

СОДЕРЖАНИЕ

Том 87, № 11, 2022

- Биохимические основы селективного накопления и таргетной доставки фотосенсибилизаторов в опухолевые ткани (обзор)
В.И. Иванова-Радкевич 1533
- Термодинамика и кинетика разворачивания антипараллельных G-квадруплексов в аптамерах к тромбину
В.А. Спиридонова, Ю.О. Наумова, П.А. Николаева, Т.М. Новикова, Г.Я. Коломийцева 1554
- Новый взгляд на роль арил-углеводородного рецептора в канцерогенезе легкого (обзор)
Д.А. Ахметова, В.В. Козлов, Л.Ф. Гуляева 1564
- Изменения экспрессии генов системы инсулин/инсулиноподобных факторов роста в поле СА1 и зубчатой фасции гиппокампа при предъявлении нового контекста
А.М. Швадченко, М.Н. Волобуева, В.О. Иванова, А.П. Белецкий, Г.Р. Смирнова, Н.В. Баль, П.М. Балабан 1573
- Роль онкосупрессора PTEN и его регуляция при злокачественной трансформации эндометрия (обзор)
А.М. Первалова, В.С. Кобелев, В.Г. Сисакян, Л.Ф. Гуляева, В.О. Пустыльняк 1584
- Свойства сердечного миозина с кардиомиопатическими мутациями в существенных лёгких цепях
Д.С. Ямпольская, Г.В. Копылова, Д.В. Щепкин, С.Ю. Бершицкий, А.М. Матюшенко, Д.И. Левицкий 1604
- Протеомный анализ перекодирования белков *Danio rerio* вследствие редактирования матричной РНК аденозиндезаминазами ADAR
Ш.Ш. Насаев, А.С. Копейкина, К.Г. Кузнецова, Л.И. Левицкий, С.А. Мошковский 1614
- Катионный каналный родопсин из водоросли *Platymonas subcordiformis* как перспективный оптогенетический инструмент
О.С. Иджилова, Г.Р. Смирнова, Л.Е. Петровская, Д.А. Колотова, М.А. Островский, А.Ю. Малышев 1625
- О возможности использования метода ультракороткого полнопротеомного анализа DirectMS1 в задачах химической протеомики по поиску мишеней лекарственного воздействия
Е.М. Соловьева, Ю.А. Бубис, И.А. Тарасова, А.А. Лобас, М.В. Иванов, А.А. Назаров, И.А. Шутков, М.В. Горшков 1634
- Раково-сетчаточные антигены в моче больных раком мочевого пузыря и предстательной железы
Ю.М. Шляпников, Е.А. Малахова, А.З. Винаров, Н.В. Потолдыкова, В.И. Владимиров, Е.Ю. Зерний, А.А. Замятнин мл., Е.А. Шляпникова 1648

- Сравнительная окисляемость разных классов липопротеидов плазмы крови
В.З. Ланкин, А.К. Тихазе, В.Я. Косач 1659
- Сравнение методов выделения микроРНК из экстраклеточных везикул, присутствующих в асцитической жидкости
Г.О. Скрябин, С.В. Винокурова, Н.В. Елкина, Д.А. Денисова, А.А. Беляева, К.И. Жордания, Д.В. Багров, А.Д. Еникеев, С.А. Галецкий, А.В. Комельков, Г.И. Краснощекова, Е.М. Чевкина 1667
- Гибридные имплантаты на основе кальций-магниево-силикатной керамики диоксида в качестве носителя рекомбинантного BMP-2 и деминерализованного костного матрикса в качестве каркаса: динамика репаративного остеогенеза на модели краниотомии у мышей
А.С. Карягина, П.А. Орлова, М.С. Попонова, И.Н. Булыгина, Р. Чоудхари, А.В. Жулина, Т.М. Грунина, К.Е. Никитин, Н.В. Струкова, М.С. Генералова, А.В. Рязанова, П.А. Ковалёва, А.И. Зимина, Е.М. Лукинова, Е.Д. Плахотнюк, М.А. Кирсанова, Е.А. Колесников, Е.В. Захарова, В.Н. Манских, Ф.С. Сенатов, А.В. Громов 1683
- Адипонектин стимулирует экспрессию гена аполипопротеина А-1 в клетках HepG2 через сигнальные пути AMPK, PPAR-альфа и LXR
Д.А. Танянский, В.С. Шавва, Э.Б. Дижге, Г.Н. Олейникова, А.В. Лизунов, Е.В. Некрасова, Д.А. Могиленко, Е.Е. Ларионова, С.В. Орлов, А.Д. Денисенко 1700
- Srpat2L подавляет TLR4-опосредованный сигнальный путь, способствуя деубиквитинированию TRAF6 и TAK1 при участии CYLD
Z. Zhang, S. Zhang, X. Jiang, D. Wu, Y. Du, X.-D. Yang 1709
- Структурные особенности, механизмы действия и перспективы практического применения бактериоцинов класса II (обзор)
Д.В. Антошина, С.В. Баландин, Т.В. Овчинникова 1720
- Позитивное (регуляторное) и негативное (цитотоксическое) действие динитрозильных комплексов железа на живые организмы (обзор)
А.Ф. Ванин 1739

CONTENTS

Vol. 87, Issue 11, 2022

Biochemical Basis of Selective Accumulation and Targeted Delivery of Photosensitizers into Tumor Tissues (Review) <i>V. I. Ivanova-Radkevich</i>	1533
Thermodynamics and Unfolding Kinetics of Antiparallel G-Quadruplexes in Aptamers to Thrombin <i>V. A. Spiridonova, Yu. O. Naumova, P. A. Nikolaeva, T. M. Novikova, and G. Ya. Kolomijtseva</i>	1554
A New Insight at the Role of AhR in Lung Carcinogenesis (Review) <i>D. A. Akhmetova, V. V. Kozlov, and L. F. Gulyaeva</i>	1564
New Context Significantly Changes Expression of <i>Irs2</i> Gene in Hippocampal Areas <i>A. M. Shvadchenko, M. N. Volobueva, V. O. Ivanova, A. P. Beletskiy, G. R. Smirnova, N. V. Bal, and P. M. Balaban</i>	1573
Role of Tumor Suppressor PTEN and Its Regulation in Malignant Transformation of Endometrium (Review) <i>A. M. Perevalova, V. S. Kobelev, V. G. Sisakyan, L. F. Gulyaeva, and V. O. Pustyl'nyak</i>	1584
Properties of Cardiac Myosin with Cardiomyopathic Mutations in Essential Light Chains <i>D. S. Yampolskaya, G. V. Kopylova, D. V. Shchepkin, S. Y. Bershitsky, A. M. Matyushenko, and D. I. Levitsky</i>	1604
Proteomic Analysis of Zebrafish Protein Recoding via Messenger RNA Editing by ADAR Adenosine Deaminases <i>S. S. Nasaev, A. S. Kopeykina, K. G. Kuznetsova, L. I. Levitsky, and S. A. Moshkovskii</i>	1614
Cationic Channelrhodopsin from the Algae <i>Platymonas subcordiformis</i> as a Promising Optogenetic Tool <i>O. S. Idzhilova, G. R. Smirnova, L. E. Petrovskaya, D. A. Kolotova, M. A. Ostrovsky, and A. Y. Malyshev</i>	1625
On the Feasibility of Using an Ultra-Fast DirectMS1 Method of Proteome-Wide Analysis for Searching Drug Targets in Chemical Proteomics <i>E. M. Solovyeva, J. A. Bubis, I. A. Tarasova, A. A. Lobas, M. V. Ivanov, A. A. Nazarov, I. A. Shutkov, and M. V. Gorshkov</i>	1634
Cancer-Retina Antigens in the Urine of Bladder and Prostate Cancer Patients <i>Yu. M. Shlyapnikov, E. A. Malakhova, A. Z. Vinarov, N. V. Potoldykova, V. I. Vladimirov, E. Yu. Zernii, A. A. Zamyatnin, Jr., and E. A. Shlyapnikova</i>	1648
Comparative Oxidizability of Different Classes of Blood Plasma Lipoproteins <i>V. Z. Lankin, A. K. Tikhaze, and V. Ya. Kosach</i>	1659

- Comparison of Methods for MicroRNA Isolation from Extracellular Vesicles
Obtained from Ascitic Fluids
*G. O. Skryabin, S. V. Vinokurova, N. V. Elkina, D. A. Denisova, A. A. Beliaeva,
K. I. Zhordania, D. V. Bagrov, A. D. Enikeev, S. A. Galetsy, A. V. Komelkov,
G. I. Krasnoshekova, and E. M. Tchevkina* 1667
- Hybrid Implants Based on Calcium-Magnesium Silicate Ceramics Diopside as a Carrier
of Recombinant BMP-2 and Demineralized Bone Matrix as a Scaffold:
Dynamics of Reparative Osteogenesis in a Mouse Craniotomy Model
*A. S. Karyagina, P. A. Orlova, M. S. Poponova, I. N. Bulygina, R. Choudhary, A. V. Zhulina,
T. M. Grunina, K. E. Nikitin, N. V. Strukova, M. S. Generalova, A. V. Ryazanova, P. A. Kovalyova,
A. I. Zimina, E. M. Lukinova, E. D. Plakhotniuk, M. A. Kirsanova, E. A. Kolesnikov,
E. V. Zakharova, V. N. Manskikh, F. S. Senatov, and A. V. Gromov* 1683
- Adiponectin Stimulates Apolipoprotein A-1 Gene Expression in HepG2 Cells
via AMPK, PPAR-Alpha, and LXR Signalling Mechanisms
*D. A. Tanyanskiy, V. S. Shavva, E. B. Dizhe, G. N. Oleinikova, A. V. Lizunov,
E. V. Nekrasova, D. A. Mogilenko, E. E. Larionova, S. V. Orlov, and A. D. Denisenko* 1700
- Spata2L Suppresses TLR4 Signaling by Promoting CYLD-Mediated
Deubiquitination of TRAF6 and TAK1
Z. Zhang, S. Zhang, X. Jiang, D. Wu, Y. Du, and X.-D. Yang 1709
- Structural Features, Mechanisms of Action and Prospects for the Practical Application
of Class II Bacteriocins (Review)
D. V. Antoshina, S. V. Balandin, and T. V. Ovchinnikova 1720
- Positive (Regulatory) and Negative (Cytotoxic) Action of Dinitrosyl Iron Complexes
on Living Organisms (Review)
A. F. Vanin 1739

БИОХИМИЧЕСКИЕ ОСНОВЫ СЕЛЕКТИВНОГО НАКОПЛЕНИЯ И ТАРГЕТНОЙ ДОСТАВКИ ФОТОСЕНСИБИЛИЗАТОРОВ В ОПУХОЛЕВЫЕ ТКАНИ

Обзор

© 2022 В.И. Иванова-Радкевич

*Российский университет дружбы народов (РУДН),
117198 Москва, Россия; электронная почта: ivanova-radkevich-vi@rudn.ru*

Поступила в редакцию 01.06.2022

После доработки 17.08.2022

Принята к публикации 06.09.2022

Одним из ключевых параметров фотодинамической терапии злокачественных новообразований является селективность накопления фотосенсибилизаторов в опухолевой ткани. Недостаточная избирательность фотосенсибилизаторов по отношению к патологически измененным тканям и генерализованное распространение по организму приводит к развитию тяжелых токсических эффектов, в том числе кожной фототоксичности. Механизмы селективности фотосенсибилизаторов в отношении опухолевой ткани включают избирательное связывание с белками и липопротеинами крови, количество рецепторов к которым увеличено на мембранах опухолевых клеток, поглощение макрофагами в опухоли, лучшую растворимость при низком рН, характерном для опухолевых клеток, и другие механизмы. В настоящее время повышение эффективности фотодинамической терапии во многом связывают с дополнительным нацеливанием фотосенсибилизаторов на ткани опухоли. Стратегии таргетной доставки основываются на различиях в метаболизме и профилях экспрессии опухолевых и здоровых клеток. В этих клетках могут по-разному экспрессироваться рецепторы, протеазы или трансмембранные переносчики. В частности, ускоренный метаболизм у многих типов опухолей приводит к гиперэкспрессии рецепторов эпидермального фактора роста, фолиевой кислоты, трансферрина и ряда других соединений. В настоящем обзоре рассмотрены биохимические основы избирательного накопления в опухолях фотосенсибилизаторов разных классов (хлорины, фталоцианины, производные 5-аминолевулиновой кислоты и др.) и обсуждаются различные стратегии таргетной доставки с акцентом на конъюгацию фотосенсибилизаторов с лигандами рецепторов, гиперэкспрессируемых в опухолевых клетках.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: фотодинамическая терапия, фотосенсибилизатор, таргетная доставка, селективность, хлорин, аминолевулиновая кислота.

