуточных форм (АФК): $\text{O}_2^{\cdot-}$, H_2O_2 , $\cdot\text{OH}$, $^1\text{O}_2$, которые могут напрямую реагировать с белками.

Обычно молекулярный кислород находится в относительно инертном триплетном состоянии ($^3\text{O}_2$). Образование АФК происходит энзиматически и неэнзиматически: в электрон-транспортных цепях митохондрий и хлоропластов, в пероксисомах при фотодыхании, в клеточных стенках в процессе реакции сверхчувствительности, а также в цитоплазме и нуклеоплазме [58]. Активация $^3\text{O}_2$ достигается за счет двух основных процессов: 1) повышения энергии одного из электронов и появления активной синглетной формы кислорода $^1\text{O}_2$ под воздействием фотосенсибилизаторов (преимущественно возбужденного триплетного хлорофилла $^3\text{P680}^*$) и УФ-излучения, 2) восстановления одного из атомов $^3\text{O}_2$ и превращения его в супероксидный анион-радикал ($\text{O}_2^{\cdot-}$) металлами с переменной валентностью или органическими донорами электрона [58]. В кислой среде (вакуоли, клеточные стенки) $\text{O}_2^{\cdot-}$ протонируется и превраща-

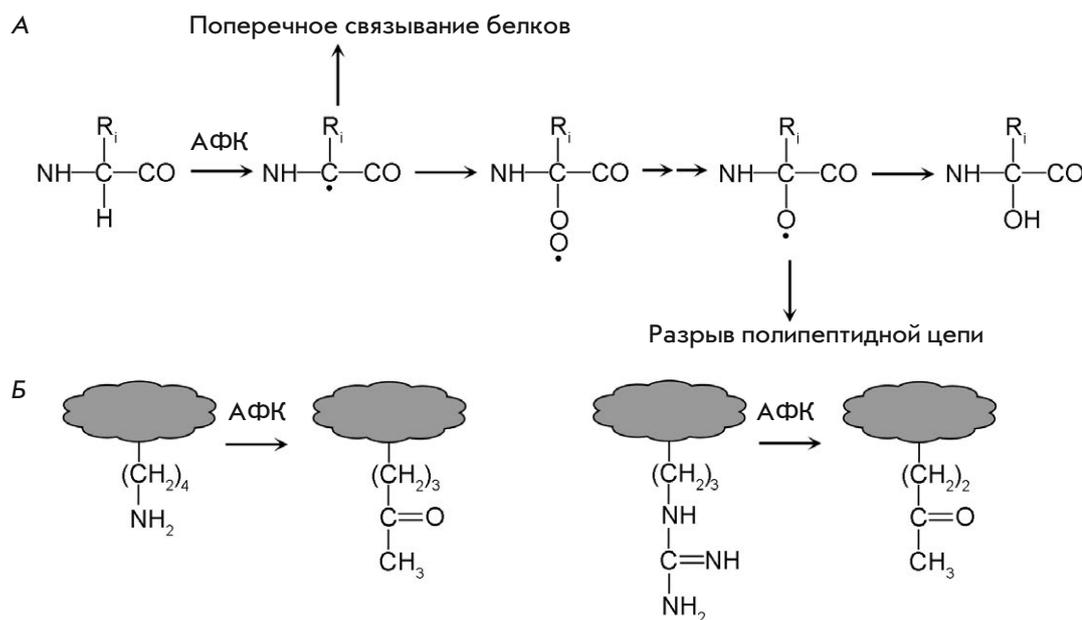


Рис. 4. Необратимое окисление полипептидной цепи (А) и боковых цепочек аминокислот (Б) под действием АФК

ется в гидропероксильный радикал ($\text{HO}_2\cdot$). Пероксид водорода (H_2O_2) – продукт активности супероксид-дисмутазы, растительных пероксидаз III класса, аминоксидаз, оксалатоксидаз, а также спонтанных превращений $\text{HO}_2\cdot$ и $\text{O}_2^{\cdot-}$. Образование гидроксильного радикала $\cdot\text{OH}$ происходит в реакции Фентона из H_2O_2 с участием металлов с переходной валентностью: $\text{H}_2\text{O}_2 + \text{Fe}^{2+} (\text{Cu}^+) \rightarrow \cdot\text{OH} + \text{Fe}^{3+} (\text{Cu}^{2+}) + \text{OH}^-$.

Вследствие своей высокой реакционной способности АФК реагируют с белками, липидами, углеводами, нуклеиновыми кислотами. Наиболее активные формы кислорода ($\text{HO}_2\cdot$ и $\cdot\text{OH}$) способны индуцировать цепные реакции, приводящие к образованию большого количества свободных радикалов, вызывающих деградацию биомолекул [59].

Степень избирательности действия АФК обратно пропорциональна их активности. Так, для $\cdot\text{OH}$ уязвимы и основная белковая цепь, и боковые цепочки аминокислотных остатков (рис. 4). Гидроксил-радикал запускает свободнорадикальный процесс, в результате которого происходит глубокое и необратимое повреждение белков: образуются сшивки между белками, распадаются полипептидные цепи, подвергаются окислительному дезаминированию остатки лизина и аргинина, распадаются остатки пролина и глутаминовой кислоты [60, 61]. Все эти изменения в целом приводят к увеличению относительного содержания карбонильных групп в белках. Такое карбонилирование обозначают как прямое, или первичное карбонилирование, так как в отличие от рассмотренного выше карбонильные группы формируются в результате окисления самого полипептида. В данном процессе участвует $\text{O}_2^{\cdot-}$, поскольку

генезис $\cdot\text{OH}$ обычно происходит в результате реакции Хабера–Вайса ($\text{O}_2^{\cdot-} + \text{H}_2\text{O}_2 \rightarrow \text{O}_2 + \cdot\text{OH} + \text{OH}^-$), катализируемой ионами железа и меди (реакция Фентона).

Синглетный кислород нестабилен, он мгновенно присоединяется по двойным связям между атомами углерода в липидах, белках, каротиноидах [62]. В белках его основной мишенью являются остатки триптофана [63, 64].

В силу высокой активности и низкой избирательности действия $\text{O}_2^{\cdot-}$, $\cdot\text{OH}$ и $^1\text{O}_2$ на биомолекулы основной способ защиты состоит в предотвращении образования и удалении этих АФК. Так, супероксид-дисмутазы, присутствующие во всех компартментах клеток, катализируют превращение $\text{O}_2^{\cdot-}$ в H_2O_2 , а каротиноиды физическим путем тушат $^1\text{O}_2$.

Пероксид водорода широко используется для высокоизбирательных и обратимых редокс-модификаций белков [65–67]. Замечательно то, что напрямую в живых клетках он окисляет только остатки серосодержащих аминокислот метионина и цистеина [13]. Одноступенчатое окисление метионина приводит к формированию метионинсульфоксида (рис. 5), ингибирующему биологическую активность белков. Метионинсульфоксид восстанавливается за счет метионинсульфоксид-редуктаз (MSR), которые у растений содержат в каталитическом центре пару остатков цистеина [68]. Один цистеин (каталитический) находится в форме тиолат-аниона (S^-) и превращается в сульфеновую кислоту (SOH), восстанавливая метионинсульфоксид. Другой (результатирующий) взаимодействует с SOH , что приводит к образованию дисульфидной связи. Регенерация

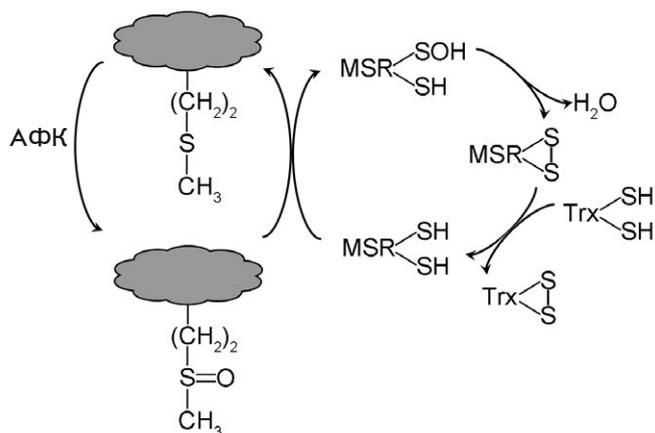


Рис. 5. Восстановление окисленного метионина с помощью метионинсульфоксид-редуктазы (MSR). Trx – тиоредоксины

фермента происходит при участии Trx, а регенерация Trx – при участии NADPH или ферредоксин-зависимых тиоредоксинредуктаз, рассмотренных ниже. В клетках растений MSR локализуется в цитоплазме, митохондриях, пластидах, эндоплазматической сети [68]. Система метионинсульфоксид/MSR часто рассматривается как «аварийный сброс», направляющий удар АФК в репарируемом направлении [69].

Окислительные модификации белков, вызываемые АФК, в отличие от карбонилирования продуктами углеводного и липидного метаболизма часто носят обратимый и даже регуляторный характер. В этих модификациях тесно переплетаются спонтанные и ферментативные процессы. В целом они образуют сложную сеть реакций, играющих не менее важную роль в живых клетках, чем реакции обратимого фосфорилирования белков, что позволяет рассматривать АФК в качестве ключевых сигнальных молекул в широком спектре сигнальных путей, включая адаптацию к стрессорам [70–73].

ОКИСЛЕНИЕ ОСТАТКОВ ЦИСТЕИНА В БЕЛКАХ

Тиольная группы цистеина SH может подвергаться следующим основным модификациям: окисляться до сульфеновой (SOH), сульфиновой (SO₂H), сульфоновой (SO₃H) кислот, формировать дисульфидную связь с SH-группой того же или другого белка, а также с SH-группой глутатиона (подвергаться глутатионилированию) [74] и сероводорода (подвергаться персульфидированию) [75].

В условиях стресса любая SH-группа в белках может окисляться до сульфеновой кислоты под действием различных АФК, включая H₂O₂ в повышенных концентрациях [13]. В благоприятной среде основной мишенью АФК являются диссоциирован-

ные SH-группы, т.е. тиолат-анионы S⁻. SH-группа аминокислоты цистеина в физиологических условиях не диссоциирована (pKa = 8.3). Однако у ряда белков есть SH-группы, которые в своем микроокружении имеют pKa ниже 7 и диссоциированы при физиологических значениях pH. Это, в первую очередь, PRX, глутатионпероксидазы (GPX), глутаредоксины (Grx), Trx, MSR.

Тиольные пероксидазы PRX и GPX, прямо окисляя тиолат-анион пероксидом водорода до сульфеновой кислоты, участвуют в утилизации H₂O₂. Растения в отличие от животных имеют низкую активность GPX, но при этом обладают широким спектром активных PRX [76, 77]. Сульфеновая кислота у типичных 2Cys-PRX взаимодействует с «результатирующей» тиольной группой, образуя с ней внутримолекулярную дисульфидную связь (рис. 6).

Восстановление 2Cys-PRX происходит с помощью Trx через образование смешанной дисульфидной связи. Trx восстанавливают дисульфидные связи не только у PRX, но и во многих других белках, локализованных в разных компартментах клетки: цитоплазме, ядре, пластидах, митохондриях, эндоплазматической сети, клеточной стенке [78, 79]. Окисленные Trx восстанавливаются Trx-редуктазами. У растений они представлены NADPH-зависимыми флавиновыми NTR, ферредоксин-зависимыми FTR, содержащими в активном центре, кроме редокс-активной S–S-связи,

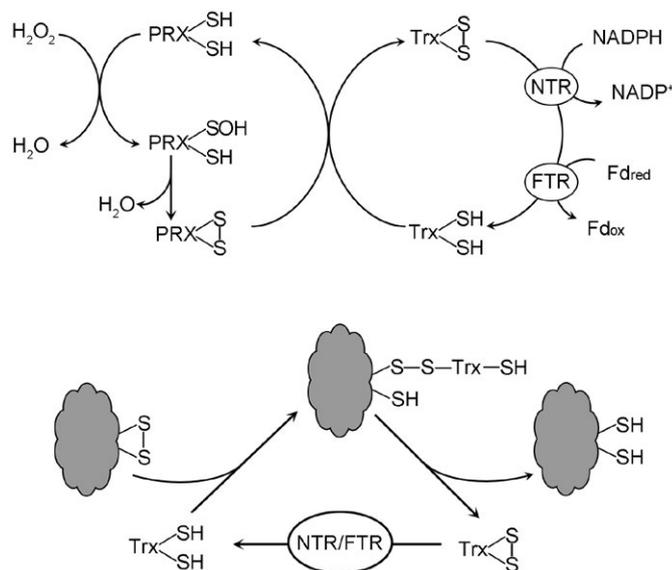


Рис. 6. Каталитические циклы пероксиредоксинов (PRX) и тиоредоксинов (Trx). NTR и FTR – NADPH-зависимые и ферредоксин-зависимые тиоредоксинредуктазы соответственно. Fd_{red} – восстановленный ферредоксин, Fd_{ox} – окисленный ферредоксин

железосерные кластеры [4Fe-4S], а также NADPH-зависимой NTRC, сочетающей функции Trx и NTR [79–81].

Все рассмотренные белки имеют редокс-чувствительные остатки цистеина, которые обеспечивают их участие в разнообразных процессах, регулирующих редокс-метаболизм живых организмов, включая растения.

ГЛУТАТИОНИЛИРОВАНИЕ БЕЛКОВ

Основная мишень глутатионилирования – это Grx, у которых тиолат-анион подвергается модификации в каталитическом цикле (рис. 7). Однако в условиях окислительного стресса глутатионилированию подвергаются и другие белки. Так, в протеоме человека найдено более 2000 сайтов глутатионилирования [82]. Глутатионилированию подвержены -S⁻, -S⁻, -SOH-группы белков [74]. Агентом спонтанного глутатионилирования выступает не только GSH, но также GSSG, накапливающийся в условиях стресса. Глутатионилирование SOH рассматривается как способ предотвращения более глубокого и необратимого окисления тиольных групп.

Деглутатионилирование белков осуществляют Grx, хотя в условиях стресса они, напротив, могут выступать агентами глутатионилирования. Таким образом, глутатионилирование – обратимая модификация, которая, как правило, ингибирует белки. У растений ей в наибольшей степени подвержены цитоплазматические глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназа (GAPDH) и ряд других ферментов гликолиза, β-амилазы хлоропластов, глициндекарбоксилаза митохондрий [74].

ФУНКЦИИ РЕДОКС-МОДИФИКАЦИЙ СУЛЬФИДРИЛЬНЫХ ГРУПП БЕЛКОВ

Основной механизм, с помощью которого АФК функционируют как регуляторы, заключается в модификации тиольных групп белков-мишеней: S-сульфенировании, S-нитрозилировании и S-глутатионилировании. Окисление тиольных групп до сульфиновых и сульфоновых кислот, как правило, необратимо нарушает функции белков [83, 84].

Окислительный фолдинг белков

Большинство белков цитоплазмы, нуклеоплазмы и органелл содержат восстановленные SH-группы цистеина. В полости эндоплазматической сети, в аппарате Гольджи, в межмембранном пространстве митохондрий и внутри тилакоидов происходит окислительный фолдинг – замыкание S-S-мостиков между остатками цистеина новосинтезированных белков [85]. Наиболее полно изучен окислительный

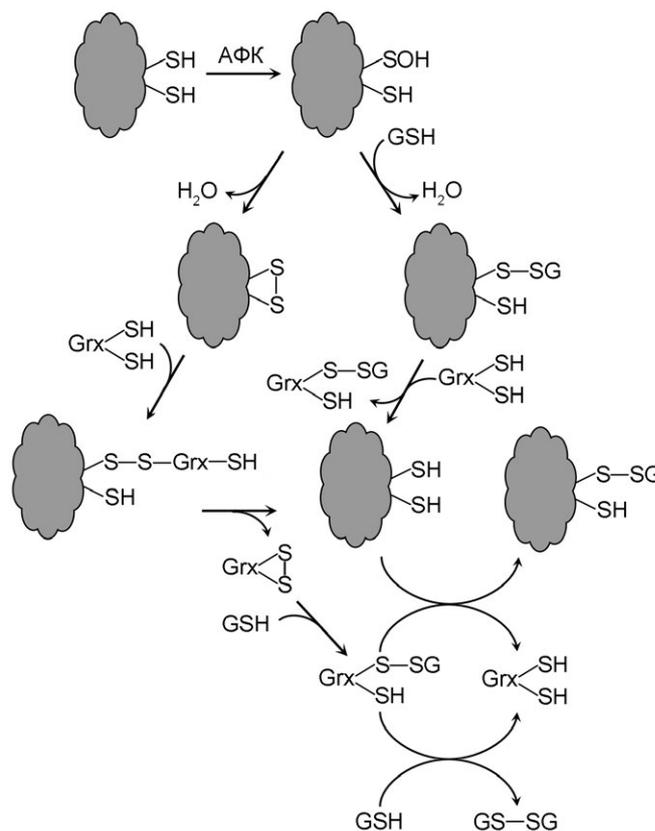


Рис. 7. Глутатионилирование и деглутатионилирование белков. Grx – глутаредоксины

фолдинг в полости эндоплазматической сети, которому подвергаются белки, содержащие N-концевую сигнальную последовательность, позволяющую ко-трансляционно пересечь эндомембрану и далее проследовать по секреторному пути в вакуоль, клеточную стенку, плазматическую мембрану [86, 87]. Предполагается, что основная роль S-S-мостиков в таких окислительных компартментах состоит в стабилизации нативной конформации белков [88].

Главным агентом окислительного фолдинга является протеиндисульфидизомераза (PDI), содержащая по два остатка цистеина в каждом из двух активных центров [89]. Благодаря многокомпонентной редокс-системе полости эндоплазматической сети часть PDI находится в окисленном состоянии, часть в восстановленном (рис. 8). Окисление PDI происходит при участии флавиновой тиолоксидазы ERO1 (endoplasmic reticulum oxidoreductin), которая окисляет PDI молекулярным кислородом, генерируя H₂O₂. Удаление H₂O₂ может происходить как в результате диффузии в цитоплазму по аквапоринам, так и с помощью тиольных пероксидаз, локализованных в полости эндоплазматической сети [77]. Кроме того, у растений, как и у млекопитающих,

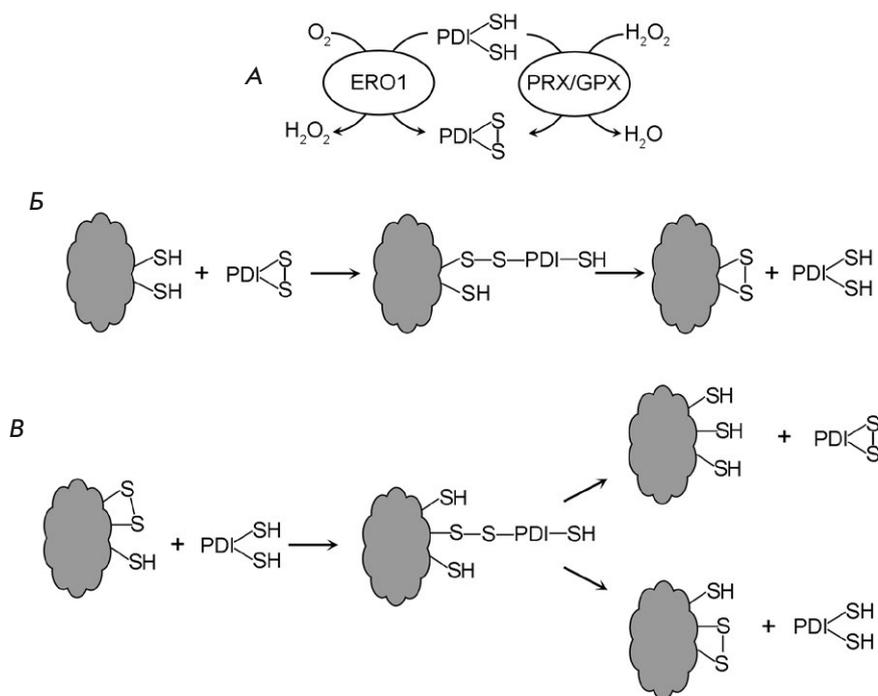


Рис. 8. Окислительный фолдинг белков в полости эндоплазматической сети.

А – окисление протеин-дисульфидизомеразы (PDI) под действием тиолоксидазы (ERO1) и тиольных пероксидаз PRX и GPX;

Б – образование дисульфидных связей при участии окисленной формы PDI;

В – изомеризация и восстановление дисульфидных связей при участии восстановленной формы PDI

есть QSOX – тиольная оксидаза, которая совмещает функции ERO1 и PDI, окисляя с помощью O_2 остатки цистеина непосредственно в белках-субстратах фолдинга [90].

В окисленной форме PDI необходима для образования дисульфидных связей (рис. 8Б). В процессе окислительного фолдинга белков PDI восстанавливается, что вносит вклад в поддержание баланса восстановленной/окисленной PDI. Важную роль в этом балансе также играет GSH/GSSG-буфер эндоплазматической сети. PDI может восстанавливаться за счет GSH. Восстановленная PDI участвует в изомеризации S-S-мостиков и в их восстановлении (рис. 8В).

Редокс-регуляция активности ферментов

Спонтанные и контролируемые ферментами окислительные модификации SH-групп влияют на конформацию белков и тем самым изменяют их каталитическую активность, локализацию, способность к белок-белковым взаимодействиям. По-видимому, наиболее изученным в данном отношении ферментом является цитоплазматическая GAPDH млекопитающих [91]. В активном центре этого фермента содержится SH-группа с показателем константы кислотности $pK_a = 6$, которая находится в форме тиолат-аниона ($-S^-$) и проявляет свойства сильного нуклеофила. Тиолат-анион подвержен окислению до сульфеновой кислоты, глутатионилированию и S-нитрозилированию, что приводит к ингибированию каталитической активности. Окисленная

GAPDH направляется в ядро и включает программу апоптоза. У растений, кроме цитоплазматической NAD-зависимой GAPDH, есть пластидный NADPH-зависимый фермент, причем оба фермента очень чувствительны к АФК [92].

У млекопитающих хорошо изучены окислительные модификации каталаз. Эти пероксисомные ферменты при окислении теряют каталитическую активность, но приобретают способность вступать в различные белок-белковые комплексы, а также перемещаются в ядро, изменяя там экспрессию генов. То же показано и для растений [93].

Из ферментов цикла Кребса от окислительного стресса сильно страдает аконитаза, у которой происходит окисление железосерных кластеров ($[4Fe-4S]^{2+} \rightarrow [3Fe-4S]^+$) и сульфгидрильных групп ($SH \rightarrow SOH$) [94]. Среди ферментов пентозофосфатного пути особенно чувствительна к АФК глюкозо-6-фосфат-дегидрогеназа [95].

В сильной степени от редокс-баланса зависят процессы, протекающие в хлоропластах. Мощную редокс-регуляцию имеет биосинтез хлорофилла [96, 97]. Известно, что этот процесс контролируется NTRC – NADPH-зависимой Trx-редуктазой С-типа, сочетающей функции Trx и Trx-редуктазы, так как в отличие от классических Trx-редуктаз активность этого фермента охватывает широкий круг белков, а не только Trx. NTRC поддерживает в восстановленном состоянии SH-группы субъединицы CHLI Mg-хелатазы – одного из ключевых ферментов биосинтеза хлорофилла, а также у ADP-

глюкозо-пирофосфорилазы – фермента, определяющего скорость биосинтеза крахмала. Поэтому при ингибировании NTRC происходит нарушение биосинтеза хлорофилла и крахмала [98].

Многокомпонентная система Trx и их редуктаз, локализованная в хлоропластах, необходима для активации на свету рибулозобисфосфаткарбоксилазы и других ферментов цикла Кальвина: фосфорибулокиназы, фосфатазы глюкозо-1,6-бисфосфата и седогептулозо-1,7-бисфосфата [98].

Все вышеперечисленное – это примеры ингибирования активности ферментов при окислении их SH-групп. Менее многочисленны сведения об активации ферментов при окислении SH-групп. Они относятся к ферментам антиоксидантной защиты растений. Так, аскорбатпероксидаза арабидопсиса активируется, если SH-группа Cys82 глутатионилируется или участвует в формировании S-S-мостика [99]. Димеризация γ -глутамил-цистеин-синтетазы за счет образования S-S-мостика приводит к активации этого ключевого фермента биосинтеза GSH [74].

Сигнальная роль окислительных модификаций тиольных групп белков

Многие компоненты сигнальных путей растений подвержены окислительным модификациям. Например, рецептор АБК PYR1 и негативные регуляторы АБК-сигналинга (ABI1 и ABI2) инактивируются при окислении тиольных групп [100]. Важную роль редокс-регуляция играет в сигналинге салициловой кислоты (SA) [101]. Известно, что регулятор сигналинга NPR1 (коактиватор транскрипции SA-зависимых генов) в отсутствие SA находится в цитоплазме в олигомерной форме, поддерживаемой S-S-мостиками. S-нитрозилирование укрепляет это олигомерное состояние [102]. Синтез SA в ответ на нападение патогенных микроорганизмов вызывает окислительный стресс, приводящий к компенсаторному усилению антиоксидантной защиты, включая активацию Trx [103]. Тиоредоксины восстанавливают дисульфидные мостики у NPR1, олигомер диссоциирует и димеры направляются в ядро, где вступают в комплекс с факторами транскрипции TGA и активируют транскрипцию связанных с патогенезом защитных PR-генов [104, 105].

У животных хорошо изучена активация MAP-киназного каскада с помощью АФК. Центральную роль в этом процессе играет ASK1 – MAP3K, которая неактивна, если связана с восстановленным Trx. При окислительном стрессе Trx окисляется и теряет связь с ASK1, что приводит к димеризации ASK1, ее автофосфорилированию и активации [106]. Так запускается MAP-киназный каскад. У растений

известна серин-треониновая протеинкиназа OXI1 (oxidative stress inducible), которая активируется в условиях окислительного стресса, вызванного нападением патогенов или отравлением тяжелыми металлами, что в итоге приводит к активации MAP3/6 [107]. Однако непонятно, на каком уровне эта киназа включает MAP-киназный каскад, активирует MAP3K, MAP2K или непосредственно MAPK?

Более 20 лет назад были получены первые доказательства существования у растений АФК-активируемых катионных каналов [108, 109]. В настоящее время Демидчик и соавт. [110, 111] развивают концепцию так называемого ROS-Ca²⁺-хаба – сигнального узла в плазматической мембране растительной клетки, оператора не только стрессовых реакций, но также и включения ряда комплексных программ развития растений. Ca²⁺-проницаемые катионные каналы активируются в ответ на увеличение продукции $\cdot\text{OH}$ в клеточных стенках и опосредуют вход в клетку ионов Ca²⁺ и выход ионов K⁺. Повышение уровня цитозольного Ca²⁺ включает сигнальные и регуляторные каскады растительной клетки [111]. Кроме того, открывание этих каналов может быть опосредовано фосфорилированием под действием протеинкиназы HPCA (hydrogen peroxide calcium). HPCA – представитель семейства рецепторных киназ, внеклеточный домен которых содержит несколько редокс-чувствительных SH-групп [112]. При их окислении апопластными АФК происходит автофосфорилирование цитоплазматического домена HPCA, что приводит к активации фермента, фосфорилированию и открыванию кальциевых каналов плазматической мембраны [113].

Известно, что органеллы могут сигнализировать ядру о своем состоянии окислительного стресса и изменять транскрипцию ядерных генов. В пероксисомах этот ретроградный сигналинг связан с дисфункцией каталазы [114], в митохондриях – с дисфункцией альтернативной оксидазы [115]. Наиболее изучен хлоропластный ретроградный сигналинг в условиях окислительного стресса [101, 107, 116], который ярко проявляется у мутантов арабидопсиса по биосинтезу хлорофилла. Эти мутанты накапливают интермедиаты, обладающие свойствами фотосенсибилизаторов и генерирующие синглетный кислород. Сигнал об окислительном стрессе, возникающий в хлоропластах на свету, передается в ядро при посредстве белков EXE1 и EXE2 и включает программу локальной клеточной смерти [117]. Синглетный кислород окисляет Trp643 в EXE1 арабидопсиса, что приводит к гидролизу этого белка под действием хлоропластной металлопротеазы FtsH. В ретроградном сигналинге в ядро о подъеме синглетного кислорода и пероксида водорода в хло-

ропластах участвует белок GUN1 [118]. Описан также редокс-сигналинг, опосредованный накоплением в хлоропластах 3-фосфоаденозин-5-фосфата (PAP). PAP накапливается в условиях окислительного стресса из-за окисления и инактивации PAP-киназы SAL, катализирующей его превращение в AMP [116, 119].

Приведенные сведения показывают, что участие редокс-модификаций белков в сигналинге у растений часто опосредовано обратимой активацией/инактивацией, изменением субклеточной локализации и подверженности деградации протеасомами.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Возникшая в конце XX века новая наука протеомика поставила перед собой задачу изучения всего многообразия событий, происходящих с белками в живых организмах: ПТМ, транспорт в пределах и за пределами клетки, взаимодействие с другими молекулами и, наконец, частичная и полная деградация. ПТМ (фосфорилирование, гликозилирование, метилирование, ацетилирование, карбонилирование и другие), как правило, изучают на денатурированных белках, сочетая различные методы хроматографического фракционирования и масс-спектрометрической идентификации. Новые

методологии позволяют не только выявлять ПТМ, но и проследить их динамику, влияние на локализацию белков, их подверженность деградации, взаимодействие с другими белками, нуклеиновыми кислотами и малыми молекулами [120]. Этот прогресс затронул и редокс-протеомику, особенно протеомику тиольных групп [121]. В данном обзоре мы описали химизм важнейших редокс-модификаций белков растений, подробно изученный за последние десятилетия, а также представили сведения об их предполагаемом значении. Более полное раскрытие функционального аспекта редокс-модификаций белков – одна из актуальных задач протеомики растений. Недавно создан информационный ресурс «Plant PTM Viewer» (<https://www.psb.ugent.be/PlantPTMViewer>), который предоставляет широкий набор инструментов для анализа потенциальной роли ПТМ различных белков в контексте системной биологии растений [7]. В настоящее время Ресурс Plant PTM содержит информацию о более чем 300 тысячах ПТМ более чем в 130 тысячах белков, в том числе обсуждаемых в данной статье.

Исследование выполнено при поддержке гранта Российского научного фонда № 20–16–00086–П.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Laloum T., Martín G., Duque P. // Trends Plant Sci. 2018. V. 23. № 2. P. 140–150.
- Lam P.Y., Wang L., Lo C., Zhu F.-Y. // Int. J. Mol. Sci. 2022. V. 23. P. 7355.
- Muhammad S., Xu X., Zhou W., Wu L. // WIREs RNA. 2023. V. 14. № 3. P. e1758.
- Vu L.D., Gevaert K., De Smet I. // Trends Plant Sci. 2018. V. 23. № 12. P. 1068–1080.
- Ramazi S., Zahiri J. // Database. 2021. V. 2021. ID baab012.
- Willems P., Horne A., van Parys T., Goormachtig S., De Smet I., Botzki A., van Breusegem F., Gevaert K. // Plant J. 2019. V. 99. № 4. P. 752–762.
- Willems P., Sterck L., Dard A., Huang J., De Smet I., Gevaert K., van Breusegem F. // J. Exp. Bot. 2024. eiae270.
- Smith L.M., Kelleher N.L. // Nat. Methods. 2013. V. 10. № 3. P. 186–187.
- Smith L.M., Kelleher N.L. // Science. 2018. V. 359. № 6380. P. 1106–1107.
- Aebersold R., Agar J.N., Amster I.J., Baker M.S., Bertozzi C.R., Boja E.S., Costello C.E., Cravatt B.F., Fenselau C., Garcia B.A., et al. // Nat. Chem. Biol. 2018. V. 14. № 3. P. 206–214.
- Kosová K., Vitámvás P., Prášil I.T., Klíma M., Renaut J. // Front. Plant Sci. 2021. V. 12. P. 793113.
- Heinemann B., Künzler P., Eubel H., Braun H.P., Hildebrandt T.M. // Plant Physiol. 2021. V. 185. № 2. P. 385–404.
- Horn P.J. // Phytochem. Rev. 2021. V. 20. P. 367–407.
- Ye T., Ma T., Chen Y., Liu C., Jiao Z., Wang X., Xue H. // Plant Physiol. Biochem. 2024. V. 213. P. 108810.
- Mukherjee S., Corpas F.J. // Plant Cell Environ. 2023. V. 46. P. 688–717.
- Mano J., Biswas M.S., Sugimoto K. // Plants. 2019. V. 8. P. 391.
- Shumilina J., Kusnetsova A., Tsarev A., Janse van Rensburg H.C., Medvedev S., Demidchik V., van den Ende W., Frolov A. // Int. J. Mol. Sci. 2019. V. 20. P. 2366.
- Valgimigli L. // Biomolecules. 2023. V. 13. № 9. P. 1291.
- Chakraborty S., Karmakar K., Chakravorty D. // IUBMB Life. 2014. V. 66. № 10. P. 667–678.
- Rabbani N., Al-Motawa M., Thornalley P.J. // Int. J. Mol. Sci. 2020. V. 21. P. 3942.
- Zeng Q., Xin J., Zhao C., Tian R. // Plant Cell Rep. 2024. V. 43. № 4. P. 103.
- Rabbani N., Thornalley P.J. // Amino Acids. 2012. V. 42. № 4. P. 1133–1142.
- Kutzli I., Weiss J., Gibis M. // Foods. 2021. V. 10. № 2. P. 376.
- Soboleva A., Vikhnina M., Grishina T., Frolov A. // Int. J. Mol. Sci. 2017. V. 18. P. 2557.
- Twarda-Clapa A., Olczak A., Białkowska A.M., Koziolkiewicz M. // Cells. 2022. V. 11. № 8. P. 1312.
- Antonova K., Vikhnina M., Soboleva A., Mehmood T., Heymich M.-L., Leonova T., Bankin M., Lukasheva E., Gensberger-Reigl S., Medvedev S., et al. // Int. J. Mol. Sci. 2019. V. 20. P. 3659.
- Zheng Q., Maksimovic I., Upad A., David Y. // Protein Cell. 2020. V. 11. № 6. P. 401–416.
- Viedma-Poyatos Á., González-Jiménez P., Langlois O., Company-Marin I., Spickett C.M., Pérez-Sala D. // Antioxidants (Basel). 2021. V. 10. № 2. P. 295.
- Vistoli G., De Maddis D., Cipak A., Zarkovic N., Carini M., Aldini G. // Free Rad. Res. 2013. V. 47. Suppl. 1. P. 3–27.