DOI: 10.31857/S032097252211001X, **EDN:** LUVMUG

ВВЕДЕНИЕ

В обзоре рассмотрены основные таргетные молекулы (векторы), используемые для нацеленной доставки фотосенсибилизаторов в ткани опухоли. Первыми приведены векторы, показывающие в исследованиях наибольшую

эффективность, с подтвержденной многочисленными исследованиями высокой фототоксичностью в отношении разных типов опухолей. Далее рассмотрены векторы, которые исследуются только недавно, эффективность которых показана в ограниченном количестве работ, и, наконец, векторы, применение которых имеет

Принятые сокращения: 5-АЛК – 5-аминолевулиновая кислота; АТ – антитела; Вир – виросома; Гц – гиперицин; ДМЭ-Хл – диметиловый эфир хлорина еб; Кур – куркумин; ЛПВП – липопротеины высокой плотности; ЛПНП – липопротеины низкой плотности; ЛпС – липосома; М – манноза; НЧ – наночастица; П – пептид; Пиро-Фео – пиррофеофорбид А; ПпIX – протопорфилин IX; ПЭГ – полиэтиленгликоль; Тмф – тамоксифен; Тф – трансферрин; Тф(п) – пептид, связывающийся с рецепторами к трансферрину; ФДТ – фотодинамическая терапия; ФеоА – феофорбид А; ФК – фолиевая кислота; Хл – хлорин еб; Э2 – эстрадиол; АlPc – фталоцианин алюминия; АlPcS4 – тетрасульфированный фталоцианин алюминия; ВPD-МА – производное бензопорфирина; EGF – эпидермальный фактор роста; EGFR – рецептор к эпидермальному фактору роста; G – глюкоза; IC₅₀ – концентрация полумаксимального ингибирования; Pс – фталоцианин; SiPc – фталоцианин кремния, ZnPc – фталоцианин цинка.

серьезные технические или иные ограничения. При оценке перспективности и эффективности векторов автор данного обзора в первую очередь ориентировался на сравнительные данные исследователей по фототоксичности нацеленного фотосенсибилизатора в сравнении с фотосенсибилизатором, не связанным с таргетной молекулой. В данном обзоре рассмотрены в основном те исследования, в которых имеются указанные сравнительные данные. Показателем, оцениваемым в большинстве рассмотренных в обзоре работ, является IC_{50} – полумаксимальная ингибирующая концентрация фотосенсибилизатора, вызывающая гибель 50% клеток. Сравнивая разницу в значениях этого показателя для нацеленных и ненацеленных фотосенсибилизаторов, можно наиболее достоверно оценить эффективность разных векторов доставки. В качестве дополнительного критерия для сравнительной оценки использован показатель увеличения уровня накопления фотосенсибилизатора в опухолевых клетках при использовании вектора доставки. Однако, как отмечает Schneider et al. [1], оценка внутриклеточного накопления фотосенсибилизатора не всегда корректна, поскольку уровень накопления фотосенсибилизатора в опухоли не всегда коррелирует с уровнем его фототоксичности. Например, накопление фотосенсибилизатора в клетках внутри эндосом и лизосом может быть менее эффективным, чем у соответствующего неконъюгированного фотосенсибилизатора, накапливающегося в цитоплазме, несмотря на повышенное внутриклеточное поглощение.

В наиболее важных обзорах по данной тематике, опубликованных за последние несколько лет [1–4], оценка эффективности разных векторов проведена с учетом сравнения между собой эффективности разных конъюгатов с векторными молекулами. Такой подход не является оптимальным, так как в нем не учитывается разница в эффективности исходных фотосенсибилизаторов и разные условия проведения экспериментов. Новизна данного обзора связана с тем, что оценка рассмотренных векторов доставки произведена по наиболее объективному критерию – величине изменения показателя IC_{50} нацеленного фотосенсибилизатора в сравнении с аналогичным показателем ненацеленного фотосенсибилизатора в одинаковых условиях.

ФОТОДИНАМИЧЕСКАЯ ТЕРАПИЯ

В основе метода фотодинамической терапии (ФДТ) злокачественных новообразований

лежит селективное накопление в опухолевой ткани фотосенсибилизатора, который при облучении светом с длиной волны, соответствующей максимуму его поглощения, вызывает образование синглетного кислорода и других цитотоксических соединений, вызывающих повреждение структурных элементов опухолевой ткани.

При облучении соответствующей длиной волны фотосенсибилизатор поглощает один фотон и переходит из основного состояния (S_0) в первое синглетное возбужденное состояние (S_1) или в более высокие синглетные возбужденные состояния (S_n). Состояния S_n быстро переходят в S_1 путем внутренней конверсии. Фотосенсибилизатор в возбужденном состоянии S_1 нестабилен, время его жизни составляет несколько наносекунд, и он быстро переходит в основное состояние S_0 , что сопровождается флуоресценцией или рассеиванием энергии в виде тепла (рис. 1). Из состояния S_1 может произойти переход в возбужденное состояние T_1 путем интеркомбинационной конверсии. Фотосенсибилизатор в возбужденном состоянии T_1 обычно характеризуется более длительным временем жизни (от мкс до с) и может вступать в различные фотофизические и фотохимические процессы, такие как фосфоресценция и образование синглетного кислорода 1O_2 с последующей генерацией других активных форм кислорода [2, 3].

К химическим соединениям, применяемым в качестве фотосенсибилизаторов для ФДТ, предъявляют определенные требования, среди которых стабильность химического состава, максимум поглощения, лежащий в области так называемого «терапевтического окна», где поглощение собственных тканей минимально, высокий квантовый выход генерации синглетного кислорода, а также, в качестве одного из основных требований, высокая селективность накопления в опухоли. Последнее обеспечивает высокую фотодинамическую активность, возможность использования низких терапевтических доз, минимальное воздействие на окружающие здоровые ткани при облучении и низкую кожную фототоксичность [5–7].

В большинстве стран первыми фотосенсибилизаторами, разрешенными для применения в клинической практике, были производные гематопорфирина – фотофрин и его аналоги. Наиболее длинноволновая полоса поглощения порфиринов лежит в области 620–640 нм. Вследствие этого ФДТ с данными фотосенсибилизаторами вызывает в опухолях ограниченные по глубине фотоиндуцированные некрозы. Также эти препараты характеризуются низкой

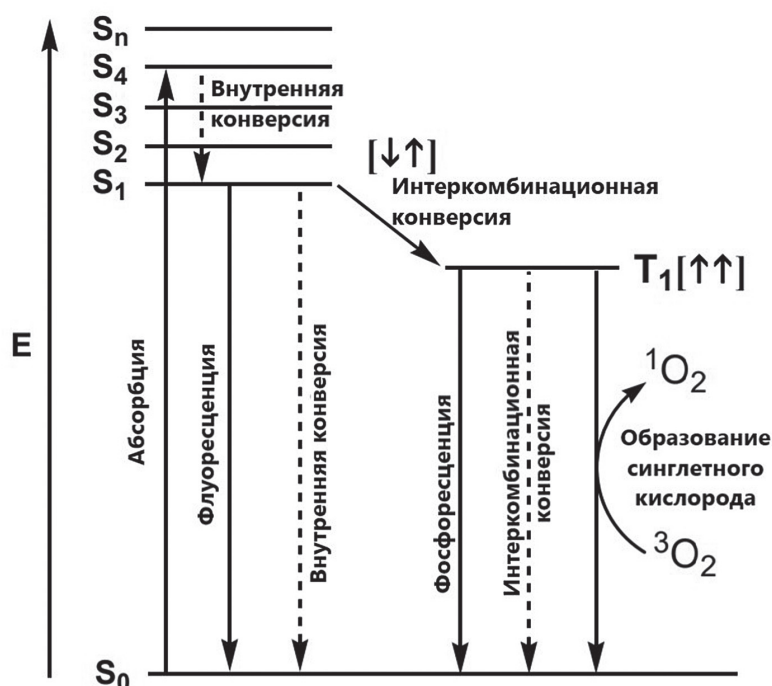


Рис. 1. Модифицированная диаграмма Яблонского. Фотофизические процессы фотодинамической терапии

селективностью накопления в опухолевой ткани по сравнению с окружающими здоровыми тканями и кожей, что является причиной высокой кожной фототоксичности, ограничивающей их клиническое применение [5–8].

При разработке фотосенсибилизаторов последующих поколений основными критериями для их успешного внедрения в клиническую практику стали смещение максимумов поглощения в более длинноволновую область спектра (650–670 нм и более), что позволило обеспечить большую глубину поражения опухолевой ткани, а также повышение селективности по отношению к опухолевой ткани по сравнению с препаратами первого поколения. К этим препаратам относятся фотосенсибилизаторы на основе фталоцианинов (Pc), хлоринов, бактериохлорина и их производных (фотосенс, темпорфин, пурлитин, фоскан, фотодитазин, радахлорин, фотохлорин, фотолон, бактериосенс и др.) [5, 6, 8, 9].

СЕЛЕКТИВНОСТЬ НАКОПЛЕНИЯ НЕНАЦЕЛЕННЫХ ФОТОСЕНСИБИЛИЗАТОРОВ В ОПУХОЛИ

Селективность накопления фотосенсибилизаторов в опухолевой ткани – один из основных параметров ФДТ [5, 10]. Низкая тропность фотосенсибилизаторов к опухолевой ткани приводит к необходимости повышения

их эффективных концентраций и накоплению фотосенсибилизаторов в здоровых органах и тканях, в том числе в коже, что вызывает ее фотосенсибилизацию и развитие тяжелой кожной фототоксичности.

Для фотосенсибилизаторов разной химической природы существуют разные теории, объясняющие избирательность их накопления в опухоли.

Хорошо известно, что при введении в кровоток все липофильные фотосенсибилизаторы связываются с белками сыворотки, включая в первую очередь липопротеины низкой плотности (ЛПНП), а также липопротеины высокой плотности (ЛПВП) и альбумин, и только небольшая их часть оказывается в свободном состоянии. Молекулы фотосенсибилизаторов связываются с белками за счет электростатических, ван-дер-ваальсовых, гидрофобных и водородных взаимодействий. Включение гидрофобных фотосенсибилизаторов (в первую очередь производных гематопорфирина) в ЛПНП обусловлено в основном гидрофобными взаимодействиями, тогда как более гидрофильные фотосенсибилизаторы связываются с альбумином [3, 10–12]. Доказано, что фталоцианин цинка (ZnPc) и этиопурпурин олова могут транспортироваться в составе ЛПВП. Некоторые хлорины и тетрафенилпорфины (N-аспартилхлорин е6, мезо-тетра-гидроксибензилхлорин, тетрафенилпорфины) переносятся в основном альбумином, а хлорин е6 (Хл) и суль-

фированный фталоцианин алюминия (AlPcS) примерно в равной степени связываются с альбумином и ЛПВП; значительная роль в переносе производного бензопорфирина, AlPcS и ZnPc также отводится ЛПНП. Следует отметить, что липопротеины не фагоцитируются клетками крови и длительно циркулируют в кровеносном русле [10, 13–16].

Из других механизмов селективного накопления фотосенсибилизаторов в опухоли некоторые авторы отмечают повышенную продукцию в опухолевых клетках коллагена, связывающего порфирины, что также может способствовать селективному накоплению фотосенсибилизаторов с порфириновой структурой в опухолевой ткани [17]. Вместе с тем, как отмечается в некоторых работах, высокое содержание коллагена во внеклеточном матриксе опухолевых тканей приводит к плохому проникновению и удержанию фотосенсибилизатора (например, хлоринов) и значительно ограничивает эффективность ФДТ [18].

На избирательность накопления фотосенсибилизаторов в опухоли значительное влияние оказывают низкие значения pH опухоли по сравнению с нормальными тканями за счет избыточного производства лактата при активном гликолизе в опухолевых клетках. В кислой среде анионные фотосенсибилизаторы лучше растворяются в водных растворах и вследствие этого лучше накапливаются в клетках [19, 20].

Согласно еще одной теории, повышенное содержание фотосенсибилизаторов в опухолевой ткани связано с увеличением в ней количества макрофагов. Макрофаги в большей степени, чем сами опухолевые клетки, накапливают фотосенсибилизаторы за счет поглощения их агрегированных комплексов путем фагоцитоза. За рубежом проведено сравнительное изучение накопления в макрофагах и опухолевых клетках протопорфирина IX (ПпIX), индуцированного приемом 5-аминолевулиновой кислоты (5-АЛК). Отмечено, что накопление в макрофагах было значительно выше, чем в опухолевых клетках [21].

По еще одной версии, фотосенсибилизаторы с одинаковой скоростью накапливаются в опухолевой и неизменной тканях, однако в опухолевой ткани они задерживаются на более длительное время. Объясняют это тем, что молекулы фотосенсибилизатора, связанные с белками или агрегированные между собой, из-за своего размера могут элиминировать из опухолевой ткани только с оттоком лимфы, а в опухолях лимфатическая система развита слабо [4, 19, 22]. Так, в исследованиях показано, что для эфира дигематопорфирина (актив-

ного компонента производного гематопорфирина) характерна высокая агрегация в водных растворах даже при наличии альбуминов в концентрации, подобной той, которая имеется в сыворотке крови [23].

К отдельной группе фотосенсибилизаторов, так называемых профотосенсибилизаторов, относятся лекарственные препараты на основе 5-АЛК. 5-АЛК является промежуточным метаболитом биосинтеза гема (рис. 2). В биосинтезе гема лимитирующим скорость этапом является образование 5-АЛК из сукцинил-КоА и глицина. Системное экзогенное введение 5-АЛК увеличивает скорость продукции фотоактивного ПпIX во всех клетках организма, в которых происходит процесс биосинтеза гема. В присутствии ионов Fe^{2+} фермент феррохелатаза (ЕС 4.99.1.1) катализирует превращение ПпIX в фотонеактивный гем. В неизменных клетках этот процесс происходит довольно быстро (2–4 часа). В опухолевых клетках в связи с большей активностью ферментов начального этапа синтеза гема (в частности, порфобилиногендеаминазы (ЕС 2.5.1.61)), а также со снижением активности в них (из-за ограниченной доступности Fe^{2+}) феррохелатазы происходит накопление фотоактивного ПпIX (рис. 2). Увеличение концентрации ПпIX в опухоли происходит в течение нескольких часов, а высокий уровень его удерживается до 24 часов, в то время как в нормальных клетках ПпIX быстро превращается в фотонеактивный гем под действием феррохелатазы. Таким образом, в интервале приблизительно от 2 до 24 часов наблюдается значительная разница (до 10–15 раз) между концентрацией фотоактивного ПпIX в опухолевых и здоровых тканях. Это позволяет выполнять процедуру ФДТ с минимальным воздействием на здоровые ткани, а также с высокой эффективностью проводить флуоресцентную диагностику для выявления опухолей и уточнения их границ [24, 25].

При местном введении поступление 5-АЛК в опухолевые ткани и клетки связано с определенными проблемами. При физиологических значениях 5-АЛК представляет собой гидрофильный цвиттерион. Подобные соединения имеют ограниченную способность преодолевать биологические барьеры, такие как клеточные мембраны или роговой слой кожи [26]. Хотя в экспериментах *in vitro* было показано, что при местном применении 5-АЛК проникает в подкожную клетчатку, небольшая глубина ее проникновения во всю кожу является одним из основных ограничений использования 5-АЛК для локальной ФДТ [27–29]. Для увеличения проникающей способности 5-АЛК

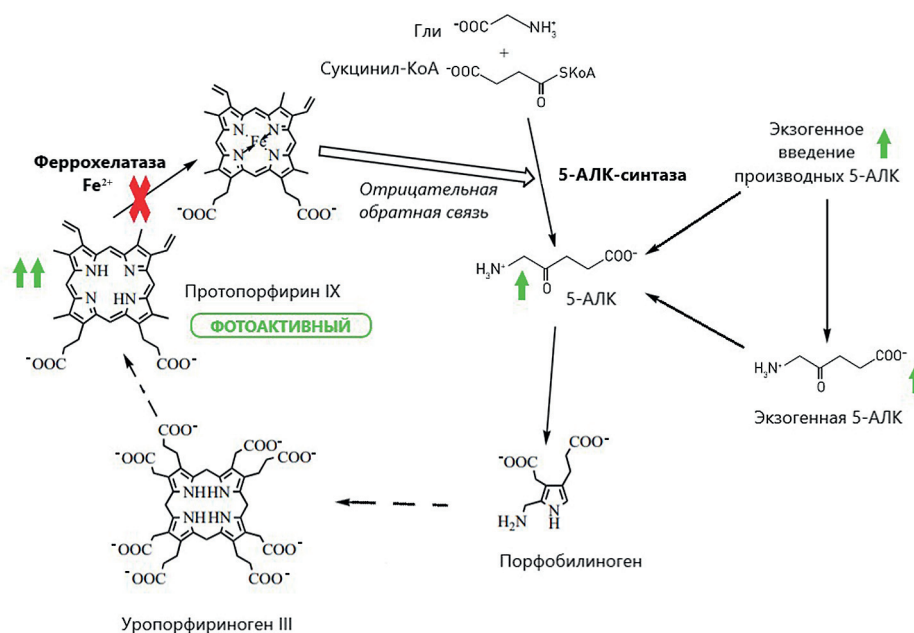


Рис. 2. Механизм накопления фотоактивного протопорфина IX в опухолевых клетках при экзогенном введении 5-АЛК и ее производных

были предприняты попытки разработки модифицированных составов 5-АЛК: добавление ДМСО, ЭДТА или использование липосом (ЛпС) [30, 31]. Другой способ заключается в этерификации 5-АЛК с получением более липофильного соединения. Peng et al. [32] и Kloek и Henegouwen [26, 33] были первыми, кто разработал концепцию использования этерифицированных производных 5-АЛК для повышения эффективности ФДТ, и продемонстрировали, что местное применение различных эфиров 5-АЛК (метиловый, этиловый и пропиловый эфиры) на коже здоровых мышей приводило к более высокой интенсивности флуоресценции ПпIX, чем при применении неэтерифицированной 5-АЛК. Позже эти данные были подтверждены в многочисленных клинических исследованиях.

Наши исследования эффективности гексилового эфира 5-АЛК для флуоресцентной диагностики опухолей мочевого пузыря показали, что данный фотосенсибилизатор демонстрирует не только более глубокое проникновение в опухолевые ткани, но и более высокую селективность в отношении опухоли, чем свободная 5-АЛК [27, 28, 34–36]. Так, в сравнительном исследовании эффективности препаратов 5-АЛК и гексилового эфира 5-АЛК [28] было показано, что интенсивность флуоресценции нормальной слизистой мочевого пузыря кролика после инстилляций 0,0001%-го раствора гексилового эфира 5-АЛК была сопоставима с аналогичным показателем при инстилляции в мочевой пузырь 0,3%-го раствора 5-АЛК.

А в проспективном многоцентровом клиническом исследовании препарата «Гексвикс» на основе гексилового эфира 5-АЛК [34] проведение флуоресцентной диагностики опухолей мочевого пузыря с этим препаратом у 124 пациентов позволило дополнительно выявить у 34 (27,4%) пациентов 65 флуоресцирующих очагов, не определяемых в белом свете, в которых при морфологическом исследовании был подтвержден опухолевый процесс. При этом флуоресцентная контрастность опухолевой ткани относительно окружающей неизмененной слизистой в среднем достигала 4,3–7,6, что в 1,5 раза выше, чем при использовании 5-АЛК.

ПОВЫШЕНИЕ СЕЛЕКТИВНОСТИ НАКОПЛЕНИЯ ФОТОСЕНСИБИЛИЗАТОРОВ В ОПУХОЛЕВОЙ ТКАНИ ЗА СЧЕТ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ СПЕЦИАЛИЗИРОВАННЫХ ТРАНСПОРТНЫХ СИСТЕМ

При ФДТ общее распространение фотосенсибилизатора по всему телу приводит к генерализованной фотосенсибилизации, кожной фототоксичности и плохой переносимости лечения пациентами. Поиск путей повышения селективности накопления фотосенсибилизаторов в опухолевых тканях идет по двум направлениям: разработка новых фотосенсибилизаторов, обладающих большей тропностью по отношению к опухолевым тканям, и использование транспортных систем для направ-

ленной доставки фотосенсибилизатора к тканям-мишеням. Во втором случае повышение селективности фотосенсибилизатора достигается путем его модификации специальными лигандами (векторами), которые будут нацелены на определенные рецепторы или ферменты. Выбор стратегии нацеливания фотосенсибилизатора на опухоль основывается на различиях в активности метаболических путей и профилях экспрессии генов в опухолевых и здоровых клетках. Так, отдельные опухолевые линии могут характеризоваться повышенной или пониженной экспрессией генов определенных ферментов, рецепторов или трансмембранных переносчиков. Фотосенсибилизаторы могут быть функционализированы белками, пептидами, а также небелковыми лигандами, такими как металлоорганические соединения. В качестве альтернативы фотосенсибилизаторы могут быть инкапсулированы в наночастицы (НЧ), несущие нацеливающие агенты, что снижает концентрацию свободно циркулирующего фотосенсибилизатора [3, 10].

На рис. 3 схематически изображены возможные формы транспортных систем для направленной доставки фотосенсибилизаторов в опухоли. В разделах, посвященных конкретным таргетным молекулам/системам, подробно рассмотрен состав каждой системы.

Далее рассмотрены основные векторы, используемые для нацеленной доставки фотосенсибилизаторов в ткани опухоли.

КОНЬЮГАЦИЯ ФОТОСЕНСИБИЛИЗАТОРОВ С ТРАНСФЕРРИНОМ

Все быстро делящиеся клетки нуждаются в постоянном притоке железа. Свободное железо не встречается в биологических системах, оно транспортируется и хранится в виде хелатных соединений с белками. Трансферрин (Тф, молекулярная масса 80 кДа) является основным циркулирующим транспортным белком ионов железа. Он содержится в крови на уровне около 3 г/л, и каждая молекула Тф может связывать два иона железа. Некоторые типы опухолевых клеток демонстрируют повышенную экспрессию рецептора Тф, и, следовательно, Тф может являться перспективным агентом для таргетной доставки фотосенсибилизаторов в опухолевые клетки [3, 37].

Тф может быть напрямую соединен с фотосенсибилизатором через линкер (рис. 3, а), например, через аминокэтил-сефадекс [38]. Для линкеров, соединяющих фотосенсибилизатор

с вектором, важными свойствами являются гидрофильность (для повышения водорастворимости конъюгата и, следовательно, эффективности таргетной доставки) и легкое расщепление связи между линкером и фотосенсибилизатором после доставки лекарства в клетку-мишень. Тф также может быть включен в состав более сложных транспортных систем. Так, в работах Gijssens et al. [39] и Derycke et al. [40] AlPcS был загружен в ЛпС, покрытые полиэтиленгликолем (ПЭГ-ЛпС), конъюгированные с Тф через линкер дистеарилфосфатидилэтанолламин (липосомальный липид), соединенный с ПЭГ, несущим на дистальном конце малеимидную группу (рис. 3, в). В другом исследовании [41] производное бензопорфирина (BPD-MA) было связано с поверхностью НЧ сополимера молочной и гликолевой кислот с ПЭГ, соединенных тиол-малеимидной связью с пептидом, связывающим рецепторы Тф (рис. 3, г).

Эффективность использования Тф в качестве нацеливающей молекулы доказана многими экспериментальными исследованиями. Hamblin и Newman [42] изучали комплексы гематопорфирина, ковалентно связанного с Тф. Авторы показали, что поглощение конъюгата фибробластами мыши NIH 3T3 и клетками рака толстой кишки человека HT29 опосредовано рецептором Тф. При этом авторы отмечают, что транспортной активности рецептора Тф может быть недостаточно для доставки фототоксичной дозы комплекса фотосенсибилизатора с Тф к опухолевым клеткам *in vivo*.

В других исследованиях оценивали эффективность конъюгата Тф с Хл [38]. Результаты эксперимента со светозависимым окислением тетраметилбензида показали, что квантовый выход синглетного кислорода конъюгата составляет примерно 70% эффективности нативного Хл. Однако высокое поглощение конъюгата обеспечивает увеличение его эффективности при одинаковых концентрациях. Конъюгат оказался в 10–40 раз более фототоксичен в отношении клеток аденокарциномы молочной железы человека MCF-7 и крысы MTLn3, чем свободный Хл: IC₅₀ для Хл – 4 мкг/мл, для конъюгата с Тф (Хл–Тф) – 0,1–0,4 мкг/мл (в пересчете на Хл).