30. Jové M., Mota-Martorell N., Pradas I., Martín-Gari M., Ayala V., Pamplona R. // *Antioxidants* (Basel). 2020. V. 9. № 11. P. 1132.
31. Alché J.D. // *Redox Biol.* 2019. V. 23. P. 101136.
32. Sankaranarayanan S., Jamshed M., Kumar A., Skori L., Scandola S., Wang T., Spiegel D., Samuel M.A. // *Int. J. Mol. Sci.* 2017. V. 18. № 4. P. 898.
33. Tola A.J., Jaballi A., Missihoun T.D. // *Plants* (Basel). 2021. V. 10. № 7. P. 1451.
34. Gupta K.J., Kaladhar V.C., Fitzpatrick T.B., Fernie A.R., Möller I.M., Loake G.J. // *Mol. Plant.* 2022. V. 15. P. 228–242.
35. Aranda-Cano L., Valderrama R., Chaki M., Begara-Morales J.C., Barroso J.B. // *Prog. Bot.* 2024. V. 84. P. 103–152.
36. Khator K., Parihar S., Jasik J., Shekhawat G.S. // *Plant Signal. Behav.* 2024. V. 19. № 1. P. 2298053.
37. Zhao H., Ma L., Shen J., Zhou H., Zheng Y. // *Plant Cell.* 2024. V. 36. № 2. P. 367–382.
38. Lundberg J.O., Weitzberg E. // *Cell.* 2022. V. 185. № 16. P. 2853–2878.
39. Allagulova C.R., Lubyanova A.R., Avalbaev A.M. // *Int. J. Mol. Sci.* 2023. V. 24. № 14. P. 11637.
40. Astier J., Lindermayr C. // *Int. J. Mol. Sci.* 2012. V. 13. P. 15193–15208.
41. Yu M., Lamattina L., Spoel S.H., Loake G.J. // *New Phytol.* 2014. V. 202. № 4. P. 1142–1156.
42. Albertos P., Romero-Puertas M.C., Tatematsu K., Mateos I., Sánchez-Vicente I., Nambara E., Lorenzo O. // *Nat. Commun.* 2015. V. 6. P. 8669.
43. Leterrier M., Chaki M., Airaki M., Valderrama R., Palma J.M., Barroso J.B., Corpas F.J. // *Plant Signal. Behav.* 2011. V. 6. № 6. P. 789–793.
44. Treffon P., Vierling E. // *Antioxidants* (Basel). 2022. V. 11. № 7. P. 1411.
45. Trujillo M., Ferrer-Sueta G., Thomson L., Flohé L., Radi R. // *Subcell. Biochem.* 2007. V. 44. P. 83–113.
46. León J. // *Front. Plant Sci.* 2022. V. 13. P. 859374.
47. Mamaeva A.S., Fomenkov A.A., Nosov A.V., Moshkov I.E., Novikova G.V., Mur L.A.J., Hall M.A. // *Rus. J. Plant Physiol.* 2015. V. 62. № 4. P. 427–440.
48. Pellicena P., Karow D.S., Boon E.M., Marletta M.A., Kuriyan J. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2004. V. 101. P. 12854–12859.
49. Yoo B.-K., Kruglik S.G., Lambry J.-C., Lamarre I., Raman C.S., Niochede P., Negrerie M. // *Chem. Sci.* 2023. V. 14. P. 8408–8420.
50. Wong A., Tian X., Yang Y., Gehring C. // *Mol. Plant.* 2021. V. 14. P. 195–197.
51. Wong A., Hu N., Tian X., Yang Y., Gehring C. // *Trends Plant Sci.* 2021. V. 26. № 9. P. 885–896.
52. Begara-Morales J.C., Sánchez-Calvo B., Chaki M., Valderrama R., Mata-Pérez C., Padilla M.N., Corpas F.J., Barroso J.B. // *Front. Plant Sci.* 2016. V. 7. P. 152.
53. Pande A., Mun B.G., Rahim W., Khan M., Lee D.S., Lee G.M., Al Azzawi T.N.I., Hussain A., Kim C.K., Yun B.W. // *Front Plant Sci.* 2022. V. 13. P. 865542.
54. Castillo M.C., Lozano-Juste J., González-Guzmán M., Rodríguez L., Rodríguez P.L., León J. // *Sci. Signal.* 2015. V. 8. № 392. P. ra89.
55. Wang P., Du Y., Hou Y.J., Zhao Y., Hsu C.C., Yuan F., Zhu X., Tao W.A., Song C.P., Zhu J.K. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2015. V. 112. № 2. P. 613–618.
56. Chen L., Sun S., Song C.-P., Zhou J.-M., Li J., Zuo J. // *J. Genet. Genomics.* 2022. V. 49. № 8. P. 756–765.
57. Shi H., Liu W., Wei Y., Ye T. // *J. Exp. Bot.* 2017. V. 68. № 5. P. 1239–1249.
58. Smirnoff N., Arnaud D. // *New Phytol.* 2019. V. 221. № 3. P. 1197–1214.
59. Noctor G., Lelarge-Trouverie C., Mhamdi A. // *Phytochemistry.* 2015. V. 112. P. 33–53.
60. Berlett B.S., Stadtman E.R. // *J. Biol. Chem.* 1997. V. 272. № 33. P. 20313–20316.
61. Davies M.J. // *Biochem. J.* 2016. V. 473. № 7. P. 805–825.
62. Goggin F.L., Fischer H.D. // *Plant Cell Environ.* 2024. V. 47. P. 1957–1970.
63. Dogra V., Rochaix J.D., Kim C. // *Plant Cell Environ.* 2018. V. 41. № 8. P. 1727–1738.
64. Dmitrieva V.A., Tyutereva E.V., Voitsekhovskaja O.V. // *Int. J. Mol. Sci.* 2020. V. 21. № 9. P. 3237.
65. Cerny M., Habanova H., Berka M., Luklova M., Brzobohaty B. // *Int. J. Mol. Sci.* 2018. V. 19. P. 2812.
66. Fu Z.-W., Feng Y.-R., Gao X., Ding F., Li J.-H., Yuan T.-T., Lu Y.-T. // *Plant Cell.* 2023. V. 35. P. 1593–1616.
67. Ji E., Hu S., Lu Q., Zhang M., Jiang M. // *Plant Physiol. Biochem.* 2024. V. 213. P. 108844.
68. Rey P., Tarrago L. // *Antioxidants* (Basel). 2018. V. 7. № 9. P. 114.
69. Boschi-Muller S., Branlant G. // *Bioorg. Chem.* 2014. V. 57. P. 222–230.
70. Kreslavski V.D., Los D.A., Allakhverdiev S.I., Kuznetsov V.V. // *Rus. J. Plant Physiol.* 2012. V. 59. № 2. P. 141–154.
71. Waszczak C., Carmody M., Kangasjärvi J. // *Annu. Rev. Plant Biol.* 2018. V. 69. P. 209–236.
72. Martin R.E., Postiglione A.E., Muday G.K. // *Curr. Opin. Plant Biol.* 2022. V. 69. P. 102293.
73. Mittler R., Zandalinas S., Fichman Y., van Breusegem F. // *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 2022. V. 23. № 10. P. 663–679.
74. Dorion S., Ouellet J.C., Rivoal J. // *Metabolites.* 2021. V. 11. P. 641.
75. Jurado-Flores A., Aroca A., Romero L.C., Gotor C. // *J. Exp. Bot.* 2023. V. 74. № 15. P. 4654–4669.
76. Liebthal M., Maynard D., Dietz K.J. // *Antioxid. Redox Signal.* 2018. V. 28. № 7. P. 609–624.
77. Bela K., Riyazuddin R., Csizsár J. // *Antioxidants.* 2022. V. 11. P. 1624.
78. Kang Z., Qin T., Zhao Z. // *Gene.* 2019. V. 706. P. 32–42.
79. Jedelská T., Luhová L., Petřivalský M. // *Plants* (Basel). 2020. V. 9. № 11. P. 1426.
80. Geigenberger P., Thormählen I., Daloso D.M., Fernie A.R. // *Trends Plant Sci.* 2017. V. 22. № 3. P. 249–262.
81. Nikkanen L., Rintamäki E. // *Biochem. J.* 2019. V. 476. № 7. P. 1159–1172.
82. Li X., Zhang T., Day N.J., Feng S., Gaffrey M.J., Qian W.J. // *Antioxidants* (Basel). 2022. V. 11. P. 2272.
83. Paulsen C.E., Carroll K.S. // *Chem. Rev.* 2013. V. 113. P. 4633–4679.
84. Musaogullari A., Chai Y.-C. // *Int. J. Mol. Sci.* 2020. V. 21. P. 8113.
85. Urade R. // *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 2019. V. 83. № 5. P. 781–793.
86. Sharova E.I. // *Rus. J. Plant Physiol.* 2002. V. 49. № 2. P. 255–268.
87. Hsieh H.H., Shan S.O. // *Int. J. Mol. Sci.* 2021. V. 23. № 1. P. 281.
88. Bechtel T.J., Weerapan E. // *Proteomics.* 2017. V. 6. P. 1600391.
89. Gansemer E.R., Rutkowski D.T. // *Front. Mol. Biosci.* 2022. V. 9. P. 858142.
90. Meyer A.J., Riemer J., Rouhier N. // *New Phytol.* 2019. V. 221. P. 1230–1246.
91. Tossounian M.A., Zhang B., Gout I. // *Antioxidants* (Basel).

2020. V. 9. № 12. P. 1288.
92. Hildebrandt T., Knuesting J., Berndt C., Morgan B., Scheibe R. // *Biol. Chem.* 2015. V. 396. № 5. P. 523–537.
93. Baker A., Lin C.-C., Lett C., Karpinska B., Wright M.H., Foyer C.H. // *Free Rad. Biol. Med.* 2023. V. 199. P. 56–66.
94. Lushchak O.V., Piroddi M., Galli F., Lushchak V.I. // *Redox Rep.* 2014. V. 19. № 1. P. 8–15.
95. Fuentes-Lemus E., Reyes J.S., Figueroa J.D., Davies M.J., López-Alarcón C. // *Biochem. Soc. Trans.* 2023. V. 51. № 6. P. 2173–2187.
96. Stenbaek A., Jensen P.E. // *Phytochemistry.* 2010. V. 71. P. 853–859.
97. Cejudo F.J., González M.C., Pérez-Ruiz J.M. // *Plant Physiol.* 2021. V. 186. № 1. P. 9–21.
98. Yoshida K., Hisabori T. // *Plant Cell Physiol.* 2023. V. 64. № 7. P. 704–715.
99. Liu H., Song S., Zhang H., Li Y., Niu L., Zhang J., Wang W. // *Int. J. Mol. Sci.* 2022. V. 23. № 23. P. 14824.
100. Li S. // *Redox Biol.* 2023. V. 64. P. 102789.
101. Bali S., Gautam A., Dhiman A., Michael R., Dogra V. // *Physiol. Plant.* 2023. V. 175. № 5. P. e14041.
102. Kohli S.K., Khanna K., Bhardwaj R., Corpas F.J., Ahmad P. // *Plant Physiol. Biochem.* 2022. V. 184. P. 56–64.
103. De Brasi-Velasco S., Sánchez-Guerrero A., Castillo M.-C., Vertommen D., León J., Sevilla F., Jiménez A. // *Redox Biol.* 2023. V. 63. P. 102750.
104. Backer R., Naidoo S., van den Berg N. // *Front. Plant Sci.* 2019. V. 10. P. 102.
105. Zavaliev R., Dong X. // *Mol. Cell.* 2024. V. 84. P. 131–141.
106. Averill-Bates D. // *Biochim. Biophys. Acta - Molecular Cell Research.* 2024. V. 1871. P. 119573.
107. Dietz K.-J., Turkan I., Krieger-Liszakay A. // *Plant Physiol.* 2016. V. 171. P. 1541–1550.
108. Demidchik V., Shabala S.N., Coutts K.B., Tester M.A., Davies J.M. // *J. Cell Sci.* 2003. V. 116. P. 81–88.
109. Foreman J., Demidchik V., Bothwell J.H.F., Mylona P., Miedema H., Torres M.A., Linstead P., Costa S., Brownlee C., Jones J.D., et al. // *Nature.* 2003. V. 422. P. 442–446.
110. Demidchik V., Shabala S. // *Funct. Plant Biol.* 2017. V. 45. P. 9–27.
111. Demidchik V. // *Int. J. Mol. Sci.* 2018. V. 19. № 4. P. 1263.
112. Wu F., Chi Y., Jiang Z., Xu Y., Xie L., Huang F., Wan D., Ni J., Yuan F., Wu X., et al. // *Nature.* 2020. V. 578. № 7796. P. 577–581.
113. Fichman Y., Zandalinas S.I., Peck S., Luan S., Mittler R. // *Plant Cell.* 2022. V. 34. № 11. P. 4453–4471.
114. Mhamdi A., Queval G., Chaouch S., Vanderauwera S., van Breusegem F., Noctor G. // *J. Exp. Bot.* 2010. V. 61. № 15. P. 4197–4220.
115. Vanlerberghe G.C. // *Int. J. Mol. Sci.* 2013. V. 14. № 4. P. 6805–6847.
116. Sevilla F., Martí M.C., De Brasi-Velasco S., Jiménez A. // *J. Exp. Bot.* 2023. V. 74. № 19. P. 5955–5969.
117. Laloi C., Havaux M. // *Front. Plant Sci.* 2015. V. 6. P. 39.
118. Fortunato S., Lasorella C., Tadini L., Jeran N., Vita F., Pesaresi P., de Pinto M.C. // *Plant Sci.* 2022. V. 320. P. 111265.
119. Foyer C.H., Hanke G. // *Plant J.* 2022. V. 111. № 3. P. 642–661.
120. Yan S., Bhawal R., Yin Z., Thannhauser T.W., Zhang S. // *Mol. Hortic.* 2022. V. 2. P. 17.
121. Degen G.E. // *Plant Physiol.* 2024. V. 195. № 2. P. 1111–1113.

УДК 577.24

Дифференцировка эмбриональных стволовых клеток в направлении дефинитивной энтодермы как модель возникновения гетерогенности во время спецификации зародышевых листков

М. Н. Гордеев^{1,2,3}, А. С. Зиновьева^{1,2}, Е. Е. Петренко^{1,2,4}, Е. В. Ломерт⁵, Н. Д. Аксёнов⁶,
А. Н. Томилин^{2*}, Е. И. Бахмет^{1,2**}

¹Институт цитологии РАН, Группа динамики плюрипотентности, Санкт-Петербург, 194064 Россия

²Институт цитологии РАН, лаборатория молекулярной биологии стволовых клеток, Санкт-Петербург, 194064 Россия

³Институт эволюции, Университет Хайфы, Хайфа, 3498838 Израиль

⁴Технион – Институт Технологий Израиля, факультет биологии, Хайфа, 3200003 Израиль

⁵Институт цитологии РАН, лаборатория молекулярной медицины, Санкт-Петербург, 194064 Россия

⁶Институт цитологии РАН, отдел внутриклеточного сигналинга и транспорта, Санкт-Петербург, 194064 Россия

*E-mail: a.tomilin@incras.ru,

**E-mail: e.bakhmet@incras.ru

Поступила в редакцию 29.08.2024

Принята к печати 23.10.2024

DOI: <https://doi.org/10.32607/actanaturae.27510>

РЕФЕРАТ Использование эмбриональных стволовых клеток (ЭСК) в регенеративной медицине крайне перспективно благодаря их способности к самообновлению и дифференцировке как в соматические клетки, так и в половые клетки. ЭСК соответствуют плюрипотентному эпибласту – ткани, которая дает начало трем зародышевым листкам (эктодерме, мезодерме и энтодерме) в ходе гастрюляции. Важно отметить, что ЭСК можно дифференцировать в различные клеточные типы, изменяя условия культивирования, что может быть использовано для моделирования гастрюляции *in vitro*. Классическая модель гастрюляции предполагает, что спецификация мезодермы и энтодермы обеспечивается градиентом сигналов FGF, BMP, Wnt и Nodal. Логично предположить, что каждый из этих сигналов должен направлять дифференцировку ЭСК в производные определенного зародышевого листка. Однако, по-видимому, спецификация ЭСК организована сложнее, а один и тот же сигнал может быть интерпретирован клетками по-разному. Используя культуральные среды с полностью определенным химическим составом, однородную популяцию «наивных» ЭСК в качестве исходной клеточной линии, а также репортерную систему *Foxa2-EGFP*, мы создали надежную модель развития дефинитивной энтодермы (ДЭ). Эта модель *in vitro* воспроизводит состояние «формативной» плюрипотентности как промежуточной стадии, которую проходит эпибласт сразу после имплантации *in vivo*. Несмотря на изначально однородное состояние популяции и высокую концентрацию активина во время энтодермальной дифференцировки, остается субпопуляция клеток, которая не дифференцируется в энтодерму. Разработанная нами модель может быть использована для исследования возникновения клеточной неоднородности во время гастрюляции.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА плюрипотентность, спецификация, дифференцировка, эмбриональные стволовые клетки, ЭСК, CRISPR/Cas9, гастрюляция, энтодерма, Foxa2.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ ЭСК – эмбриональные стволовые клетки; FGF – fibroblast growth factor (фактор роста фибробластов); BMP – bone morphogenic protein (костный морфогенетический белок); EGFP – enhanced green fluorescent protein (улучшенный зеленый флуоресцентный белок); ДЭ – дефинитивная энтодерма; иПСК – индуцированные плюрипотентные стволовые клетки; ЛИФ – лейкемия-ингиби-

рующий фактор; ЭпиПК – эпибластоподобные стволовые клетки; ЭпиСК – эпибластные стволовые клетки; ППК – первичные половые клетки; KSR – knockout serum replacement (заменитель сыворотки); TGFβ – transforming growth factor beta (трансформирующий фактор роста бета).

ВВЕДЕНИЕ

Эмбриональные стволовые клетки (ЭСК), выделенные более 40 лет назад, примечательны своей способностью к самообновлению и дифференцировке во все типы соматических клеток [1, 2]. Открытие индуцированных плюрипотентных стволовых клеток (иПСК) в 2006 году стало настоящим прорывом в области исследования стволовых клеток. иПСК во многом соответствуют ЭСК, но их источником являются дифференцированные соматические клетки, которые приобрели плюрипотентное состояние посредством экзогенной экспрессии Oct4, Sox2, Klf4 и c-Myc [3, 4]. Как ЭСК, так и иПСК соответствуют клеткам эпибласта до имплантации [5, 6]. Во время развития мыши эпибласт появляется вместе с первичной энтодермой и трофэктодермой на 4.5 сутки эмбрионального развития (E4.5) [7, 8]. После имплантации из-за изменений в профиле экспрессии клетки эпибласта становятся восприимчивыми к внешним сигналам дифференцировки в экто-, мезо- и энтодерму [9]. На стадии E6.5 процесс гастрюляции, который опосредован сигналами FGF, Wnt, BMP и Activin/Nodal, приводит к формированию первичной полоски в задней части эпибласта [10–16]. Эта структура, образованная клетками, претерпевающими эпителиально-мезенхимальный переход, впоследствии дает начало мезодерме и дефинитивной энтодерме (ДЭ) [17, 18]. ДЭ появляется в дистальной части первичной полоски, где сигнал Activin/Nodal, обеспечиваемый висцеральной энтодермой, сильнее и мощнее сигнала BMP, источником которого является внезародышевая эктодерма [17, 19]. Соответственно, применение высоких доз активина способствует дифференцировке ЭСК в ДЭ *in vitro* [20, 21]. За формирование ДЭ ответственны транскрипционные факторы Foxa2, Eomes и Sox17 [22–27]. Интересно, что результаты нескольких исследований указывают на возможное участие основных маркеров ЭСК – Oct4, Sox2 и Nanog – не только в поддержании плюрипотентного состояния, но и в спецификации клеточных линий [28–32]. Было высказано предположение, что Nanog, который является мишенью для сигнального пути Activin/Nodal, может способствовать спецификации ДЭ [33–35].

Будущее регенеративной медицины связано с (ЭСК) и (иПСК). Однако, прежде чем эти клетки будут использоваться на практике, необходимо разработать безопасные, эффективные и воспроизводимые протоколы их дифференцировки *in vitro*. Уже

разработано несколько таких протоколов, имитирующих ранний эмбриогенез. Во-первых, культивирование ЭСК/иПСК в химически определенной среде N2B27 позволяет избавиться от неизвестных компонентов сыворотки; дальнейшее добавление лейкемия-ингибирующего фактора (ЛИФ), ингибитора MEK (PD0325901) и ингибитора GSK3 (CHIR99021) в среду 2i-LIF-N2B27 способствует поддержанию так называемых «наивных» ЭСК, которые являются однородной популяцией и имеют транскрипционный профиль, соответствующий профилю в эпибласте до имплантации на стадии E4.5 [5, 36]. Эти условия культивирования используются на протяжении короткого периода, поскольку длительное культивирование ЭСК в такой среде приводит к эпигенетическим и геномным изменениям [37, 38]. Последующая смена этой среды на N2B27 с добавлением bFGF, активина и заменителя сыворотки KSR на 2 дня способствует переходу «наивных» ЭСК в «формативное» плюрипотентное состояние; клетки на этой стадии обозначаются как эпибластоподобные (ЭпиПК). ЭпиПК соответствуют эпибласту эмбриона после имплантации на стадии E5.5, они способны дифференцироваться как в первичные половые клетки (ППК), так и в производные трех зародышевых листков [6, 39–42]. В нескольких недавних исследованиях описаны химически определенные среды, способствующие поддержанию стабильного «формативного» плюрипотентного состояния [43–46].

В настоящем исследовании мы использовали протокол перехода от «наивных» ЭСК к ЭпиПК с последующим добавлением высоких доз активина для запуска дифференцировки в ДЭ. Эта стратегия позволила нам эффективно и воспроизводимо получать клетки-предшественники энтодермы. Важно отметить, что использование однородной культуры клеток в качестве исходной и применение вышеупомянутой схемы культивирования максимально приближают эту дифференцировку к соответствующим процессам *in vivo*. Кроме того, в данной работе была создана линия ЭСК, благодаря которой возможно непрерывное отслеживание процесса спецификации дефинитивной энтодермы в живых клетках. Дифференцировка ЭСК в конкретном направлении представляется как следствие добавления определенного ростового фактора. Следовательно, использование однородной адгезивной культуры ЭСК и добавление подобных сигнальных молекул теоретически должны приводить к дифференцировке всех клеток в опре-

Таблица 1. Олигонуклеотиды, использованные для CRISPR/Cas9

Название	Нуклеотидная последовательность
cM_LA-Foxa2_F (AvrII)	TATcctaggGACATACCGACGCAGCTACA
cM_LA-Foxa2_R (NsiI)	TATatgcatGGATGAGTTCATAATAGGCCTGGA
cM_RA-Foxa2_F (MluI)	TATcgcgttAGAGAAGATGGCTTTCAGGCC
cM_RA-Foxa2_R (SalI)	ATAgtcgacTATTGACCCCGTCTCCCACA
Foxa2_guide_F	caccgATGAACTCATCCTAAGAAGA
Foxa2_guide_R	aaacTCTTCTTAGGATGAGTTCATc
gtM_FoxA2-F3	CAGTCACGAACAAAGCGGGC
gtM-FoxA2-R2	TCAGCGCATCTCCAGTAAC

деленном направлении. Однако, вне зависимости от высокой концентрации активина, нам не удалось получить ДЭ со 100% эффективностью и, вероятно, этот эффект может быть объяснен с помощью реакционно-диффузной модели [47].

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

ДНК-конструкции, использованные в работе

Левое и правое плечи гомологии (941 и 810 п.н. соответственно) вблизи стоп-кодона гена *Foxa2* были амплифицированы с геномной ДНК мыши с использованием ДНК-полимеразы Phusion (ThermoFisher, США). Далее полученные фрагменты лигировали в вектор Oct4-T2A-EGFP (созданный А.А. Кузьминым, неопубликованные данные) по сайтам рестрикции AvrII, NsiI, MluI и SalI с заменой плечей локуса *Oct4*. Последовательности гидовой РНК (гРНК) для двойного разрыва ДНК, опосредованного CRISPR, были выбраны с помощью платформы Benchling (benchling.com) в области, близкой к стоп-кодону гена *Foxa2*. Выбранная гРНК обладала наименьшей вероятностью неспецифической активности в соответствии с методом Hsu [48]. Олигонуклеотиды для выбранных последовательностей гРНК были синтезированы в компании «Евроген» (Россия), отожджены и лигированы в вектор lentiCRISPRv2 (Addgene). Все конечные конструкции были проверены с помощью секвенирования по Сэнгеру. Использованные олигонуклеотиды приведены в табл. 1.

Работа с клеточными культурами

Все реактивы для культивирования клеток, если не указано иное, произведены компанией ThermoFisher (Gibco, США). ЭСК мыши линии E14 Tg2a (Bay Genomics, США) культивировали при температуре 37°C и 5% CO₂. Клетки пассировали с использованием 0.05% раствора трип-

сина / 0.01% раствора EDTA в стандартных условиях на пластике, обработанном желатином в среде mES: Knockout DMEM с добавлением 15% фетальной телячьей сыворотки (Biosera, США), 100 ед/мл пенициллина, 100 мкг/мл стрептомицина, 2 мМ L-глутамин, 1× незаменимых аминокислот, 50 мкМ β-меркаптоэтанола (Merck, ФРГ) и 500 ед/мл экспрессированного в бактериях hLIF собственного производства.

Для получения наивных ЭСК, клетки, которые культивировали в среде, содержащей сыворотку, высевали на пластик, обработанный поли-L-орнитином (0.01%), в среду 2i-LIF-N2B27: N2B27 с добавлением 500 ед/мл hLIF, 3 мкМ CHIR99021 (Axon, США) и 1 мкМ PD0325901 (Axon) как описано ранее [39]. Для получения ЭпиПК наивные ЭСК высевали на пластик, покрытый фибронектином (Merck) (15 мкг/мл), в среде для ЭпиПК: N2B27 с добавлением 12 нг/мл bFGF (Peprotech, США), 20 нг/мл активина А (Peprotech) и 1% заменителя сыворотки KSR. Для анализа РНК клетки высевали в плотности 25 000 клеток/см². Для экспериментов по дифференцировке клетки первоначально высевали в низкой плотности 250 клеток/см² в среду ЭпиПК. Через 2 дня среду ЭпиПК заменяли на N2B27 с добавлением специфических факторов: 10 мкМ SB505124 (Tocris, Великобритания) для эктодермальной дифференцировки, 50 нг/мл BMP4 (Peprotech) для мезодермальной дифференцировки и 100 нг/мл активина А (Peprotech) для ДЭ-дифференцировки.

Получение линии ЭСК Foxa2::T2A-EGFP

Донорная конструкция Foxa2::T2A-EGFP и плазида lentiCRISPRv2, содержащая гРНК (500 нг при молярном соотношении 1:1), были котрансфицированы в ЭСК с использованием реагента FuGENE (Promega, США) в среде OptiMEM. На следующий день клетки пересевали на 10-см чашку Петри, об-

Таблица 2. Олигонуклеотиды, использованные для ОТ-ПЦР

Название	Нуклеотидная последовательность
Nanog_F	GCTCCATAACTTCCGGGGAGG
Nanog_R	GTGCTAAAAATGCGCATGGCT
Esrrb_F	GTCTGACACTTGGGGACCAG
Esrrb_R	CTACCAGGCGAGAGTGTTC
Klf4_F	TACCCCTACACTGAGTCCCG
Klf4_R	GGAAAGGAGGGTAGTTGGGC
Fgf5_F	TCCTTCACCGTCACTGTTCC
Fgf5_R	TTCACTGGGCTGGGACTTCT
Otx2_F	ACTTGCCAGAATCCAGGGTG
Otx2_R	CTTCTTCTTGGCAGGCCTCA

Таблица 3. Антитела, использованные в данном исследовании

Белок	Каталожный номер	Производитель
Oct4	sc-5279 (C-10)	Santa-Cruz
Sox2	MA1-014	ThermoFisher
Nanog	A300-397	Bethyl
Foxa2	sc-374375	Santa-Cruz
Brachyury	AF2085	R&D Systems
Sox1	ab109290	Abcam
Sox17	AF1924	R&D Systems

работанную желатином. На следующий день в культуральную среду на 2 суток добавляли 2 мкг/мл пурамицина (Merck). Далее клетки культивировали в течение 10 дней без добавления антибиотиков. Затем проводили отбор отдельных клонов и тестировали их на включение трансгена методом ПЦР с использованием праймеров *gtM_FoxA2* и набора LR HS-PCR (Biolabmix, Россия). Уровень EGFP в ходе экспериментов по дифференцировке измеряли с помощью проточной цитофлуориметрии на приборе CytoFLEX (Beckman Coulter), а также в ходе цейтраферной съемки на конфокальном микроскопе Yokogawa CQ1.

Приготовление метафазных пластинок

Метафазные пластинки получали как описано ранее [49]. ЭСК, находящиеся в стадии экспоненциального роста, в течение 2 ч обрабатывали раствором Колцемида (0.1 мкг/мл) в CO₂-инкубаторе (Sigma-Aldrich, США). Далее клетки собирали и инкубировали в гипотоническом 0.56% растворе KCl в течение 20 мин, затем фиксировали раствором метанола/уксусной кислоты (3:1), промывали и хранили в фиксирующем растворе при температуре -20°C. Клеточную суспензию каплями наносили на предметные стекла (Superfrost; ThermoFisher), высушивали на воздухе и выдерживали в течение

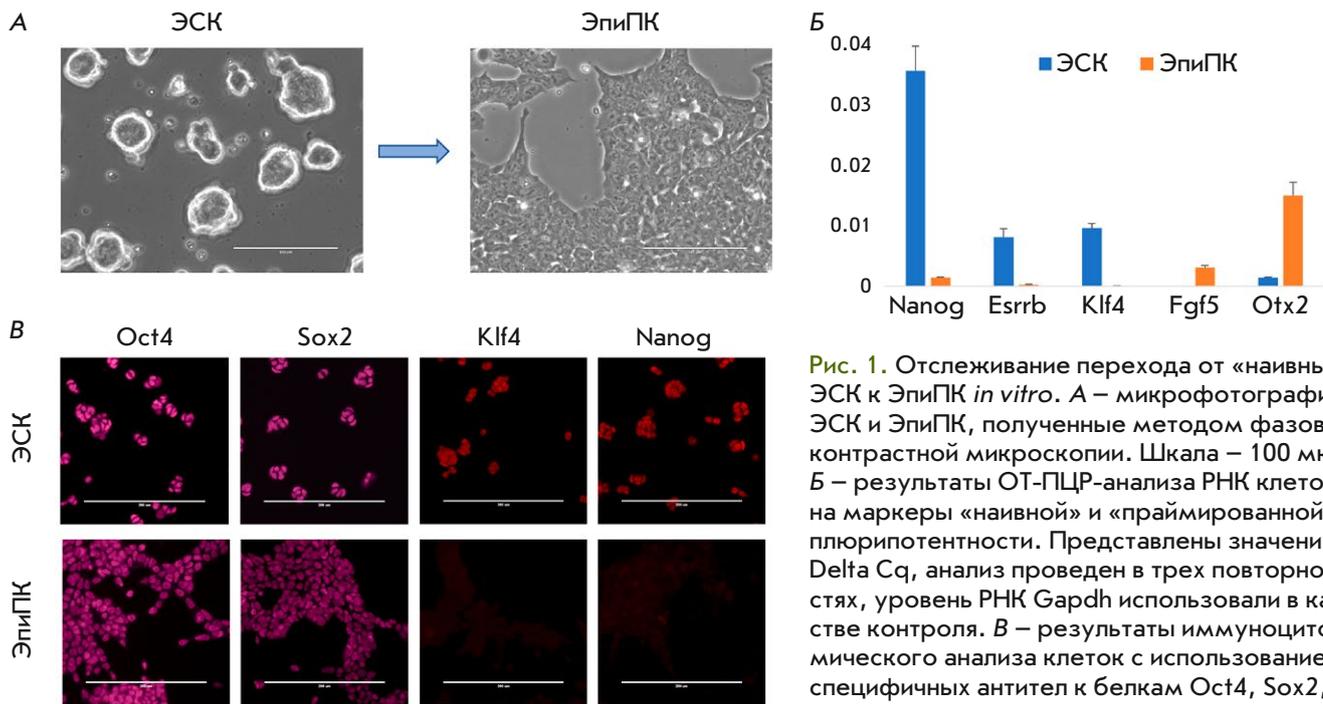
ночи при комнатной температуре. Затем метафазные пластинки окрашивали DAPI и визуализировали с помощью микроскопа EVOS fl Auto.

Выделение РНК и ОТ-ПЦР

Тотальную РНК выделяли из клеток с помощью реагента для экстракции РНК ExtractRNA Reagent (Евроген, Россия). кДНК синтезировали с использованием 1 мкг тотальной РНК, обратной транскриптазы M-MuLV (Евроген) и праймера *oligo(dT)* (ThermoFisher). Количественную ОТ-ПЦР проводили в буфере 5× qPCRmix-HS SYBR (Евроген) на приборе LightCycler 96 (Roche, Швейцария). Уровень экспрессии нормировали по количеству GAPDH; для визуализации брали значения dCq. Праймеры для ОТ-ПЦР приведены в *табл. 2*.

Иммуноцитохимический анализ

Клетки фиксировали в 4% параформальдегиде (ThermoFisher) в течение 10 мин, обрабатывали 0.1% раствором Triton X-100 в течение 15 мин, блокировали в 3% растворе БСА в течение 1 ч при комнатной температуре и окрашивали соответствующими антителами (*табл. 3*) в течение ночи при 4°C. Затем образцы промывали 5–6 раз раствором PBS с добавлением 0.1% Tween (PBST), окрашивали вторичными флуоресцентными антителами (Jackson



ImmunoResearch, США) в течение 2 ч при комнатной температуре и также промывали PBST. Окрашенные клетки анализировали с помощью флуоресцентного микроскопа EVOS fl Auto (Life Technologies, ThermoFisher), оснащенного фильтрами DAPI, GFP, RFP и CY5.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Применение метода перехода наивных ЭСК в ЭпиПК

В процессе культивирования в химически определенной среде 2i-LIF-N2B27 [36] в течение 5 дней ЭСК формировали округлые колонии, при этом признаков дифференцировки не наблюдалось (рис. 1А, левое изображение). Для перехода наивных ЭСК в ЭпиПК клетки пересевали на пластик, обработанный фибронектином, в среду ЭпиПК, и в таких условиях культивировали на протяжении 2 дней [39]. В этот период отмечались морфологические изменения – клетки расплывались и образовывали однослойные колонии (рис. 1А, правое изображение). Анализ РНК и иммуноцитохимический анализ подтвердили, что ЭСК и ЭпиПК соответствовали «наивному» и «формативному» состоянию плюрипотентности соответственно (рис. 1Б, В). Как и ожидалось, экспрессия маркеров «наивной» плюрипотентности *Nanog*, *Esrrb* и *Klf4* отмечалась в ЭСК, но снижалась в ЭпиПК. Напротив, ЭпиПК демонстрировали

экспрессию маркеров формативной плюрипотентности – *Fgf5* и *Otx2* (рис. 1Б).

Направленная дифференцировка ЭпиПК в экто-, мезо- и энтодерму

Для осуществления дифференцировки ЭпиПК в направлении трех зародышевых листков, наивные ЭСК пересевали в низкой плотности в среду для ЭпиПК. Через 2 дня среду меняли на N2B27 с добавлением одного из следующих факторов: ингибитора рецептора $TGF\beta$ – SB505124 (для запуска эктодермальной дифференцировки [34, 44, 50]), рекомбинантного BMP4 (для мезодермальной дифференцировки [51–53]) или рекомбинантного активина А в высокой концентрации (100 нг/мл, для энтодермальной дифференцировки [20, 21, 43]). Иммуноцитохимическое окрашивание на маркеры, специфичные для клеточных линий, подтвердило успешный запуск дифференцировки: маркер мезодермы *Brachyury* был обнаружен в клетках, обработанных BMP4, маркер нейроэктодермы *Sox1* – в клетках, обработанных ингибитором SB, фактор ДЭ *Foxa2* – в клетках, обработанных активинном (рис. 2А). Известно, что *Foxa2* также может обнаруживаться в кардиогенных клетках-предшественниках, т.е. в мезодермальной линии, поэтому спецификация энтодермы должна быть подтверждена детекцией *Sox17*. Полученные *Foxa2*⁺-клетки также окрашивались на маркер *Sox17* (рис. 2Б).