Исследования фотодинамической активности конъюгата гиперперина с трансферрином (Гц–Тф) [43] показали снижение IC₅₀ для конъюгата в 2–2,5 раза по сравнению с неконъюгированным фотосенсибилизатором. На культуре клеток SW480 при одних и тех же параметрах облучения IC₅₀ для Гц составила 5 мкМ, для Гц–Тф – 2,5 мкМ; на клетках HCT116 и Caco2 IC₅₀ для Гц – 2,5 мкМ, для Гц–Тф – 1 мкМ.

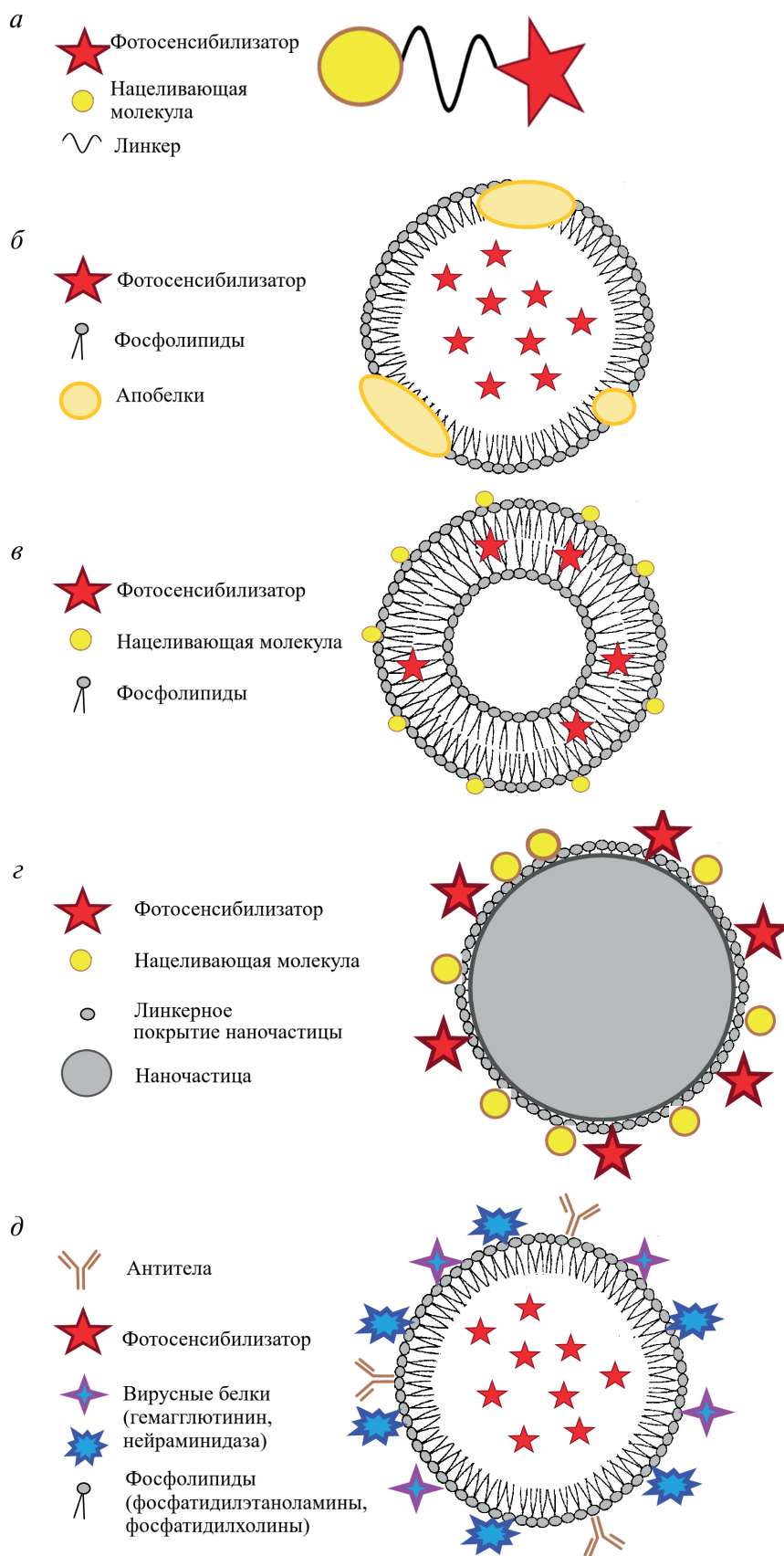


Рис. 3. Возможные стратегии соединения фотосенсибилизаторов с нацеливающими молекулами. *а* – Фотосенсибилизатор соединяется с нацеливающей молекулой через линкер. *б* – Фотосенсибилизатор включен в состав липопротеина, связанного с нацеливающими молекулами. *в* – Нагруженная фотосенсибилизатором липосома связана с нацеливающими молекулами. *г* – Нагруженная фотосенсибилизатором наночастица связана с нацеливающими молекулами. *д* – Нагруженная фотосенсибилизатором виросома связана с нацеливающими молекулами (антителами)

Gijssens et al. [39] использовали Тф в качестве вектора направленной доставки для содержащих тетрасульфированный фталоцианин алюминия (AlPcS₄) ЛпС, покрытых ПЭГ. После 24-часовой инкубации клеток HeLa с фотосенсибилизатором и его конъюгатом в одинаковой концентрации (10 мкМ по AlPcS₄) внутриклеточная концентрация фотосенсибилизатора составляла 37,3 мкМ для свободного AlPcS₄, 4,9 мкМ – для фотосенсибилизатора в составе ЛпС (ЛпС–AlPcS₄) и 136,5 мкМ – для фотосенсибилизатора в составе ЛпС, конъюгированных с Тф (ЛпС–AlPcS₄–Тф). Из приведенных данных видно, что включение фотосенсибилизатора в состав ЛпС снижало его накопление в опухоли, однако функционализация ЛпС Тф повышала накопление даже выше уровня исходного свободного фотосенсибилизатора. Исследования показали, что конъюгаты ЛпС–AlPcS₄–Тф были в 10 раз более фототоксичны в отношении клеток HeLa, чем свободный AlPcS₄, при этом ПЭГ–ЛпС без фотосенсибилизатора не проявляли фототоксичности. Было показано, что эта высокая фототоксичность индуцируется внутриклеточным накоплением AlPcS₄, которое резко снижается в присутствии свободного Тф. Это объясняется конкуренцией за рецептор Тф между свободным и связанным с ЛпС Тф. При одних и тех же параметрах облучения IC₅₀ для AlPcS₄ составила 6,3 мкМ, для ЛпС–AlPcS₄–Тф – 0,63 мкМ, для ЛпС–AlPcS₄ IC₅₀ не была достигнута.

Те же авторы продолжили исследования разработанного конъюгата на культуре клеток АУ-27 [40]. После 24-часовой инкубации клеток АУ-27 с фотосенсибилизатором и его конъюгатом в одинаковой концентрации (10 мкМ по AlPcS₄) внутриклеточная концентрация фотосенсибилизатора составляла 3,7 мкМ для свободного AlPcS₄, 52,7 мкМ – для ЛпС–AlPcS₄ и 384,1 мкМ – для ЛпС–AlPcS₄–Тф. Исследования этой системы *in vivo* также показали ее высокую специфичность в отношении трансплантированных крысам опухолей мочевого пузыря по сравнению с нормальными тканями.

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ ФОЛИЕВОЙ КИСЛОТЫ ДЛЯ НАПРАВЛЕННОЙ ДОСТАВКИ ФОТОСЕНСИБИЛИЗАТОРОВ В ОПУХОЛЕВЫЕ КЛЕТКИ

Использование фолиевой кислоты (ФК) для нацеливания на опухолевые клетки – одно из самых перспективных и активно развивающихся в последние годы направлений таргетной доставки фотосенсибилизатора в опухоль. К не-

сомненным преимуществам использования ФК относятся ее доступность, низкая стоимость, биосовместимость, возможность применения с разными таргетными системами (прямая сшивка с фотосенсибилизатором через линкер, конъюгация с ЛпС или НЧ), гиперэкспрессия рецептора ФК на поверхности многих опухолевых клеток, включая опухоли головного мозга, легких, яичников, молочной железы, толстой кишки, предстательной железы, носа, горла, гемопоэтические злокачественные новообразования миелоидного происхождения, включая хронические и острые миелогенные лейкозы. При этом высоко недифференцированные метастатические опухоли экспрессируют значительно больше рецепторов ФК, чем их локализованные аналоги с низкой степенью злокачественности [44–51]. Гиперэкспрессия рецептора ФК не обнаруживается в клетках нормальных тканей, за исключением активированных макрофагов при некоторых воспалительных заболеваниях. Все это позволяет использовать ФК как вектор для направленной доставки фотосенсибилизатора к опухоли [3, 52, 53].

В более ранних исследованиях [44–45] использовали конъюгаты фотосенсибилизаторов, связанных с ФК через линкеры различной химической природы (рис. 3, а). В качестве линкера для присоединения ФК может быть использован глутамат [54], также описано успешное применение 1,6-диаминогексана и 2,20-(этилендиокси)-бис-(этиламина) [44–45]. В исследованиях последних лет применяют более сложные транспортные конструкции. Так, в работе Nwaha et al. [46] использовали нагруженные фотосенсибилизатором ЛпС, связанные с ФК (рис. 3, в). В ряде исследований в качестве транспортной системы применяют модифицированные НЧ, связанные с фотосенсибилизатором и ФК (рис. 3, г). В работах Liang et al. [47], Akbarzadeh et al. [48] и Pan et al. [55] были изучены НЧ оксида титана и висмута, модифицированные линкерами с аминогруппами (например, АРТЕС (3-аминопропил-триэтоксисилан)), в работе Hwang et al. [49] – НЧ оксида железа, покрытые ПЭГ, а в работе Son et al. [50] – полимерные НЧ, покрытые фосфолипидами, модифицированными ПЭГ.

В последние несколько лет данное направление таргетной доставки активно развивается. Показана перспективность использования ФК как вектора таргетной доставки в опухоль для многих фотосенсибилизаторов, в том числе для тетрафенилпорфинов [44], ZnPc [46] и AlPc [47, 55], 5-АЛК [48], ФеоА [49, 50], производных хлорина [45, 51, 56].

В экспериментах на клетках носоглотки человека KB при прямом конъюгировании с ФК клеточное поглощение и фотодинамическая активность конъюгата тетрафенилпорфирина и аналога мета-тетра(гидроксифенил)хлорина значительно увеличивались по сравнению со свободным фотосенсибилизатором [44, 45]. В работе Schneider et al. [44] накопление конъюгированного с ФК тетрафенилпорфирина в опухолевых клетках KB (оцененное по интенсивности флуоресценции) в экспериментах *in vitro* было выше в 10–15 раз, чем для свободного фотосенсибилизатора. В другом исследовании [45] в экспериментах *in vivo* на опухолевой модели KB у мышей было показано, что и селективность накопления в опухоли по сравнению с здоровыми окружающими тканями тоже увеличивается после конъюгации: селективность накопления конъюгата аналога мета-тетра(гидроксифенил)хлорина составила 5,0, а при использовании свободного фотосенсибилизатора – 2,1. В работе Schneider et al. [44] 24-часовая инкубация клеток KB с тетрафенилпорфирином, конъюгированным с бычьим альбумином, в достаточно низкой концентрации (10 мкМ) с последующим облучением не приводила к гибели клеток, а при проведении облучения после инкубации клеток с конъюгатами фотосенсибилизатора с ФК с той же концентрацией фотосенсибилизатора доля погибших клеток достигала 30–70% от контроля в зависимости от использованного линкера и параметров облучения. Данные по IC_{50} авторами не представлены (показатели не были достигнуты в изучаемом диапазоне концентраций (до 30 мкМ)).

Nwahara et al. [46] изучали фотодинамическую активность ZnPc с использованием в качестве транспортной системы ЛпС, связанных с ФК. Авторы показали в экспериментах *in vitro* с использованием флуоресцентной визуализации увеличение специфичности фотосенсибилизатора в отношении клеток HeLa и MCF-7 со сверхэкспрессией рецептора ФК с использованием флуоресцентной визуализации. На клетках HeLa интенсивность флуоресценции фотосенсибилизатора в составе ЛпС, связанных с ФК, была почти в 3 раза выше, чем при использовании ЛпС с фотосенсибилизатором без ФК. По результатам исследования авторами сделан вывод, что подобная транспортная система обладает превосходной противоопухолевой эффективностью в условиях гипоксии и располагает потенциалом для снижения побочных эффектов, связанных с нецелевой терапией. Последнее особенно актуально для фотосенсибилизаторов на основе Pc, основным побочным эффектом которых является длительная кожная фототоксичность.