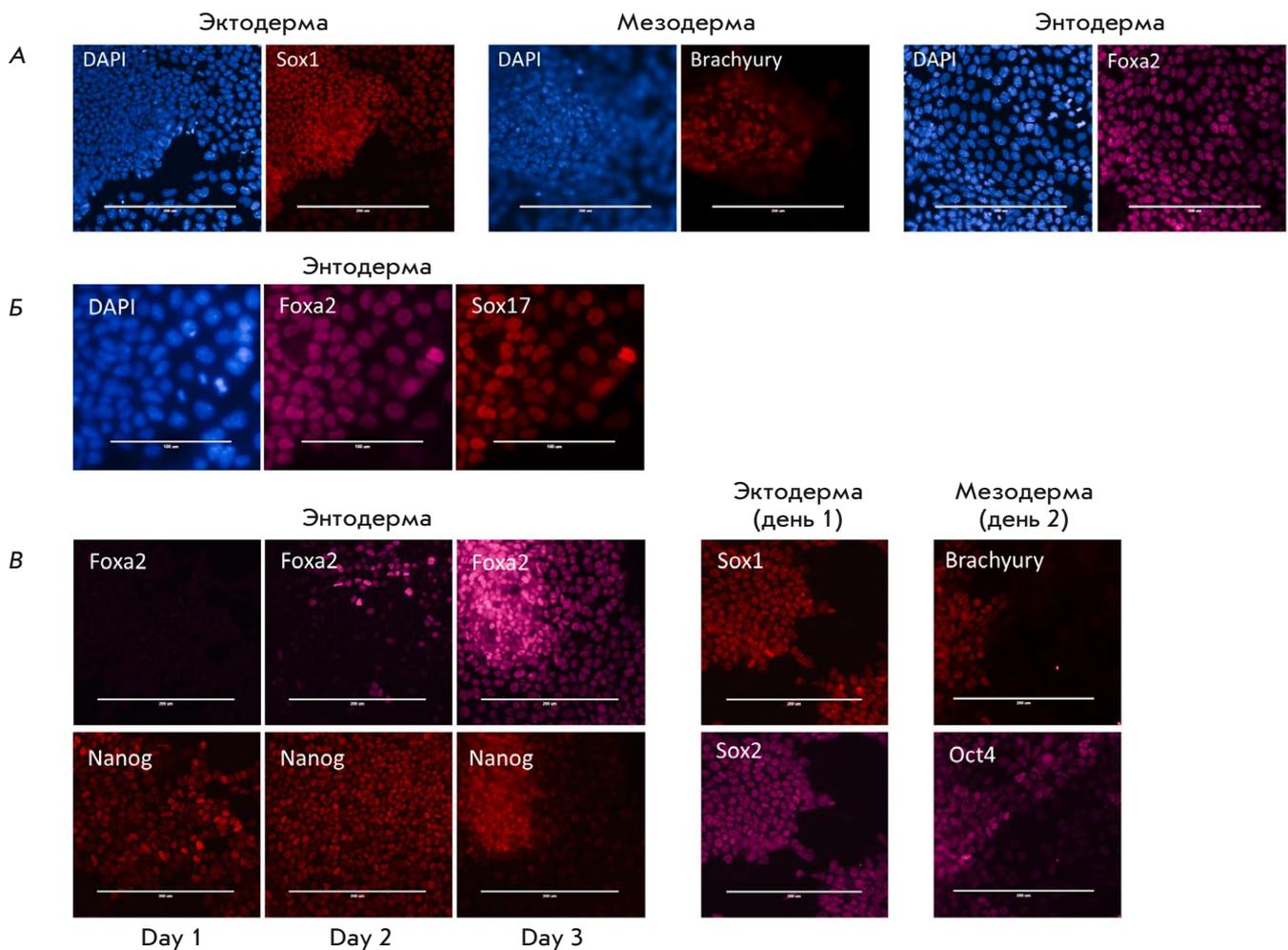


Рис. 2. ЭпиПК отвечают на внешние сигналы дифференцировки и могут развиваться в направлении трех зародышевых листков. *А* – иммуноцитохимическое окрашивание дифференцированных клеток на белки Sox1, Brachyury и Foxa2. Шкала – 200 мкм. *Б* – иммуноцитохимическое окрашивание производных энтодермы на маркеры Foxa2 и Sox17. Шкала – 100 мкм. *В* – реактивация экспрессии Nanog во время спецификации энтодермы. Oct4 колокализует с Brachyury во время спецификации мезодермы, в то время как Sox2 колокализует с Sox1 во время дифференцировки нейроэктодермы. Масштабная линейка – 200 мкм

На ранних стадиях эмбриогенеза экспрессия Nanog снижается на этапе имплантации, но затем повторно активируется в области первичной полоски [54–56]. Ранее предполагали, что Nanog необходим для надлежащей энтодермальной дифференцировки посредством регуляции Eomes [35]. Экспрессия Nanog действительно не обнаруживалась в ЭпиПК (рис. 1*В*), что напоминает снижение его экспрессии в эпибласте во время имплантации. Чтобы точно воспроизвести энтодермальную дифференцировку *in vivo*, модель *in vitro* должна характеризоваться повторной активацией экспрессии Nanog. В рамках нашей дифференцировки мы наблюдали повторную экспрессию Nanog уже на 1-й день (рис. 2*В*). Кроме того, экспрессия Nanog пред-

шествовала экспрессии Foxa2, обнаруженной на 2-й день и усиливалась к 3-му дню дифференцировки в ДЭ (рис. 2*В*). Хотя Oct4 и Sox2 функционируют совместно в самообновляющихся ЭСК, в ходе дифференцировки они действуют независимо и участвуют в спецификации мезодермы и нейроэктодермы соответственно [30, 31]. В соответствии с этими данными, мы наблюдали колокализацию Oct4 с маркером мезодермы Brachyury, а в случае Sox2 – с маркером нейроэктодермы Sox1 (рис. 2*В*).

Создание репортерной линии ЭСК Foxa2::T2A-EGFP

С целью прижизненного отслеживания дифференцировки ДЭ, с помощью системы CRISPR/Cas9, пе-

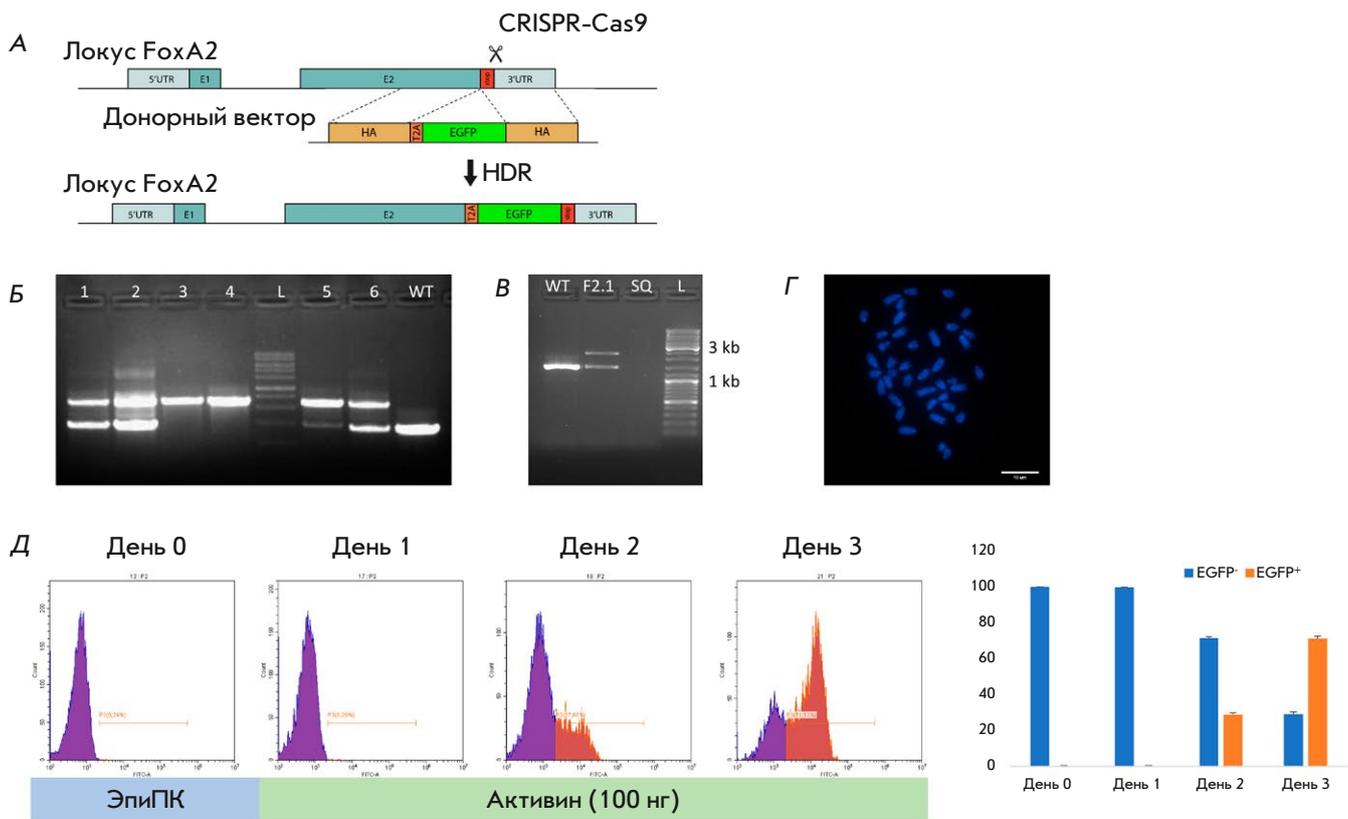


Рис. 3. Создание репортерной линии ЭСК *Foxa2::T2A-EGFP*. **А** – схематическое изображение стратегии модификации локуса *Foxa2*. E1, E2 – экзоны, HA – плечи гомологии, UTR – нетранспируемая область, stop – стоп-кодон. **Б** – проверка вставки с помощью ПЦР в отобранных клонах ЭСК. Геномную ДНК исходной клеточной линии (WT) использовали в качестве контроля. **В** – повторная проверка вставки в субклонированной клеточной линии. **Г** – нормальный кариотип (40 XY) полученной репортерной линии ЭСК F2.1. Шкала – 10 мкм. **Д** – левая панель – анализ экспрессии EGFP в линии ЭСК F2.1 во время спецификации ДЭ; правая панель – процент EGFP⁻ и EGFP⁺ клеток во время дифференцировки ДЭ; результаты представлены как среднее значение трех повторов ± SD (стандартное отклонение)

ред стоп-кодоном гена *Foxa2* была внедрена кассета T2A-EGFP (рис. 3А). Эта стратегия имеет явные преимущества в сравнении с традиционным низкоэффективным методом направленного изменения генов «gene targeting» [57–59]. Наличие в химерной РНК *Foxa2::T2A-EGFP*-последовательности саморасщепляющегося пептида T2A приводит к трансляции двух отдельных белков (*Foxa2* и EGFP) и, таким образом, исключает влияние EGFP на функции *Foxa2*. Кроме того, уровни *Foxa2* и EGFP коррелируют, что облегчает приблизительную количественную оценку уровня *Foxa2* посредством визуализации EGFP в живых клетках.

После трансфекции целевых плазмид было отобрано несколько клонов ЭСК, в которых далее была проверена правильность вставки кассеты в локус *Foxa2* (рис. 3Б). Один из этих клонов (F2) с наличием вставки в одном аллеле был субклонирован (F2.1,

рис. 3В). Этот субклон, имеющий нормальный кариотип (рис. 3Г), использовали в дальнейших экспериментах. Используя метод проточной цитофлуориметрии, мы визуализировали флуоресцентный сигнал EGFP на разных временных отрезках дифференцировки линии ЭСК F2.1 в ДЭ (рис. 3Д). Активацию EGFP первоначально обнаружили на 2-й день дифференцировки (29% клеток), в то время как к 3-му дню энтодермальной дифференцировки количество EGFP⁺-клеток увеличилось до 71% (рис. 3Д, правая панель). Этот результат согласуется с иммуноцитохимическим анализом на наличие *Foxa2* в ходе дифференцировки в ДЭ (рис. 2В).

Возникновение гетерогенности в ответ на добавление фактора дифференцировки

Для визуализации дифференцировки в ДЭ мы применили метод непрерывной цитраферной съем-

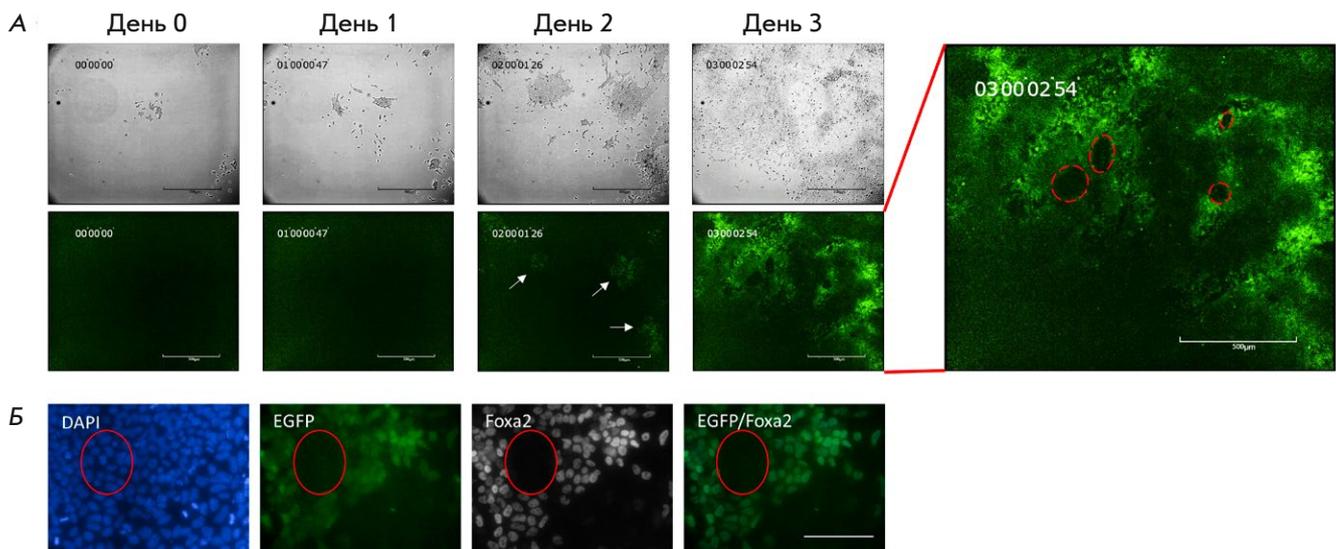


Рис. 4. Гетерогенная дифференцировка ДЭ *in vitro*. **А** – цейтраферная съемка ЭСК F2.1 во время спецификации ДЭ. Стрелки указывают на появляющиеся EGFP⁺-клетки. Шкала – 500 мкм. Таймлапс-видео можно найти в дополнительных материалах. **Б** – колокализация EGFP и Foxa2 после дифференцировки ЭСК F2.1 в ДЭ. Шкала – 100 мкм

ки (рис. 4А, видео в дополнительных материалах). В соответствии с результатами проточной цитофлуориметрии, сигнал EGFP не наблюдался в течение первых 24 ч, что, по-видимому, указывает на подготовку хроматина к последующей дифференцировке клеток. EGFP впервые обнаруживался через 38 ч после добавления активина к ЭпиПК, при этом максимальное количество EGFP⁺-клеток наблюдалось через 72 ч после обработки. Самой интересной особенностью, неоднократно отмеченной в ходе экспериментов, была гетерогенность распределения EGFP в клеточной популяции (рис. 4А, правая панель). Число EGFP⁺-клеток постепенно увеличивалось в процессе дифференцировки и достигало примерно 70%, однако далее не возрастало. Интересно, что распределение сигнала EGFP по популяции не демонстрировало каких-либо закономерностей вроде смещения к центру или краю колоний, что показано в *in vitro* дифференцировках в виде «микропаттернов» [51, 60]. Во время иммуноцитохимической окраски дифференцированных клеток наблюдалась колокализация сигнала от антител с EGFP, что подтверждает адекватность работы полученной репортерной линии (рис. 4Б).

ОБСУЖДЕНИЕ

За последнее десятилетие было разработано множество методов культивирования и дифференцировки плюрипотентных стволовых клеток (ПСК). В настоящее время ПСК можно поддерживать в различных состояниях плюрипотентности в химически определенных условиях культивирования и, что важ-

но, они точно соответствуют клеткам эпибласта на разных стадиях эмбрионального развития [5, 6, 44]. В последние годы появилось несколько работ, посвященных эмбриогенезу *ex vivo*, включая создание бластоидов, гастролоидов и даже целых эмбрионов до стадии развития, которая соответствует 8.5 дню эмбриогенеза (E8.5) [61–68]. В то же время очень ценными остаются методы моделирования процессов направленной дифференцировки плюрипотентных клеток, которые нацелены на изучение молекулярных механизмов, контролирующих эти процессы. Полученные таким образом данные могут в дальнейшем с высокой вероятностью быть экстраполированы на эмбриональное развитие.

В настоящем исследовании мы использовали химически определенные условия культивирования для создания воспроизводимого и надежного метода дифференцировки эмбриональных стволовых клеток мыши в дефинитивную энтодерму. Все эксперименты проводили в химически определенной бессывороточной среде (N2B27) с добавлением различных ростовых факторов. Также мы создали линию ЭСК Foxa2::T2A-EGFP и продемонстрировали удобство ее использования при моделировании спецификации ДЭ. Мы предполагаем, что сочетание химически определенных сред и репортерных клеточных линий облегчит исследование комплексных механизмов, регулирующих выбор направления дифференцировки плюрипотентными стволовыми клетками.

Опубликованы данные, ставящие под сомнение парадигму о том, что транскрипционные факторы Oct4, Sox2 и Nanog действуют исключительно

как факторы, поддерживающие плюрипотентное состояние [30–32, 35]. Манипуляции с уровнем экспрессии этих факторов в ЭСК мыши обычно вызывали дифференцировку в сторону экстраэмбриональных тканей [69–71]; однако в ЭСК человека эти манипуляции способствовали дифференцировке в направлении производных зародышевых листков [35, 72]. Вероятнее всего, эти различия обусловлены пребыванием клеток в «наивном» и в «праймированном» состояниях плюрипотентности, соответственно, а не видовыми различиями. В данном исследовании получены убедительные доказательства того, что Oct4, Sox2 и Nanog временно колокализуются с известными маркерами зародышевых листков в начале дифференцировки. Более того, экспрессия Nanog активируется повторно во время спецификации энтодермы. Особый интерес для нас представляет модуляция уровня этого транскрипционного фактора в ходе энтодермальной дифференцировки, а созданная нами репортерная линия ЭСК в дальнейшем окажется ценным инструментом для изучения этого процесса.

Дифференцировку в экто- и мезодерму, а также в дефинитивную энтодерму в основном изучали на ЭСК человека, которые находятся в «праймированном» плюрипотентном состоянии и соответствуют эпибласту после имплантации [50, 52, 73, 74]. В то же время использование ЭСК мыши осложнено тем, что они находятся в «наивном» плюрипотентном состоянии и должны быть переведены в «праймированное» перед дифференцировкой в направлении трех зародышевых листков. Эти сложности разрешились с появлением эпибластных стволовых клеток мыши (ЭпиСК), которые соответствуют клеткам эпибласта после имплантации и имеют много общего с «праймированными» ЭСК человека [75, 76]. Впоследствии была показана возможность получения ЭпиСК мыши из ЭСК [39]. На пути к ЭпиСК ЭСК проходят через «формативное» плюрипотентное состояние (ЭпиПК), которое соответствует эпибласту сразу после имплантации (E5.5) [41]. Самая отличительная черта ЭпиПК заключается в их способности дифференцироваться в первичные половые клетки (ППК) [39, 77]. При этом популяция ЭпиПК является однородной, а профиль экспрессии этих клеток делает их более подходящими для моделирования эмбриогенеза, чем ЭпиСК. Кроме того, ЭпиСК соответствуют эпибласту на стадии E7.5, т. е. они уже более коммитированы для развития в определенном направлении [78]. «Формативные» ПСК уже использовались для *in vitro* моделирования эмбриогенеза мыши [40, 43–45, 51, 79] и могут рассматриваться, на наш взгляд, как золотой стандарт для изучения спецификации зародышевых листков.

Однородная популяция ЭпиПК также облегчает изучение механизмов клеточной спецификации. Стало очевидно, что этот процесс контролируется не только градиентами FGF, BMP, Wnt и Nodal. Наше исследование показывает, что при избытке активина и в отсутствие каких-либо дополнительных сигналов невозможно добиться дифференцировки всех ЭпиПК в направлении ДЭ. Таким образом, определенные стохастические процессы также могут быть вовлечены в спецификацию ЭпиПК в ДЭ.

По всей видимости, антагонизм Nodal-Lefty управляет не только становлением лево-правой асимметрии зародыша [80], но и вносит вклад в спецификацию ДЭ. Известно, что сигнальный путь Activin/Nodal активирует Lefty, который, в свою очередь, ингибирует этот путь, обеспечивая тем самым отрицательную обратную связь [81]. Этот механизм является хорошим примером реакционно-диффузной модели [47], которая объясняет происхождение неоднородности в изначально однородных системах [82]. Мы предполагаем, что, согласно этой модели, вероятность активации Nodal при добавлении активина к ЭпиПК составляет около 70%, в то время как вероятность активации Lefty – примерно 30%. Дальнейшее развитие ДЭ будет зависеть от наличия активатора (Nodal) или ингибитора (Lefty). В целом, разработанная модель может служить отправной точкой для дальнейшего исследования механизмов возникновения неоднородности в процессе спецификации зародышевых листков.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Представленный переход ЭСК–ЭпиПК–ДЭ *in vitro* очень близок к развитию ДЭ во время эмбриогенеза. Экспрессия транскрипционного фактора Nanog снижается в ЭпиПК, но повторно активируется в клетках-предшественниках ДЭ. Несмотря на химически определенные условия дифференцировки ДЭ *in vitro*, только 70% клеток выбирают эту программу развития. Молекулярные механизмы, лежащие в основе этого явления, требуют дальнейшего уточнения.

Дополнительное видео. Спецификация ДЭ *in vitro*, зарегистрированная методом цейтраферной съемки. Начало съемки приходится на момент добавления активина А к ЭпиПК. Доступно на сайте <https://doi.org/10.32607/actanaturae.27510>.

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Исследование выполнено за счет гранта Российского научного фонда № 23-75-10096, <https://rscf.ru/project/23-75-10096/>.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Martin G.R. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1981. V. 78. № 12. P. 7634–7638.
2. Evans M.J., Kaufman M.H. // Nature. 1981. V. 292. № 5819. P. 154–156.
3. Takahashi K., Yamanaka S. // Cell. 2006. V. 126. № 4. P. 663–676.
4. Takahashi K., Tanabe K., Ohnuki M., Narita M., Ichisaka T., Tomoda K., Yamanaka S. // Cell. 2007. V. 131. № 5. P. 861–872.
5. Boroviak T., Loos R., Bertone P., Smith A., Nichols J. // Nat. Cell. Biol. 2014. V. 16. № 6. P. 516–528.
6. Plusa B., Hadjantonakis A.K. // Nat. Cell. Biol. 2014. V. 16. № 6. P. 502–504.
7. Schrode N., Xenopoulos P., Piliszek A., Frankenberg S., Plusa B., Hadjantonakis A.K. // Genesis. 2013. V. 51. № 4. P. 219–233.
8. Tarkowski A.K. // Nature. 1959. V. 24. № 184. P. 1286–1287.
9. Tam P.P., Loebel D.A. // Nat. Rev. Genet. 2007. V. 8. № 5. P. 368–381.
10. Baker C.L., Pera M.F. // Cell. Stem Cell. 2018. V. 22. № 1. P. 25–34.
11. Arnold S.J., Robertson E.J. // Nat. Rev. Mol. Cell Biol. 2009. V. 10. № 2. P. 91–103.
12. Conlon F.L., Lyons K.M., Takaesu N., Barth K.S., Kispert A., Herrmann B., Robertson E.J. // Development. 1994. V. 120. № 7. P. 1919–1928.
13. Mishina Y., Suzuki A., Ueno N., Behringer R.R. // Genes Dev. 1995. V. 9. № 15. P. 3027–3037.
14. Liu P., Wakamiya M., Shea M.J., Albrecht U., Behringer R.R., Bradley A. // Nat. Genet. 1999. V. 22. № 4. P. 361–365.
15. Lu C.C., Robertson E.J. // Dev. Biol. 2004. V. 273. № 1. P. 149–159.
16. Gattiglio M., Protzek M., Schroter C. // Biol. Open. 2023. V. 12. № 8. bio059941.
17. Nowotschin S., Hadjantonakis A.K., Campbell K. // Development. 2019. V. 146. № 11. dev150920.
18. Shahbazi M.N., Zernicka-Goetz M. // Nat. Cell Biol. 2018. V. 20. № 8. P. 878–887.
19. Vincent S.D., Dunn N.R., Hayashi S., Norris D.P., Robertson E.J. // Genes Dev. 2003. V. 17. № 13. P. 1646–1662.
20. D'Amour K.A., Agulnick A.D., Eliazer S., Kelly O.G., Kroon E., Baetge E.E. // Nat. Biotechnol. 2005. V. 23. № 12. P. 1534–1541.
21. Si-Tayeb K., Noto F.K., Nagaoka M., Li J., Battle M.A., Duris C., North P.E., Dalton S., Duncan S.A. // Hepatology. 2010. V. 51. № 1. P. 297–305.
22. Kaestner K.H. // Curr. Opin. Genet. Dev. 2010. V. 20. № 5. P. 527–532.
23. Ang S.L., Rossant J. // Cell. 1994. V. 78. № 4. P. 561–574.
24. Fu S., Fei Q., Jiang H., Chuai S., Shi S., Xiong W., Jiang L., Lu C., Atadja P., Li E., et al. // PLoS One. 2011. V. 6. № 11. P. e27965.
25. Wang P., Rodriguez R.T., Wang J., Ghodasara A., Kim S.K. // Cell Stem Cell. 2011. V. 8. № 3. P. 335–346.
26. Arnold S.J., Hofmann U.K., Bikoff E.K., Robertson E.J. // Development. 2008. V. 135. № 3. P. 501–511.
27. Dufort D., Schwartz L., Harpal K., Rossant J. // Development. 1998. V. 125. № 16. P. 3015–3025.
28. Loh K.M., Lim B., Ang L.T. // Physiol. Rev. 2015. V. 95. № 1. P. 245–295.
29. Malleshaiah M., Padi M., Rue P., Quackenbush J., Martinez-Arias A., Gunawardena J. // Cell Rep. 2016. V. 14. № 5. P. 1181–1194.
30. Thomson M., Liu S.J., Zou L.N., Smith Z., Meissner A., Ramanathan S. // Cell. 2011. V. 145. № 6. P. 875–889.
31. Valcourt J.R., Huang R.E., Kundu S., Venkatasubramanian D., Kingston R.E., Ramanathan S. // Cell Repts. 2021. V. 37. № 6. P. 109990.
32. Koch F., Scholze M., Wittler L., Schifferl D., Sudheer S., Grote P., Timmermann B., Macura K., Herrmann B.G. // Dev Cell. 2017. V. 42. № 5. P. 514–526.
33. Xu R.H., Sampsell-Barron T.L., Gu F., Root S., Peck R.M., Pan G., Yu J., Antosiewicz-Bourget J., Tian S., Stewart R., et al. // Cell Stem Cell. 2008. V. 3. № 2. P. 196–206.
34. Vallier L., Mendjan S., Brown S., Chng Z., Teo A., Smithers L.E., Trotter M.W., Cho C.H., Martinez A., Rugg-Gunn P., et al. // Development. 2009. V. 136. № 8. P. 1339–1349.
35. Teo A.K., Arnold S.J., Trotter M.W., Brown S., Ang L.T., Chng Z., Robertson E.J., Dunn N.R., Vallier L. // Genes Dev. 2011. V. 25. № 3. P. 238–250.
36. Ying Q.-L., Wray J., Nichols J., Batlle-Morera L., Doble B., Woodgett J., Cohen P., Smith A. // Nature. 2008. V. 453. № 7194. P. 519–523.
37. Choi J., Huebner A.J., Clement K., Walsh R.M., Savol A., Lin K., Gu H., Di Stefano B., Brumbaugh J., Kim S.Y., et al. // Nature. 2017. V. 548. № 7666. P. 219–223.
38. Yagi M., Kishigami S., Tanaka A., Semi K., Mizutani E., Wakayama S., Wakayama T., Yamamoto T., Yamada Y. // Nature. 2017. V. 548. № 7666. P. 224–227.
39. Hayashi K., Ohta H., Kurimoto K., Aramaki S., Saitou M. // Cell. 2011. V. 146. № 4. P. 519–532.
40. Buecker C., Srinivasan R., Wu Z., Calo E., Acampora D., Faial T., Simeone A., Tan M., Swigut T., Wysocka J. // Cell Stem Cell. 2014. V. 14. № 6. P. 838–853.
41. Kinoshita M., Smith A. // Development, Growth & Differentiation. 2018. V. 60. № 1. P. 44–52.
42. Morgani S., Nichols J., Hadjantonakis A.K. // BMC Dev. Biol. 2017. V. 17. № 1. P. 7.
43. Kinoshita M., Barber M., Mansfield W., Cui Y., Spindlow D., Stirparo G.G., Dietmann S., Nichols J., Smith A. // Cell Stem Cell. 2020. V. 28. № 3. P. 453–471.
44. Yu L., Wei Y., Sun H.X., Mahdi A.K., Pinzon Arteaga C.A., Sakurai M., Schmitz D.A., Zheng C., Ballard E.D., Li J., et al. // Cell Stem Cell. 2020. V. 28. № 3. P. 550–567.
45. Wang X., Xiang Y., Yu Y., Wang R., Zhang Y., Xu Q., Sun H., Zhao Z.A., Jiang X., Wang X., et al. // Cell Res. 2021. V. 31. № 5. P. 526–541.
46. Pera M.F., Rossant J. // Cell Stem Cell. 2021. V. 28. № 11. P. 1896–1906.
47. Turing A.M. // Bull. Math. Biol. 1990. V. 52. № 1–2. P. 153–197; discussion 119–152.
48. Hsu P.D., Scott D.A., Weinstein J.A., Ran F.A., Konermann S., Agarwala V., Li Y., Fine E.J., Wu X., Shalem O., et al. // Nat. Biotechnol. 2013. V. 31. № 9. P. 827–832.
49. Ponomartsev S.V., Sinenko S.A., Skvortsova E.V., Liskovykh M.A., Voropaev I.N., Savina M.M., Kuzmin A.A., Kuzmina E.Y., Kondrashkina A.M., Larionov V., et al. // Cells. 2020. V. 9. № 4. P. 879.
50. Shi Y., Kirwan P., Livesey F.J. // Nat. Protoc. 2012. V. 7. № 10. P. 1836–1846.
51. Morgani S.M., Metzger J.J., Nichols J., Siggia E.D., Hadjantonakis A.K. // Elife. 2018. V. 7. e32839.
52. Warmflash A., Sorre B., Etoc F., Siggia E.D., Brivanlou A.H. // Nat. Methods. 2014. V. 11. № 8. P. 847–854.
53. Bardot E., Calderon D., Santoriello F., Han S., Cheung K., Jadhav B., Burtcher I., Artap S., Jain R., Epstein J., et al. // Nat. Commun. 2017. V. 8. P. 14428.

54. Chambers I, Colby D, Robertson M, Nichols J, Tweedie S, Smith A. // *Cell*. 2003. V. 113. № 5. P. 643–655.
55. Hart A.H., Hartley L., Ibrahim M., Robb L. // *Dev. Dyn.* 2004. V. 230. № 1. P. 187–198.
56. Hoffman J.A., Wu C.I., Merrill B.J. // *Development*. 2013. V. 140. № 8. P. 1665–1675.
57. Aubert J, Stavridis M.P., Tweedie S, O'Reilly M., Vierlinger K, Li M, Ghazal P, Pratt T, Mason J.O., Roy D., et al. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2003. V. 100. Suppl 1. P. 11836–11841.
58. Sladitschek H.L., Neveu P.A. // *Mol. Syst. Biol.* 2019. V. 15. № 12. P. e9043.
59. Fehling H.J., Lacaud G., Kubo A., Kennedy M., Robertson S., Keller G., Kouskoff V. // *Development*. 2003. V. 130. № 17. P. 4217–4227.
60. Tewary M., Ostblom J., Prochazka L., Zulueta-Coarasa T., Shakiba N., Fernandez-Gonzalez R., Zandstra P.W. // *Development*. 2017. V. 144. № 23. P. 4298–4312.
61. Aguilera-Castrejon A., Oldak B., Shani T., Ghanem N., Itzkovich C., Slomovich S., Tarazi S., Bayerl J., Chugaeva V., Ayyash M., et al. // *Nature*. 2021. V. 593. № 7857. P. 119–124.
62. Amadei G., Lau K.Y.C., De Jonghe J., Gantner C.W., Sozen B., Chan C., Zhu M., Kyprianou C., Hollfelder F., Zernicka-Goetz M. // *Dev. Cell*. 2021. V. 56. № 3. P. 366–382.e9.
63. Liu X., Tan J.P., Schroder J., Aberkane A., Ouyang J.F., Mohenska M., Lim S.M., Sun Y.B.Y., Chen J., Sun G., et al. // *Nature*. 2021. V. 591. № 7851. P. 627–632.
64. Rossant J., Tam P.P.L. // *Stem Cell Reports*. 2021. V. 16. № 5. P. 1031–1038.
65. Yu L., Wei Y., Duan J., Schmitz D.A., Sakurai M., Wang L., Wang K., Zhao S., Hon G.C., Wu J. // *Nature*. 2021. V. 591. № 7851. P. 620–626.
66. van den Brink S.C., van Oudenaarden A. // *Trends Cell Biol.* 2021. V. 31. № 9. P. 747–759.
67. Amadei G., Handford C.E., Qiu C., De Jonghe J., Greenfield H., Tran M., Martin B.K., Chen D.Y., Aguilera-Castrejon A., Hanna J.H., et al. // *Nature*. 2022. V. 610. № 7930. P. 143–153.
68. Tarazi S., Aguilera-Castrejon A., Joubran C., Ghanem N., Ashoukhi S., Roncato F., Wildschutz E., Haddad M., Oldak B., Gomez-Cesar E., et al. // *Cell*. 2022. V. 185. № 18. P. 3290–3306 e25.
69. Niwa H., Miyazaki J.-I., Smith A.G. // *Nat. Genet.* 2000. V. 24. № 4. P. 372–376.
70. Masui S., Nakatake Y., Toyooka Y., Shimosato D., Yagi R., Takahashi K., Okochi H., Okuda A., Matoba R., Sharov A.A., et al. // *Nat. Cell Biol.* 2007. V. 9. № 6. P. 625–635.
71. Ivanova N., Dobrin R., Lu R., Kotenko I., Levorse J., DeCoste C., Schafer X., Lun Y., Lemischka I.R. // *Nature*. 2006. V. 442. № 7102. P. 533–538.
72. Wang Z., Oron E., Nelson B., Razis S., Ivanova N. // *Cell Stem Cell*. 2012. V. 10. № 4. P. 440–454.
73. Surmacz B., Fox H., Gutteridge A., Fish P., Lubitz S., Whiting P. // *Stem Cells*. 2012. V. 30. № 9. P. 1875–1884.
74. Tristan C.A., Ormanoglu P., Slamecka J., Malley C., Chu P.-H., Jovanovic V.M., Gedik Y., Jethmalani Y., Bonney C., Barnaeva E., et al. // *Stem Cell Repts*. 2021. V. 16. № 12. P. 3076–3092.
75. Brons I.G., Smithers L.E., Trotter M.W., Rugg-Gunn P., Sun B., Chuvpova S., Lopes de Sousa S.M., Howlett S.K., Clarkson A., Ahrlund-Richter L., Pedersen R.A., et al. // *Nature*. 2007. V. 448. № 7150. P. 191–195.
76. Tesar P.J., Chenoweth J.G., Brook F.A., Davies T.J., Evans E.P., Mack D.L., Gardner R.L., McKay R.D. // *Nature*. 2007. V. 448. № 7150. P. 196–199.
77. Nakaki F., Hayashi K., Ohta H., Kurimoto K., Yabuta Y., Saitou M. // *Nature*. 2013. V. 501. № 7466. P. 222–226.
78. Kojima Y., Kaufman-Francis K., Studdert J.B., Steiner K.A., Power M.D., Loebel D.A., Jones V., Hor A., de Alencastro G., Logan G.J., et al. // *Cell Stem Cell*. 2014. V. 14. № 1. P. 107–120.
79. Morgani S.M., Hadjantonakis A.K. // *Curr. Top. Dev. Biol.* 2020. V. 137. P. 391–431.
80. Nakamura T., Mine N., Nakaguchi E., Mochizuki A., Yamamoto M., Yashiro K., Meno C., Hamada H. // *Dev. Cell*. 2006. V. 11. № 4. P. 495–504.
81. Shen M.M. // *Development*. 2007. V. 134. № 6. P. 1023–1034.
82. Kondo S., Miura T. // *Science*. 2010. V. 329. № 5999. P. 1616–1620.