Транспортные системы на основе НЧ, связанных с ФК, также демонстрируют повышение уровня накопления фотосенсибилизатора в опухолевых клетках и его фотодинамической активности. Так, в работе Liang et al. [47] при одной и той же концентрации фталоцианина алюминия (10 мкг/мл) и условиях облучения выживаемость клеток HeLa при использовании фталоцианина алюминия AlPc в свободном виде составила 92%, а для комплекса НЧ оксида титана, нагруженного фотосенсибилизатором и модифицированных ФК (НЧ–AlPc–ФК) – менее 35%. Akbarzadeh et al. [48] сообщили, что интенсивность флуоресценции ПпIX на клетках KB для конъюгата НЧ оксида висмута с 5-АЛК и ФК (НЧ–5-АЛК–ФК) была в 2–3 раза (в зависимости от времени инкубации) выше, чем для свободной 5-АЛК, и в 1,5–2,3 раза выше, чем для НЧ с 5-АЛК, но без ФК (НЧ–5-АЛК). Согласно данным, представленным авторами, выживаемость клеток KB после инкубации с 5-АЛК, НЧ–5-АЛК и НЧ–5-АЛК–ФК (концентрация 5-АЛК во всех случаях – 20 мкг/мл) и проведения облучения составила 85%, 65% и 50%. IC_{50} для 5-АЛК, НЧ–5-АЛК и НЧ–5-АЛК–ФК составила 170, 110 и 90 мкг/мл. Hwang et al. [49] в аналогичном исследовании НЧ оксида железа, покрытых ПЭГ, связанных с FeoA и ФК (НЧ–FeoA–ФК), на клетках KB получили разницу в интенсивности флуоресценции для НЧ–FeoA–ФК по сравнению с НЧ–FeoA и FeoA в 3 и 4 раза соответственно. Выживаемость клеток KB после инкубации с FeoA, НЧ–FeoA и НЧ–FeoA–ФК (концентрация FeoA во всех случаях – 200 мкМ) и проведения облучения составила 95%, 65% и 10%. Значения IC_{50} для НЧ–FeoA–ФК были достигнуты при концентрации 50 мкг/мл (в пересчете на FeoA), а для свободного FeoA и НЧ–FeoA значения IC_{50} не были достигнуты при 200 мкг/мл (то есть разница в показателях IC_{50} составляет более, чем 4 раза). По данным Bharathiraja et al. [51], выживаемость клеток MDA-MB-231 после инкубации с НЧ кремния, связанными с Хл и ФК (НЧ–Хл–ФК), и облучения составила 20%, а после инкубации со свободным Хл в той же концентрации (5 мкМ) и облучения – 80%.

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ EGF ДЛЯ НАПРАВЛЕННОЙ ДОСТАВКИ ФОТОСЕНСИБИЛИЗАТОРОВ В ОПУХОЛЕВЫЕ КЛЕТКИ

Некоторые опухолевые клетки экспрессируют повышенное количество рецепторов эпидермального фактора роста (EGF) [57].

EGF представляет собой небольшой полипептид (молекулярная масса 6 кДа). Рецептор EGF (EGFR) является трансмембранным белком с тирозинкиназной активностью. При связывании с поверхностным рецептором производные EGF поглощаются клетками путем рецептор-опосредованного эндоцитоза, что обеспечивает их внутриклеточное накопление [58].

Для связывания фотосенсибилизаторов с EGF используются как простые модели — через линкер (рис. 3, а), причем в качестве линкера могут выступать декстраны, поливиниловый спирт, сывороточный альбумин [2, 59, 60], так и более сложные конструкции, например, НЧ золота, связанные с фотосенсибилизатором и EGF (рис. 3, з) [61].

Lutsenko et al. [59] в экспериментах на клетках карциномы молочной железы человека MCF-7 продемонстрировали 7-кратное увеличение фотодинамической активности AlPcS2, связанного с EGF (AlPcS2–EGF), по сравнению со свободным фталоцианином (AlPcS2): IC_{50} составила 1,6 мкМ для AlPcS2–EGF и 11 мкМ — для AlPcS2. В экспериментах на клетках В16 разница была не столь значительная: IC_{50} составила 2,5 мкМ для AlPcS2–EGF против 6,1 мкМ — для AlPcS2 (разница в 2,4 раза). В других исследованиях [60] фотодинамическая активность конъюгата производного хлорина е6 с EGF в отношении клеток аденокарциномы молочной железы MDA-MB-468 была значительно сильнее, чем у свободного фотосенсибилизатора. Еще в одном исследовании Castilho et al. [61] показали высокую фотодинамическую активность НЧ золота, связанных с Хл и EGF, в отношении клеток трижды негативного рака молочной железы MDA-MB-468. В исследовании Tsai et al. [62] использование EGF для таргетной доставки НЧ хитозана, нагруженных фотосенсибилизатором куркумином (Кур), в опухолевые клетки, вызвало почти 4-кратное снижение IC_{50} по сравнению с использованием ненацеленных НЧ. На клетках MKN45 IC_{50} для комплекса НЧ с фотосенсибилизатором и EGF (НЧ–Кур–EGF) составила 3,4 мкМ, для ненацеленных НЧ (НЧ–Кур) — 11,9 мкМ. На клетках GES результаты были хуже и почти не различались для нацеленных и ненацеленных НЧ: IC_{50} для НЧ–Кур–EGF составила 12,8 мкМ, для НЧ–Кур — 13,1 мкМ.

КОНЬЮГАЦИЯ ФОТОСЕНСИБИЛИЗАТОРОВ С ПЕПТИДНЫМИ ЛИГАНДАМИ

Пептиды, как и белки, представляют собой полимеры аминокислот, соединенных вместе

пептидными связями, но их размер и молекулярная масса существенно меньше, чем у белков. Обычно считается, что пептиды состоят менее чем из пятидесяти аминокислот. Это приводит к нечетко определенной третичной структуре и высокому сродству к связыванию с рецепторами. Пептиды могут быть легко синтезированы. По сравнению с белками они обычно обладают улучшенным проникновением в ткани, а также повышенной чувствительностью к пептидазам и быстрым клиренсом.

В 2006 г. Schneider et al. [1] опубликовали обзор конъюгатов фотосенсибилизаторов с различными пептидами. Авторы отмечают, что, несмотря на идентификацию в последние годы значительного количества тропных к опухолевым клеткам пептидов, только небольшое количество конъюгатов пептидов с фотосенсибилизаторами были протестированы *in vivo* с оценкой их фотодинамической активности. Одной из причин сложности изучения этих конъюгатов является присущая немодифицированным пептидам ферментативная нестабильность. В свою очередь, пептиды обычно менее токсичны, более растворимы, и их легче идентифицировать и синтезировать, чем небольшие органические молекулы-мишени. Чтобы пептиды можно было использовать в качестве эффективных систем для транспортной доставки, их необходимо химически модифицировать. Наиболее распространенными стратегиями повышения стабильности пептидов являются использование D-аминокислот, псевдоаминокислот и циклизация пептидов [2].

Пептиды могут соединяться с фотосенсибилизатором напрямую, через линкер (рис. 3, а) [63] или входить в состав более сложных транспортных систем, связываясь, например с НЧ (рис. 3, д) [41, 64].

Конъюгация с пептидами используется для повышения селективности доставки в опухолевые ткани фотосенсибилизаторов на основе Хл [65, 66], Рс [63], ФеоА [67], 5-АЛК [64] и других химических групп.

Во многих работах показано, что конъюгация с пептидами повышает и селективность доставки, и фотодинамическую активность фотосенсибилизаторов. Так, Yan et al. [67] использовали для повышения селективности доставки фотосенсибилизатора пиррофеофорбида А (Пиро-Фео) к раковым стволовым клеткам колоректального рака конъюгацию фотосенсибилизатора с пептидом, нацеленным на CD133, который высоко экспрессируется на этих клетках и коррелирует с плохим прогнозом пациентов с колоректальным раком. Синтезированный конъюгат продемонстрировал

способность к адресной доставке и высокую фотодинамическую активность на культуре раковых стволовых клеток колоректального рака, полученных из клеточных линий HT29 и SW620, и на опухолевой модели у мышей с ксенотрансплантатом.

В исследовании Liu et al. [63] изучали фототоксичность конъюгатов фталоцианина кремния с пептидом, нацеленным на $\alpha_v\beta_3$ -интегриновый рецептор, который широко экспрессируется в кровеносных сосудах опухоли. Были изучены как прямые конъюгаты (без линкеров), так и конъюгаты с одним или несколькими соединенными ПЭГ-линкерами. Наибольшую активность продемонстрировал конъюгат, в котором фотосенсибилизатор был соединен с пептидом двумя ПЭГ-линкерами и глутаматом. IC_{50} этого конъюгата (SiPc–П) и свободного SiPc различались в 1,8–2,4 раза и на культуре клеток глиобластомы человека U87-MG составили 17,3 и 39,9 нМ; на культуре клеток рака предстательной железы человека 22RV1 – 16,7 и 30,7 нМ; на культуре клеток рака предстательной железы человека PC3 – 15,5 и 37,1 нМ соответственно.

В другой работе также использовали пептид, нацеленный на $\alpha_v\beta_3$ -интегриновый рецептор, в качестве вектора доставки 5-АЛК, связанной с НЧ золота. Wu et al. [64] сообщили о высокой фотодинамической активности полученного конъюгата. На культуре клеток A549 после 4-часовой инкубации поглощение клетками НЧ с фотосенсибилизатором и пептидом (НЧ–5-АЛК–П) было выше в 3,7 раза, чем для НЧ–5-АЛК. IC_{50} для конъюгата НЧ–5-АЛК–П составила 12 мкг/мл, для НЧ–5-АЛК – 20 мкг/мл. Выживаемость клеток снижалась в ряду 5-АЛК > НЧ–5-АЛК > НЧ–5-АЛК–П в диапазоне исследованных доз 10–50 мкг/мл (по 5-АЛК). Так, для дозы 20 мкг/мл выживаемость составила 100%, 50% и 20%.

Jadia et al. [41] в качестве вектора таргетной доставки использовали пептид-агонист рецептора Тф. Они оценивали интенсивность флуоресценции и фотодинамическую активность BPD-МА в виде полимерных НЧ, конъюгированных с пептидом, связывающимся с рецептором Тф (НЧ–BPD-МА–Тф(п)). Флуоресцентная визуализация подтвердила, что НЧ, нагруженные BPD-МА, демонстрировали флуоресценцию с большей интенсивностью в клетках трижды негативного рака молочной железы по сравнению со свободным BPD-МА. Исследования также подтвердили специфичность НЧ, связанных с пептидом-агонистом рецептора Тф, для клеток трижды негативного рака молочной железы. Результаты противо-

опухолевой ФДТ соответствовали результатам флуоресцентной визуализации: связанные с векторным пептидом НЧ проявляли самую высокую фототоксичность в отношении клеток трижды негативного рака молочной железы. Выживаемость клеток линии MDA-MB-231 после инкубации со свободным BPD-МА, НЧ–BPD-МА и НЧ–BPD-МА–Тф(п) и проведения облучения составила 29,4%, 23,1% и 19,9% соответственно.

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ ЭСТРОГЕНОВ ДЛЯ НАПРАВЛЕННОЙ ДОСТАВКИ ФОТОСЕНСИБИЛИЗАТОРОВ В ОПУХОЛЕВЫЕ КЛЕТКИ

Еще одной перспективной мишенью для доставки фотосенсибилизаторов к эстроген-зависимым опухолям являются рецепторы к эстрогенам. В этом случае вектором для направленной доставки является либо сам эстрадиол, эндогенный стероидный гормон, связывающийся с рецептором для эстрогенов, либо тамоксифен (Тмф), являющийся антагонистом данного рецептора, но также селективно связывающийся с ним. В ряде исследований на эстроген-зависимых опухолевых клетках человека была изучена фотодинамическая активность фотосенсибилизаторов на основе порфиринов, ФеоА и Рс, конъюгированных с этими агентами. Связывание фотосенсибилизатора с вектором доставки обеспечивали линкеры различной длины и химической природы (рис. 3, а), в частности, кислородсодержащие углеводородные линкеры, состоящие из оксоэтиленовых или оксопропиленовых фрагментов [68], и углеводородные линкеры, содержащие алкильные группы [69] и различные алифатические и/или ароматические фрагменты [70].