УДК 616.8

Интравентрикулярное введение экзосом от пациентов с боковым амиотрофическим склерозом вызывает болезнь двигательного нейрона у мышей

А. В. Ставровская¹, Д. Н. Воронков¹, А. К. Павлова¹, А. С. Ольшанский¹, Б. В. Белугин²,
М. В. Иванова¹, М. Н. Захарова¹, С. Н. Иллариошкин^{1*}

Научный центр неврологии, Министерство науки и высшего образования РФ, Москва, 125367 Россия

²Национальный исследовательский центр эпидемиологии и микробиологии им. Н.Ф. Гамалеи
Министерства здравоохранения РФ, Москва, 123098 Россия

*E-mail: snillario@gmail.com

Поступила в редакцию 21.09.2024

Принята к печати 02.10.2024

DOI: 10.32607/actanaturae.27499

РЕФЕРАТ Боковой амиотрофический склероз (БАС) – тяжелое заболевание центральной нервной системы (ЦНС) с поражением мотонейронов и гибелью пациентов от дыхательных нарушений. Нейродегенеративный процесс при БАС характеризуется накоплением в клетках ЦНС aberrantных белков (TDP-43, SOD1 и др.), трансинаптическое распространение которых посредством экзосом может быть одним из механизмов прогрессирования патологии. Изучали эффект интравентрикулярного введения экзосом, полученных из цереброспинальной жидкости (ЦСЖ) больных БАС, на двигательную активность мышей и патоморфологию ЦНС. Экзосомы получали от двух пациентов с БАС и здорового донора. Суспензию экзосом в высоком и низком разведениях вводили в боковые желудочки мозга мышшей-самцов линии BALB/C ($n = 45$); двигательную активность и физиологические показатели оценивали 2 раза в месяц, морфологическое исследование спинного мозга проводили через 14 месяцев после начала эксперимента. Через 9 месяцев после введения экзосом от пациентов с БАС у животных формировался патологический двигательный фенотип – изменение локомоции с парезом задних конечностей, нарушением координации, нарастанием эпизодов неподвижности. Двигательные симптомы развивались быстрее после введения экзосом в более высокой концентрации. Выявлено значимое снижение плотности мотонейронов в вентральных рогах спинного мозга мышшей опытной группы, а также значимое увеличение числа клеток микроглии и ее активация. Белок TDP-43 у контрольных мышшей локализовался в ядрах мотонейронов, тогда как в опытной группе наблюдали нарушения локализации TDP-43 и его накопление в цитоплазме. Таким образом, показан иницирующий эффект экзосомных белков, полученных из ЦСЖ от пациентов с БАС, в развитии патологии мотонейронов у экспериментальных животных, что подтверждает патогенетическую роль экзосом в распространении нейродегенеративного процесса и открывает возможность определения новых мишеней для таргетной терапии БАС.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА боковой амиотрофический склероз, нейродегенерация, мотонейроны, экзосомы, TDP-43.
СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ БАС – боковой амиотрофический склероз (ALS – amyotrophic lateral sclerosis); ЛВД – лобно-височная деменция (FTD – fronto-temporal dementia); ОП – открытое поле (OF – open field); СД – сужающаяся дорожка (NP – narrowing path); СДГ – сукцинатдегидрогеназа (SDH – succinate dehydrogenase); ЦНС – центральная нервная система (CNS – central nervous system); ЦСЖ – цереброспинальная жидкость (CSF – cerebrospinal fluid); IBA1 – аллотрансплантатный воспалительный фактор-1 или адапторная молекула-1, связывающая ионизированный кальций (ionized calcium binding adaptor molecule 1); IL – интерлейкин (interleukin); PGP9.5/UCHL1 – карбоксиконцевая убиквитингидролаза L1 (protein gene product 9.5/ubiquitin carboxy-terminal hydrolase L1).

ВВЕДЕНИЕ

Боковой амиотрофический склероз (БАС) – тяжелое нейродегенеративное заболевание, которое до настоящего времени остается неизлечимым. БАС характеризуется селективным поражением верхнего и нижнего мотонейронов, локализованных соответственно в двигательной коре головного мозга и в периферических ядрах (стволе головного мозга и передних рогах спинного мозга) [1]. Такая локализация патологического процесса при БАС приводит к прогрессирующей нейрогенной мышечной слабости, исходом чего является нарушение жизненно важных функций – дыхания и глотания, с неизбежным развитием дыхательной недостаточности и необходимостью проведения инвазивной вентиляции легких и гастростомии. Заболевание отличается значительной клинической гетерогенностью, обусловленной первичной локализацией нейродегенеративных изменений (бульбарный или спинальный уровень), степенью вовлечения верхнего и/или нижнего мотонейрона, скоростью прогрессирования, различием патогенных мутаций.

БАС относится к группе орфанных болезней, его распространенность составляет около 5 на 100 000 населения в год, а заболеваемость – от 2 до 3 случаев на 100 000 населения в год [2]. Средний возраст развития первых симптомов заболевания варьирует от 55 до 65 лет, но в последние десятилетия отмечается отчетливая тенденция к уменьшению возраста дебюта и возрастанию уровня заболеваемости БАС [3]. У большинства пациентов причина БАС остается неизвестной; эти случаи классифицируются как спорадические, обуславливающие 90% структуры заболевания. На долю генетически обусловленных (семейных) форм БАС, связанных с каузальными мутациями в различных генах, приходится около 10% всех случаев [1]. Среди основных звеньев молекулярного патогенеза БАС называют нарушение протеостаза белков, аберрантный метаболизм РНК, нарушение эндосомного и везикулярного транспорта, митохондриальную дисфункцию, нейровоспаление и др., значение которых требует уточнения [2]. Наличие генетических форм БАС позволило получить репрезентативные клеточные и животные модели этого заболевания на основе экспрессии в модельных организмах мутаций в генах *SOD1*, *TARDBP*, *FUS* и др., при этом в экспериментальных исследованиях чаще всего используются трансгенные мыши линии B6SJL-Tg (*SOD1*-G93A) [3].

Исследования последних лет отводят большую роль одному из механизмов распространения дегенеративного процесса в центральной нервной системе (ЦНС) при помощи внеклеточных везикул, преимущественно представленных экзосомами [4].

Экзосомы – это инкапсулированные частицы, обогащенные различными молекулами, включая мембранные и цитоплазматические белки, липиды и нуклеиновые кислоты [5]. В качестве эффективных транспортных систем экзосомы доставляют молекулярные грузы к клеткам-реципиентам, что позволяет рассматривать их как один из наиболее важных инструментов межклеточной коммуникации как в физиологических, так и в патологических процессах [6]. Экзосомы происходят из внутриклеточных мультивезикулярных телец и имеют диаметр от 30 до 150 нм [7]. В процессе созревания экзосомы экспортируются во внеклеточное пространство, где способны проникать в кровоток, в том числе преодолевать гематоэнцефалический барьер (ГЭБ) [8], в связи с чем их можно обнаружить в различных биологических жидкостях [9, 10]. Многие из белковых продуктов генов, ассоциированных с БАС, обнаружены в экзосомах, посредством которых они способны перемещаться между нейрональными и глиальными клетками в различных областях мозга, способствуя распространению нейродегенерации [11]. Среди этих белков следует в первую очередь упомянуть *SOD1*, *TDP-43*, *FUS* и белки с дипептидными повторами, характерные для внутриклеточных включений при мутациях в гене *C9orf72* [6]. В исследовании Braak и соавт. [12] предложено несколько гипотез распространения нейродегенеративного процесса в ЦНС при БАС, и одной из самых привлекательных считается передача патологических белков между смежными областями ЦНС посредством экзосомного транспорта. Распространение симптоматики на смежные анатомические области, характерное для БАС, по-видимому, клинически отражает передачу патологически агрегированных белков между соседними клетками и внутри взаимосвязанных областей ЦНС.

Цель настоящего исследования состояла в изучении эффекта интравентрикулярного введения экзосомной фракции, полученной из цереброспинальной жидкости (ЦСЖ) пациентов со спорадической формой БАС, а также здорового донора, на двигательную активность модельных животных и патоморфологию ЦНС.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Получение суспензии с экзосомами

Используемые в работе экзосомы получены от двух пациентов с БАС. Пациент БАС110 – мужчина, 48 лет, шейно-грудная форма БАС, стадия 4а, длительность заболевания 8 мес.; пациент БАС111 – мужчина, 67 лет, шейно-грудная форма БАС, стадия 4а, длительность заболевания 26 мес. Материал, обо-

значаемый далее как «контроль», получен от клинически здоровой женщины 57 лет.

Экзосомы из ЦСЖ выделяли согласно инструкции к набору Total Exosome Isolation (from other body fluids) (Invitrogen, ref. 4484456). Все операции проводили в асептических условиях. Перед выделением аликвоту ЦСЖ 0.5 мл последовательно центрифугировали (2000 g, 30 мин, 4°C), очищенный супернатант затем центрифугировали при 10000 g в течение 30 мин и 4°C. Полученный супернатант тщательно смешивали с реагентом Total Exosome Isolation, инкубировали при 2–8°C в течение 1 ч и осаждали экзосомы центрифугированием (10000 g, 1 ч, 2–8°C). Осадок ресуспендировали в 40 мкл фосфатного буфера.

Концентрацию экзосом в суспензии оценивали по одному из его основных маркеров – CD9. Содержание экзосом в очищенной суспензии составило 7×10^8 , эта концентрация обозначена как высокая (В). В свою очередь суспензию с низкой (Н) концентрацией экзосом получали разведением суспензии с высокой концентрацией в 10 раз фосфатным буфером. Указанные два разведения (В, Н) использовали для введения экспериментальным животным.

Животные

Работа проведена на мышах-самцах линии BALB/C ($n = 45$) в возрасте 2.5 мес. (на начало эксперимента), с массой тела 22–25 г, полученных из питомника НЦБМТ ФМБА России филиал «Столбовая». Манипуляции с животными проводили в соответствии с требованиями European Convention for the Protection of Vertebral Animals Used for Experimental and Other Scientific Purposes (CETS No. 170), Приказом МЗ РФ № 119Н от 1 апреля 2016 г. «Об утверждении Правил лабораторной практики», а также руководствуясь «Правилами работы с лабораторными грызунами и кроликами» (ГОСТ 33216-2014). Животных содержали в стандартных условиях вивария со свободным доступом к пище и воде, в режиме 12-часового чередования день/ночь. До начала эксперимента животные находились на 14-дневном карантине. Исследование одобрено этическим комитетом Научного центра неврологии.

Для процедуры введения суспензии экзосом мышей помещали на раму лабораторного стереотаксического прибора (Stoelting, США), затем через просверленные в их черепе отверстия, билатерально, в боковые желудочки мозга вводили по 2 мкл суспензии. Введение осуществляли в соответствии с координатами атласа мозга мышей [13]: AP – -0.22; L – 1.0; V – 2.3. Для анестезии использовали золетил-100 (Virbac Sante Animale, Франция) и ксилу (Interchemie Werken “de Adelaar BV”, Нидерланды). Стандартный раствор золетила-100 (500 мг в 5 мл) разводили фи-

зиологическим раствором в соотношении 1:4 и вводили внутримышечно из расчета 1.5 мг действующего вещества на 25 г веса мыши. Ксилу разводили физиологическим раствором в соотношении 1:2 и вводили внутримышечно из расчета 0.6 мг на 25 г веса мыши.

Все животные были разделены на пять групп (контрольную и экспериментальные, получившие указанные препараты в высокой и низкой дозах) по 9 особей в каждой.

Физиологическое исследование

Наблюдение за состоянием здоровья экспериментальных мышей осуществляли 2 раза в неделю, изменения двигательной активности тестировали 2 раза в месяц. Состояние здоровья животных оценивали по изменению веса, наличию порфириновых выделений из носа и глаз, состоянию шерстного покрова и т.д. Для оценки степени полученных двигательных и неврологических нарушений проводили тесты «открытое поле» (ОП) и «сужающаяся дорожка» (СД).

ОП представляло собой короб 40×40×20 см из поливинилхлорида (мастерские Института мозга Научного центра неврологии). Мышь помещали в центр и в течение 3 мин осуществляли регистрацию двигательной активности с помощью системы видеонаблюдения за животными Any-maze (Stoelting Inc., США).

Установка для изучения двигательных нарушений СД представляла собой две планки, наложенные друг на друга, длиной 100 см (Open Science, Россия). Ширина верхней планки от 2 до 0.5 см, высота 1 см, ширина нижней планки от 4 до 2.5 см. На узком конце «дорожки» располагается короб (укрытие), имеющий съемную крышку и отверстие в передней панели, через которое животное может проникнуть внутрь. Вся конструкция приподнята над полом на высоту 70 см. Экспериментальное животное должно пройти по верхней планке от начала дорожки до укрытия. Учитывали время прохождения и процент соскальзываний конечностей на нижнюю планку от общего числа шагов по СД.

Поведенческие тесты, результаты которых приведены в статье, проведены через 11 мес. после введения экзосом.

Морфологическое исследование

Для морфологического исследования были взяты образцы спинного мозга мышей из экспериментальной группы БАС111(В). Группу контроля составили четыре мыши из той же поставки, что и участвующие в эксперименте. Помимо этого, для сопоставления использовали препараты трансгенных мышей, моделирующих БАС, линии B6SJL-Tg (SOD1-G93A), полученные нами в предыдущем исследовании [3]. Мышей декапитировали, извлекали позвоночник

и под бинокулярным микроскопом выделяли спинной мозг. Люмбальные отделы спинного мозга фиксировали в 4% формалине. После фиксации образцы пропитывали 30% сахарозой, помещали в среду О.С.Т., после чего на криостате Sakura TissueTek готовили срезы толщиной 12 мкм. Для иммуногистохимического исследования использовали антитела к нейрональному белку PGP9.5 / UCHL1 (карбоксиконцевая убиквитингидролаза L1), к маркеру микроглии IBA1 (аллотрансплантатный воспалительный фактор-1 или адапторная молекула-1, связывающая ионизированный кальций), а также к белкам, участвующим в патогенезе БАС – SOD1 и TDP-43. Для тепловой демаскировки антигенов срезы нагревали в пароварке в течение 15 мин в буфере Трис-EDTA (Antigen retrieval solution. pH 9.0, Nordic Biosite). Затем срезы инкубировали с первичными антителами. Связывание антител выявляли иммунофлуоресцентным методом, для чего применяли соответствующие вторичные антитела козы и осла, меченные флуорохромами CF488 и CF555 (Sigma, США). Реакцию проводили в соответствии с рекомендациями производителя антител. Помимо этого, на свежемороженых срезах передней большеберцовой мышцы двух экспериментальных животных после введения экзосом и двух трансгенных мышей с SOD1-G93A-моделью БАС выявляли активность сукцинатдегидрогеназы (СДГ) по образованию формаза [14], используя классический гистохимический метод.

Препараты исследовали под микроскопом Nikon Eclipse Ni-u. Нейроны подсчитывали согласно описанному ранее [15] протоколу. Интенсивность иммунофлуоресценции при окрашивании на IBA1 оценивали с использованием программы NIS Elements. Оценку проводили не менее чем на 12 срезах с уровня L1-L5 на правой стороне спинного мозга от каждого животного и усредняли полученные данные.

Статистическая обработка данных

Полученные данные обрабатывали в программе Statistica 12.0, используя однофакторный дисперсионный анализ (ANOVA) с последующими внутригрупповыми апостериорными сравнениями по критерию Фишера для неравных групп, а также критерий Манна-Уитни. Результаты представлены в виде среднего и стандартной ошибки ($M \pm SEM$) с указанием статистической значимости различий между сравниваемыми группами по изучаемым показателям. Статистически значимыми считали различия при $p < 0.05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Первые признаки двигательных нарушений у отдельных животных отмечены через 9 мес. после

введения экзосом. К 10–11-му мес. нарастало число мышей с признаками заболевания (рис. 1), причем в большей степени это касалось животных групп БАС111(В) и БАС110(В), то есть получавших большую дозу вводимого препарата. При осмотре наблюдалось поредение шерстного покрова, незначительные порфириновые выделения из глаз и носа, снижение массы тела (рис. 2Б).

Тестирование поведения таких животных выявило значительное снижение двигательной активности, увеличение времени и эпизодов неподвижности в ОП (рис. 2Г, Д), нарушение координации и увеличение времени выполнения теста СД (рис. 2Е), частичный парез задних конечностей. В тесте ОП показано уменьшение величины пройденного пути ($p = 0.0276$) и увеличение времени неподвижности в группе БАС111(В) ($p = 0.0466$) по сравнению с группой контроля. Также отмечено снижение пройденной дистанции ($p = 0.0035$) и увеличение времени неподвижности ($p = 0.0045$) в группе БАС111(В) по сравнению с группой БАС110(В). Тест СД (рис. 2Е) показал выраженные изменения в работе задних конечностей у мышей. Число соскальзываний задними лапами статистически значимо увеличивалось в группе БАС111(Н) ($p = 0.0101$) и БАС111(В) ($p = 0.0119$) по сравнению с контролем. Также отмечено уменьшение числа оступаний передними лапами в группе БАС111(В) по сравнению с группой БАС110(В) ($p = 0.04$). У мышей БАС110(Н) и БАС110(В) не выявлено нарушений работы передних и задних конечностей.

Наблюдавшиеся изменения внешнего вида, походки и локомоции мышей после введения экзосом отличаются от изменений, характерных для возрастной нормы, и сходны с признаками БАС на трансгенной модели данного заболевания B6SJL-Tg (SOD1-G93A) (см. рис. 2А–В).

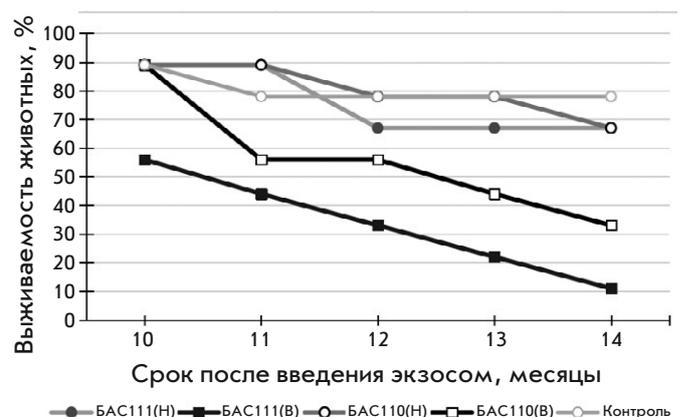


Рис. 1. Динамика выживаемости экспериментальных мышей в группах

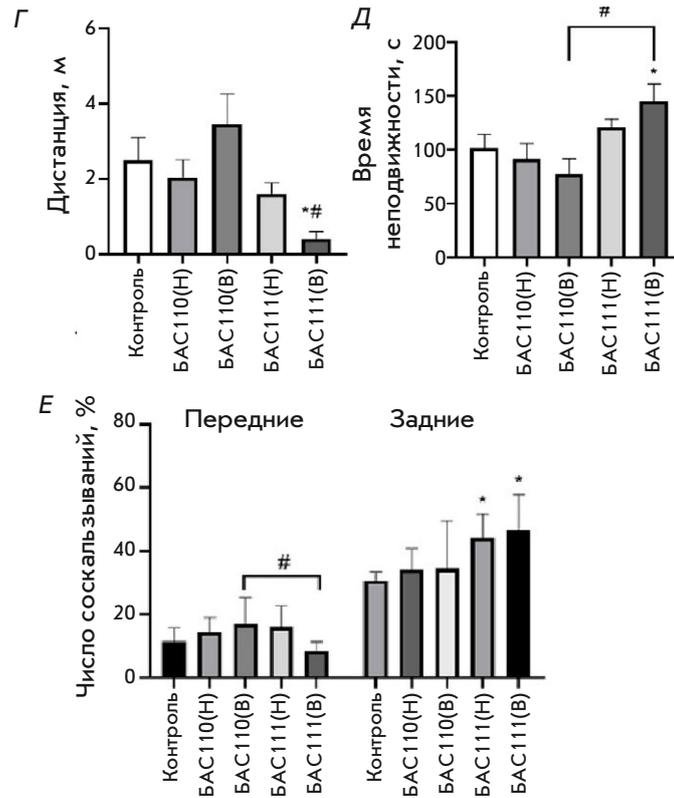


Рис. 2. Внешний вид мышей G93A (А) и мышей группы БАС111 (Б) после развития симптомов БАС. В – контрольное животное; пройденный путь (Г) и время неподвижности (Д) при тестировании в ОП; количество соскальзываний конечностей с верхней планки (в %) на СД (Е). * $p < 0.05$ по сравнению с группой «контроль». # $p < 0.05$ по сравнению с группой БАС110(В). Данные представлены в виде среднего \pm ошибка среднего

Животные с наиболее выраженными двигательными нарушениями (поджимание задних конечностей, нарушение походки, снижение двигательной активности) были взяты для гистологического исследования через 14 мес. после начала эксперимента. Проведение поведенческих тестов на этом сроке было невозможно в силу развившихся тяжелых неврологических нарушений.

Подсчет числа мотонейронов выявил значимое снижение их плотности в вентральных рогах спинного мозга после введения препарата БАС111 в высокой дозе по сравнению с контролем. Помимо этого, отмечено и значимое увеличение числа клеток микроглии и ее активацию в экспериментальной группе, а также статистически значимое увеличение интенсивности окрашивания на маркерный белок микроглии IBA1 (рис. 3А,Д).

Исследование белка TDP-43 в цитоплазме нейронов показало, что у контрольных мышей TDP43 локализован преимущественно в ядрах. В экспериментальной группе в отдельных нейронах наблюдали нарушения локализации TDP43 и его накопление в цитоплазме (рис. 3Б).

В контроле агрегированная форма белка SOD1 в спинальных мотонейронах не выявлялась. У экспериментальных мышей нами обнаружены единичные включения агрегированного белка SOD1 (рис. 3В), выраженной гибели нейронов при этом не наблюдали. Позитивным контролем служили

трансгенные мыши SOD1-G93A, в спинном мозге которых выявляли множественные агрегаты SOD1 и снижение числа мотонейронов.

Гистохимическая реакция на активность СДГ в скелетной мускулатуре животных выявила в экспериментальной группе тенденцию к повышению активности фермента. Этот процесс характерен для перестройки метаболической активности мышц при БАС (рис. 3Г), его наблюдали ранее также у мышей линии B6SJL-Tg (SOD1-G93A) [3].

ОБСУЖДЕНИЕ

Общей чертой нейродегенеративных заболеваний является прогрессирующая гибель нейронов (с избирательной уязвимостью определенного их подтипа при конкретных патологиях) и aberrantная агрегация ключевых белков [16]. При БАС патологический процесс начинается локально с гибели двигательных нейронов и распространяется предсказуемым образом по ЦНС вдоль определенных трактов, соответствующих нейроанатомическим связям [17]. В нашей работе показано, что уже через 9 мес. после интравентрикулярного введения экзосом, полученных из ЦСЖ пациентов с БАС, животные начинали приобретать характерный для данного заболевания двигательный фенотип – изменение локомоции с парезом задних конечностей, нарушением координации и увеличением времени и числа эпизодов неподвижности по данным физиологического исследования.

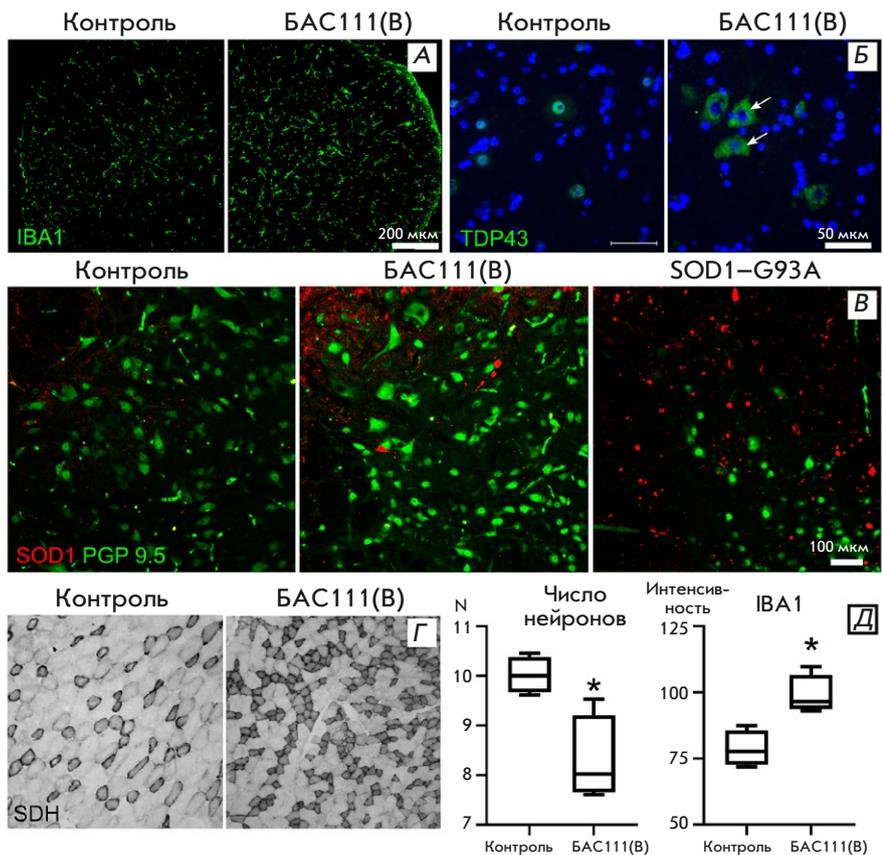


Рис. 3. Результаты морфологического исследования. **А** – активация микроглии. Окрашивание на маркерный белок микроглии IBA1. Вентральный рог спинного мозга, поясничный отдел. **Б** – выявление TDP-43 (зеленый цвет) в мотонейронах. Стрелками обозначено накопление TDP-43 в цитоплазме. Вентральный рог спинного мозга, поясничный отдел. **В** – накопление SOD1 у экспериментальных животных. Выявление SOD1 (красным), PGP9.5 (зеленым). Вентральный рог спинного мозга, поясничный отдел. **Г** – увеличение количества СДГ-позитивных волокон. Передняя большеберцовая мышца. **Д** – изменения мотонейронов и нейроглии. Снижение числа мотонейронов вентральных рогов спинного мозга (клеток в поле зрения), увеличение интенсивности окрашивания на маркерный белок микроглии IBA1. * $p < 0.05$, тест Манна–Уитни. Данные представлены в виде медианы и интерквартильного размаха

Указанный фенотип был сходен с фенотипом трансгенных животных, экспрессирующих мутацию G93A в гене *SOD1* [3]. Важно отметить, что на скорость развития двигательных симптомов влияла концентрация вводимой суспензии экзосом. Это согласуется с представлением о необходимом «инкубационном» периоде, когда белку с прионоподобным доменом (например, TDP-43 или SOD1) необходимо время для конверсии нормальных форм белка в патологические [16, 18], а в случае большей концентрации суспензии экзосом, «иницирующих» нейродегенеративный процесс, это время сокращается.

Одним из механизмов, наблюдаемых при различных нейродегенеративных заболеваниях, является секреция во внеклеточное пространство патологического белка – либо нативного, либо связанного с мембраной в составе внеклеточных везикул (экзосом), с последующим поглощением соседними клетками посредством рецептор-опосредованного эндоцитоза или пиноцитоза [18–20]. Другим механизмом является трансинаптическая передача путем anterograde и/или retrograde транспорта [21, 22].

Одна из главных патоморфологических особенностей БАС – наличие убиквитин-положительных цитоплазматических включений (стресс-гранул) в нейронах, содержащих агрегаты белка TDP-43, что показано на аутопсийном материале от паци-

ентов с БАС [23, 24]. Выявление каузальных мутаций в гене *TARDBP*, кодирующем белок TDP-43, подтвердило важность этого белка в патогенезе БАС [25] и лобно-височной деменции (ЛВД) [26]. Приблизительно в 97% всех случаев БАС и почти в половине случаев ЛВД отмечена агрегация TDP-43 в нейронах [27]. TDP-43 – это высококонсервативный ДНК/РНК-связывающий белок с многочисленными клеточными функциями, одна из которых связана с регуляцией транскрипции и альтернативного сплайсинга РНК [28]. Структурно TDP-43 содержит четыре домена: аминоконцевой домен, два мотива распознавания РНК и карбоксиконцевой домен, который и обладает прионоподобными свойствами [29]. В нормальных условиях TDP-43 находится преимущественно в ядре [30]. У пациентов с БАС белок приобретает патологическую конформацию и после трансинаптического захвата клеткой-реципиентом он взаимодействует с эндогенным TDP-43, провоцируя (подобно прионам) агрегацию собственного TDP-43 и тем самым распространяя патологию на другие структуры ЦНС [31, 32]. Показано, что ЦСЖ и ткань ЦНС от пациентов с БАС и ЛВД вызывают агрегацию TDP-43 и индуцируют распространение протеинопатии TDP-43 на клеточных культурах и *in vivo* [32–34]. В условиях патологии, например при БАС или ЛВД, отмечается нарушение клеточ-

ной локализации данного белка и увеличение уровня цитоплазматического TDP-43 с формированием его включений в цитоплазме и недостаточностью функциональной активности TDP-43 в ядре клетки [35]. В нашей работе для иммуногистохимического исследования использовали образцы спинного мозга мышей, имеющих наиболее выраженные двигательные нарушения (14 мес. после начала эксперимента), на которых показано нарушение локализации белка TDP-43 с его преимущественным накоплением в цитоплазме нейронов, что согласуется с данными других исследователей.

Опубликованы данные о межклеточном транспорте агрегатов TDP-43 посредством экзосом [36]. Экзосомная секреция патологических белков, таких, как β -амилоид, тау, прионный белок и α -синуклеин, показана и при других нейродегенеративных заболеваниях [16, 20]. Экзосомный транспорт TDP-43 имеет важное значение в патогенезе БАС, поскольку в биоптатах мозга [37] и ЦСЖ [33] пациентов с данным заболеванием обнаруживаются значительно более высокие уровни экзосомного TDP-43 по сравнению с контролем.

Помимо передачи между нейронами, также описано распространение патологических белков между нейронами и глией (астроцитами, микроглией и/или олигодендроцитами) [20]. Например, тау-белок может попадать в астроциты [38] и микроглию, которые играют ключевую роль в распространении патологического тау-белка посредством экзосомного транспорта [38, 39]. В нашем исследовании окрашивание образцов спинного мозга от экспериментальных животных на маркер микроглии IBA1 выявило увеличение числа клеток микроглии и ее активацию, что говорит о непосредственном участии врожденного иммунитета в молекулярных механизмах гибели мотонейронов. Воспалительный ответ, возникающий в условиях патологии, имеет определенные благоприятные эффекты, способствуя восстановлению целостности и гомеостаза тканей, однако хроническое нейровоспаление приводит к истощению регенеративного потенциала микроглии [40]. Активация микроглии осуществляется через инфламмосомы, которые представляют собой высокомолекулярный комплекс в цитозоле иммунных клеток, опосредующих активацию провоспалительных каспаз [41]. Важнейшим внутриклеточным фактором, на который реагируют инфламмосомы при БАС, является накопление в нейронах токсичных агрегатов TDP-43, SOD1 и других белков, вызывающих нейровоспаление [42]. Каскад активации инфламмосом инициирует высвобождение интерлейкина (IL)-1 β и IL-18 и вызывает пироптоз – запрограммированную гибель клеток, опосредуемую газдермином-D и притоком

ионов натрия и воды, что приводит к набуханию клеток с разрывом мембраны и выбросом содержимого цитозоля во внеклеточное пространство, что также способствует дальнейшему распространению патологических белков в клетках ЦСН [43].

В отличие от спорадических форм БАС, где основным компонентом внутриклеточных включений является TDP-43 [24], семейные формы с верифицированной мутацией в гене *SOD1* характеризуются преимущественным отложением мутантного белка SOD1 [44]. Важно отметить, что клеточные агрегаты белка SOD1 дикого типа обнаружены и при некоторых случаях других семейных форм БАС, а также в отдельных случаях спорадических форм, при которых мутации *SOD1* отсутствуют [45]. Это может объяснить найденные нами депозиты агрегированного белка SOD1 у экспериментальных животных без мутации в гене *SOD1*, причем их минимальное количество объясняет относительную сохранность мотонейронов. В то же время при оценке позитивного контроля (трансгенные мыши SOD1-G93A) мы обнаружили множественные агрегаты SOD1 и снижение числа мотонейронов, которые погибают в результате токсического воздействия белка SOD1 на клетку по механизму приобретения функции.

В последние годы предложено несколько инновационных методов лечения БАС с использованием экзосом и внеклеточных везикул [46], причем в большинстве своем они касались использования экзосом в качестве таргетного пути доставки различных нейротрофических факторов и микроРНК через гематоэнцефалический барьер с целью замедлить гибель мотонейронов. Учитывая, что в патогенезе БАС экзосомы предположительно опосредуют один из основных механизмов распространения патологического процесса в ЦНС, что показано и в настоящей экспериментальной работе, можно предположить возможность модуляции нейродегенеративного процесса посредством ингибирования экзосомного транспорта на разных его этапах. Одним из таких перспективных методов, направленных на замедление распространения нейродегенеративного процесса экзосомами, является иммунное блокирование слияния экзосом с мембраной мотонейронов посредством анти-CD63-антител и, вероятно, других основных маркеров экзосом [47]. Помимо такого воздействия на экзосомы, важным вопросом в ингибировании экзосомного пути распространения патологического процесса при БАС остается разработка препаратов, селективно блокирующих передачу белков с измененной конформацией и прионоподобными свойствами.

Таким образом, в проведенном нами исследовании показан инициирующий эффект экзосомных белков, полученных из ЦСЖ пациентов с БАС, в развитии

гибели мотонейронов у экспериментальных животных. Это подтверждает патогенетическую роль экзосом в распространении нейродегенеративного процесса при данном заболевании и открывает возможность определения новых мишеней для таргетной терапии БАС.

Работа выполнена при поддержке гранта Министерства высшего образования и науки РФ на проведение крупных научных проектов по приоритетным направлениям научно-технологического развития (проект № 075-15-2024-638).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Feldman E.L., Goutman S.A., Petri S., Mazzini L., Savelieff M.G., Shaw P.J., Sobue G. // *Lancet*. 2022. V. 400. № 10360. P. 1363–1380.
2. Hardiman O., Al-Chalabi A., Chio A., Corr E.M., Logroscino G., Robberecht W., Shaw P.J., Simmons Z., van den Berg L.H. // *Nat. Rev. Dis. Primers*. 2017. V. 5. P. 17071.
3. Ставровская А.В., Воронков Д.Н., Артемова Э.А., Белугин Б.В., Шмаров М.М., Ямщикова Н.Г., Гущина А.С., Ольшанский А.С., Народицкий Б.С., Иллариошкин С.Н. // *Нервно-мышечные болезни*. 2020. № 3. С. 63–73.
4. Иванова М.В., Чеканова Е.О., Белугин Б.В., Тутыхина И.Л., Должикова И.В., Закройщикова И.В., Васильев А.В., Захарова М.Н. // *Нейрохимия*. 2019. Т. 36. № 3. С. 195–207.
5. Иванова М.В., Чеканова Е.О., Белугин Б.В., Должикова И.В., Тутыхина И.Л., Захарова М.Н. // *Нейрохимия*. 2020. Т. 37. № 3. С. 271–279.
6. Gagliardi D., Bresolin N., Comi G.P., Corti S. // *Cell Mol. Life Sci*. 2021. V. 78. № 2. P. 561–572.
7. Cocucci E., Meldolesi J. // *Trends Cell Biol*. 2015. V. 25. P. 364–372.
8. Matsumoto J., Stewart T., Banks W.A., Zhang J. // *Curr. Pharm. Des*. 2017. V. 23. P. 6206–6214.
9. Kourembanas S. // *Annu. Rev. Physiol*. 2015. V. 77. P. 13–27.
10. Théry C., Amigorena S., Raposo G., Clayton A. // *Curr. Protoc. Cell Biol*. 2006. V. 30. P. 3.22.1–3.22.29.
11. Silverman J.M., Fernando S.M., Grad L.I., Hill A.F., Turner B.J., Yerbury J.J., Cashman N.R. // *Cell Mol. Neurobiol*. 2016. V. 36. P. 377–381.
12. Braak H., Brettschneider J., Ludolph A.C., Lee V.M., Trojanowski J.Q., Del Tredici K. // *Nat. Rev. Neurol*. 2013. V. 9. № 12. P. 708–714.
13. Paxinos G., Franklin K.B.J. *The mouse brain in stereotaxic coordinates*. San Diego etc.: Acad. Press, 2001.
14. Берстон М. *Гистохимия ферментов*. М.: Мир, 1965. 464 с.
15. Austin A., Beresford L., Price G., Cunningham T., Kalmar B., Yon M. // *Curr. Protocols*. 2022. V. 2. e428.
16. Peng C., Trojanowski J.Q., Lee V.M.-Y. // *Nat. Rev. Neurol*. 2020. V. 16. P. 199–212.
17. Ravits J.M., La Spada A.R. // *Neurology*. 2009. V. 73. P. 805–811.
18. Goedert M., Clavaguera F., Tolnay M. // *Trends Neurosci*. 2020. V. 33. P. 317–325.
19. Saman S., Kim W., Raya M., Visnick Y., Miro S., Saman S., Jackson B., McKee A.C., Alvarez V.E., Lee N.C.Y., Hall G.F. // *J. Biol. Chem*. 2012. V. 287. P. 3842–3849.
20. Uemura N., Uemura M.T., Luk K.C., Lee V.M.-Y., Trojanowski J.Q. // *Trends Mol. Med*. 2020. V. 26. № 10. P. 936–952.
21. Meziat C., Rey N., Brundin P., Raj A. // *Neurobiol. Dis*. 2020. V. 134. P. 104623.
22. Schaser A.J., Stackhouse T.L., Weston L.J., Kerstein P.C., Osterberg V.R., López C.S., Dickson D.W., Luk K.C., Meshul C.K., Woltjer R.L., et al. // *Acta Neuropathol. Commun*. 2020. V. 8. P. 150.
23. Arai T., Hasegawa M., Akiyama H., Ikeda K., Nonaka T., Mori H., Mann D., Tsuchiya K., Yoshida M., Hashizume Y., Oda T. // *Biochem. Biophys. Res. Commun*. 2006. V. 351. P. 602–611.
24. Neumann M., Sampathu D.M., Kwong L.K., Truax A.C., Micsenyi M.C., Chou T.T., Bruce J., Schuck T., Grossman M., Clark C.M., et al. // *Science*. 2006. V. 314. № 5796. P. 130–133.
25. Sreedharan J., Blair I.P., Tripathi V.B., Hu X., Vance C., Rogelj B., Ackerley S., Durnall J.C., Williams K.L., Buratti E., et al. // *Science*. 2008. V. 319. № 5870. P. 1668–1672.
26. Borroni B., Bonvicini C., Alberici A., Buratti E., Agosti C., Archetti S., Papetti A., Stuani C., Di Luca M., Gennarelli M., Padovani A. // *Hum. Mutat*. 2009. V. 30. № 11. P. 974–983.
27. Tan R.H., Yang Y., Kim W.S., Dobson-Stone C., Kwok J.B., Kiernan M.C., Halliday G.M. // *Acta Neuropathol. Commun*. 2017. V. 5. № 1. P. 76.
28. Buratti E., Baralle F.E. // *J. Biol. Chem*. 2001. V. 276. P. 36337–36343.
29. Cohen T.J., Lee V.M.Y., Trojanowski J.Q. // *Trends Mol. Med*. 2011. V. 17. № 11. P. 659–667.
30. Ayala Y.M., Zago P., D'Ambrogio A., Xu Y.-F., Petrucelli L., Buratti E., Baralle F.E. // *J. Cell Sci*. 2008. V. 121. P. 3778–3785.
31. Smethurst P., Newcombe J., Troakes C., Simone R., Chen Y.-R., Patani R., Sidle K. // *Neurobiol. Dis*. 2016. V. 96. P. 236–247.
32. Tamaki Y., Ross J.P., Alipour P., Castonguay C.-É., Li B., Catoire H., Rochefort D., Urushitani M., Takahashi R., Sonnen J.A., et al. // *PLoS Genet*. 2023. V. 19. № 2. e1010606.
33. Ding X., Ma M., Teng J., Teng R.K.F., Zhou S., Yin J., Fonkem E., Huang J.H., Wu E., Wang X. // *Oncotarget*. 2015. V. 6. № 27. P. 24178–24191.
34. Nonaka T., Masuda-Suzukake M., Arai T., Hasegawa Y., Akatsu H., Obi T., Yoshida M., Murayama S., Mann D.M.A., Akiyama H., Hasegawa M. // *Cell Rep*. 2013. V. 4. № 1. P. 124–134.
35. Gambino C.M., Ciaccio A.M., Lo Sasso B., Giglio R.V., Vidali M., Agnello L., Ciaccio M. // *Diagnostics*. 2023. V. 13. P. 416.
36. Doyle L.M., Wang M.Z. // *Cells*. 2019. V. 8. № 7. P. 727.
37. Iguchi Y., Eid L., Parent M., Soucy G., Bareil C., Riku Y., Kawai K., Takagi S., Yoshida M., Katsuno M., et al. // *Brain*. 2016. V. 139. P. 3187–3201.
38. Perea J.R., López E., Carlos Díez-Ballesteros J., Ávila J., Hernández F., Bolós M. // *Front. Neurosci*. 2019. V. 13. P. 442.
39. Asai H., Ikezu S., Tsunoda S., Medalla M., Luebke J., Haydar T., Wolozin B., Butovsky O., Kügler S., Ikezu T. // *Nat. Neurosci*. 2015. P. 18. № 11. C. 1584–1593.
40. Kempuraj D., Thangavel R., Natteru P.A., Selvakumar G.P., Saeed D., Zahoor H., Zaheer S., Iyer S.S., Zaheer A. // *J. Neurol. Neurosurg. Spine*. 2016. V. 1. № 1. P. 1003.
41. Martinon F., Burns K., Tschopp J. // *Mol. Cell*. 2002. V. 10. № 2. P. 417–426.
42. Komine O., Yamanaka K. // *Nagoya J. Med. Sci*. 2015. V. 77. № 4. P. 537–549.
43. Lieberman J., Wu H., Kagan J.P. // *Sci. Immunol*. 2019. V. 4. № 39. eaav144.
44. Valentine J.S., Doucette P.A., Zittin Potter S. // *Annu. Rev. Biochem*. 2005. V. 74. P. 563–593.
45. Rotunno M.S., Bosco D.A. // *Front. Cell. Neurosci*. 2013. V. 7. P. 253.
46. Bobis-Wozowicz S., Marbán E. // *Front. Cell. Dev. Biol*. 2022. V. 10. P. 919426.
47. Afonso G.J.M., Cavaleiro C., Valero J., Mota S.I., Ferreira E. // *Cells*. 2023. V. 12. P. 1763.

УДК 577.213

Сравнительный анализ мишеней спейсеров CRISPR-Cas заквасочных культур

А. А. Фаткулин¹, Т. А. Чуксина¹, Н. П. Сорокина², И. Т. Смыков², Е. В. Кураева²,
Е. С. Масежная², К. А. Смагина², М. Ю. Шкурников^{1*}

¹Высшая школа экономики, факультет биологии и биотехнологии, Москва, 101000 Россия

²Федеральный научный центр пищевых систем им. В.М. Горбатова РАН, Москва, 109316 Россия

*E-mail: mshkurnikov@hse.ru

Поступила в редакцию 09.10.2024

Принята к печати 07.11.2024

DOI: 10.32607/actanaturae.27533

РЕФЕРАТ Предприятия молочной промышленности представляют собой уникальную экологическую нишу для бактериофагов молочнокислых бактерий. В ходе эволюции бактерии выработали широкий спектр защитных механизмов, направленных против инфекций, вызванных бактериофагами. Особый интерес представляет система CRISPR-Cas, которая позволяет бактериям приобретать специфичную устойчивость к определенным бактериофагам. В представленной работе изучены системы CRISPR-Cas молочнокислых бактерий. Особое внимание было уделено специфичности спейсеров CRISPR-кассет. Системы CRISPR-Cas выявлены в геномах 43% исследованных молочнокислых бактерий. Кроме того, лишь 13.1% от общего числа спейсеров CRISPR-кассет совпадали с геномами бактериофагов, что свидетельствует о том, что многие из предсказанных спейсеров либо не имеют известных фаговых мишеней, либо направлены против других видов мобильных генетических элементов, например, плазмид.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА бактериофаг, CRISPR-Cas, сыроделие, заквасочные культуры, единое здоровье.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ R-M – система рестрикции-модификации; Abi – система абортирования фаговой инфекции.

ВВЕДЕНИЕ

В процессе производства ферментированных молочных продуктов применяются заквасочные культуры, которые способствуют сквашиванию молока и формированию продукта с характерными текстурными, ароматическими и вкусовыми свойствами [1]. Однако молочнокислые бактерии могут подвергаться заражению бактериофагами [2], поскольку предприятия молочной промышленности представляют собой уникальную экологическую нишу для бактериофагов молочнокислых бактерий, содержащихся в сыром молоке [3].

В ходе эволюции у бактерий сформировался широкий спектр защитных механизмов, направленных против инфекций, вызванных бактериофагами. К таким механизмам относятся системы abortивной инфекции (Abi), рестрикции-модификации (R-M) и CRISPR-Cas [4]. Особый интерес к системам CRISPR-Cas обусловлен их адаптивной природой, которая позволяет бактериям приобретать и сохранять специфичную устойчивость к определенным

бактериофагам [5]. CRISPR-Cas-опосредованный иммунитет обнаружен примерно у половины секвенированных бактерий, а также у большинства архей [6], что делает его одним из ключевых элементов антивирусной защиты прокариот.

В настоящее время выделяют два класса систем CRISPR-Cas, представленных шестью типами (I–VI), которые различаются по своим механизмам и компонентам [6]. Несмотря на такое разнообразие, все системы CRISPR-Cas обладают рядом характерных черт. Основным элементом каждой системы CRISPR-Cas является CRISPR-локус. Этот локус содержит CRISPR-ассоциированные (cas) гены, ответственные за взаимодействие с чужеродными нуклеиновыми кислотами, а также CRISPR-кассету: короткие палиндромные повторяющиеся последовательности ДНК, разделенные уникальными вставками – спейсерами. Спейсеры представляют собой фрагменты чужеродной ДНК, интегрированные в бактериальный геном в результате предшествующей инфекции [5]. Они определяют последователь-

ность, которую будут распознавать нуклеазы Cas, и, как следствие, играют ключевую роль в иммунитете, опосредованном CRISPR-Cas. Большинство спейсеров имеют небольшую длину, например, для подтипов I-E и I-F характерны спейсеры длиной 31–33 п.н., а для I-B, I-C, I-D и I-U – 34–37 п.н. [7].

Механизм действия системы CRISPR-Cas можно разделить на несколько основных этапов: при попадании в бактериальную клетку чужеродной нуклеиновой кислоты новые спейсеры встраиваются в CRISPR-кассету. Далее спейсеры транскрибируются с образованием предшественников CRISPR-РНК (pre-crRNA), которые затем процессируются в зрелые crRNA и, связываясь с нуклеазами Cas, формируют активный комплекс, способный распознавать и связываться с комплементарной последовательностью чужеродной ДНК или РНК. После связывания с мишенью происходит деградация чужеродного генетического материала, что обеспечивает защиту клетки от повторных инфекций [5]. Для успешной деградации генома бактериофага его участок должен обладать высокой степенью гомологии со спейсером. Например, показано, что наличие трех и более мутаций может привести к почти полной инактивации CRISPR-Cas-иммунитета [8].

В настоящей работе изучены системы CRISPR-Cas молочнокислых бактерий. Особое внимание уделено специфичности спейсеров CRISPR-кассет, что позволило оценить устойчивость исследуемых бактерий к известным бактериофагам.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Геномные последовательности молочнокислых бактерий, а также бактериофагов класса *Caudoviricetes* получены из базы данных NCBI. Геномные данные были предварительно обработаны для удаления дубликатов. Для выявления CRISPR-Cas-систем в бактериальных геномах использовали инструмент PADLOC [9]. Спейсеры в бактериальных геномах предсказывали с помощью MinCED [10], после чего выравнивали с помощью Bowtie2 [11] на последовательности геномов фагов, при выравнивании использовали опции «--end-to-end» и «--very-sensitive». С целью установить функции участков, на которые были выровнены спейсеры, геномы бактериофагов были дополнительно проаннотированы с помощью PharoKka [12]. Для оценки перепредставленности функциональных групп среди мишеней спейсеров для каждой группы рассчитывали долю спейсеров, выровненных на гены этой группы, и долю генов этой группы среди всех генов. Равномерность распределения спейсеров по группам проверяли с использованием точного теста Фишера по принципу «один против всех».

РЕЗУЛЬТАТЫ

Из базы данных NCBI были получены последовательности 563 геномов молочнокислых бактерий, принадлежащих к шести видам (табл. 1). Далее в 243 из них с помощью PADLOC выявили системы CRISPR-Cas (табл. 1), что соответствует приблизительно 43% от всех исследуемых геномов. Предсказанные системы CRISPR-Cas относятся к шести различным подтипам: I-B, I-C, I-E, I-G, II-A и II-C (рис. 1). В геномах *Lactiplantibacillus plantarum*, *Lacticaseibacillus paracasei* и *Lacticaseibacillus rhamnosus* доминируют системы подтипа II-A, что может косвенно свидетельствовать об их важной роли в защитных механизмах этих видов. Среди штаммов *Lacticaseibacillus casei* распространены подтипы I-C и II-A, в то время как для *Lactobacillus helveticus* характерны подтипы I-B и I-C. В геномах *Propionibacterium freudenreichii* преобладал подтип I-G.

Общее количество предсказанных с помощью MinCED спейсеров в бактериальных геномах составило 6971 (табл. 2), однако многие из них перепредставлены внутри видов. По этой причине количество уникальных спейсеров среди исследуемых видов равно лишь 3477. Распределение длин предсказанных спейсеров (рис. 2) согласуется с ранее опубликованными данными [7]. Последующее выравнивание на геномы 21261 фага класса *Caudoviricetes*, полученные из базы данных NCBI, выявило 916 совпадений (табл. 2), из них только 485 уникальны по последовательности и видовой принадлежности.

Все полученные выравнивания относятся к геномам 69 фагов, описанных ранее как бактериофаги молочнокислых бактерий (рис. 3). Функциональная аннотация геномов фагов показала, что предсказанные спейсеры чаще выравниваются на гены, кодирующие белки хвоста, гены, участвующие в упаковке, и гены, участвующие в метаболизме ДНК (скорректированный p -value < 0.05) (табл. 3).

ОБСУЖДЕНИЕ

В проведенном исследовании установлено наличие CRISPR-Cas-систем в геномах 43% исследованных молочнокислых бактерий, что подтверждает их важную роль в механизмах защиты этих микроорганизмов от чужеродных нуклеиновых кислот, в том числе от генетического материала бактериофагов. Полученные результаты демонстрируют разнообразие CRISPR-Cas-систем у разных видов молочнокислых бактерий.

Сравнительно низкий процент спейсеров, совпадающих с геномами бактериофагов (лишь 13.1% от общего числа), может свидетельствовать о том,

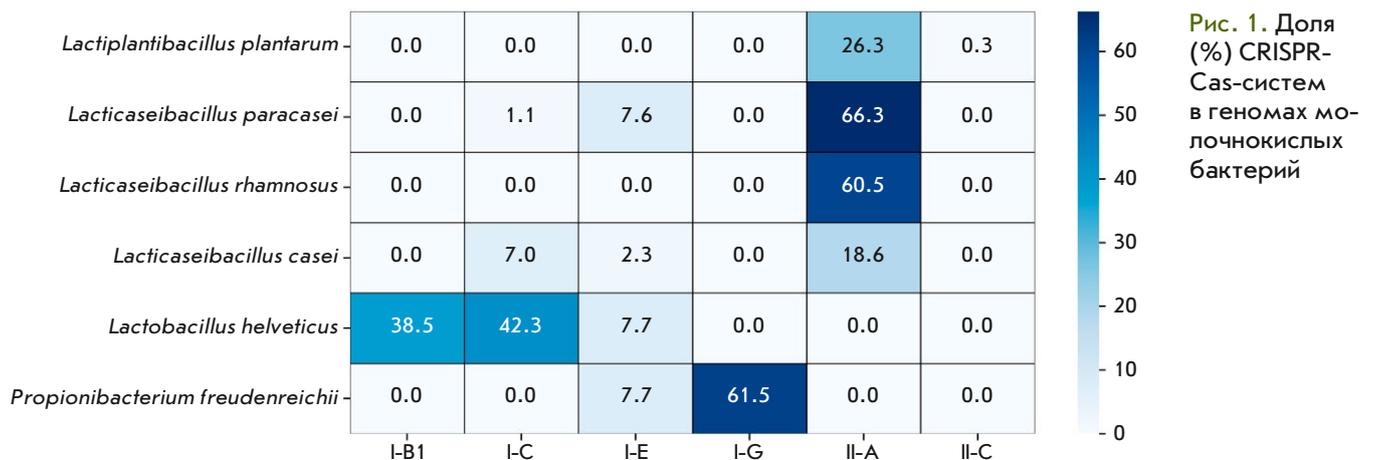


Рис. 1. Доля (%) CRISPR-Cas-систем в геномах молочнокислых бактерий

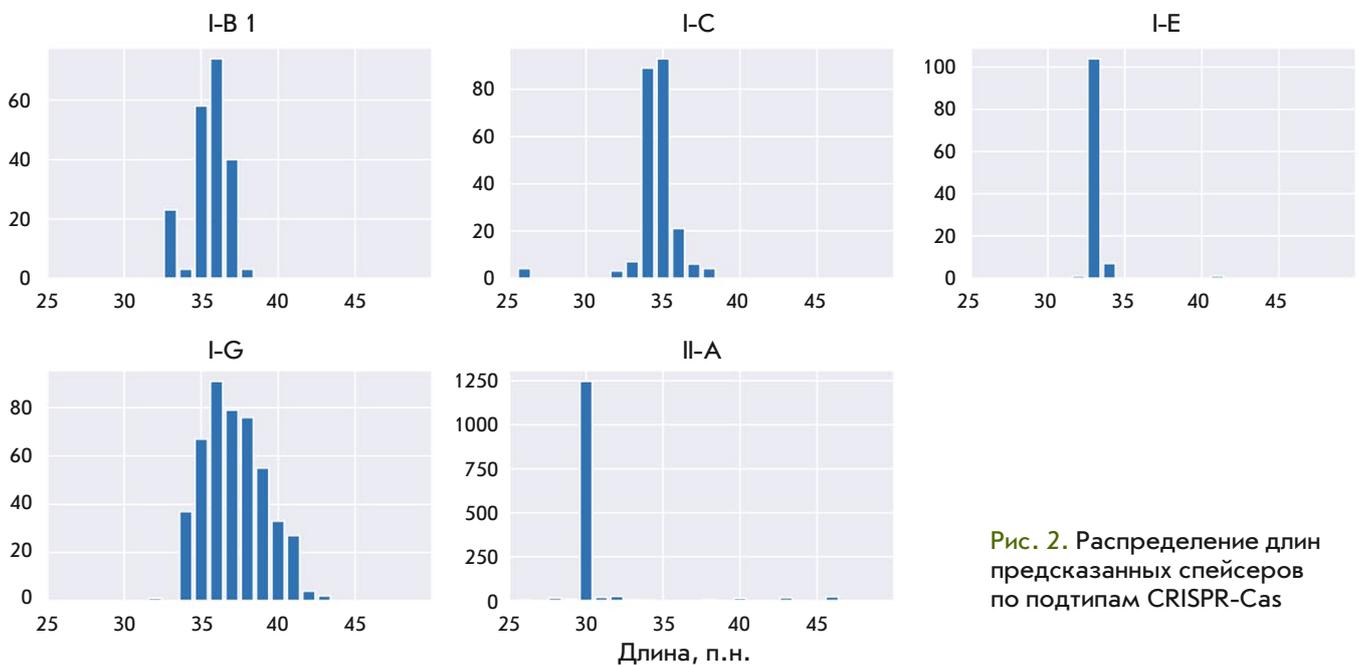


Рис. 2. Распределение длин предсказанных спейсеров по подтипам CRISPR-Cas

Таблица 1. Распределение систем CRISPR-Cas в геномах молочнокислых бактерий

Вид	Геномы, число	Геномы, содержащие CRISPR-Cas, %
<i>Lactiplantibacillus plantarum</i>	300	80 (26.7)
<i>Lacticaseibacillus paracasei</i>	92	68 (73.9)
<i>Lacticaseibacillus rhamnosus</i>	76	46 (60.5)
<i>Lacticaseibacillus casei</i>	43	10 (23.3)
<i>Lactobacillus helveticus</i>	26	22 (84.6)
<i>Propionibacterium freudenreichii</i>	26	17 (65.4)
	563	243

Таблица 2. Распределение спейсеров в геномах молочнокислых бактерий

Вид	Всего предсказано	Идентифицировано в фагах, %
<i>Lactiplantibacillus plantarum</i>	1519	67 (4.4)
<i>Lacticaseibacillus paracasei</i>	2128	296 (13.9)
<i>Lacticaseibacillus rhamnosus</i>	1239	289 (23.3)
<i>Lacticaseibacillus casei</i>	379	53 (14.0)
<i>Lactobacillus helveticus</i>	778	48 (6.2)
<i>Propionibacterium freudenreichii</i>	928	163 (17.6)

Таблица 3. Гены, перепредставленные среди мишеней спейсеров

Ген (согласно аннотации PharoKka)	Скорректированное <i>p</i> -value
Малая субъединица терминазы	3.8×10^{-6}
Адаптер головы и хвоста Ad1	2.5×10^{-3}
Головной каркасный белок	3.6×10^{-3}
Основной белок хвоста	3.8×10^{-3}
Экзонуклеаза репарации ДНК	3.9×10^{-2}

что многие из предсказанных спейсеров либо не имеют известных фаговых мишеней, либо направлены против других видов мобильных генетических элементов, например, плазмид. Данное наблюдение также подчеркивает необходимость дальнейших исследований, направленных на более глубокое понимание механизмов взаимодействия CRISPR-Cas-систем с различными мобильными генетическими элементами. Кроме того, актуальным остается поиск и описание новых, ранее неизвестных, бактериофагов.

Интересно, что среди мишеней спейсеров перепредставлены гены, отвечающие за упаковку вирусной частицы, гены белков хвоста, а также гены, вовлеченные в метаболизм ДНК, поскольку эти участки должны быть более консервативными в силу своих функций, связанных с основными стадиями жизненного цикла вируса, такими как сборка вириона и проникновение в клетку-хозяина.

Примечательно также, что спектры фагов, резистентность к которым проявляют штаммы *Lactocaseibacillus paracasei*, *Lactocaseibacillus rhamnosus* и *Lactocaseibacillus casei*, обладают выраженным сходством. Этот факт в совокупности со сходством представленных в геномах данных штаммов систем CRISPR-Cas может указывать на общие механизмы защиты или на сходство эволюционных путей формирования устойчивости этих бактерий к бактериофагам.

В представленном исследовании проведен комплексный анализ систем CRISPR-Cas, обнаруженных в геномах молочнокислых бактерий. Полученные результаты в значительной степени согласуются с ранее опубликованными данными [13, 14], однако мы использовали наиболее актуальные источники информации и сосредоточились на изучении опосредованного CRISPR-Cas иммунитета нескольких штаммов. Кроме того, мы подробнее изучили специфичность выявленных спейсеров,

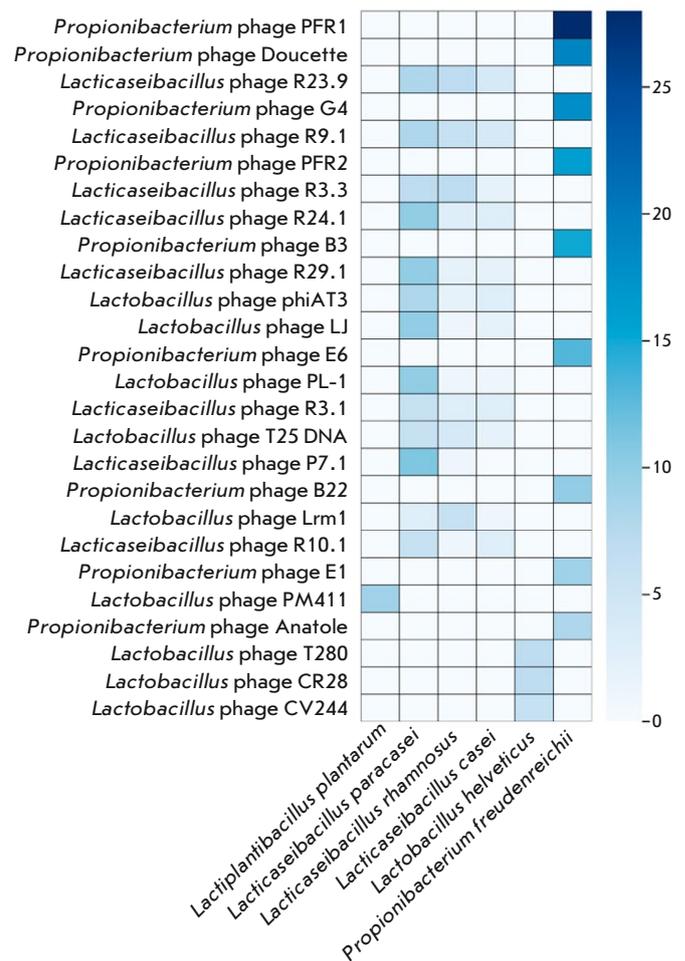


Рис. 3. Выравнивания уникальных спейсеров на геномы бактериофагов. Фаги, на которые выравнивались менее пяти спейсеров от каждого из видов, исключены для улучшения восприятия изображения

а также функции участков, против которых они направлены. Таким образом, полученные результаты не только расширяют текущее понимание роли CRISPR-Cas в адаптивном иммунитете молочнокислых бактерий, но и подчеркивают важность дальнейших исследований в данном направлении.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Для лучшего понимания роли системы CRISPR-Cas в защите заквасочных культур от бактериофагов и ее влияния на процесс ферментации необходимы дополнительные исследования. Обилие бактериофагов, инфицирующих заквасочные культуры, на молочных предприятиях еще раз подчеркивает важность анализа спектра резистентности заквасочных культур для их рационального комбинирования в зависимости от спектра фагов в молочном сырье.

*Исследование выполнено за счет гранта
Министерства науки и высшего образования
Российской Федерации на проведение крупных*

*научных проектов по приоритетным
направлениям научно-технологического развития
(Проект № 075-15-2024-483).*

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Frantzen C.A., Kleppen H.P., Holo H. // Appl. Environ. Microbiol. 2018. V. 84. № 3. P. e02199-17.
2. Lahbib-Mansais Y., Mata M., Ritzenthaler P. // Biochimie. 1988. V. 70. № 3. P. 429–435.
3. Romero D.A., Magill D., Millen A., Horvath P., Fremaux C. // FEMS Microbiol. Rev. 2020. V. 44. № 6. P. 909–932.
4. van Houte S., Buckling A., Westra E.R. // Microbiol. Mol. Biol. Rev. 2016. V. 80. № 3. P. 745–763.
5. Nussenzweig P.M., Marraffini L.A. // Annu. Rev. Genet. 2020. V. 54. № 1. P. 93–120.
6. Makarova K.S., Wolf Y.I., Iranzo J., Shmakov S.A., Alkhnbashi O.S., Brouns S.J.J., Charpentier E., Cheng D., Haft D.H., Horvath P., et al. // Nat. Rev. Microbiol. 2020. V. 18. № 2. P. 67–83.
7. Kuznedelov K., Mekler V., Lemak S., Tokmina-Lukaszewska M., Datsenko K.A., Jain I., Savitskaya E., Mallon J., Shmakov S., Bothner B., et al. // Nucl. Acids Res. 2016. V. 44. № 22. P. 10849–10861.
8. Xue C., Seetharam A.S., Musharova O., Severinov K., Brouns S.J., Severin A.J., Sashital D.G. // Nucl. Acids Res. 2015. V. 43. № 22. P. 10831–10847.
9. Payne L.J., Todeschini T.C., Wu Y., Perry B.J., Ronson C.W., Fineran P.C., Nobrega F.L., Jackson S.A. // Nucl. Acids Res. 2021. V. 49. № 19. P. 10868–10878.
10. Bland C., Ramsey T.L., Sabree F., Lowe M., Brown K., Kyrpides N.C., Hugenholtz P. // BMC Bioinformatics. 2007. V. 8. № 1. P. 209.
11. Langmead B., Salzberg S.L. // Nat. Meth. 2012. V. 9. № 4. P. 357–359.
12. Bouras G., Nepal R., Houtak G., Psaltis A.J., Wormald P.-J., Vreugde S. // Bioinformatics. 2023. V. 39. № 1. P. btac776.
13. Crawley A.B., Henriksen E.D., Stout E., Brandt K., Barrangou R. // Sci. Rep. 2018. V. 8. № 1. P. 11544.
14. Horvath P., Coûté-Monvoisin A.-C., Romero D.A., Boyaval P., Fremaux C., Barrangou R. // Internat. J. Food Microbiol. 2009. V. 131. № 1. P. 62–70.

УДК 577.2

Пептид, имитирующий петлю II эпителиального белка человека SLURP-2, повышает жизнеспособность и стимулирует миграцию кератиноцитов кожи

О. В. Шлепова^{1†}, Т. Я. Горностаева^{1,2†}, И. Д. Кукушкин^{1,2}, В. Н. Азев³, М. Л. Бычков¹, З. О. Шенкарев^{1,2}, М. П. Кирпичников^{1,5}, Е. Н. Люкманова^{1,2,4,5*}

¹ Государственный научный центр Российской Федерации Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, Москва, 117997 Россия

² Московский центр перспективных исследований, Москва, 123592 Россия

³ Филиал Института биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, Пушкино, 142290 Россия

⁴ Шеньчжэньский МГУ-ППИ университет, провинция Гуандун, Шэньчжэнь, р-он Лунган, Даюньсиньчэн, 518172 Китай

⁵ Междисциплинарная научно-образовательная школа «Молекулярные технологии живых систем и синтетическая биология», биологический факультет Московского государственного университета им. М.В. Ломоносова, Москва, 119234 Россия

*E-mail: lyukmanova_ekaterina@smbu.edu.cn

† - равный вклад авторов.

Поступила в редакцию 16.08.2024

Принята к печати 07.11.2024

DOI: 10.32607/actanaturae.27494

РЕФЕРАТ Секретируемый белок человека SLURP-2 является регулятором гомеостаза эпителия, повышает жизнеспособность и стимулирует миграцию кератиноцитов. Мишенями SLURP-2 в кератиноцитах служат никотиновые и мускариновые ацетилхолиновые рецепторы. Данная работа посвящена поиску функциональных участков молекулы SLURP-2, отвечающих за повышение жизнеспособности и стимуляцию миграции кератиноцитов. Получены синтетические пептиды, соответствующие петлевым участкам белка SLURP-2, изучено их влияние на жизнеспособность кератиноцитов кожи HaCaT с помощью теста WST-8 и их миграцию с помощью scratch-теста. Наиболее активным оказался пептид, соответствующий петле II, стимулирующий жизнеспособность и миграцию кератиноцитов. Активность этого пептида обусловлена взаимодействием с $\alpha 7$ - и $\alpha 3\beta 2$ -nAChR, а также подавлением сигнальных внутриклеточных путей p38 MAP-киназы. Таким образом, получены новые данные, объясняющие механизмы, лежащие в основе регуляторной активности SLURP-2 и указывающие на перспективность дальнейших исследований пептидов, соответствующих петле II, в качестве прототипов препаратов для ранозаживления.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА SLURP-1, SLURP-2, Ly6/uPAR, никотиновый ацетилхолиновый рецептор, кератиноциты, ранозаживление.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ α -Bgtx – α -бунгаротоксин; ACh – ацетилхолин; Atr – атропин; Dh β e – дигидро- β -эритроидина гидробромид; mAChR – мускариновый ацетилхолиновый рецептор; MII – α -конотоксин MII; MLA – метилликаконитин; mTOR – мишень рапамицина у млекопитающих; NF-kB – ядерный фактор kB; nAChR – никотиновый ацетилхолиновый рецептор; p38 MAPK – митоген-активируемая протеинкиназа p38; STAT3 – сигнальный белок и активатор транскрипции 3.

ВВЕДЕНИЕ

Белки семейства Lu6/uPAR экспрессируются во многих тканях и клетках человека [1]. Белки Lu6/uPAR обладают широким спектром функций и участвуют в контроле пролиферации клеток, миграции, межклеточном взаимодействии, созревании иммунных клеток, активации макрофагов и выработке цитокинов, а также в когнитивных процессах [1–3]. Некоторые из них являются лигандами никотиновых и мускариновых ацетилхолиновых рецепторов (nAChR и mAChR соответственно). Ацетилхолиновые рецепторы регулируют различные процессы, в том числе рост, миграцию и дифференцировку эпителиальных клеток [4, 5]. Лиганды ацетилхолиновых рецепторов могут быть использованы в качестве прообразов препаратов, эффективных при заболеваниях, связанных с нарушением регуляции работы этих рецепторов [6, 7]. Секретируемые белки Lu6/uPAR человека – SLURP-1 и SLURP-2 , являются ауто/паракринными регуляторами гомеостаза эпителия и лигандами ацетилхолиновых рецепторов [8–11]. SLURP-1 ингибирует рост и миграцию нормальных и опухолевых клеток [12–15]. Ранее этот белок рассматривался в качестве прототипа противоопухолевых препаратов, направленных на таргетирование $\alpha 7\text{-nAChR}$ [12, 16]. Белок SLURP-2 стимулирует пролиферацию и миграцию кератиноцитов полости рта Het-1A и может служить прообразом препаратов для ранозаживления [17, 18]. SLURP-2 может взаимодействовать с $\alpha 3$, $\alpha 4$, $\alpha 5$, $\alpha 7$, $\beta 2$ и $\beta 4$ -субъединицами nAChR , а также с mAChR типа M1 и M3 . SLURP-2 ингибирует ток через ионный канал $\alpha 4\beta 2$ - и $\alpha 3\beta 2\text{-nAChR}$, в то время как при низких концентрациях потенцирует $\alpha 7\text{-nAChR}$ [17]. При этом SLURP-2 усиливает миграцию кератиноцитов Het-1A , взаимодействуя с $\alpha 7\text{-nAChR}$ [18], и стимулирует пролиферацию кератиноцитов, взаимодействуя с $\alpha 3\beta 2\text{-nAChR}$ и mAChR [17]. Замена аминокислотного остатка R20 на остаток аланина в «голове» молекулы SLURP-2 приводит к усилению ингибирования тока через $\alpha 7\text{-nAChR}$ и повышению ускорения миграции кератиноцитов [18].

Функциональными эпитопами белков Lu6/uPAR (называемых также «трехпетельными» белками, благодаря их характерной «трехпетельной» организации, *рис. 1А,Б*) являются петлевые участки [19]. В данной работе получены синтетические фрагменты, соответствующие петлевым участкам и участку «головы» молекулы SLURP-2 , и изучено их влияние на миграцию и жизнеспособность кератиноцитов кожи HaCaT . Показано, что пептид, соответствующий петле II, повышает жизнеспособность кератиноцитов, взаимодействуя с $\alpha 7\text{-nAChR}$, и сти-

мулирует миграцию, взаимодействуя с $\alpha 3\beta 2\text{-nAChR}$ и ингибируя активацию p38 MAPK . Результаты работы указывают на перспективность использования пептида «петля II» в качестве ранозаживляющего препарата.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Культивирование клеток

Клетки HaCaT человека (иммортилизованная линия кератиноцитов кожи человека) были получены из Американской коллекции типовых культур (ATCC, США). Клетки культивировали при 37°C и $5\% \text{CO}_2$ в среде DMEM («ПанЭко», Россия) с 2 mM L -глутамин и 25 mM глюкозы с добавлением 10% эмбриональной телячьей сыворотки (Biosera, Франция), обозначенной ниже как «полноценная» среда. Клетки культивировали при 37°C и $5\% \text{CO}_2$, пересевали минимум 2 раза в неделю.

Получение SLURP-2 и его пептидных миметиков

Рекомбинантный препарат SLURP-2 получали в клетках *E. coli* как описано ранее [20]. Пептиды, имитирующие первую, вторую, третью петли и «голову» молекулы SLURP-2 (*рис. 1В*), получены с помощью химического синтеза согласно [15]. Чистоту и корректную пространственную структуру препаратов подтверждали с помощью масс-спектрометрии, высокоэффективной жидкостной хроматографии и ^1H -ЯМР-спектроскопии.

Влияние SLURP-2 , его пептидных миметиков и ингибиторов ацетилхолиновых рецепторов на жизнеспособность клеток HaCaT

Клетки высевали в 96-луночные планшеты (5×10^3 клеток на лунку), через 24 ч к клеткам добавляли SLURP-2 или его пептидные миметики, разведенные в полноценной среде из 1 mM стокового раствора в 100% DMCO , в концентрации 100 nM . Затем клетки инкубировали при 37°C и $5\% \text{CO}_2$ в течение 24 ч. Отсутствие влияния 0.01% DMCO на жизнеспособность и миграцию клеток подтверждено в отдельном эксперименте.

Для изучения влияния ингибиторов ацетилхолиновых рецепторов на эффект SLURP-2 и петли II клетки HaCaT предварительно инкубировали с атропином (Atr (Sigma-Aldrich, США), неселективный ингибитор mAChR), α -конотоксином МII (МII (Tocris, Великобритания), селективный ингибитор $\alpha 3\beta 2\text{-nAChR}$), дигидро- β -эритроидином ($\text{Dh}\beta\text{e}$ (Sigma-Aldrich), селективный ингибитор $\alpha 4\beta 2\text{-nAChR}$), метилликаонитином (MLA (Sigma-Aldrich), селективный ингибитор $\alpha 7\text{-nAChR}$), разведенными в полноценной среде, в течение 30 мин.