Как правило, конъюгаты сохраняли хорошее сродство к рецепторам эстрогена и обеспечивали высокую селективность фотосенсибилизатора в отношении опухолевых тканей [68–71].

Swamy et al. [69] в экспериментах на клеточной линии MCF-7 показали, что выживаемость клеток после инкубации с конъюгатом диметилового эфира Хл с эстрадиолом (ДМЭ-Хл–Э2) и проведения облучения составила 50%, а инкубация со свободным диметиловым эфиром хлорина е6 (ДМЭ-Хл) и последующим облучением не вызывала цитотоксических эффектов – выживаемость клеток составила 100%. IC_{50} для ДМЭ-Хл–Э2 составила 0,18 мкМ, а для свободного ДМЭ-Хл – не была достигнута в

экспериментах с концентрациями фотосенсибилизатора до 1 мкМ. Таким образом, конъюгация с эстрадиолом более чем в 5 раз повысила цитотоксичность ДМЭ-Хл. Интенсивность флуоресценции Хл после инкубации клеток MCF-7 с ДМЭ-Хл–Э2 была в 3 раза сильнее, чем после инкубации со свободным ДМЭ-Хл в той же концентрации.

Использование Тмф в качестве вектора доставки также показало высокую эффективность. В исследованиях Fernandez-Gacio et al. [71] выживаемость клеток MCF-7 после инкубации с конъюгатом Пиро-Фео с Тмф (Пиро-Фео–Тмф) и облучения составляла 10–15%, в то время как облучение клеток, инкубированных со свободным Пиро-Фео, не приводило к гибели клеток (выживаемость составила 100%).

Несмотря на эффективность применения Тмф в качестве вектора направленной доставки для фотосенсибилизаторов, использование его ограничено побочными эффектами. В частности, известно, что Тмф значительно повышает риск развития поражений эндометрия, включая гиперплазию, полипы, карциномы, саркомы, а также рак матки и тромбоемболию [72, 73]. Ведется разработка производных Тмф с антиэстрогенными свойствами, но не обладающих агонистическим действием на ткани матки. Díaz et al. [74] сообщили об успешных испытаниях комплекса FLTX2. В состав FLTX2 входят ковалентно связанные Тмф, 7-нитробензофуразан (в качестве флуоресцентного красителя) и бенгальский розовый (в качестве фотосенсибилизатора). Авторы продемонстрировали, что FLTX2 обладает такой же антиэстрогенной активностью, как Тмф, и эффективно вызывает апоптоз клеток карциномы молочной железы человека MCF-7 при проведении ФДТ.

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ ЛИПОПРОТЕИНОВ ДЛЯ НАПРАВЛЕННОЙ ДОСТАВКИ ГИДРОФОБНЫХ ФОТОСЕНСИБИ- ЛИЗАТОРОВ В ОПУХОЛЕВЫЕ КЛЕТКИ

Как было отмечено ранее, считается, что селективность накопления в опухолевых тканях ряда фотосенсибилизаторов, в том числе производных гематопорфирина, обусловлена их связыванием с ЛПНП, рецепторы к которым гиперэкспрессированы на мембранах многих опухолевых клеток [10]. ЛПНП являются основными переносчиками холестерина в крови. Экспрессия рецепторов ЛПНП регулируется потребностью клеток в холестерине

и обычно выше в быстрорастущих клетках. Различные исследования *in vitro* и *in vivo* показывают, что лейкемические и некоторые солидные опухоли (например, толстой кишки, почек, легких и головного мозга) характеризуются повышенной экспрессией рецепторов ЛПНП по сравнению с соответствующими нетрансформированными клетками [75, 76].

В настоящее время известно, что связанные с липопротеинами порфирины активнее захватываются и дольше удерживаются опухолевыми клетками, чем порфирины в водных растворах. Кроме того, для порфиринов, связанных с липопротеинами, и их свободной формы различаются мишени фотодинамического воздействия: цитоплазматическая мембрана, как более доступная, поражается водным раствором порфирина, а порфирины, связанные с липопротеинами, вызывают более глубокие внутриклеточные поражения митохондрий, лизосом и цитоплазмы [3, 77].

ЛПНП характеризуются высокой грузочной емкостью для гидрофобных препаратов и являются эндогенными переносчиками, биосовместимыми, биodeградируемыми и неиммунными. Все перечисленные особенности делают ЛПНП привлекательными для использования в качестве транспортных систем в таргетной доставке фотосенсибилизаторов [3].

Исследования ЛПНП, как транспортных систем для доставки фотосенсибилизаторов в опухоль, продолжают несколько десятилетий. Гидрофобные фотосенсибилизаторы могут быть включены в ядро ЛПНП (рис. 3, б) и в таком виде доставлены к опухолевым клеткам, многие из которых характеризуются повышенной экспрессией рецепторов к ЛПНП. Еще в 1988 г. Zhou et al. [78] в экспериментах на мышах с перевитой фибросаркомой MS-2 продемонстрировали селективное накопление в опухолевых клетках гематопорфирина, введенного мышам в составе ЛПНП. С помощью электронной микроскопии авторами было показано, что введение мышам комплекса гематопорфирина с ЛПНП индуцирует прямую гибель клеток, в то время как свободный гематопорфирин вызывает регрессию опухоли через повреждение сосудов. В 1994 г. Hamblin и Newman [79] показали специфичность гематопорфирина, включенного в ЛПНП, в отношении рецепторов апоВ ЛПНП клеток фибробластов NIH 3T3 и клеток рака толстой кишки HT29. Фототоксичность в отношении клеток 3T3 для гематопорфирина в составе ЛПНП была выше, чем для чистого гематопорфирина (выживаемость клеток составила приблизительно 0,5% и 2% соответственно).

Вместе с тем для клеток HT29 фототоксичность была выше для неконъюгированного фотосенсибилизатора.

За последние годы ряд исследований подтвердил высокую эффективность ЛПНП как транспортных систем для таргетной доставки фотосенсибилизаторов в опухоль. В исследовании Polo et al. [80] была показана роль рецепторов ЛПНП в накоплении комплексов фотосенсибилизатор–ЛПНП трансформированными фибробластами человека и крысы. Авторы показали, что ЛПНП связывают как амфифильный гематопорфирин IX, так и гидрофобный фталоцианин цинка. Связывание фталоцианина с ЛПНП происходит в молярных соотношениях: 5–6/1 (для амфифильного гематопорфирина IX) и 10–12/1 (для гидрофобного фталоцианина цинка). Исследования показали, что комплекс гематопорфирин–ЛПНП проникает в фибробласты человека HT1080 в основном с участием высокоаффинных рецепторов ЛПНП, в то время как комплекс Рс–ЛПНП поглощается фибробластами посредством неспецифического эндоцитоза. В клетках HT1080, стимулированных для максимальной экспрессии рецепторов ЛПНП, поглощение доставленного липопротеинами гематопорфирина увеличивалось примерно в 4 раза по сравнению с нестимулированными клетками. Для ZnРс изменения поглощения фотосенсибилизатора при стимуляции клеток не происходило. Авторы связывают это наблюдение с изменениями структуры апоВ–ЛПНП, индуцированными ассоциацией с Рс, что подтверждается данными спектроскопических исследований. В исследованиях Song et al. [81] было показано 8-кратное увеличение уровня накопления производного нафталоцианина, включенного в ЛПНП, в перевиваемых опухолях HepG2 у мышей по сравнению с окружающей мышечной тканью.

В исследованиях Wang et al. [82] новый фотосенсибилизатор ТРА–DPPy на основе пиридиновой соли был включен в гидрофобное ядро ЛПНП для таргетной доставки к опухолевым клеткам, характеризующимся гиперэкспрессией рецепторов ЛПНП. На культуре клеток карциномы легкого человека A549 было показано высокое внутримитохондриальное накопление и флуоресценция с высокой интенсивностью ТРА–DPPy–ЛПНП. Дополнительным преимуществом использования ЛПНП в качестве транспортной системы является ограниченный контакт фотосенсибилизатора в составе ЛПНП с растворенным кислородом в водной среде. В результате в процессе транспорта к клеткам-мишеням фотосенсибилизатора в составе ЛПНП в крови не происходит генера-

ции активных форм кислорода, в отличие от использования свободного фотосенсибилизатора.

ЛПВП также рассматриваются в качестве потенциальных транспортных систем для таргетной доставки, поскольку было показано, что их рецепторы (в частности, рецептор SR-B1) сверхэкспрессируются в опухолевых клетках. Так, в исследовании Cao et al. [83] аналог бактериохлорофилла еб, этерифицированный олеиновой кислотой для увеличения липофильности, был включен в гидрофобное ядро ЛПВП. Полученный комплекс фотосенсибилизатора с ЛПВП был использован для визуализации опухолей. В проведенных экспериментах клетки назофарингиальной карциномы человека, экспрессирующие рецептор ЛПВП, активно поглощали ЛПВП, нагруженные фотосенсибилизатором. При этом 25-кратный избыток нативных ЛПВП тормозил поступление фотосенсибилизатора в опухолевые клетки за счет конкуренции свободных и связанных с фотосенсибилизатором ЛПВП за связывание с рецепторами. Дополнительные исследования *in vivo* показали хорошую флуоресценцию опухолей у мышей с ксенотрансплантированными опухолями назофарингиальной карциномы человека после введения им ЛПВП, нагруженных фотосенсибилизатором.

КОНЬЮГАЦИЯ ФОТОСЕНСИБИЛИЗАТОРОВ С МОНОКЛОНАЛЬНЫМИ АНТИТЕЛАМИ

Одним из эффективных способов таргетной доставки является конъюгация фотосенсибилизаторов с моноклональными антителами (АТ), специфичными к антигенам на поверхности опухолевых клеток или стенок сосудов опухоли. Это обеспечивает возможность доставки фотосенсибилизатора непосредственно в опухолевую ткань. В литературе можно найти много сообщений об успешном использовании для таргетной доставки фотосенсибилизаторов цельных моноклональных АТ с молекулярной массой около 150 кДа, либо меньших фрагментов моноклональных АТ в диапазоне 25–100 кДа [3]. Антитела могут быть связаны с фотосенсибилизатором напрямую или через линкер (рис. 3, а), фотосенсибилизатор также может присоединяться к АТ через так называемый множитель, чаще всего полимерной структуры [4]. С точки зрения синтеза, проще реализуется прямое присоединение фотосенсибилизатора к АТ. Однако в данном случае могут изменяться свойства АТ, и это будет снижать эффективность таргетной доставки.

Создание модульной транспортной системы на основе умножителя, связанного с АТ, является гораздо более трудоемким процессом. Данный подход дает возможность максимально сохранить свойства используемого АТ. Кроме того, использование модульной транспортной системы позволяет изменять количество и виды связываемых фотосенсибилизаторов [4, 17, 22, 84]. Так, в исследовании Savellano и Hasan [85] BPD-MA был связан с АТ к EGFR через разветвленный («two-branched») ПЭГ. Благодаря такому строению линкера молярное соотношение BPD-MA/АТ в структуре конъюгата можно было изменять. Авторы подобрали режимы фотодинамического воздействия, позволяющие достичь снижения выживаемости клеток до 8% от контроля (концентрация фотосенсибилизатора составляла 0,14–0,28 мкМ). Однако сравнение выживаемости клеток А-431 при проведении ФДТ со свободным фотосенсибилизатором (BPD-MA) и конъюгатом с АТ (BPD-MA-АТ) показало, что свободный BPD-MA позволяет достичь той же эффективности, что и BPD-MA-АТ, при дозе меньшей в 5 раз (доза BPD-MA-АТ – 0,14 мкМ, доза BPD-MA – 0,028 мкМ). При увеличении времени инкубации фотосенсибилизатора с клетками фототоксичность BPD-MA-АТ возрастала, но в пределах 40 часов не достигала показателей фотоактивности чистого BPD-MA. Авторы связывают такие наблюдения с постепенным высвобождением фотосенсибилизатора из конъюгата и указывают на необходимость увеличения соотношения BPD-MA/АТ для повышения фототоксичности конъюгата. Однако технические сложности не позволяют увеличить соотношение более, чем в 11 раз, в связи со снижением аффинности и чистоты связывания полученного конъюгата. Один из путей решения этой проблемы Savellano и Hasan [85] видят в реализации стратегии множественного нацеливания (использование АТ нескольких типов). По мнению автора данного обзора, предложенный путь представляется излишне технически сложным, особенно учитывая сомнительную эффективность разрабатываемых конъюгатов и наличие других, более технически простых и эффективных путей нацеливания.