Таблица 1. Олигонуклеотидные праймеры, использованные в работе

Ген	Нуклеотидная последовательность	
	Прямой праймер	Обратный праймер
<i>RPL13A</i>	ТСAAAGCCTTCGCTAGTCTCC	GGCTCTTTTTGCCCGTATGC
<i>ITGA1</i>	ATAAGTGGCCAGCCAGAGA	CAGCAGCGTAGAACAACAGTG
<i>ITGA2</i>	CGGTTATTCAGGCTCACCGA	GCTGACCCAAAATGCCCTCT
<i>ITGA3</i>	CCTGCACCCCAAAAACATCA	AGGTCTTGCCACCCATCATT
<i>ITGA5</i>	GGGCTTCAACTTAGACGCGGA	CCCCAAGGACAGAGGTAGACA
<i>ITGA6</i>	GGTGGAGAGACTGAGCATGA	GTCAAAAACAGCAGGCCTAAGTA
<i>ITGA9</i>	GACCGCGATGATGAGTGGAT	GATGAGCACAGGCCAACACA
<i>ITGAV</i>	GACTCCTGCTACCTCTGTGC	GAAGAAACATCCGGGAAGACG
<i>ITGB1</i>	CCGCGCGGAAAAGATGAAT	CCACAATTTGGCCCTGCTTG
<i>ITGB3</i>	ATTGGAGACACGGTGAGCTT	ACTCAAAGGTCCCATTGCCA
<i>SNAI1</i>	GGTTCTTCTGCGCTACTGCT	TGCTGGAAGGTAAACTCTGGAT
<i>SNAI2</i>	ACTGGACACACATACAGTGATT	ACTCACTCGCCCCAAAGATG

сигнала. Все реакции ПЦР проводили с использованием амплификатора Roche Light cycler 96 с детекцией в режиме реального времени. Данные анализировали с использованием программного обеспечения Light-Cycler 96 SW1.01. Уровень экспрессии генов нормировали по уровню экспрессии гена домашнего хозяйства *RPL13A*.

Анализ фосфорилирования белков

Фосфорилирование клеточных сигнальных белков анализировали с использованием магнитных частиц Bio-Plex (Bio-Rad, США). Клетки инкубировали в течение 24 ч с SLURP-2 или петлей II в концентрации 100 нМ, разведенными в полноценной среде из 1 мМ стокового раствора в 100% ДМСО, далее клетки лизировали с использованием буфера, предоставленного производителем. Анализ проводили с использованием проточного цитометра Bio-Rad 200 (Bio-Rad) согласно инструкциям производителя и с использованием программного обеспечения Bio-Plex Manager 6.2 (Bio-Rad).

Статистическая обработка данных

Данные представляли как среднее \pm стандартная ошибка среднего (SEM). Количество образцов (*n*) указано в подписях к рисункам. Статистический анализ проводили с использованием программного обеспечения GraphPad Prism 9.5.0. Нормальность распределения оценивали с помощью теста Шапиро–Уилка. Анализ проводили с использованием одновыборочного критерия Стьюдента (в случае сравнения с нормированным контролем, *рис. 2–5*) и однофакторного теста ANOVA с последующим тестом Даннета (в случае множественного сравнения,

рис. 3). Различия между группами считали статистически значимыми при $p < 0.05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Петли I, II, III белка SLURP-2 важны для повышения жизнеспособности кератиноцитов кожи

Петли Lu6/uPAR белков рассматриваются как функциональные эпитопы, отвечающие за активность «трехпетельных» белков [19]. Ранее мы показали, что пептид, имитирующий петлю I белка SLURP-1, воспроизводит противоопухолевую активность полноразмерного белка [15, 16]. В данной работе мы решили выяснить, какие участки молекулы SLURP-2 отвечают за активность белка, а именно за повышение жизнеспособности и стимуляцию миграции кератиноцитов, показанные ранее [17, 18, 21]. Для этого с помощью химического синтеза были получены пептиды, содержащие петлевые участки молекулы SLURP-2 и имитирующие его первую, вторую и третью петли, а также «голову» молекулы (*рис. 1*).

Исследование влияния SLURP-2 и этих пептидов на жизнеспособность кератиноцитов кожи линии HaCaT показало, что SLURP-2 повышал жизнеспособность кератиноцитов (*рис. 2A*). При этом пептид «голова» не влиял на жизнеспособность кератиноцитов, в то время как пептиды, имитирующие петли I, II и III, стимулировали жизнеспособность кератиноцитов подобно полноразмерному SLURP-2 (*рис. 2A*).

Таким образом, петли I, II и III являются важными участками молекулы белка SLURP-2, необходимыми для повышения жизнеспособности и, воз-

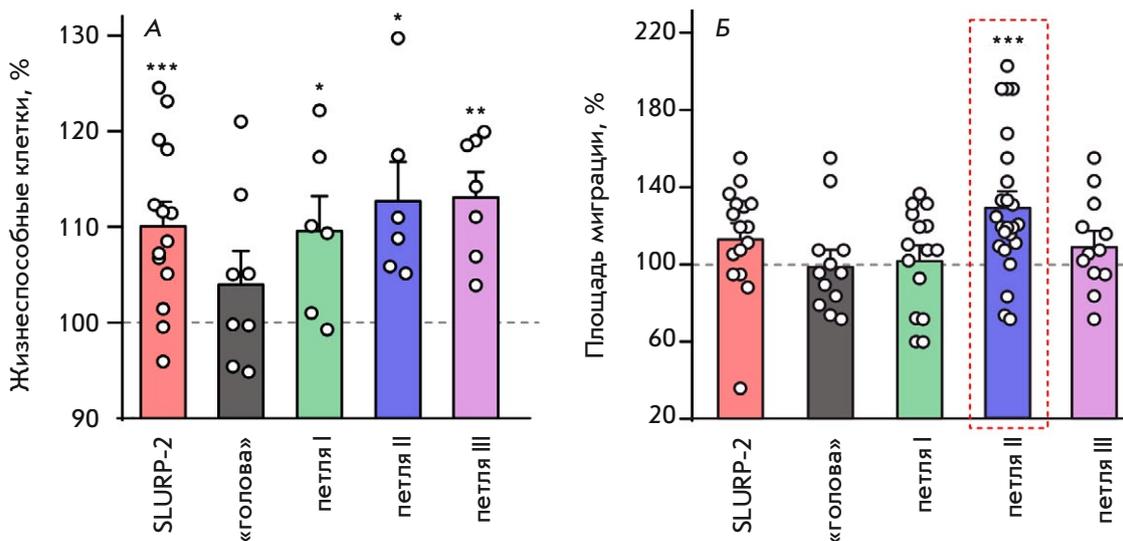


Рис. 2. Влияние SLURP-2 и пептидов на жизнеспособность кератиноцитов HaCaT. А – влияние SLURP-2 и пептидов в концентрации 100 нМ на жизнеспособность кератиноцитов HaCaT. Данные приведены в процентах от контроля ± стандартная ошибка среднего ($n = 6-14$), 100% жизнеспособных клеток соответствует необработанным клеткам. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ и *** $p < 0.001$ указывают на достоверное отличие от контроля (100%) по одновыборочному критерию Стьюдента. Б – влияние 100 нМ SLURP-2 и пептидов на миграцию кератиноцитов HaCaT. Данные приведены в процентах от контроля ± стандартная ошибка среднего ($n = 12-24$), 100% соответствует площади миграции необработанных клеток. *** $p < 0.01$ – достоверное отличие от контроля (100%) по одновыборочному критерию Стьюдента

можно, пролиферации кератиноцитов. Отсутствие какой-либо активности у пептида, соответствующего «голове» SLURP-2, указывает на то, что этот участок молекулы полноразмерного белка не участвует во взаимодействии с мишенью, отвечающей за стимуляцию жизнеспособности кератиноцитов. Возможно, неактивная «голова» компенсирует повышенную активность петли II, в то время как активность петель I и III схожа с активностью полноразмерного белка. В пользу этого предположения говорит то, что замена аминокислотного остатка R20 на остаток аланина в «голове» молекулы SLURP-2 приводит к стимуляции миграции кератиноцитов [18].

Ранее была предсказана возможность одновременного взаимодействия белка SLURP-1 с разными мишенями: $\alpha 7$ -nAChR и рецептором эпидермального фактора роста [15]. Причем взаимодействие со второй мишенью осуществлялось именно с помощью «головы» молекулы SLURP-1. Возможно, похожую ситуацию мы имеем и в случае SLURP-2, когда петля II и «голова» взаимодействуют с разными мишенями, компенсирующими свое влияние на жизнеспособность кератиноцитов. Примечательно, что, в отличие от SLURP-2, эпителиальный белок SLURP-1 не повышает, а понижает жизнеспособность кератиноцитов полости рта Het-1A, а его функциональным участком является петля I [22].

Петля II активирует миграцию кератиноцитов кожи, взаимодействуя с $\alpha 3\beta 2$ -nAChR

Ранее было показано, что SLURP-2 усиливает миграцию кератиноцитов Het-1A, взаимодействуя с $\alpha 7$ -nAChR [18]. В данной работе мы изучили влияние SLURP-2 и его пептидных миметиков на миграцию кератиноцитов кожи HaCaT. Оказалось, что SLURP-2, петли I, III и «голова» не оказывают заметного влияния на миграцию кератиноцитов HaCaT (рис. 2Б) в модели застарения «царапины». При этом петля II ускоряла миграцию кератиноцитов на ~30% (рис. 2Б). Вероятно, SLURP-2, взаимодействуя с разными подтипами ацетилхолиновых рецепторов, может как повышать, так и понижать миграцию клеток, и от экспрессии тех или иных рецепторов в конкретных клетках зависит суммарный эффект.

Известно, что SLURP-2 может взаимодействовать с $\alpha 3$, $\alpha 4$, $\alpha 5$, $\alpha 7$, $\beta 2$ и $\beta 4$ -субъединицами nAChR, а также с mAChR типа M1 и M3 [17]. Чтобы понять, взаимодействием с каким именно рецептором обусловлено стимулирующее действие петли II белка SLURP-2 на миграцию кератиноцитов, был изучен эффект петли II в присутствии ингибиторов различных подтипов ацетилхолиновых рецепторов: неселективного ингибитора mAChR – атропина (Atr), селективного ингибитора $\alpha 3\beta 2$ -nAChR – α -коноксина MII (MII), селективного ингибитора

$\alpha 2\beta 4$ -nAChR – дигидро- β -эритроидина гидробромида (Dh β e) и селективного ингибитора $\alpha 7$ -nAChR – метилликаонитина (MLA). Нами показано, что ингибирование $\alpha 3\beta 2$ -nAChR с помощью МП приводит к отмене влияния петли II на миграцию кератиноцитов HaCaT. Совместное применение атропина и Dh β e с петлей II не влияло значимо на миграцию, при этом полученные значения не отличались значимо от эффекта петли II. Полученные данные не позволяют утверждать, вовлечены ли mAChR и $\alpha 2\beta 4$ -nAChR в эффект петли II на миграцию (рис. 3А). Таким образом, петля II стимулирует миграцию кератиноцитов кожи, взаимодействуя с $\alpha 3\beta 2$ -nAChR и, возможно, с mAChR и $\alpha 2\beta 4$ -nAChR. Стоит отметить, что в ранее построенной модели взаимодействия SLURP-2 с $\alpha 3\beta 2$ -nAChR петля II была основным участком молекулы SLURP-2, взаимодействующим с этим рецептором и формирующим наибольшее число контактов в комплексе [17]. При этом не наблюдалось значи-

мого влияния ингибиторов других ацетилхолиновых рецепторов на эффект петли II.

Влияние SLURP-2 и петли II на жизнеспособность кератиноцитов кожи обусловлено взаимодействием с $\alpha 7$ -nAChR

В данной работе мы также изучили влияние ингибиторов различных подтипов ацетилхолиновых рецепторов (атропин, α -конотоксин MII, Dh β e и MLA) на эффект SLURP-2 и петли II на жизнеспособность кератиноцитов. Показано, что предынкубация клеток с MLA полностью отменяла стимулирующий эффект SLURP-2 и петли II на жизнеспособность клеток HaCaT (рис. 3Б). В то же время ни один из ингибиторов, кроме MLA, не оказывал значимого эффекта на активность SLURP-2 и петли II. При этом атропин, α -конотоксин MII, Dh β e совместно со SLURP-2 и петлей II не приводили к значимому увеличению жизнеспособности относительно контроля, поэтому вовлеченность mAChR, $\alpha 3\beta 2$ -

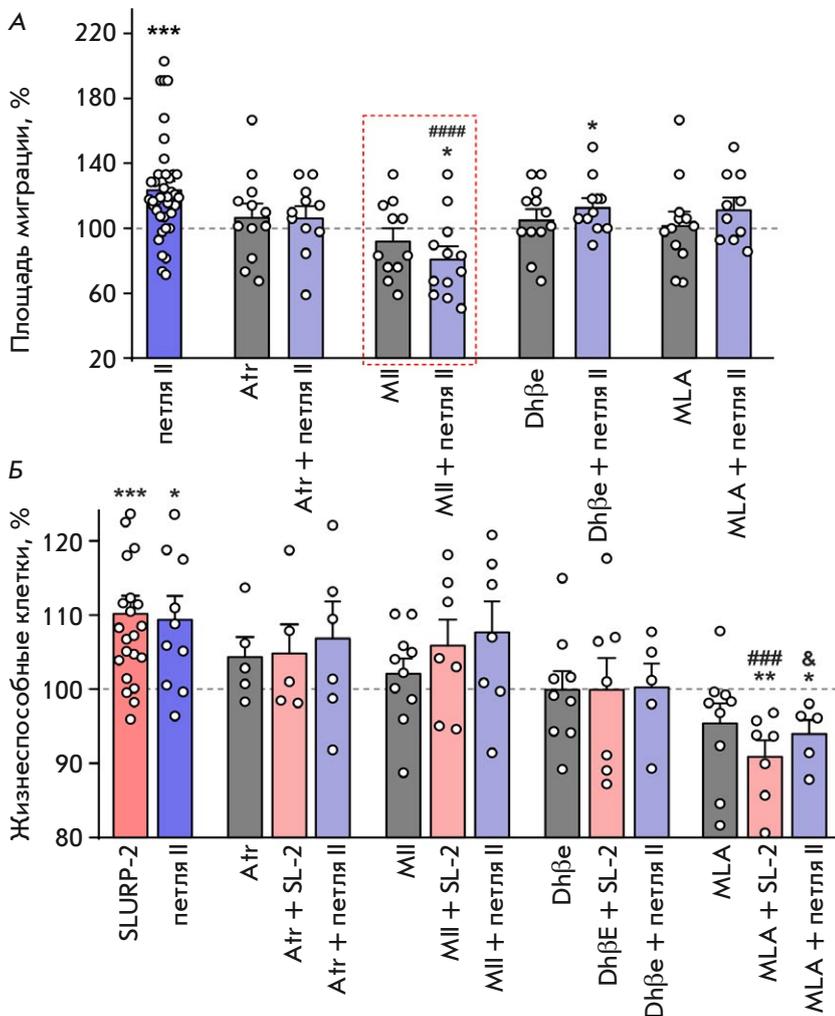


Рис. 3. Влияние SLURP-2, пептидов и ингибиторов различных ацетилхолиновых рецепторов на жизнеспособность и миграцию кератиноцитов HaCaT. А – влияние петли II (100 нМ) и ингибиторов различных ацетилхолиновых рецепторов (1 мкМ) на миграцию кератиноцитов HaCaT. Данные приведены в процентах от контроля \pm стандартная ошибка среднего ($n = 11-40$), 100% соответствует площади миграции необработанных клеток. * $p < 0.05$ и *** $p < 0.001$ – достоверное отличие от контроля (100%) по одновыборочному критерию Стьюдента. #### $p < 0.001$ указывает на отличие от группы «петля II» по однофакторному тесту ANOVA с последующим тестом Даннета. Б – влияние ингибиторов различных ацетилхолиновых рецепторов на эффект SLURP-2 и петли II на жизнеспособность. Данные приведены в процентах от контроля \pm стандартная ошибка среднего ($n = 4-14$), 100% жизнеспособных клеток соответствует необработанным клеткам. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ и *** $p < 0.001$ – достоверное отличие от контроля (100%) по одновыборочному критерию Стьюдента. ### $p < 0.001$ указывает на отличие от группы «SLURP-2» по однофакторному тесту ANOVA с последующим тестом Даннета, & $p < 0.05$ указывают на отличие от группы «петля II» по однофакторному тесту ANOVA с последующим тестом Даннета

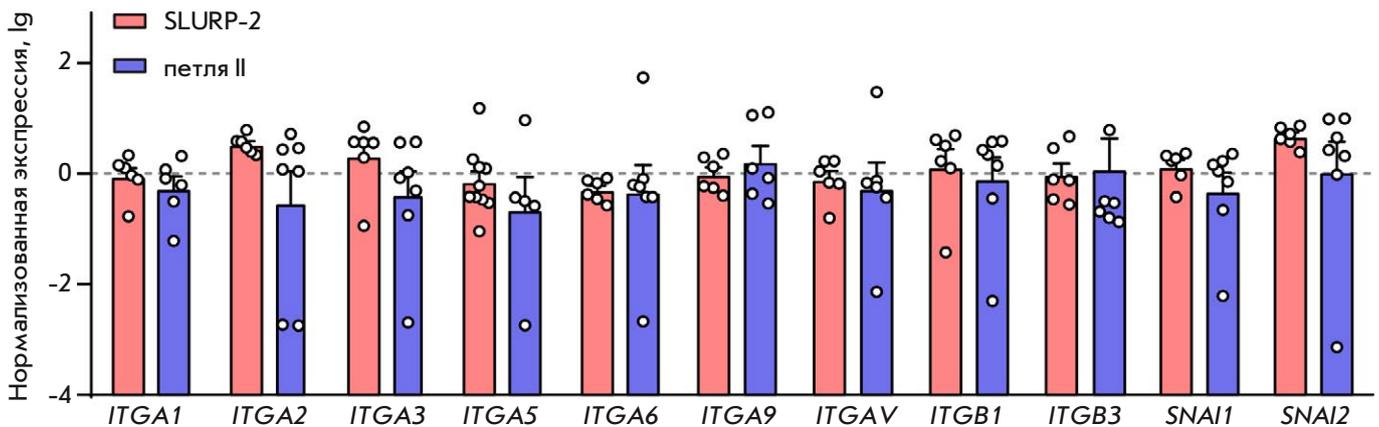


Рис. 4. Влияние SLURP-2 и петли II на экспрессию мРНК, кодирующих $\alpha 1, \alpha 2, \alpha 3, \alpha 5, \alpha 6, \alpha 9, \beta 1, \beta 3$ -интегрины и факторы транскрипции SNAI1 и SNAI2. Использовали 100 нМ концентрацию SLURP-2 и петли II. Данные нормированы на среднее значение экспрессии необработанных клеток и приведены как $\lg \pm$ стандартная ошибка среднего ($n = 5-10$). Экспрессия генов нормирована на экспрессию гена домашнего хозяйства *RPL13A*

nAChR и $\alpha 2\beta 4$ -nAChR во влияние SLURP-2 и петли II на жизнеспособность нуждается в дополнительном изучении. Таким образом, способность белка SLURP-2 и пептида «петля II», повышать жизнеспособность кератиноцитов, обусловлена взаимодействием с $\alpha 7$ -nAChR и, вероятно, с mAChR, $\alpha 3\beta 2$ -nAChR и $\alpha 2\beta 4$ -nAChR.

Однако ранее было показано, что SLURP-2 повышает жизнеспособность кератиноцитов полости рта Het-1A, взаимодействуя с $\alpha 3\beta 2$ -nAChR, но не с $\alpha 7$ -nAChR [17]. Участие различных рецепторов в регуляции активности SLURP-2 в кератиноцитах полости рта и кожи может быть связано с различным профилем экспрессии тех или иных рецепторов в различных клетках и тканях организма и лежит в рамках «полигамной» активности эпителиального белка, способного взаимодействовать с различными ацетилхолиновыми рецепторами [17].

Влияние SLURP-2 и петли II на жизнеспособность и миграцию кератиноцитов кожи не связано с изменением экспрессии интегринов и транскрипционных факторов SNAI1 и SNAI2

Известно, что интегрины регулируют процессы адгезии, миграции и пролиферации клеток эпителия, в том числе кератиноцитов кожи [23, 24]. Также в число факторов, регулирующих миграцию и дифференцировку кератиноцитов, входят факторы транскрипции SNAI1 и SNAI2 [25]. Мы предположили, что влияние SLURP-2 и петли II на жизнеспособность и миграцию может быть обусловлено влиянием на экспрессию интегринов или факторов транскрипции SNAI. Однако мы не обнаружили какого-либо значимого изменения в экспрессии генов

ITGA1, ITGA2, ITGA3, ITGA5, ITGA6, ITGA9, ITGB1, ITGB3, и SNAI1 и SNAI2 в кератиноцитах HaCaT после инкубации с SLURP-2 или петлей II в течение 24 ч относительно контроля (необработанные клетки, рис. 4). Таким образом, эффекты SLURP-2 и петли II на жизнеспособность и миграцию кератиноцитов HaCaT не связаны с изменением экспрессии генов, кодирующих интегрины и факторы транскрипции SNAI1 и SNAI2.

Эффекты SLURP-2 и петли II в кератиноцитах кожи обусловлены подавлением активности сигнальных путей p38 MAPK и mTOR

Ранее было показано, что белок SLURP-1 ингибирует в опухолевых клетках активность внутриклеточных сигнальных каскадов, связанных с АКТ, фосфатазой PTEN и протеинкиназой mTOR [15]. Мы предположили, что эффекты SLURP-2 и петли II также могут быть связаны с регуляцией внутриклеточных сигнальных каскадов, связанных с пролиферацией и миграцией. Кроме того, мы исследовали влияние SLURP-2 и петли II на активность транскрипционных факторов STAT3 и NF- κ B, участвующих в контроле генной экспрессии в эпителиальных клетках и связанных с активацией $\alpha 7$ -nAChR [26–29]. С помощью анализа на магнитных частицах Bioplex мы показали, что и SLURP-2, и пептид петля II подавляют фосфорилирование и, следовательно, активацию киназы p38 MAPK в кератиноцитах HaCaT после 24-часовой инкубации (рис. 5). Кроме того, SLURP-2, но не петля II, снижал фосфорилирование киназы mTOR в кератиноцитах HaCaT (рис. 5).

Известно, что активация p38 MAPK может приводить к апоптозу кератиноцитов и, как следствие, к снижению числа жизнеспособных клеток [30, 31].

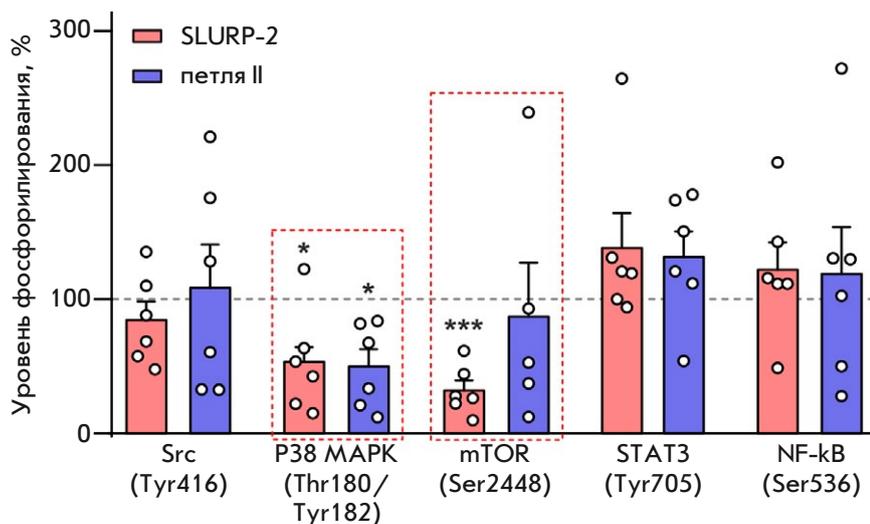


Рис. 5. Влияние SLURP-2 и петли II на фосфорилирование сигнальных белков: Src (Tyr416), p38 MAPK (Thr180/Tyr182), mTOR (Ser2448), STAT3 (Tyr705) и NF-kB (Ser536). Использовали 100 нМ концентрации SLURP-2 и петли II. Данные приведены в процентах от контроля ± стандартная ошибка среднего ($n = 5-6$), 100% соответствует уровню фосфорилирования белков в необработанных клетках. * $p < 0.05$ и *** $p < 0.001$ – достоверное отличие от контроля (100%) по одновыборочному критерию Стьюдента

В то же время активация $\alpha 7$ -nAChR ингибирует фосфорилирование и активацию p38 MAPK [32]. Ранее было показано, что SLURP-2 в концентрации 100 нМ потенцирует $\alpha 7$ -nAChR в присутствии ацетилхолина [17]. Таким образом, мы можем предположить, что в кератиноцитах HaCaT в присутствии 100 нМ SLURP-2 происходит потенцирование $\alpha 7$ -nAChR, что в свою очередь приводит к подавлению сигнального пути p38 MAPK и увеличению числа жизнеспособных клеток. С этим предположением согласуется предложенная ранее модель взаимодействия SLURP-2 с $\alpha 7$ -nAChR, в которой петля II молекулы SLURP-2 взаимодействует именно с открытым (активным) состоянием $\alpha 7$ -nAChR [17]. Это также указывает на связь активации этого рецептора с подавлением сигнального пути p38 MAPK с препятствием апоптозу кератиноцитов HaCaT и увеличением числа жизнеспособных клеток в присутствии петли II.

Стоит заметить, что ингибирование фосфорилирования mTOR может приводить к подавлению миграции кератиноцитов [33]. Однако мы не обнаружили какого-либо значимого эффекта SLURP-2 на миграцию (рис. 2Б). При этом петля II стимулирует миграцию, взаимодействуя с $\alpha 3\beta 2$ -nAChR (рис. 3), и не ингибирует сигнальный внутриклеточный каскад, ассоциированный с mTOR (рис. 5). Возможно, в ингибировании фосфорилирования mTOR участвуют другие участки молекулы SLURP-2 (не петля II), при этом вносящие отрицательный вклад в стимуляцию миграции полноразмерным белком.

Ранее было показано, что инкубация кератиноцитов полости рта Het-1A в присутствии SLURP-1 приводила к активации транскрипционного фактора NF-kB [34]. При этом известно, что SLURP-1 является негативным модулятором $\alpha 7$ -nAChR [35].

Таким образом, отсутствие потенцирующего эффекта на фосфорилирование NF-kB в присутствии как SLURP-2, так и петли II поддерживает наше предположение, что обе эти молекулы потенцируют $\alpha 7$ -nAChR в исследуемой концентрации в кератиноцитах HaCaT, и находится в согласии с подавлением сигнального пути p38 MAPK (рис. 5).

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В данной работе получены синтетические пептиды, соответствующие петлевым фрагментам белка SLURP-2: пептиды «голова», петля I, петля II и петля III, изучено их влияние на жизнеспособность и миграцию кератиноцитов кожи. Пептид «голова» не влиял ни на жизнеспособность, ни на миграцию кератиноцитов. Пептиды петля I и петля III повышали жизнеспособность и не влияли на миграцию кератиноцитов. Наиболее активным оказался пептид, соответствующий петле II. Он стимулировал как жизнеспособность кератиноцитов, взаимодействуя с $\alpha 7$ -nAChR, так и их миграцию, взаимодействуя с $\alpha 3\beta 2$ -nAChR. При этом сам белок SLURP-2 повышал только жизнеспособность кератиноцитов и не влиял на их миграцию. Различия во влиянии SLURP-2 и петли II на жизнеспособность и миграцию кератиноцитов HaCaT, вероятно, связаны с возможностью полноразмерного белка взаимодействовать одновременно с несколькими мишенями и ингибированием фосфорилирования mTOR, что не наблюдается в случае петли II. Таким образом, получены новые знания о регуляции гомеостаза эпителиальных клеток эпителиальным белком SLURP-2 человека. Полученные данные указывают на перспективность дальнейших исследований свойств петли II и рассмотрения ее в качестве прототипа для разработки новых ранозаживляющих препаратов.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда (проект № 23-24-00636).

Авторы благодарят Ирину Чулину за помощь с химическим синтезом исследованных пептидов.

М.П. Кирпичников и Е.Н. Люкманова входят в состав инновационной группы по разработке лекарственных препаратов на основе структурной биологии и биоинформатики в Шэньчжэньском университете МГУ-ППИ (#2022KCXTD034).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Loughner C.L., Bruford E.A., McAndrews M.S., Delp E.E., Swamynathan S., Swamynathan S.K. // Hum. Genomics. 2016. V. 10. P. 10.
2. Shenkarev Z.O., Shulepko M.A., Bychkov M.L., Kulbatskii D.S., Shlepova O.V., Vasilyeva N.A., Andreev-Andrievskiy A.A., Popova A.S., Lagereva E.A., Loktyushov E.V., et al. // J. Neurochem. 2020. V. 155. № 1. P. 45–61.
3. Kulbatskii D., Shenkarev Z., Bychkov M., Loktyushov E., Shulepko M., Koshelev S., Povarov I., Popov A., Peigneur S., Chugunov A., et al. // Front. Cell. Dev. Biol. 2021. V. 9. P. 662227.
4. Kulbatskii D.S., Bychkov M.L., Lyukmanova E.N. // Rus. J. Bioorg. Chem. 2018. V. 44. № 6. P. 595–607.
5. Shulepko M., Bychkov M., Kulbatskii D., Lyukmanova E. // Rus. J. Bioorg. Chem. 2019. V. 45. № 2. P. 66–74.
6. Papke R.L., Lindstrom J.M. // Neuropharmacology. 2020. V. 168. P. 108021.
7. Hone A.J., McIntosh J.M. // Pharmacol. Res. 2023. V. 190. P. 106715.
8. Arredondo J., Chernyavsky A.I., Grando S.A. // Life Sci. 2007. V. 80. № 24–25. P. 2243–2247.
9. Arredondo J., Chernyavsky A.I., Webber R.J., Grando S.A. // J. Invest. Dermatol. 2005. V. 125. № 6. P. 1236–1241.
10. Arredondo J., Chernyavsky A.I., Jolkovsky D.L., Webber R.J., Grando S.A. // J. Cell. Physiol. 2006. V. 208. № 1. P. 238–245.
11. Arredondo J., Chernyavsky A.I., Grando S.A. // Biochem. Pharmacol. 2007. V. 74. № 8. P. 1315–1319.
12. Lyukmanova E., Bychkov M., Sharonov G., Efremenko A., Shulepko M., Kulbatskii D., Shenkarev Z., Feofanov A., Dolgikh D., Kirpichnikov M. // Br. J. Pharmacol. 2018. V. 175. № 11. P. 1973–1986.
13. Shulepko M.A., Bychkov M.L., Shlepova O.V., Shenkarev Z.O., Kirpichnikov M.P., Lyukmanova E.N. // Internat. Immunopharmacol. 2020. V. 82. P. 106303.
14. Shulepko M.A., Bychkov M.L., Lyukmanova E.N., Kirpichnikov M.P. // Dokl. Biochem. Biophys. 2020. V. 493. № 1. P. 211–214.
15. Bychkov M.L., Shulepko M.A., Shlepova O.V., Kulbatskii D.S., Chulina I.A., Paramonov A.S., Baidakova L.K., Azev V.N., Koshelev S.G., Kirpichnikov M.P., et al. // Front. Cell. Dev. Biol. 2021. V. 9. P. 739391.
16. Shlepova O.V., Shulepko M.A., Shipunova V.O., Bychkov M.L., Kukushkin I.D., Chulina I.A., Azev V.N., Shramova E.I., Kazakov V.A., Ismailova A.M., et al. // Front. Cell. Dev. Biol. 2023. V. 11. P. 1256716. doi: 10.3389/fcell.2023.1256716.
17. Lyukmanova E., Shulepko M.A., Shenkarev Z., Bychkov M., Paramonov A.S., Chugunov A., Kulbatskii D., Arvaniti M., Dolejsi E., Schaer T., et al. // Sci. Rep. 2016. V. 6. P. 30698. doi: 10.1038/srep30699.
18. Bychkov M.L., Shlepova O.V., Shulepko M.A., Kulbatskii D.S., Bertrand D., Kirichenko A.V., Shenkarev Z.O., Kirpichnikov M.P., Lyukmanova E.N. // Rus. J. Bioorg. Chem. 2024. V. 50. № 3. P. 696–705.
19. Vasilyeva N.A., Loktyushov E.V., Bychkov M.L., Shenkarev Z.O., Lyukmanova E.N. // Biochemistry (Moscow). 2017. V. 82. № 13. P. 1702–1715.
20. Lyukmanova E.N., Shulepko M.A., Bychkov M.L., Shenkarev Z.O., Paramonov A.S., Chugunov A.O., Arseniev A.S., Dolgikh D.A., Kirpichnikov M.P. // Acta Naturae. 2014. V. 6. № 4. P. 60–66.
21. Chernyavsky A.I., Kalantari-Dehaghi M., Phillips C., Marchenko S., Grando S.A. // Wound Repair Regen. 2012. V. 20. № 1. P. 103–113.
22. Shulepko M.A., Bychkov M.L., Shenkarev Z.O., Kulbatskii D.S., Makhonin A.M., Paramonov A.S., Chugunov A.O., Kirpichnikov M.P., Lyukmanova E.N. // J. Invest. Dermatol. 2021. V. 141. № 9. P. 2229–2237.
23. Watt F.M. // EMBO J. 2002. V. 21. № 15. P. 3919–3926.
24. Longmate W.M., DiPersio C.M. // Adv. Wound Care (New Rochelle). 2014. V. 3. № 3. P. 229–246.
25. Sou P.W., Delic N.C., Halliday G.M., Lyons J.G. // Internat. J. Biochem. Cell Biol. 2010. V. 42. № 12. P. 1940–1944.
26. Chen Y., Lian P., Peng Z., Wazir J., Ma C., Wei L., Li L., Liu J., Zhao C., Pu W., et al. // Cell Death Discov. 2022. V. 8. № 1. P. 141.
27. Kwok H.-H., Gao B., Chan K.-H., Ip M.S.-M., Minna J.D., Lam D.C.-L. // Cancers (Basel). 2021. V. 13. № 21. P. 5345.
28. Arredondo J., Chernyavsky A.I., Jolkovsky D.L., Pinkerton K.E., Grando S.A. // Life Sci. 2007. V. 80. № 24–25. P. 2191–2194.
29. Stegemann A., Böhm M. // Exp. Dermatol. 2019. V. 28. № 3. P. 276–282.
30. Fukada S., Ohta K., Sakuma M., Akagi M., Kato H., Naruse T., Nakagawa T., Shigeishi H., Nishi H., Takechi M., et al. // Oral Dis. 2024. V. 30. № 2. P. 639–649.
31. Nys K., van Laethem A., Michiels C., Rubio N., Piette J.G., Garmyn M., Agostinis P. // J. Invest. Dermatol. 2010. V. 130. № 9. P. 2269–2276.
32. Uwada J., Nakazawa H., Mikami D., Islam M.S., Muramatsu I., Taniguchi T., Yazawa T. // Biochem. Pharmacol. 2020. V. 182. P. 114297.
33. Wu X., Sun Q., He S., Wu Y., Du S., Gong L., Yu J., Guo H. // BMC Anesthesiol. 2022. V. 22. № 1. P. 106.
34. Chernyavsky A.I., Arredondo J., Galitovskiy V., Qian J., Grando S.A. // Am. J. Physiol. Cell Physiol. 2010. V. 299. № 5. P. C903–C911.
35. Lyukmanova E.N., Shulepko M.A., Kudryavtsev D., Bychkov M.L., Kulbatskii D.S., Kasheverov I.E., Astapova M.V., Feofanov A.V., Thomsen M.S., Mikkelsen J.D., et al. // PLoS One. 2016. V. 11. № 2. P. e0149733.

УДК 574.1

Антибактериальная активность дрожжей из уникальных биоценозов

О. В. Шуленина¹, Е. А. Суханова¹, Б. Ф. Яровой¹, Е. А. Толстыко¹, А. Л. Коневега^{1,2,3*},
Е. В. Полесскова^{1,2**}

¹Петербургский институт ядерной физики им. Б.П. Константинова Национального исследовательского центра «Курчатовский институт», Гатчина, 188300, Россия

²Санкт-Петербургский политехнический университет Петра Великого, Санкт-Петербург, 195251, Россия

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

*E-mail: Konevega_AL@pnpi.nrcki.ru

**E-mail: Polesskova_EV@pnpi.nrcki.ru

Поступила в редакцию 30.09.2024

Принята к печати 24.10.2024

DOI: 10.32607/actanaturae.27527

РЕФЕРАТ Пополнение банка веществ, обладающих терапевтическим потенциалом, является важной задачей современной биомедицины. Несмотря на достижения в области химического синтеза, природное многообразие организмов и микроорганизмов остается важным источником биологически активных соединений. Представлены результаты изучения уникальной коллекции, содержащей более 3000 образцов дрожжей, обнаруженных на полуострове Камчатка, Курильских островах и острове Сахалин. Поскольку дрожжи и бактерии сосуществуют в различных местах обитания и могут взаимодействовать между собой, мы проанализировали антибактериальную активность коллекционных штаммов дрожжей в отношении клеток *E. coli* с использованием флуоресцентного бактериального репортера. Обнаружено, что Сахалинские штаммы преимущественно стимулируют рост бактерий, в то время как большинство штаммов, обнаруженных на полуострове Камчатка, демонстрируют ингибирующие свойства. При этом образцы с наиболее выраженной антибактериальной активностью, идентифицированные как представители *Cryptococcus (Naganishia)*, были обнаружены в ущелье в окрестностях п. Паужетка на полуострове Камчатка на полыни (*Artemisia vulgaris*) и татарнике (*Onopordum acanthium*). Наши данные указывают на важность совокупности растения и места его произрастания для возникновения дрожжевых штаммов, секретирующих антибактериальные соединения.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА антибиотики, биоразнообразие, дрожжи, коллекция, флуоресцентная репортерная система.

ВВЕДЕНИЕ

Отсутствие строгого контроля за использованием антимикробных препаратов в медицине и животноводстве приводит к возникновению и распространению патогенных бактерий, устойчивых к антибиотикам [1], что делает необходимым создание новых лекарственных средств. Флора и фауна являются важным источником биологически активных соединений, прошедших проверку временем [2, 3]. Некоторые виды дрожжей хорошо изучены, поскольку они широко используются в пищевой промышленности или служат модельными организмами в научных исследованиях [4]. Известны дрожжевые метаболиты, которые снижают уровень холестерина в крови, действуют как иммуномодуляторы или проявляют противогрибковую активность [5]. Представители родов *Candida*, *Pichia*

и *Saccharomyces* также демонстрируют антибактериальную активность [5–8]. При этом дрожжи невероятно разнообразны в биологическом и химическом отношении, а популяции дрожжей, обитающие в труднодоступных регионах, недостаточно изучены и могут обладать уникальными свойствами [3].

В данной работе изучали коллекцию дрожжей, собранных на Дальнем Востоке России. Уникальность коллекции обусловлена территорией сбора образцов: Камчатка и Курильские острова входят в Тихоокеанское огненное кольцо, которое характеризуется повышенной вулканической и сейсмической активностью. Население этих территорий невелико, а туризм развит слабо, поэтому природа мало подвержена прямому влиянию цивилизации. Практически изолированный от материка полуостров Камчатка имеет самую высокую кон-

центрацию вулканов на Земле – более 300, из которых 30 действующие. На Камчатке и Курильских островах находятся густые сети горных рек, богатых пресной водой, озера с высокой минерализацией воды, в вулканических районах, подогреваемой вулканическими газами, и слабосоленые озера-лагуны. На склонах и в кратерах потухших вулканов активны гидротермальные, газовые и грязевые выбросы различной температуры и кислотности, содержащие высокие концентрации неорганических соединений. Сахалин расположен в тех же широтах, что и Камчатка, и Курильские острова, однако его обитатели не подвержены влиянию экстремальных факторов среды. Кроме того, Сахалинские образцы дрожжей, в отличие от других образцов коллекции, собраны ближе к районам деятельности человека.

Задачей данного исследования стало выявление и изучение образцов коллекции дрожжей, содержащих антимикробные соединения в своих культуральных жидкостях. Мы использовали репортерную систему, которая позволяет не только обнаруживать антимикробную активность, но и сортировать потенциальные антибактериальные соединения по механизму их действия. Такую систему с двойным флуоресцентным репортером, идентифицирующую вещества, вызывающие остановку рибосом или индуцирующие реакцию SOS-ответа из-за повреждения ДНК, успешно использовали для скрининга библиотеки синтезированных органических соединений [9] и экстрактов актиномицетов [10–13]. Данная тест-система разработана преимущественно для применения на твердых средах, что сводит к минимуму необходимость пипетирования, количество реагентов и расходных материалов. Однако анализ флуоресцентных репортерных белков на агаре не позволяет количественно оценить антибактериальное действие, обусловленное механизмами, отличными от остановки рибосом и повреждения ДНК. Примечательно, что чувствительность репортера, определенная с использованием нескольких антибиотиков, на агаре и в жидкой среде различалась на два порядка в пользу жидкой среды [9].

Таким образом, для обнаружения в культуральных жидкостях дрожжей даже небольших количеств биологически активных соединений, которые могли бы повлиять на жизнеспособность бактерий, мы адаптировали репортерную систему для анализа в жидкой среде. С целью еще большего повышения чувствительности системы мы использовали штамм *E. coli* JW5503, в котором отсутствует ген *tolC*, кодирующий важный компонент нескольких бактериальных эффлюкс-систем [14]. Данный вариант репортерной системы был протестирован с использованием 15 антибиотиков с известным механизмом действия.

Проведен анализ антибактериальной активности 810 образцов дрожжей, из которых 251 относился к коллекции, собранной на Сахалине, и 559 – на Камчатке. Сахалинские штаммы преимущественно стимулировали рост бактерий, в то время как большинство штаммов Камчатки проявляли ингибирующие свойства. Наши данные указывают на важность сочетания вида растения и места его произрастания для возникновения дрожжевых штаммов, секретирующих антибактериальные соединения.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Коллекция дрожжей и дрожжеподобных грибов

Коллекция дрожжей, насчитывающая более 3000 образцов, собрана в четырех экспедициях под руководством В.П. Степановой и Б.Ф. Ярового в экстремальные регионы России: на полуостров Камчатка и Курильские острова в августе–сентябре 1988, 1989, 1994 гг. и на о. Сахалин в августе–сентябре 2004 г. [15]. Микроорганизмы выделяли с живых растений, опавших частей растений, почвы и насекомых. Сбор субстратов производили на склонах вулканов, рядом с гидротермальными выбросами и внутри активных зон, в долинах рек и ручьев.

Чистые культуры дрожжей получали в лабораторных условиях. Штаммы дрожжей длительно хранили при -80°C в среде YPD (Sigma-Aldrich, США) с добавлением 25% глицерина [16].

На начальном этапе формирования коллекции с применением морфологического и биохимического подходов идентифицировали видовую принадлежность 98 образцов, выбранных случайным образом [17, 18]. Среди отобранных штаммов были представители 20 известных видов: *Candida haemulorni*, *Candida sake*, *Candida sorbosivorans*, *Cryptococcus albidus*, *Cryptococcus hungaricus*, *Cryptococcus laurentii*, *Debaryomyces hansenei*, *Metschnikowia reukaufii*, *Pichia farinosa*, *Rhodotorulla aurantiaca*, *Rhodotorula glutinis*, *Rhodotorula minuta*, *Rhodotorula mucilaginosa*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Sporobolomyces roseus*, *Sporidiobolus salmonicolor*, *Torulasporea delbrueckii*, *Tremella foliacea* и по одному представителю родов *Bullera* и *Trichosporon*. В данном списке представлены все три класса грибов: 1) аскомицеты – 6 видов; 2) базидиомицеты – 2 вида; 3) несовершенные грибы – 12 видов. Выявленное разнообразие видов в основном соответствует данным, полученным при изучении видового состава дрожжей, обитающих в северных широтах Западной Сибири и Аляски [19].

Ранее у группы штаммов коллекции была обнаружена способность поглощать радионуклиды и ионы тяжелых металлов [15, 20].

Получение культуральных жидкостей дрожжей

Дрожжевые клетки выращивали на чашках с агаризованной средой YPD в течение 3 суток при комнатной температуре. Отсутствие примесей контролировали по морфологии культур. Клетки помещали в жидкую среду YPD и инкубировали в течение 3 суток при комнатной температуре на шейкере-ротаторе. Культуральные жидкости отделяли от клеток центрифугированием (4000 *g*, 15 мин, 4°C) на центрифуге Union 5KR centrifuge (Hanil Science Industrial) и концентрировали в 15–20 раз на вакуумном центрифужном концентраторе Concentrator Plus (Eppendorf AG) при комнатной температуре в течение 8–9 ч. Образцы хранили при -20°C.

Двойная флуоресцентная репортерная система для идентификации веществ, вызывающих остановку рибосом или индуцирующих реакцию SOS-ответа

Репортерная плаزمида pDualrep2 несет ген *rfp* под контролем SOS-индуцибельного промотора *sulA* и ген, кодирующий белок Katushka2S, под контролем модифицированного триптофанового аттенуатора (триптофановые кодоны в нем заменены на аланиновые), управляемого промотором T5 [9, 21]. Модификация триптофанового аттенуатора приводит к нарушению движения рибосом из-за специфических ингибиторов трансляции, а не из-за голодания по триптофану.

Штамм *E. coli* JW5503 (лишенный гена *tolC*, кодирующего критический компонент эффлюксной системы), трансформированный репортерной плазмидой pDualrep2 (AmpR), синтезирует RFP в присутствии агентов, повреждающих ДНК (вызывающих SOS-ответ), и Katushka2S в присутствии веществ, тормозящих трансляцию [9]. Флуоресцентный сигнал RFP детектируется на 574 нм, при возбуждении на 553 нм; флуоресцентный сигнал Katushka2S – при 633 и 588 нм соответственно.

Анализ антибактериальной активности с применением репортерной системы

Клеточную культуру репортерного штамма выращивали до OD₆₀₀ = 0.5–1 при 37°C в среде LB с добавлением ампициллина в концентрации 100 мкг/мл и хранили при 4°C в течение ночи. На следующий день культуру разбавляли свежей средой LB до OD₆₀₀ = 0.1. В лунки 96-луночного культурального планшета вносили по 200 мкл клеточной культуры. Образец добавляли к суспензии бактерий в лунках. Культуральный планшет инкубировали в шейкере-термостате при 37°C. Флуоресценцию репортерных белков RFP (553/574 нм) и Katushka2S (588/633 нм) и OD₆₀₀ в лунках культурального планшета опре-

деляли на планшетном ридере Enspire2300 (Perkin Elmer). Полученные данные анализировали с помощью GraphPad Prism 6.0.

Для валидации репортерной системы в лунки с суспензией бактерий добавляли 2 мкл известных антибиотиков в сублетальных концентрациях. Были выбраны ингибиторы трансляции с различным механизмом действия, такие как гентамицин, хлорамфеникол, фузидиевая кислота, неомицин, гигромицин Б, канамицин, пурамицин, тетрациклин, эритромицин и стрептомицин. Панель препаратов, вызывающих SOS-ответ, состояла из налидиксовой кислоты, левофлоксацина, цiproфлоксацина и рифампицина.

К суспензии бактерий в лунках планшета добавляли по 5 мкл концентрированной культуральной жидкости. При таком способе дозирования концентрация образца в лунке планшета была в 2–2.5 раза ниже исходной неконцентрированной. Образцы с наибольшими ингибирующими свойствами тестировали в трех повторах.

Обработка данных

Мы вычисляли S/S_0 , где S – величина репортерного флуоресцентного сигнала или OD₆₀₀ репортерной бактериальной культуры в присутствии тестового образца, S_0 – величина репортерного флуоресцентного сигнала или OD₆₀₀ репортерной бактериальной культуры в отсутствие добавок.

Для расчета интервала фоновых значений использовали значения S/S_0 в контроле. Нормальность распределения была подтверждена с уровнем достоверности 99% с использованием теста D'Agostino-Pearson omnibus в GraphPad Prism 6.0. Фоновый интервал определяли как [mean–3σ; mean+3σ]. Интервалы фоновых значений: репортерный сигнал SOS-ответа спустя 5 ч [0.87; 1.13], репортерный сигнал SOS-ответа спустя 24 ч [0.82; 1.18], репортерный сигнал ингибирования трансляции спустя 5 ч [0.93; 1.07], репортерный сигнал ингибирования трансляции спустя 24 ч [0.85; 1.15], OD₆₀₀ спустя 5 ч [0.95; 1.05], OD₆₀₀ спустя 24 ч [0.97; 1.03].

Таксономическая идентификация

Для таксономической идентификации дрожжевых штаммов клеточные стенки разрушали зимолизой (Zymo Research) в растворе 1 М сорбитола и 0.1 М EDTA (pH 8.0). Геномная ДНК была получена с использованием DNeasy Blood & Tissue Kit (Qiagen) и визуализирована с помощью электрофореза в 1% агарозном геле. Последовательности внутреннего транскрибируемого региона ITS1-5.8S-ITS2 и домены D1/D2 26S рДНК (большой рибосомной субъединицы) [22] были амплифицирова-

ны с использованием праймеров, перечисленных в табл. 1. ПЦР-продукты очищали с использованием NucleoSpin Gel и PCR clean-up kit (Macherey-Nagel) и секвенировали с использованием тех же праймеров. Результаты секвенирования обрабатывали с помощью The Basic Local Alignment Search Tool (BLAST) (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>).

РЕЗУЛЬТАТЫ

Валидация репортерной системы с помощью набора известных антибиотиков

Для проверки специфичности анализа антибактериальной активности в жидкой среде с помощью репортерной системы мы выбрали ряд ингибиторов с различными механизмами действия. Такой выбор позволял гарантировать, что все антибиотики подавляют рост бактерий, тогда как синтез репортерных белков происходит избирательно в результате остановки рибосомы (экспрессия флуоресцентного репортерного белка *Katushka2S*) или повреждения ДНК (экспрессия RFP). Для визуализации профиля экспрессии репортеров использовали 5–6 сублетальных концентраций антибиотиков.

Подавляющее большинство ингибиторов, мишенью которых является рибосома, блокируют определенные реакции трансляции, вызывая остановку рибосомы. Например, хлорамфеникол (фениколы) и эритромицин (макролиды) связываются на входе канала выхода пептида и препятствуют образованию пептидной связи в зависимости от длины и последовательности растущей аминокислотной цепи [23, 24]. Оба антибиотика значительно активируют экспрессию *Katushka2S* (рис. 1). Сравнимая индукция *Katushka2S* наблюдалась при добавлении ингибиторов транслокации: гигромицина В (аминогликозиды), который блокирует движение тРНК в ходе элонгации [25], и фузидиевой кислоты (фузидины), которая ингибирует диссоциацию EF-G от рибосомы [26]. Тетрациклин (поликетины), связывающийся на малой субъединице рибосомы и влияющий на доставку тРНК на рибосому [27], и пурамицин, встраивающийся в растущую полипептидную цепь, вызывая ее преждевременную терминацию [28], привели к увеличению уровня флуоресценции репортерного белка выше базового уровня после 24 ч инкубации.

Аминогликозидные антибиотики нарушают процесс трансляции в основном за счет снижения селективности рибосомы, что приводит к включению неправильных аминокислот в растущую пептидную цепь, а не к остановкам рибосомы [29]. Неомицин индуцировал флуоресценцию репортерного белка через 5 ч инкубации с последующим исчезновением сигнала через 24 ч, тогда как другие представите-

Таблица 1. Праймеры, используемые для таксономической идентификации

Регион	Праймер [22]
ITS1-5.8S-ITS2	ITS1 (прямой) 5'-TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3' ITS4 (обратный) 5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3'
26S рДНК (часть 1)*	LROR (прямой) 5'-ACCCGCTGAACCTTAAGC-3' LR3 (обратный) 5'-CCGTGTTTCAAGACGGG-3'
26S рДНК (часть 2)*	LR3R (прямой) 5'-GTCTTGAACACGGACC-3' LR7 (обратный) 5'-ТАСТАССАССААГАТСТ-3'

*ПЦР-продукт 26S рДНК, полученный с помощью праймеров LROR и LR7, состоит более чем из 1000 п.н. Для удобства работы этот ПЦР-продукт получен с использованием 4 праймеров.

ли группы (гентамицин, канамицин и стрептомицин) вообще не стимулировали синтез *Katushka2S*.

Добавление хинолонов (налиндиксовая кислота, левофлоксацин, ципрофлоксацин), блокирующих репликацию ДНК [30], и ансамицина (рифампицин), останавливающего синтез РНК в клетке [31], приводит к снижению уровня флуоресценции *Katushka2S* ниже фонового уровня практически при всех протестированных концентрациях. В то же время экспрессия RFP существенно усиливалась в течение всего времени эксперимента с диапазоном увеличения сигнала до 15 раз по сравнению с необработанными клетками после 5 ч инкубации. Примечательно, что некоторые ингибиторы трансляции также стимулировали появление сигнала RFP, однако ни один из них не обеспечивал превышение соотношения $S/S_0 = 2$ в течение 24 ч инкубации.

Таким образом, 5 ч инкубации абсолютно достаточно, чтобы сделать вывод о том, активирует ли исследуемое вещество SOS-ответ, тогда как выявление соединений, приводящих к остановкам рибосом, может потребовать продления инкубации до 24 ч.

Анализ антибактериальной активности культуральных жидкостей дрожжей

Мы проанализировали антибактериальную активность всей Сахалинской коллекции, содержащей 251 штамм (рис. 2). Скорость роста бактерий снижали 11 образцов культуральных жидкостей, однако ни один из них не активировал экспрессию репортерных белков. В то же время 233 образца стимулировали рост клеток, вероятно, из-за присутствия некоторых питательных компонентов. Примечательно, что среди стимуляторов мы обнаружили 74 образца, вызы-

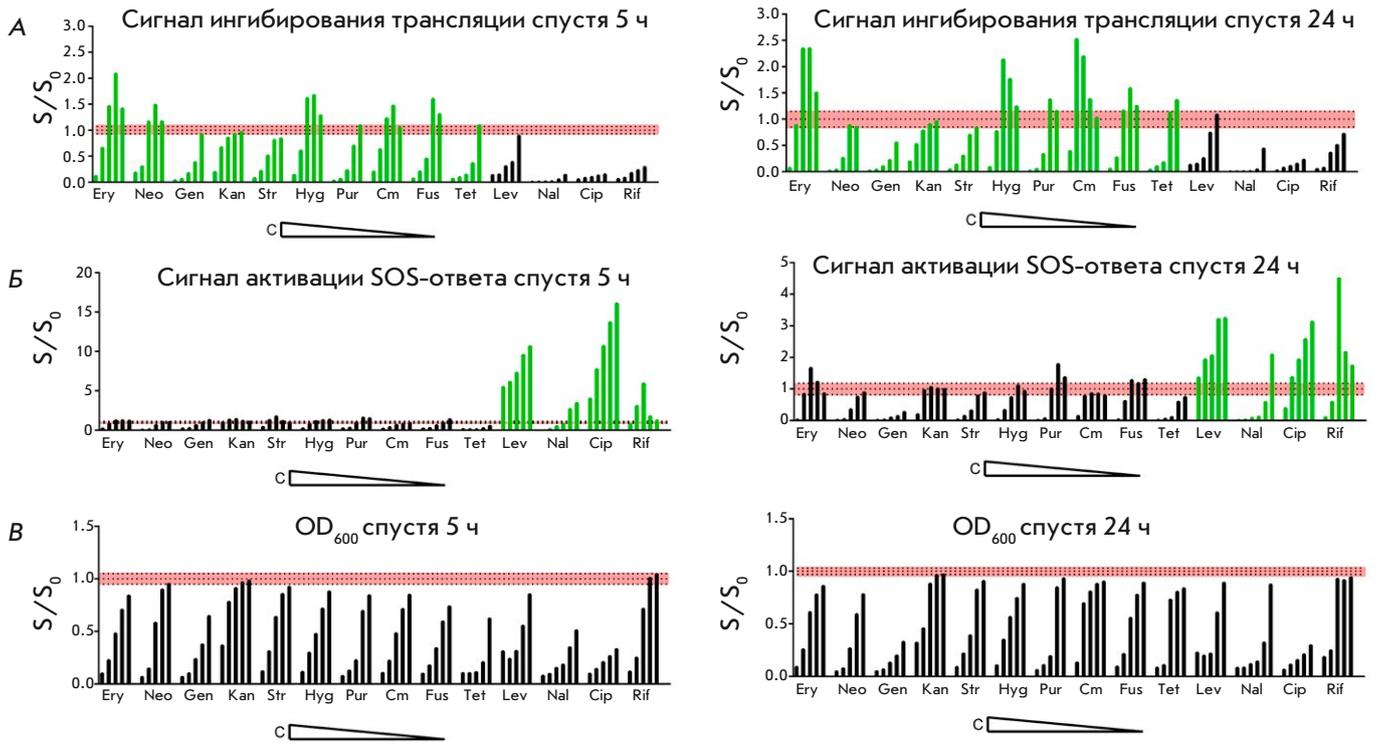


Рис. 1. Валидация репортерной системы с помощью набора известных антибиотиков. По вертикальной оси отложены значения отношения S/S_0 , где S – значение флуоресцентного репортерного сигнала или OD_{600} в присутствии образца, S_0 – без образца. На горизонтальной оси указаны антибиотики; концентрации (C) каждого антибиотика расположены в порядке убывания. Эритромицин (Ery) 10, 5, 2.5, 1.25, 0.6 мкг/мл; неомицин (Neo) 20, 10, 5, 2.5, 1.25 мкг/мл; гентамицин (Gen) 20, 10, 5, 2.5, 1.25 мкг/мл; канамицин (Kan) 30, 15, 7.5, 3.8, 1.9 мкг/мл; стрептомицин (Str) 12.5, 6.3, 3.1, 1.6, 0.8 мкг/мл; гигромицин Б (Hyg) 100, 50, 25, 12.5, 6.3 мкг/мл; пурамицин (Pur) 15, 7.5, 3.8, 1.9, 0.9 мкг/мл; хлорамфеникол (Cm) 0.7, 0.35, 0.18, 0.09, 0.04 мкг/м; фузидиевая кислота (Fus) 10, 5, 2.5, 1.25, 0.6 мкг/мл; тетрациклин (Tet) 1.2, 0.6, 0.3, 0.15, 0.075 мкг/мл; левофлоксацин (Lev) 0.1, 0.05, 0.025, 0.013, 0.006 мкг/мл; налидиксовая кислота (Nal) 100, 50, 25, 12.5, 6.3, 3.1 мкг/мл; ципрофлоксацин (Cip) 1, 0.5, 0.25, 0.13, 0.06 мкг/мл; рифампицин (Rif) 25, 12.5, 6.3, 3.1, 1.6 мкг/мл. Красная область показывает диапазон фоновых значений. А – репортерный сигнал остановки рибосомы спустя 5 ч (слева) и 24 ч (справа) инкубации. Зеленые столбцы обозначают антибиотики, воздействующие на рибосому, черные – антибиотики, активирующие SOS-ответ. Б – репортерный сигнал активации SOS-ответа спустя 5 ч (слева) и 24 ч (справа) инкубации. Зеленые столбцы обозначают антибиотики, активирующие SOS-ответ, черные – антибиотики, воздействующие на рибосому. В – значения OD_{600} через 5 ч (слева) и 24 ч (справа) инкубации

вающих остановку рибосом, и 50 образцов, активирующих SOS-ответ. Это наблюдение подразумевает сложность состава экстрактов с относительно низким содержанием ингибирующих компонентов, которые не способны преодолеть пробиотическое действие, но все же обнаруживаются репортерной системой. Таким образом, умеренная антибактериальная активность с неустановленным механизмом действия обнаружена у 4% образцов Сахалинской коллекции, а пробиотическая активность обнаружена в 93% экстрактов. Фракционирование культуральных жидкостей может привести к выявлению дополнительных компонентов с антибактериальной активностью.

Коллекция дрожжей с Камчатки содержит более 2500 образцов. Мы протестировали 559 образцов, 482 из которых подавляли рост бактериальных клеток, 41 образец стимулировал его, а 36 не оказывали никакого эффекта (рис. 3).

Мы обнаружили два образца, индуцирующих экспрессию *Katushka2S*, 46 образцов, стимулирующих экспрессию RFP, и один образец, активирующий оба репортерных сигнала, одновременно с подавлением роста клеток. Оба индуктора *Katushka2S* продемонстрировали снижение сигнала RFP, а все 46 образцов, увеличивающих сигнал SOS-ответа, снизили сигнал репортера ингибирования трансляции. Можно предположить, что эти экстракты могут со-

держат вещества, тормозящие рибосомы и влияющие на ДНК соответственно. Образец, стимулирующий экспрессию обоих репортерных белков, имеет профиль, напоминающий антибиотики, останавливающие рибосомы, а не индуцирующие SOS-ответ.

В группе ингибиторов роста клеток 471 образец снизил сигнал *Katushka2S* ниже базового уровня. Около половины из них, 213 экстрактов, привели к экспрессии RFP на базовом уровне. Аналогичные эффекты наблюдали в присутствии ингибиторов трансляции, которые не приводят к остановке рибосомы (рис. 1). Восемь образцов ингибировали рост клеток, не влияя на сигнал *Katushka2S* и снижая сигнал RFP, подобно некоторым концентрациям неомицина и тетрациклина. Это может указывать на присутствие в культуральных жидкостях ингибитора, который не вызывает SOS-ответ, механизм действия которого может быть связан с нарушением трансляции.

Среди экстрактов, стимулирующих рост клеток, мы обнаружили 21 образец, вызывающий остановку рибосом, и 30 образцов, активирующих SOS-ответ. Найден также один образец, активирующий SOS-ответ, который не подавлял рост клеток. Потенциально эти экстракты могут содержать антибактериальные компоненты в низких концентрациях.

Таким образом, в отличие от Сахалинской коллекции, только 7% протестированной Камчатской коллекции показали пробиотическую активность. Антибактериальное действие разной степени интенсивности проявили 86% образцов, при этом ряд экстрактов вызвал активацию SOS-ответа и остановку рибосом.

Следует отметить, что большинство ингибирующих экстрактов имели схожий профиль репортерных сигналов со значительным снижением экспрессии *Katushka2S* и уровнем RFP, близким к фоновому. Подобное поведение продемонстрировали ингибиторы трансляции, не вызывающие остановку рибосом. По-видимому, это может быть возможным механизмом ингибирования, свойственным дрожжевым экстрактам.

Среди всех изученных образцов выраженными антибактериальными свойствами (снижение OD_{600} бактериальной культуры более чем в 2 раза относительно контроля) обладали 44 образца коллекции Камчатки. Места сбора образцов на Камчатке были выбраны таким образом, чтобы в непосредственной близости от них находились грязевые, водные или газовые выбросы: поселки Паужетка, Озерновский, Мутновский, Эссо и их окрестности; территории вблизи сопки Скалистой и Курильского озера. При этом 28 из 44 изолятов были обнаруже-

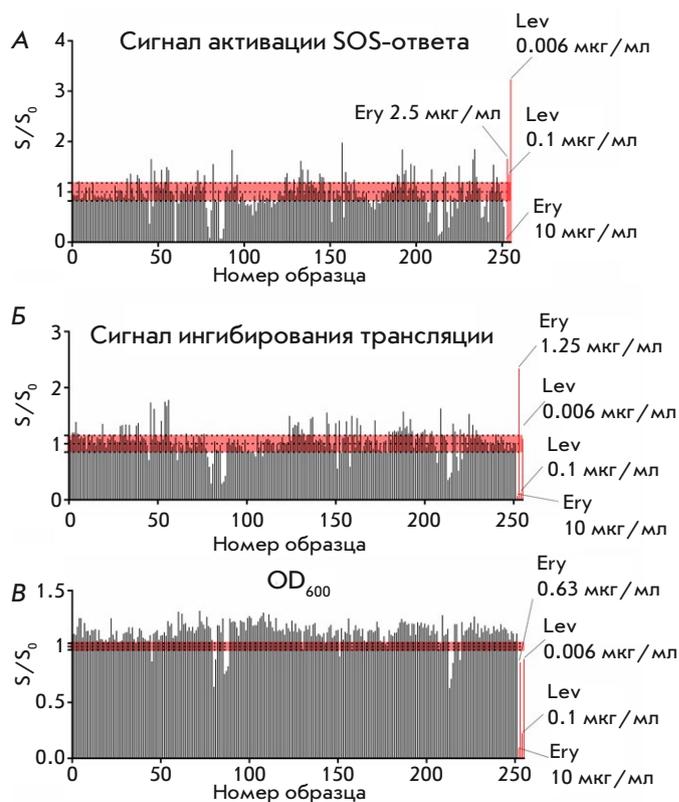


Рис. 2. Анализ антибактериальной активности Сахалинской коллекции дрожжей с помощью репортерной системы. По вертикальной оси отложены значения S/S_0 , где S – значения флуоресценции репортерного сигнала или OD_{600} в присутствии образца, S_0 – без образца через 24 ч инкубации. По горизонтальной оси отложены порядковые номера образцов. В качестве положительных контролей приведены данные для эритромицина (Ery, 10, 2.5, 1.25, 0.6 мкг/мл), левофлоксацина (Lev, 0.1, 0.006 мкг/мл). Красная область показывает диапазон фоновых значений. А – репортерный сигнал активации SOS-ответа. Б – репортерный сигнал ингибирования трансляции. В – значения OD_{600}

ны в ущелье, удаленном на расстояние около 200 м от Паужетской геотермальной электростанции: 11 – на татарнике (*Onopordum acanthium*) и 17 – на полыни (*Artemisia vulgaris*).

В данном ущелье собирали также спорыш, мятлик луговой, водосбор, вероника и др., однако дрожжевые изоляты, живущие на них, не проявляли ярких антибактериальных свойств. Полынь и татарник собирали и на других территориях: полынь – в бухте Тихой Курильского озера (один изолят с выраженными антибактериальными свойствами), на побережье Охотского моря в окрестностях п. Озерновский, на равнинных территориях вблизи п. Паужетка, на склонах сопки Скалистой

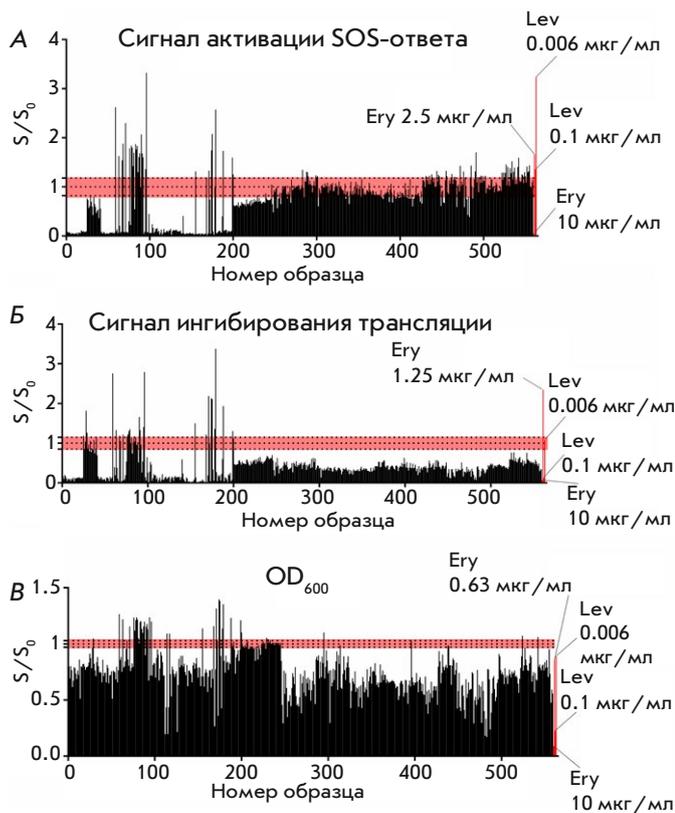


Рис. 3. Анализ антибактериальной активности коллекции дрожжей Камчатки с помощью репортерной системы. По вертикальной оси отложены значения отношения S/S_0 , где S – значения флуоресцентного репортерного сигнала или OD_{600} в присутствии образца, S_0 – без образца через 24 ч инкубации. По горизонтальной оси отложены порядковые номера образцов. В качестве положительных контролей приведены данные для эритромицина (Ery, 10, 2.5, 1.25, 0.6 мкг/мл), левофлоксацина (Lev, 0.1, 0.006 мкг/мл). Красная область показывает диапазон фоновых значений. А – репортерный сигнал активации SOS-ответа. Б – репортерный сигнал ингибирования трансляции. В – значения OD_{600} .

(нет изолятов с выраженными антибактериальными свойствами); татарник – в бухте Тихой Курильского озера, на склонах сопки Скалистой (нет изолятов с выраженными антибактериальными свойствами), на равнинных территориях вблизи п. Мутновский (один изолят с выраженными антибактериальными свойствами).

Культуральные жидкости 43 из 44 изолятов с выраженными антибактериальными свойствами снижали репортерные сигналы ниже контрольного уровня, т.е. не приводили к активации SOS-ответа и остановке рибосом.

Таблица 2. Результаты таксономической идентификации штаммов дрожжей, культуральные жидкости которых проявили антибактериальные свойства

Коллекционный номер штамма	Видовая принадлежность штамма / соответствующий номер последовательности в BLAST
KI-1-1	<i>Cryptococcus adeliensis</i> / JX188117.1
KI-3-6a	<i>Cryptococcus adeliensis</i> / JX188117.1
KI-19-1a	<i>Candida parapsilosis</i> / KT282393.1
KI-174-4a	<i>Candida parapsilosis</i> / KT282393.1
KI-17-5-1a	<i>Rhodotorula mucilaginosa</i> / MN006694.1
KI-18-1a	<i>Naganishia diffluens</i> / MK793259.1, MT303133.1
KI-53-1-6r	<i>Cryptococcus adeliensis</i> / JX188117.1
KI-80-1	<i>Naganishia liquefaciens</i> / MG722803.1
KI-81-2-1	<i>Naganishia vishniacii</i> / OM337523.1
KI-55-1-1**	<i>Naganishia diffluens</i> / MK793259.1, MT303133.1
KI-46-5b-2	<i>Naganishia albidosimilis</i> / MW248429.1, MT127371.1
KI-31-3	<i>Naganishia albidosimilis</i> / MW248429.1, MT127371.1
KI-39-5	<i>Naganishia vishniacii</i> / OM337523.1
KI-151-0	<i>Naganishia vishniacii</i> / OM337523.1
KI-223-16	<i>Naganishia vishniacii</i> / OM337523.1
KI-193-3	<i>Cryptococcus adeliensis</i> / JX188117.1, JX188114.1
KI-55-1-9-1	<i>Naganishia albidosimilis</i> / LC203701.1, LC203699.1, MW248429.1
KI-55-1-9-3*	<i>Naganishia albidosimilis</i> / LC203701.1, LC203699.1, MW248429.1
KI-53-1-13a*	<i>Naganishia adeliensis</i> / JX188117.1, JX188114.1, LC202041.1

Таксономическая идентификация

Мы выбрали 19 штаммов, культуральные жидкости которых подавляли рост клеток с соотношением S/S_0 в диапазоне 0.17–0.97. Наибольшие ингибирующие свойства проявили три образца (с коллекционными номерами KI-55-1-9-1, KI-55-1-9-3* и KI-53-1-13a*), их значения S/S_0 находились в интервале 0.17–0.29. Четыре образца (номера KI-1-1, KI-3-6a, KI-19-1a и KI-31-3) привели к увеличению репортерного сигнала активации SOS-ответа.

Показано, что данная группа представлена преимущественно дрожжами рода *Cryptococcus*

(*Naganishia*) (табл. 2). Видовое разнообразие было следующим: пять штаммов – *Cryptococcus adeliensis*, четыре – *Naganishia (Cryptococcus) albidosimilis*, два – *Naganishia (Cryptococcus) diffluens*, один – *Naganishia (Cryptococcus) liquefaciens*, четыре – *Naganishia (Cryptococcus) vishniacii*, два – *Candida parapsilosis*, один – *Rhodotorula mucilaginosa*.

Дрожжевые изоляты KI-55-1-9-1, KI-55-1-9-3* и KI-53-1-13a* с наиболее выраженными ингибиторными свойствами принадлежали видам *Naganishia (Cryptococcus) albidosimilis* и *Naganishia (Cryptococcus) adeliensis*. Штаммы KI-1-1, KI-3-6a, KI-19-1a и KI-31-3, культуральные жидкости которых стимулировали SOS-ответ, были представителями видов *Naganishia (Cryptococcus) albidosimilis*, *Naganishia (Cryptococcus) adeliensis* и *Candida parapsilosis*.

ОБСУЖДЕНИЕ

Современные темпы вымирания видов примерно в 100–1000 раз выше, чем за последние столетия [32]. Продолжающаяся потеря биоразнообразия приводит к исчезновению по крайней мере одной важной биоактивной молекулы каждые 2 года [33]. Обнаружение и хранение биоматериалов с последующей организацией коллекций видов, а затем исследование этих коллекций способствуют сохранению биоразнообразия [2, 3].

В данной работе мы проанализировали антибактериальную активность штаммов дрожжей, обнаруженных на полуострове Камчатка и острове Сахалин, в отношении бактериальных репортерных клеток *E. coli ΔtolC*. Отсутствие гена *tolC* повысило чувствительность анализа [9, 34] за счет увеличения концентрации малых молекул в клетке, что предпочтительно для многокомпонентных неочищенных природных экстрактов с потенциально низким содержанием биологически активных соединений.