Большую эффективность показывают более сложные транспортные системы, в том числе на основе нагруженных фотосенсибилизаторами полимерных мицелл, НЧ, вирусом (Вир) или ЛпС, связанных с АТ [1]. Подобная конструкция реализована, например, в работе Low et al. [86], которые изучали фотодинамическую активность Вир, связанных с Хл

и АТ к EGFR (Вир-Хл-АТ) (рис. 3, д). Исследования показали, что специфичность в отношении клеток плоскоклеточной карциномы полости рта OSCC (которые характеризуются гиперэкспрессией рецептора к EGF) была выше для Вир, связанных с АТ. IC₅₀ для конъюгата Вир-Хл-АТ на клетках OSCC составила 10 мкМ. Для свободного фотосенсибилизатора (Хл) и конъюгата Вир-Хл в той же концентрации выживаемость составила 70%. IC₅₀ для Хл и Вир-Хл в проведенных экспериментах не была достигнута (максимальная исследованная концентрация 10 мкМ).

Основное преимущество моноклональных АТ состоит в том, что они обладают высокой степенью специфичности. При этом они являются дорогостоящими молекулами, их производство требует много времени, и они могут вызывать иммунные реакции. Конъюгация фотосенсибилизатора с АТ должна происходить строго контролируемо в участках, которые не будут влиять на распознавание антигена. Кроме того, фотосенсибилизаторы с явно выраженными гидрофобными свойствами могут изменять растворимость АТ. Эффективность применения АТ, как векторов таргетной доставки, также может быть ограничена возможностью присоединения к носителю только определенного количества молекул. Использование АТ для таргетной доставки в ряде случаев повышает фототоксичность фотосенсибилизаторов, но их эффективность сопоставима с эффективностью других рассмотренных транспортных систем, многие из которых гораздо более простые в техническом исполнении, более доступные и более дешевые.

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ УГЛЕВОДОВ ДЛЯ НАПРАВЛЕННОЙ ДОСТАВКИ ФОТОСЕНСИБИЛИЗАТОРОВ В ОПУХОЛЕВЫЕ КЛЕТКИ

В опухолевых клетках изменяется активность многих метаболических путей, в том числе связанных с превращениями углеводов, вероятно, в результате ускоренного метаболизма и потребности в энергии активно метаболизирующих опухолевых клеток. Эффект Варбурга и высокая экспрессия GLUT1 в опухолевых клетках определяют высокую скорость использования глюкозы, что может применяться для направленной доставки [3]. Ряд исследований показывает, что накопление фотосенсибилизаторов в опухолевых клетках увеличивается после конъюгации с углеводами. Так, напри-

мер, было показано, что конъюгированный с глюкозой Хл (G–Хл) обладает высокой селективностью к опухолевым клеткам, быстрее выводится из организма и обладает большей фотодинамической активностью, чем свободный Хл [87, 88]. В работе Nishie et al. [87] показано повышение эффективности G–Хл по сравнению со свободным талапорфином натрия (моно-L-аспартил хлорин еб). Сравнение этих двух фотосенсибилизаторов можно принять условно, поскольку контрольный фотосенсибилизатор отличается по химической структуре от фотосенсибилизатора, конъюгированного с глюкозой. Согласно результатам, представленным авторами, IC_{50} для конъюгата на клетках OE21, KYSE30, MKN45 и HT29 была выше, чем у талапорфина в 12–52 тысяч раз. Также показано в 70–190 раз большее накопление G–Хл в клетках MKN45 и HT29 по сравнению с талапорфином. Следует отметить, что подобные результаты (со снижением IC_{50} в десятки тысяч раз) не встречались в других исследованиях и не были повторены позже самими авторами.

В исследованиях тех же авторов [88] на клетках SNP было продемонстрировано снижение IC_{50} для G–Хл с последующим облучением всего в 2,3–18 раз в сравнении со свободным талапорфином натрия с облучением в том же режиме. Значения IC_{50} для талапорфина в отношении клеток SNP, подвергнутых облучению световыми дозами 1, 5 и 15 Дж/см², составили 75,2, 30,4 и 30,6 мкг/мл соответственно. Для G–Хл значения IC_{50} в отношении клеток SNP, подвергшихся облучению в тех же световых дозах, составили 33,4, 10,4 и 1,7 мкг/мл соответственно.

Имеются данные, что после конъюгации с углеводами накопление происходит преимущественно в эндоплазматическом ретикулуме, а длина олигосахарида является важным фактором, определяющим скорость проникновения через мембрану [89, 90].

Soyama et al. [91] использовали таргетную доставку Хл к M2-подобным опухолеассоциированным макрофагам (M2-TAM). Хл конъюгировали с маннозой (M–Хл), рецепторы к которой гиперэкспрессированы на поверхности M2-TAM. Авторы сравнивали фотодинамическую активность M–Хл и G–Хл с талапорфином натрия. Накопление M–Хл в опухолевой ткани было выше, чем в нормальной ткани кожи сингенных мышей, причем селективность конъюгированных форм Хл к опухолевой ткани (1,4 – для G–Хл и 1,7 – для M–Хл) была выше, чем у талапорфина натрия (1,2). ФДТ с конъюгированным хлорином значительно снижала объем и массу опухо-

левой ткани. Сравнительные данные по эффективности ФДТ с неконъюгированным Хл в тех же условиях авторами не представлены. Цитопроточный анализ подтвердил, что ФДТ с M–Хл вызывала избирательное повреждение M2-TAM.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В настоящее время активно развивается таргетная доставка фотосенсибилизаторов в опухолевые ткани. Об этом свидетельствует большое количество экспериментальных и клинических работ в этой области.

Одним из наиболее эффективных методов нацеливания фотосенсибилизаторов на опухолевые ткани представляется их конъюгация со специфическими лигандами к рецепторам, гиперэкспрессируемым на мембранах опухолевых клеток. Основная проблема использования таких лигандов связана с тем, что опухолевая клетка чаще всего способна использовать их для повышения скорости метаболических процессов, что может опосредованно привести к прогрессированию злокачественного процесса. Такие данные имеются, например, для транспортных систем с использованием в качестве лигандов эстрогенов и EGF. Развитие этого направления таргетной доставки происходит по пути использования в качестве векторов доставки молекул-антагонистов.

Наиболее перспективными мишенями для нацеливания фотосенсибилизаторов на опухоль являются рецепторы Тф, ФК и EGF, которые гиперэкспрессируются на большинстве опухолевых клеток. Традиционно для нацеливания на данные рецепторы используются их нативные лиганды – Тф, ФК и EGF. Использование указанных векторов показывает значительное повышение уровня накопления фотосенсибилизатора и увеличение эффективности фотодинамической терапии. Так, при связывании ФК с самим фотосенсибилизатором или его транспортной формой уровень накопления фотосенсибилизатора в опухолевых клетках увеличивается в 1,5–15 раз, селективность накопления в опухолевых клетках возрастает в 2,5 раза, наблюдается почти 6-кратное увеличение противоопухолевой эффективности, а показатели IC_{50} снижаются в 2–4 раза [44–49, 51]. При использовании в качестве вектора доставки Тф уровень накопления фотосенсибилизатора в опухолевых клетках повышается до 4–28 раз, а показатели IC_{50} снижаются до 2–40 раз [38–40, 42, 43]. Использование EGF позволяет снизить показатели IC_{50} до

2,4–7 раз [59, 62]. Из указанных соединений наиболее доступным, дешевым и простым в конъюгации является ФК. В многочисленных исследованиях показана эффективность ФК как вектора направленной доставки в опухоль 5-АЛК, Хл, Рс, ФеоА, порфиринов и других групп фотосенсибилизаторов [44–49, 51]. Скорее всего, сочетание эффективности с доступностью и простотой конъюгации обуславливает такой интерес к ФК, хотя она несколько проигрывает Тф и EGF в эффективности.

Еще одно перспективное, активно развивающееся направление таргетной доставки – использование в качестве векторов доставки пептидов, чаще всего нацеленных на рецепторы, гиперэкспрессированные на поверхности опухолевых клеток, например, EGFR, рецептор Тф, $\alpha_v\beta_3$ -интегриновый рецептор и другие. Сами пептиды доступны и могут быть легко синтезированы, однако они чувствительны к действию пептидаз и требуют химической модификации для повышения устойчивости. Эффективность пептидов показана в ряде исследований, их использование позволяет увеличить накопление фотосенсибилизатора в опухолевой ткани (по имеющимся данным, до 4 раз) и снизить IC₅₀ (в 2–3 раза). По общему уровню эффективности пептиды уступают вышеописанным векторам, однако представляются перспективной группой для дальнейшего изучения [36, 41, 63, 64].

Использование в качестве векторов доставки лигандов к рецепторам эстрогенов ограничено эстроген-чувствительными опухолями, гиперэкспрессирующими на своей поверхности рецепторы эстрогена. Также существенным минусом является способность эстрогенов оказывать стимулирующее действие на таргетные опухолевые клетки, активируя их пролиферацию. Антагонист эстрогеновых рецепторов, Тмф, хотя и показывает хорошие результаты как векторная молекула (повышение эффективности до 10 раз), также обладает пролиферирующим действием на ткани матки, что ограничивает возможность его применения [69, 71–73].

Исследования липопротеинов, как транспортных форм для доставки фотосенсибилизаторов, насчитывают несколько десятилетий, однако в последние годы активные исследования в данной области не ведутся. Это связано с ограниченными возможностями применения данной транспортной системы. Использование липопротеинов оправдано только для гидрофобных фотосенсибилизаторов. Кроме того, не все опухолевые клетки характеризуются

повышенной экспрессией рецепторов к липопротеинам. Несмотря на то что многие исследования показывают хорошую эффективность подобных транспортных систем, полноценных сравнительных исследований эффективности свободных фотосенсибилизаторов и включенных в состав липопротеинов практически нет [2, 78–80, 82, 83].

Использование АТ в качестве векторов направленной доставки фотосенсибилизаторов представляется излишне дорогостоящим и технически сложным. АТ могут вызывать иммунные реакции, и их эффективность не превышает эффективность других, гораздо более простых и дешевых векторов [1, 2, 85, 86].

Последняя группа рассмотренных в обзоре нацеливающих молекул – углеводы. Для данной группы векторов имеется очень мало исследований, в которых было бы проведено полноценное сравнение фототоксичности конъюгированной с углеводом и свободной формы фотосенсибилизатора. Те редкие исследования, в которых такое сравнение выполнено, показывают очень высокую эффективность конъюгированных форм (увеличение эффективности в десятки тысяч раз) [87]. Однако последующие исследования не подтверждают полученные результаты [88].

Таким образом, анализ сравнительных исследований эффективности фотосенсибилизаторов и их конъюгатов с различными векторами направленной доставки показывает наибольшую эффективность и перспективность таких нацеливающих молекул, как ФК, Тф и EGF. Данные векторы в настоящее время наиболее активно исследуются и признаны научным сообществом как эффективные способы таргетной доставки [1–4].

За счет селективного накопления фотосенсибилизаторов в опухолевой ткани реализуется его фотодинамическая активность, сохранность окружающих тканей при проведении облучения и низкая кожная фототоксичность. Изучение механизмов селективного накопления фотосенсибилизаторов в опухоли и поиск новых транспортных систем, обеспечивающих еще более высокую избирательность попадания фотосенсибилизатора в опухоль, необходимы для дальнейшего развития метода ФДТ.

Конфликт интересов. Автор заявляет об отсутствии конфликта интересов.