Высокопроизводительный скрининг биоактивных веществ обычно проводится на газоне бактерий с использованием агаризованных сред [35]. Однако бактериальные культуры, растущие на твердых средах и в жидкости, метаболически различаются. В протеоме одной колонии *E. coli*, культивируемой в двух условиях, выявлено перекрытие только 68% белков [36]. Таким образом, несмотря на широкое использование двойной флуоресцентной репортерной системы на твердой среде [9], было необходимо валидировать применение данной системы в жидкой среде с помощью набора известных антибиотиков. Примечательно, что активаторы SOS-ответа продемонстрировали колоссальное увеличение флуоресценции RFP после 5 ч инкубации с бакте-

риальными клетками, тогда как разделение ингибиторов трансляции на индукторы останова рибосом и ошибочного декодирования стало возможным только после 24 ч. В целом, наши результаты соответствуют ранее полученным данным [9], что доказывает применимость системы в жидкости.

Текущая модификация анализа имеет ряд преимуществ. Во-первых, она позволяет контролировать плотность культуры клеток путем измерения OD_{600} с последующим выводом о пробиотических или антибактериальных качествах образца. Кроме того, она обеспечивает возможность добавления тестируемого вещества на разных фазах роста бактерий. Это может быть значимым, поскольку чувствительность бактерий к антибиотикам зависит от метаболического состояния клетки [37]. Во-вторых, она позволяет регистрировать как увеличение, так и уменьшение репортерных сигналов относительно контрольного уровня. Снижение уровня флуоресценции, сопровождающееся снижением OD_{600} , может указывать на гибель клетки, тогда как снижение уровня флуоресценции с увеличением OD_{600} по сравнению со стартовыми значениями может указывать на глубокие изменения в клеточном метаболизме [24]. В-третьих, на агаризованной среде, когда исследуемый образец контактирует со средой, начинается гонка «лекарство–бактерия» (drug–bug) [35]. Молекулы образца диффундируют в агаре, создавая динамически изменяющийся градиент концентраций, в то время как рост бактерий прогрессирует по направлению градиента. Результатом является конкуренция скорости роста клеток и скорости диффузии исследуемого вещества. В случае образцов с низкими биоактивными концентрациями этот эффект может ухудшить анализ. В то же время методика определения антибактериальной активности в жидкой среде имеет ряд недостатков, таких, как более длительное время обработки, большее количество расходных материалов и невозможность анализа плохо растворимых веществ.

Мы проанализировали антибактериальные свойства коллекции дрожжей и сравнили данные, полученные для образцов с Сахалина и Камчатки. Интересно, что в Сахалинских образцах не обнаружили значимых антимикробных свойств; напротив, они были преимущественно пробиотиками. Штаммы Камчатки показали сильные антибактериальные свойства, некоторые из них активировали репортерные сигналы в тест-системе. Однако 43 из 44 изолятов с наиболее выраженными антибактериальными свойствами не приводили к активации SOS-ответа и останова рибосом, позволяя предположить, что выделяемые ими биоактивные

вещества могут нарушать целостность бактериальной мембраны или подавлять способность бактерий образовывать биопленки [38]. Поскольку в данном исследовании культуральные жидкости были получены неразрушающим способом по отношению к дрожжевым клеткам, то, вероятнее всего, дикие дрожжи могут выделять обнаруженные биологически активные метаболиты во внеклеточное пространство.

Таксономическая идентификация штаммов дрожжей показала, что изоляты с наиболее сильными антимикробными свойствами принадлежат к роду *Naganishia (Cryptococcus)*. Это согласуется с предыдущими сообщениями о токсичности представителей рода *Naganishia (Cryptococcus)*, обитающих в различных географических зонах. Виды *Naganishia albida* и *Naganishia diffluens*, обнаруженные в районе щелочного озера Вади-эль-Натрун, Египет, обладали антибактериальной активностью против *E. coli* и *Staphylococcus capitis* [39], а вероятная патогенность штаммов *Naganishia adeliensis* в отношении живых организмов и продукция ими вторичных метаболитов, включая микотоксины, зарегистрированы у дрожжей, обнаруженных в окрестностях Лодзи, Польша [40].

Оказалось, что более половины штаммов с выраженными антибактериальными свойствами были найдены в ущелье рядом с Паужетской геотермальной электростанцией на татарнике и полыни. Причем именно совокупность растений и места их произрастания приводила к появлению антибактериальных качеств у культуральных жидкостей дрожжей. Ущелье вблизи п. Паужетка является биотопом, где сочетаются повышенная влажность, низкая освещенность и нагрев почвы термальными источниками. Такие условия обеспечивают значительное биоразнообразие микроорганизмов. При этом известно, что дрожжи способны защищать растение-хозяина от микопатогенов, прикрепляясь к поверхности грибов и секретировав ферменты, которые разрушают их клеточные стенки [38]. В случае высокой конкуренции концентрация данных дрожжевых ферментов может быть увеличена и может разрушать также и мембраны бактерий. При этом полынь и татарник содержат биоактивные сесквитерпеновые лактоны [41, 42], обладающие антимикотическими свойствами [43]. Комфортные условия окружающей среды могли побудить клетки дрожжей развить устойчивость к данным соединениям, например, с помощью синтеза ферментов, способных модифицировать се-

сквитерпеновые лактоны до безопасной формы, либо синтезируя низкомолекулярные компоненты, нарушающие биосинтез сесквитерпеновых лактонов. Эти биоактивные соединения могли бы также оказывать негативное воздействие на бактериальные клетки. Известно, что растения с антибактериальной активностью «культивируют» мутуалистическую микрофлору, которая обладает схожей биоактивностью. К примеру, антибактериальный потенциал кожуры граната может определяться не только содержанием собственных компонентов, но также и микрофлорой, в частности, местными дрожжами [44].

Истинные механизмы антибактериального действия культуральных жидкостей штаммов коллекции предстоит определить после выделения и идентификации активных компонентов, однако уникальность обнаруженного биоценоза не вызывает сомнений и может стать ориентиром для схожих экспедиций. Исследователи отмечают необходимость анализа взаимодействия не только внутри отдельных групп микроорганизмов – бактерий с бактериями или дрожжей с дрожжами, но и взаимодействий между группами для более глубокого понимания их функционирования и влияния на окружающую среду [45]. Наша работа вносит вклад в изучение взаимодействий микробных сообществ в рамках определенных биоценозов, подчеркивая важность комплексного подхода к поиску биологически активных веществ.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В ходе работы выявлены штаммы коллекции дрожжей, проявляющие антибактериальные и пробиотические свойства, что подтверждает ценность уникальной Дальневосточной коллекции и демонстрирует необходимость сохранения и изучения биоразнообразия.

*Работа поддержана грантом Российского
научного фонда (№ 22-14-00278).*

Благодарности Авторы выражают благодарность научной группе П.В. Сергиева (МГУ) за любезно предоставленный бактериальный штамм с двойным флуоресцентным репортером, С.А. Булату за консультацию по таксономической идентификации дрожжей и Я.А. Пуцкиной за помощь в анализе антибактериальной активности коллекции дрожжей.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Seal B.S., Lillehoj H.S., Donovan D.M., Gay C.G. // *Animal Hlth Res. Rev.* 2013. V. 14. № 1. P. 78–87.
2. Beutler J.A. // *Curr. Protocols Pharmacol.* 2009. V. 46. P. 9.11.1–9.11.21.
3. Neergheen-Bhujun V., Awan A.T., Baran Y., Bunnefeld N., Chan K., Dela Cruz T.E., Egamberdieva D., Elsässer S., Johnson M.V., Komai S., et al. // *J. Global Hlth.* 2017. V. 7. № 2. P. 020304.
4. Tao Z., Yuan H., Liu M., Liu Q., Zhang S., Liu H., Jiang Y., Huang D., Wang T. // *J. Microbial. Biotechnol.* 2023. V. 33. № 2. P. 151–166.
5. Aly A.H., Debbab A., Proksch P. // *Fungal Diversity.* 2011. V. 50. P. 3–19.
6. Younis G., Awad A., Dawod R.E., Yousef N.E. // *Veterinary World.* 2017. V. 10. № 8. P. 979–983.
7. Deveau A., Bonito G., Uehling J., Paoletti M., Becker M., Bindschedler S., Hacquard S., Hervé V., Labbé J., Lastovetsky O.A., et al. // *FEMS Microbial. Rev.* 2018. V. 42. № 3. P. 335–352.
8. Gut A.M., Vasiljevic T., Yeager T., Donkor O.N. // *Microbiology.* 2018. V. 164. № 11. P. 1327–1344.
9. Osterman I.A., Komarova E.S., Shiryaev D.I., Korniltsev I.A., Khven I.M., Lukyanov D.A., Tashlitsky V.N., Serebryakova M.V., Efremenkova O.V., Ivanenkov Y.A., et al. // *Antimicrob. Agents Chemother.* 2016. V. 60. № 12. P. 7481–7489.
10. Liu S., Wang T., Lu Q., Li F., Wu G., Jiang Z., Habden X., Liu L., Zhang X., Lukianov D.A., et al. // *Front. Microbial.* 2021. V. 12. P. 604999.
11. Liu S.W., Jadamba N., Nikandrova A.A., Osterman I.A., Sun C.H. // *Microorganisms.* 2022. V. 10. № 5. P. 989.
12. Wang T., Li F., Lu Q., Wu G., Jiang Z., Liu S., Habden X., Razumova E.A., Osterman I.A., Sergiev P.V., et al. // *J. Pharmaceut. Anal.* 2021. V. 11. № 2. P. 241–250.
13. Volynkina I.A., Zakalyukina Y.V., Alferova V.A., Belik A.R., Yagoda D.K., Nikandrova A.A., Buyuklyan Y.A., Udalov A.V., Golovin E.V., Kryakvin M.A., et al. // *Antibiotics.* 2022. V. 11. № 9. P. 1198.
14. Koronakis V., Eswaran J., Hughes C. // *Annu. Rev. Biochem.* 2004. V. 73. P. 467–489.
15. Суслов А.В., Сусллова И.Н., Багиян Г.А., Давыденко С.Г., Степанова В.П., Суханова Е.А., Яровой Б.Ф. // *Радиационная биология. Радиоэкология.* 2004. Т. 44. № 5. С. 574–578.
16. MacDonald P.N. (Ed) *Two-hybrid systems: Methods and protocols methods in molecular biology.* Springer Science & Business Media, 2008. V. 177. 336 p.
17. Barnett J.A., Payne R.W., Yarrow D. (Eds) *Yeasts: Characteristics and identification.* Cambridge Univ. Press, 1983. 811 p.
18. Kreger-van Rij N.J.W. (Ed) *The Yeasts: A taxonomic study.* Amsterdam: Elsevier, 1984. 1082 p.
19. Полякова А.В., Чернов И.Ю., Паников Н.С. // *Микробиология.* 2001. Т. 70. № 5. С. 714–720.
20. Stepanova V.P., Suslov A.V., Suslova I.N., Sukhanova E.A., Yarovoy B.F., Verbenko V.N. // *Marine Biol. J.* 2020. V. 5. № 3. P. 64–73.
21. Сергиев П.В., Остерман И.А., Головина А.Я., Лаптев И.Г., Плетнев Ф.И., Евфратов С.А., Марусич Е.И., Леонов С.В., Иваненков Я.А., Богданов А.А. и др. // *Биомед. химия.* 2016. Т. 62. № 2. С. 117–123.
22. Raja H.A., Miller A.N., Pearce C.J., Oberlies N.H. // *J. Nat. Prod.* 2017. V. 80. № 3. P. 756–770.
23. Tenson T., Lovmar M., Ehrenberg M. // *J. Mol. Biol.* 2003. V. 330. № 5. P. 1005–1014.
24. Stokes J.M., Lopatkin A.J., Lobritz M.A., Collins J.J. // *Cell Metabolism.* 2019. V. 30. № 2. P. 251–259.
25. Borovinskaya M.A., Shoji S., Fredrick K., Cate J.H. // *RNA.* 2008. V. 14. № 8. P. 1590–1599.
26. Fernandes P. // *Cold Spring Harb. Perspectives Med.* 2016. V. 6. № 1. P. a025437.
27. Chopra I., Roberts M. // *Microbiol. Mol. Biol. Rev. MMBR.* 2001. V. 65. № 2. P. 232–260.
28. Aviner R. // *Comput. Struct. Biotechnol. J.* 2020. V. 18. P. 1074–1083.
29. Kotra L.P., Haddad J., Mobashery S. // *Antimicrobial Agents and Chemotherapy.* 2000. V. 44. № 12. P. 3249–3256.
30. Fàbrega A., Madurga S., Giralt E., Vila J. // *Microb. Biotechnol.* 2009. V. 2. № 1. P. 40–61.
31. Campbell E.A., Korzheva N., Mustaev A., Murakami K., Nair S., Goldfarb A., Darst S.A. // *Cell.* 2001. V. 104. № 6. P. 901–912.
32. Pimm S.L., Jenkins C.N., Abell R., Brooks T.M., Gittleman J.L., Joppa L.N., Raven P.H., Roberts C.M., Sexton J.O. // *Science.* 2014. V. 344. № 6187. P. 1246752.
33. Pimm S.L., Russell G.J., Gittleman J.L., Brooks T.M. // *Science.* 1995. V. 269. № 5222. P. 347–350.
34. Fan J., de Jonge B.L., MacCormack K., Sriram S., McLaughlin R.E., Plant H., Preston M., Fleming P.R., Albert R., Foulk M., et al. // *Antimicrobial Agents and Chemotherapy.* 2014. V. 58. № 12. P. 7264–7272.
35. Audrey W. // *Antimicrobial susceptibility testing protocols / Eds Schwalbe R., Steele-Moore L., Goodwin A.C.* Boca Raton: CRC Press Taylor and Francis Group, 2007. P. 53–72.
36. Fortuin S., Nel A.J.M., Blackburn J.M., Soares N.C. // *J. Proteomics.* 2020. V. 228. P. 103929.
37. Lobritz M.A., Belenky P., Porter C.B., Gutierrez A., Yang J.H., Schwarz E.G., Dwyer D.J., Khalil A.S., Collins J.J. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2015. V. 112. № 27. P. 8173–8180.
38. Georgescu A.M., Corbu V.M., Csutak O. // *Curr. Issue. Mol. Biol.* 2024. V. 46. № 5. P. 4721–4750.
39. Sipiczki M., Selim S.A. // *Antonie van Leeuwenhoek.* 2019. V. 112. № 4. P. 523–541.
40. Wójcik A., Kurnatowski P., Błaszczowska J. // *Internat. J. Occup. Med. Environ. Hlth.* 2013. V. 26. № 3. P. 477–487.
41. Csupor-Löffler B., Zupkó I., Molnár J., Forgo P., Hohmann J. // *Nat. Prod. Commun.* 2014. V. 9. № 3. P. 337–340.
42. Chen X.Y., Liu T., Hu Y.Z., Qiao T.T., Wu X.J., Sun P.H., Qian C.W., Ren Z., Zheng J.X., Wang Y.F. // *Front. Chem.* 2022. V. 10. P. 948714.
43. Nawrot J., Adamski Z., Kamińska-Kolat B., Kubisiak-Rzecznyk H., Kroma A., Nowak G., Gornowicz-Porowska J. // *Plants.* 2021. V. 10. № 6. P. 1180.
44. Utama G.L., Rahmah S.A., Kayaputri I.L., Balia R.L. // *J. Adv. Pharm. Technol. Res.* 2022. V. 13. № 1. P. 56–60.
45. Senne de Oliveira Lino F., Bajic D., Vila J.C.C., Sánchez A., Sommer M.O.A. // *Nat. Commun.* 2021. V. 12. № 1. P. 1498.

УДК 577.29

Бактериоцин микробиоты ротовой полости енотовидной собаки подавляет рост метициллинрезистентного патогена *Staphylococcus aureus*

М. Н. Баранова¹, Е. А. Соболева¹, М. А. Корниенко², М. В. Малахова², Ю. А. Мокрушина^{1,3}, А. Г. Габибов^{1,3}, С. С. Терехов¹, И. В. Смирнов^{1,3*}

¹Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Государственный научный центр Российской Федерации Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова Российской академии наук (ГНЦ ИБХ РАН), Москва, 117997 Россия

²Федеральное государственное бюджетное учреждение «Федеральный научно-клинический центр физико-химической медицины имени академика Ю.М. Лопухина федерального медико-биологического агентства», Москва, 119435 Россия

³Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова», Москва, 119991 Россия

*E-mail: ivansmr@inbox.ru

Поступило в редакцию 11.12.2023

Принято к печати 18.11.2024

DOI: 10.32607/actanaturae.27349

РЕФЕРАТ Глобальное распространение антибиотикорезистентности патогенных бактерий является одной из ключевых проблем XXI века. Разработка новых технологических платформ, основанных на анализе антибактериальной активности индивидуальных представителей микробиома, позволила проводить широкомасштабный поиск антимикробных агентов различного механизма действия. Ввиду своей малой изученности, микробиом диких животных можно рассматривать как естественный резервуар биоразнообразия для поиска новых антибиотиков. В данной работе с использованием микрофлюидной технологии ультравысокопроизводительного скрининга из микробиома ротовой полости енотовидной собаки (*Nyctereutes procyonoides*) выделен штамм бактерии *Staphylococcus pseudintermedius* E18, с высокой эффективностью подавляющий рост метициллинрезистентного патогена *S. aureus* (MRSA). Показано, что основным действующим веществом штамма *S. pseudintermedius* E18 является бактериоцин с молекулярной массой 27 кДа, обладающий высоким положительным зарядом и чрезвычайно узким спектром активности. Бактериоцин *S. pseudintermedius* E18 инактивировался под действием повышенной температуры, протеиназы К и EDTA. Дальнейшие исследования структуры бактериоцина *S. pseudintermedius* E18 позволят понять механизм его антимикробного действия, что открывает перспективы разработки новых антимикробных препаратов белковой природы.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА ультравысокопроизводительный скрининг, антибиотикорезистентность, антимикробные пептиды, литические ферменты.

Поиск новых противомикробных препаратов необходим, поскольку бактерии постоянно эволюционируют, приобретая устойчивость к новым антибиотикам [1]. Использование новых платформ, задействующих методы метаболомики, геномного и транскриптомного секвенирования с последующим биоинформатическим анализом, а также внедрение альтернативных способов культивирования микроорганизмов открывают новые возможности для скрининга антибиотической активности природных соединений.

Микробиомы животных представляют собой уникальный резервуар для поиска новых антимикробных агентов [2–4]. Пробиотические микроорганизмы привлекают особый интерес в качестве потенциальных продуцентов антибиотиков [5, 6]. Несмотря на то, что пробиотические штаммы и бактерии-комменсалы могут оказывать не прямое действие на микробиом, влияя на иммунную систему хозяина [7] или продуцируя функционально значимые ферменты [8], для большинства бактериоцинов характерен механизм прямого убийства патогенов.

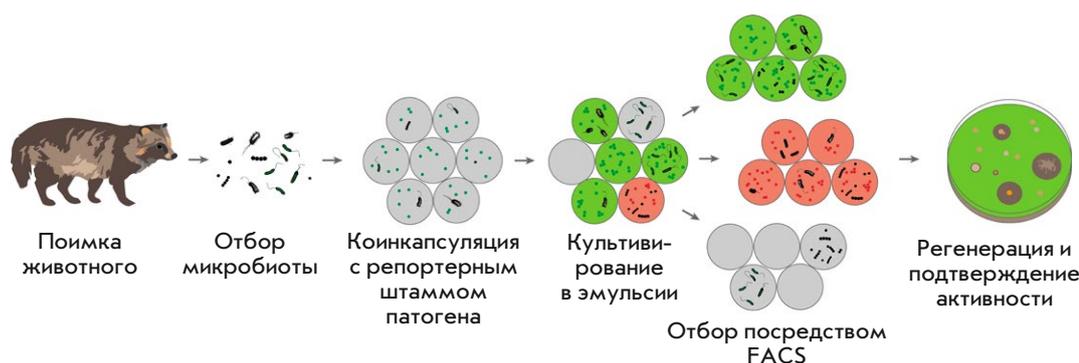


Рис. 1. Схема платформы ультравысокопроизводительного скрининга для отбора микроорганизмов, ингибирующих рост бактерии-мишени

Таблица 1. Масс-спектрометрическая идентификация и антагонистическая активность отобранных штаммов бактерий-продуцентов в отношении золотистого стафилококка

Штамм	Микроорганизм	Зоны ингибирования роста <i>S. aureus</i> , диаметр, мм	Максимальная активность в жидкой культуре	
			Кратность ингибирующего разведения	Время культивирования, сут
E14	<i>Bacillus pumilus</i>	11 ± 2	61 ± 9	2
E18	<i>Staphylococcus pseudintermedius</i>	5 ± 1	256 ± 47	4
E32	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	4* ± 1	5 ± 1	2
EB10	<i>Pasteurella dagmatis</i>	0.9 ± 0.1	8 ± 1	8
EB16	<i>Ralstonia insidiosa</i>	3.1 ± 0.4	-	-
EB27	<i>Curtobacterium luteum</i>	-	4 ± 1	1
EB30	<i>Brachybacterium sp.</i>	-	2.1 ± 0.5	1

*Диффузная зона ингибирования.

В этой работе с целью выделения штаммов-продуцентов веществ, обладающих антимикробной активностью в отношении золотистого стафилококка и идентификации метаболитов, обуславливающих их антагонистические свойства, проведен ультравысокопроизводительный скрининг микробиома слюны енотовидной собаки (*Nyctereutes procyonoides*).

Ранее нами была описана платформа ультравысокопроизводительного скрининга микробных сообществ (рис. 1) [2, 9], основанная на культивировании одиночных клеток микроорганизмов с репортерным штаммом бактерий в изолированных каплях двойной эмульсии с последующим выделением активных фенотипов методом флуоресцентно-активируемой клеточной сортировки. Эту платформу применили для профилирования микробиома ротовой полости енотовидной собаки и выявления штаммов, активных в отношении золотистого стафилококка.

В результате скрининга получили шесть фенотипически различных штаммов, воспроизводимо ингибирующих рост *Staphylococcus aureus* на агаризованной среде ВНИ и в жидкой культуре (активность оценивали методом двухкратных серийных разведений). Штаммы идентифицировали методом времяпролетной масс-спектрометрии с матрично-

активированной лазерной десорбцией/ионизацией (MALDI-TOF MS) (табл. 1).

Наибольшей активностью в отношении *S. aureus* в жидкой среде обладал штамм *S. pseudintermedius* E18 (рис. 2А). Для наработки и идентификации активного вещества проведен более подробный анализ динамики антагонистического действия штамма-продуцента (рис. 2Б).

Для очистки активного соединения применили твердофазную экстракцию с использованием сорбента LPS-500 (табл. 2). Большая часть вещества не могла быть элюирована повышением содержания ацетонитрила в буферном растворе при pH 5.0, для элюции использовали 0.1% трифторуксусную кислоту (TFA) в водном растворе ацетонитрила.

Инкубация соединения, продуцируемого штаммом E18, в течение 1.5 ч при 60°C приводила к утрате его антибиотической активности. В связи с термоллабильностью и характером элюции при твердофазной экстракции была выдвинута гипотеза о высокомолекулярной природе вещества. Активные образцы среды культивирования с добавлением 50 мМ фосфата натрия с pH 7.5 подвергали действию протеиназы К (0.1 мг/мл). После 3 ч инкубации при 37°C наблюдалась полная потеря ингибирующей активно-

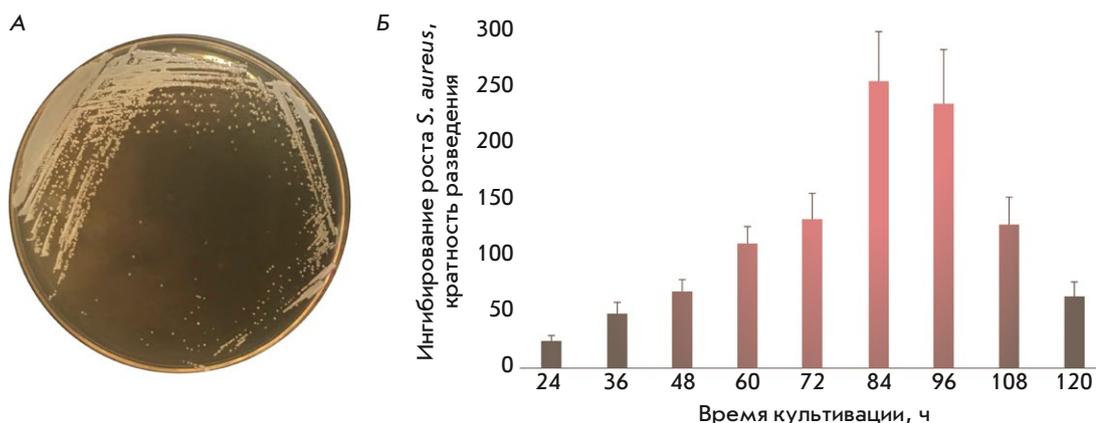


Рис. 2. Фенотип штамма-продуцента E18 на агаризованной среде ВНИ (А) и анализ динамики продукции метаболитов, ингибирующих рост *S. aureus* (Б)

Таблица 2. Очистка соединения, продуцируемого штаммом E18, методом импульсной твердофазной экстракции с использованием сорбента LPS-500

Буферный раствор	А	Б	А + В, %В		
			40	70	100
Активность по ингибирующему разведению, % от нанесенной пробы	2 ± 1	9 ± 1	12 ± 3	68 ± 7	11 ± 2

Примечание. Буфер А: 10 мМ NH₄OAc, 5% ацетонитрил, рН 5.0; буфер Б: 10 мМ NH₄OAc, 80% ацетонитрил, рН 5.0; буфер В: 0.1% TFA, 80% ацетонитрил.

сти в отношении *S. aureus*. Ввиду предположительно белковой природы соединения для его дальнейшей очистки использовали соответствующие методы.

Первая стадия очистки включала ионообменную хроматографию с использованием сорбента SP-sepharose (табл. 3).

На второй стадии очистки использовали хроматографическую колонку Heparin-sepharose (GE Healthcare, США), буферные растворы А (20 мМ HEPES, рН 7.0) и Б (20 мМ HEPES, 1 М NaCl, рН 7.0) со скоростью потока 1 мл/мин. Элюцию проводили линейным градиентом буфера Б, 20 мин (рис. 3А,Б). Время удержания косвенно свидетельствовало о высоком положительном заряде белка.

На третьей стадии очистки применяли гель-фильтрационную хроматографию с использованием колонки Superdex 75 и буферного раствора 20 мМ HEPES, 250 мМ NaCl, рН 7.0 со скоростью 0.4 мл/мин. Активность соответствовала белку размером приблизительно 27 кДа (рис. 3В), время удержания составило приблизительно 23 мин.

Очищенный белок использовали для функциональных исследований. Минимальная ингибирующая концентрация этого белка в отношении *S. aureus* составила 0.05 ± 0.02 мкг/мл. Полученный бактериоцин оказался высокоспецифичным – МИК в отношении *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella pneumoniae*, *Enterococcus faecium*, *Acinetobacter baumannii*, *Enterobacter*

cloacae, *Streptococcus pneumoniae* и *Bacillus cereus* была выше 10 мкг/мл, что свидетельствует об отсутствии антимикробной активности.

Таким образом, штамм *S. pseudintermedius* продуцирует бактериоцин III класса – термолабильный полипептид размером 27 кДа, ингибирующий рост бактерий, рода *Staphylococcus* [10–12]. Бактериоцины III класса включают бактериолизины, тайлоцины и нелитические белки. Наиболее изученным подклассом являются бактериолизины. Известные представители бактериолизин относятся к металл-зависимым протеазам, катализирующим гидролиз пептидных мостиков или створковых пептидов в пептидогликане бактерии-мишени [12]. Было выдвинуто предположение, что выделенный из *S. pseudintermedius* белок также является пептидогликан-гидролазой. Инкубация белка в течение 15 мин при 25°C в присутствии 10 мМ EDTA приводила к полной потере его активности. Таким образом, вещество, обеспечивающее антистафилококковую активность штамма *S. pseudintermedius*, является металл-зависимым ферментом, что характерно для бактериолизин.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Развитие резистентности к антибиотикам у патогенных бактерий привело к возобновлению интереса к противомикробным средствам, разрушающим бактериальные мембраны и клеточные стенки

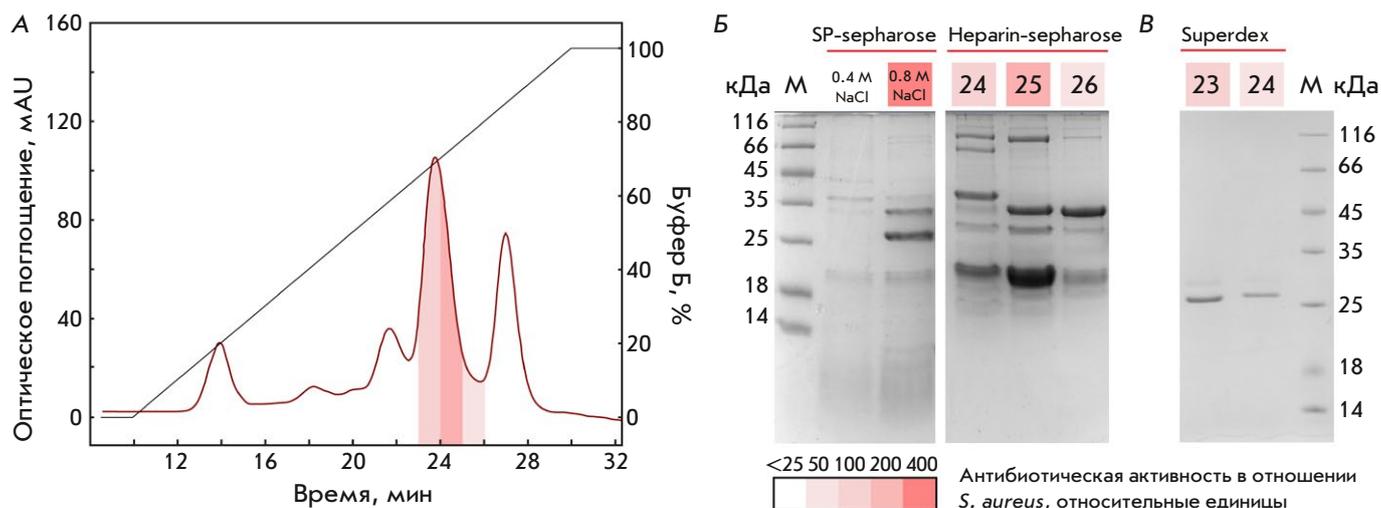


Рис. 3. Хроматографическая очистка белка, определяющего антибиотическую активность штамма *S. pseudintermedius* E18. Красным обозначены фракции, обладающие наибольшей антибактериальной активностью. А – репрезентативная хроматограмма, полученная при фракционировании активных метаболитов *S. pseudintermedius* E18 с использованием смолы Heparin-sepharose. Б – репрезентативные электрофореграммы (15% ПААГ). Очистка белка методом хроматографии с использованием сорбента SP-sepharose и последующая очистка с использованием колонки Heparin-sepharose. В – репрезентативная электрофореграмма. Фракции, полученные в результате очистки белка методом гель-фильтрации с использованием колонки Superdex 75

Таблица 3. Очистка соединения, продуцируемого штаммом E18, методом катионообменной хроматографии с использованием сорбента SP-sepharose

Содержание буфера Б, %	0	20	40	60	80	100
Активность по ингибирующему разведению, % от нанесенной пробы	6 ± 5	2 ± 1	15 ± 3	26 ± 7	21 ± 5	11 ± 2

Примечание. Буфер А: 10 мМ NH₄OAc, pH 6.0; буфер Б: 10 мМ NH₄OAc, 1 М NaCl, pH 6.0. Для дальнейшей работы использовали фракции, соответствующие 60 и 80% содержания буфера Б (600 и 800 мМ NaCl).

[13]. В результате ультравысокопроизводительного скрининга микробиоты енотовидной собаки обнаружен штамм бактерии *S. pseudintermedius* E18. Посредством хроматографического фракционирования показано, что этот штамм продуцирует ан-

тимикробный агент, являющийся литическим ферментом.

Работа выполнена при поддержке гранта РНФ № 19-14-00331.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- https://www.who.int/news/item/27-02-2017-who-publishes-list-of-bacteria-for-which-new-antibiotics-are-urgently-needed.
- Terekhov S.S., Smirnov I.V., Malakhova M.V., Samoilov A.E., Manolov A.I., Nazarov A.S., Danilov D.V., Dubiley S.A., Osterman I.A., Rubtsova M.P., et al. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 2018. V. 115. № 38. P. 9551–9556.
- Adnani N., Rajski S.R., Bugni T.S. // Nat. Prod. Rep. 2017. V. 34. № 7. P. 784–814.
- Akbar N., Siddiqui R., Sagathevan K.A., Khan N.A. // Appl. Microbiol. Biotechnol. 2019. V. 103. № 10. P. 3955–3964.
- Pereira W.A., Mendonça C.M.N., Urquiza A.V., Marteinsson V.P., LeBlanc J.G., Cotter P.D., Villalobos E.F., Romero J., Oliveira R.P.S. // Microorganisms. 2022. V. 10. № 9. P. 1705.
- Liao S.F., Nyachoti M. // Anim. Nutr. 2017. V. 3. № 4. P. 331–343.
- Liang L., Yang C., Liu L., Mai G., Li H., Wu L., Jin M., Chen Y. // Microb. Cell Fact. 2022. V. 21. № 1. P. 88.
- El-Saadony M.T., Alagawany M., Patra A.K., Kar I., Tiwari R., Dawood M.A.O., Dhama K., Abdel-Latif H.M.R. // Fish Shellfish Immunol. 2021. V. 117. P. 36–52.
- Terekhov S.S., Smirnov I.V., Stepanova A.V., Bobik T.V., Mokrushina Y.A., Ponomarenko N.A., Belogurov A.A., Rubtsova M.P., Kartseva O.V., Gomzikova M.O., et al. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 2017. V. 114. № 10. P. 2550–2555.
- Meade E., Slattery M.A., Garvey M. // Antibiotics. 2020. V. 9. № 1. P. 32.
- Heng N.C.K., Tagg J.R. // Nat. Rev. Microbiol. 2006. V. 4. № 2. P. 160.
- Zimina M., Babich O., Prosekov A., Sukhikh S., Ivanova S., Shevchenko M., Noskova S. // Antibiotics. 2020. V. 9. № 9. P. 553.
- Bush K. // Rev. Sci. Tech. 2012. V. 31. № 1. P. 43–56.

ОБЩИЕ ПОЛОЖЕНИЯ

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

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

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

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

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

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

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

ОФОРМЛЕНИЕ РУКОПИСЕЙ

Рукопись должна быть построена следующим образом:

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

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

РЕКОМЕНДАЦИИ ПО НАБОРУ И ОФОРМЛЕНИЮ ТЕКСТА

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

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

ТРЕБОВАНИЯ К ИЛЛЮСТРАЦИЯМ

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

РЕЦЕНЗИРОВАНИЕ, ПОДГОТОВКА РУКОПИСИ К ПЕЧАТИ, ОЧЕРЕДНОСТЬ ПУБЛИКАЦИИ

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

Статьи, поступившие в редакцию, проходят экспертизу членов редколлегии и направляются на внешнее рецензирование. Выбор рецензента является прерогативой редакции. Рукопись направляется на отзыв специалистам

в данной области исследований, и по результатам рецензирования редколлегия определяет дальнейшую судьбу рукописи: принятие к публикации в представленном виде, необходимость доработки или отклонение.

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

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

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

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

ОФОРМЛЕНИЕ ССЫЛОК

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

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

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

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

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

Ross M.T., Grafham D.V., Coffey A.J., Scherer S., McLay K., Muzny D., Platzer M., Howell G.R., Burrows C., Bird C.P., et al. // Nature. 2005. V. 434. № 7031. P. 325–337. doi: 10.1038/nature03440.

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

Шкурников М.Ю. Влияние нагрузок различной интенсивности на концентрацию белка теплового шока с молекулярной массой 70 кДа. Дис. ... канд. мед. наук. М.: ФГУ ВНИИФК, 2009.

Ссылки на *патенты* должны содержать фамилии и инициалы авторов, вид патентного документа (авторское свидетельство или патент), номер, название страны, выдавшей документ, индекс международной классификации изобретений, год выдачи патента.

Для связи с редакцией следует использовать следующий электронный адрес: actanaturae@gmail.com, телефон: (495) 727-38-60.