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

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Schneider, R., Tirand, L., Frochot, C., Vanderesse, R., Thomas, N., et al. (2006) Recent improvements in the use of synthetic peptides for a selective photodynamic therapy, *Curr. Med. Chem. Anti Cancer Agents*, **6**, 469-488, doi: 10.2174/187152006778226503.
- Ulfo, L., Costantini, P. E., Di Giosia, M., Danielli, A., and Calvaresi, M. (2022) EGFR-targeted photodynamic therapy, *Pharmaceutics*, **14**, 241, doi:10.3390/pharmaceutics14020241.
- Schmitt, F., and Juillerat-Jeanneret, L. (2012) Drug targeting strategies for photodynamic therapy, *Anticancer Agents Med Chem.*, **12**, 500-525, doi: 10.2174/187152012800617830.
- Sharma, S., Jajoo, A., and Dube, A. (2007) 5-Aminolevulinic acid-induced protoporphyrin-IX accumulation and associated phototoxicity in macrophages and oral cancer cell lines, *J. Photochem. Photobiol. B*, **88**, 156-162, doi: 10.1016/j.jphotobiol.2007.07.005.
- Castano, A. P., Demidova, T. N., and Hamblin, M. R. (2004) Mechanisms in photodynamic therapy: part one – photosensitizers, photochemistry and cellular localization, *Photodiag. Photodynam. Ther.*, **1**, 279-293, doi: 10.1016/S1572-1000(05)00007-4.
- Chilakamarthi, U., and Giribabu, L. (2017) Photodynamic therapy: past, present and future, *Chem Rec.*, **17**, 775-802, doi: 10.1002/tcr.201600121.
- Филоненко Е. В., Серова Л. Г. (2016) Фотодинамическая терапия в клинической практике, *Biomed. Photonics*, **5**, 26-37.
- Kwiatkowski, S., Кнап, В., Przystupski, D., Saczko, J., Кędzierska, E., et al. (2018) Photodynamic therapy – mechanisms, photosensitizers and combinations, *Biomed. Pharmacother.*, **106**, 1098-1107, doi: 10.1016/j.biopha.2018.07.049.
- Juzeniene, A., and Moan, J. (2007) The history of PDT in Norway/Part one: identification of basic mechanisms of general PDT, *Photodiag. Photodynam. Ther.*, **4**, 3-11, doi: 10.1016/j.pdpdt.2006.11.002.
- Мачинская Е. А., Иванова-Радкевич В. И. (2013) Обзор механизмов селективного накопления фотосенсибилизаторов различной химической структуры в опухолевой ткани, *Фотодинамическая терапия и фотодиагностика*, **2**, 28-32.
- Maziere, J. C., Morliere, P., and Santus, R. (1991) The role of the low density lipoprotein receptor pathway in the delivery of lipophilic photosensitizers in the photodynamic therapy of tumours, *J. Photochem. Photobiol. B Biol.*, **8**, 351-360, doi: 10.1016/1011-1344(91)80111-t.
- Niamien Konan, Y., Gurny, R., and Allemann, E. (2002) State of the art in the delivery of photosensitizers for photodynamic therapy, *J. Photochem. Photobiol. B Biol.*, **66**, 89-106, doi: 10.1016/s1011-1344(01)00267-6.
- Jones, H. J., Vernon, D. I., and Brown, S. B. (2003) Photodynamic therapy effect of m-THPC (Foscan) *in vivo*: correlation with pharmacokinetics, *Br. J. Cancer*, **89**, 398-404, doi: 10.1038/sj.bjc.6601101.
- Moan, J., and Berg, K. (1991) The photodegradation of porphyrins in cells can be used to estimate the lifetime of singlet oxygen, *Photochem. Photobiol.*, **53**, 549-553, doi: 10.1111/j.1751-1097.1991.tb03669.x.
- Lukyanets, E. A. (1999) Phthalocyanines as photosensitizers in the photodynamic therapy of cancer, *J. Porphyrins Phthalocyanines*, **3**, 424-432, doi: 10.1002/(SICI)1099-1409(199908/10)3:6/7<424::AID-JPP151>3.0.CO;2-K.
- Zheng, G., Li, H., Zhang, M., Lund-Katz, S., Chance, B., et al. (2002) Low-density lipoprotein reconstituted by pyropheophorbide cholesteryl oleate as target specific photosensitizer, *Bioconj. Chem.*, **13**, 392-396, doi: 10.1021/bc025516h.
- Nowis, D., Makowski, M., Stokłosa, T., Legat, M., Issat, T., et al. (2005) Direct tumor damage mechanisms of photodynamic therapy, *Acta Biochim. Pol.*, **52**, 339-352.
- Tang, Y., Liu, Y., Wang, S., Tian, Y., Li, Y., et al. (2019) Depletion of collagen by losartan to improve tumor accumulation and therapeutic efficacy of photodynamic nanoplateforms, *Drug Deliv. Transl. Res.*, **9**, 615-624, doi: 10.1007/s13346-018-00610-1.
- Moan, J., and Peng, Q. (2003) An outline of the history of PDT, in *Photodynamic Therapy. Comprehensive series in Photochem. Photobiol. Sci. Ed. T. Patrice*, The Royal Society of Chemistry, London, pp. 3-17.
- Pottier, R., and Kennedy, J. C. (1990) The possible role of ionic species in selective biodistribution of photochemotherapeutic agents toward neoplastic tissue, *J. Photochem. Photobiol. B Biol.*, **8**, 1-16, doi: 10.1016/1011-1344(90)85183-w.
- Solban, N., Rizvi, I., and Hasan, T. (2006) Targeted photodynamic therapy, *Lasers Surg. Med.*, **38**, 522-531, doi: 10.1002/lsm.20345.
- Wiedmann, M. W., and Caca, K. (2004) General principles of photodynamic therapy (PDT) and gastrointestinal applications, *Curr. Pharmaceut. Biotechnol.*, **5**, 397-408, doi: 10.2174/1389201043376805.
- Dougherty, T. J., Potter, W. R., and Weishaupt, K. R. (1984) *Porphyrin Localization and Treatment of Tumors* (Liss, A. R. ed) pp. 301-314.
- Filonenko, E. V., Kaprin, A. D., Alekseev, B. Ya., Apolikhin, O. I., Slovokhodov, E. K., et al. (2016) 5-aminolevulinic acid in intraoperative photodynamic therapy of bladder cancer (results of multicenter trial), *Photodiagnosis Photodyn. Ther.*, **16**, 106-109, doi: 10.1016/j.pdpdt.2016.09.009.
- Filonenko, E., Kaprin, A., Urlova, A., Grigorievikh, N., and Ivanova-Radkevich, V. (2020) Topical 5-aminolevulinic acid-mediated photodynamic therapy for basal cell carcinoma, *Photo-*

- diagnosis Photodyn. Ther.*, **30**, 101644, doi: 10.1016/j.pdpdt.2019.101644.
26. Kloek, J., Akkermans, W., and Beijersbergen van Henegouwen, G. M. (1998) Derivatives of 5-aminolevulinic acid for photodynamic therapy: enzymatic conversion into protoporphyrin, *Photochem. Photobiol.*, **67**, 150-154, doi: 10.1111/j.1751-1097.1998.tb05178.x.
 27. Каприн А. Д., Трушин А. А., Головащенко М. П., Иванова-Радкевич В. И., Чиссов В. И., и др. (2019) Повышение эффективности диагностики рака мочевого пузыря при использовании цистоскопии с гексилловым эфиром 5-АЛК, *Biomedical Photonics*, **8**, 29-37, doi: 10.24931/2413-9432-2019-8-1-29-37.
 28. Якубовская Р. И., Панкратов А. А., Филоненко Е. В., Лукьянец Е. А., Иванова-Радкевич В. И., и др. (2018) Сравнительное экспериментальное исследование специфической активности 5-АЛК и гексиллового эфира 5-АЛК, *Biomedical Photonics*, **7**, 43-46, doi: 10.24931/2413-9432-2018-7-3-43-46.
 29. Lopez, R. F., Lange, N., Guy, R., and Bentley, M. V. (2004) Photodynamic therapy of skin cancer: controlled drug delivery of 5-ALA and its esters, *Adv. Drug. Deliv. Rev.*, **56**, 77-94, doi: 10.1016/j.addr.2003.09.002.
 30. Malik, Z., Kostenich, G., Roitman, L., Ehrenberg, B., and Orenstein, A. (1995) Topical application of 5-aminolevulinic acid, DMSO and EDTA: protoporphyrin IX accumulation in skin and tumours of mice, *J. Photochem. Photobiol. B Biol.*, **28**, 213-218, doi: 10.1016/1011-1344(95)07117-k.
 31. Fukuda, H., Paredes, S., and Batlle, A. M. (1992) Tumour-localizing properties of porphyrins. *In vivo* studies using free and liposome encapsulated aminolevulinic acid, *Comp. Biochem. Physiol. B*, **102**, 433-436, doi: 10.1016/0305-0491(92)90147-j.
 32. Peng, Q., Warloe, T., Moan, J., Heyerdahl, H., Steen, H. B., et al. (1995) Distribution of 5-aminolevulinic acid-induced porphyrins in noduloulcerative basal cell carcinoma, *Photochem. Photobiol.*, **62**, 906-913, doi: 10.1111/j.1751-1097.1995.tb09154.x.
 33. Kloek, J., and Beijersbergen van Henegouwen, G. M. (1996) Prodrugs of 5-aminolevulinic acid for photodynamic therapy, *Photochem. Photobiol.*, **64**, 994-1000, doi: 10.1111/j.1751-1097.1996.tb01868.x.
 34. Филоненко Е. В., Каприн А. Д., Алексеев Б. Я., Иванова-Радкевич В. И., Словоходов Е. К., и др. (2017) Флуоресцентная диагностика рака мочевого пузыря с препаратом гексасенс – результаты многоцентрового клинического исследования, *Biomedical Photonics*, **6**, 20-27, doi: 10.24931/2413-9432-2017-6-1-20-27.
 35. Slovokhodov, E. K., Ivanova-Radkevich, V. I., and Brodsky, I. B. (2017) Fluorescent diagnosis of bladder cancer by hexasens as a drug, *J. Biol. Today's World*, **6**, 123-128, doi: 10.15412/J.JBTW.01060701.
 36. Ivanova-Radkevich, V. I., Smirnova, I. P., Kuznetsova, O. M., Lobaeva, T. A., Gushchina, Yu. Sh., et al. (2016) Organization of clinical trials of photosensitizer based on 5-aminolevulinic acid hexyl ester, *Ind. J. Sci. Technol.*, **9**, 1-7, doi: 10.17485/ijst/2016/v9i18/93759.
 37. Shen, Y., Li, X., Dong, D., Zhang, B., Xue, Y., and Shang, P. (2018) Transferrin receptor 1 in cancer: a new sight for cancer therapy, *Am. J. Cancer Res.*, **8**, 916-931.
 38. Cavanaugh, P. G. (2002) Synthesis of chlorin e6-transferrin and demonstration of its light-dependent *in vitro* breast cancer cell killing ability, *Breast Cancer Res. Treat.*, **72**, 117-130, doi: 10.1023/a:1014811915564.
 39. Gijssens, A., Derycke, A. S., Missiaen, L., De Vos, D., Huwyler, J., et al. (2002) Targeting of the photocytotoxic compound ALPcS4 to Hela cells by transferrin conjugated PEG-liposomes, *Int. J. Cancer*, **101**, 78-85, doi: 10.1002/ijc.10548.
 40. Derycke, A. S., Kamuhabwa, A., Gijssens, A., Roskams, T., De Vos, D., et al. (2004) Transferrin-conjugated liposome targeting of photosensitizer ALPcS4 to rat bladder carcinoma cells, *J. Natl. Cancer Inst.*, **96**, 1620-1630, doi: 10.1093/jnci/djh314.
 41. Jadia, R., Kydd, J., and Rai, P. (2018) Remotely phototriggered, transferrin-targeted polymeric nanoparticles for the treatment of breast cancer, *Photochem. Photobiol.*, **94**, 765-774, doi: 10.1111/php.12903.
 42. Hamblin, M. R., and Newman, E. L. (1994) Photosensitizer targeting in photodynamic therapy. I. Conjugates of haematoporphyrin with albumin and transferrin, *J. Photochem. Photobiol. B Biol.*, **26**, 45-56, doi: 10.1016/1011-1344(94)85035-6.
 43. Sardoiwala, M. N., Kushwaha, A. C., Dev, A., Shrimali, N., Guchhait, P., et al. (2020) Hypericin-loaded transferrin nanoparticles induce PP2A-regulated BMI1 degradation in colorectal cancer-specific chemo-photodynamic therapy, *ACS Biomater. Sci. Eng.*, **6**, 3139-3153, doi: 10.1021/acsbiomaterials.9b01844.
 44. Schneider, R., Schmitt, F., Frochot, C., Fort, Y., Lourette, N., et al. (2005) Design, synthesis, and biological evaluation of folic acid targeted tetraphenylporphyrin as novel photosensitizers for selective photodynamic therapy, *Bioorg. Med. Chem.*, **13**, 2799-2808, doi: 10.1016/j.bmc.2005.02.025.
 45. Gravier, J., Schneider, R., Frochot, C., Bastogne, T., Schmitt, F., et al. (2008) Improvement of meta-tetra(hydroxyphenyl)chlorin-like photosensitizer selectivity with folate-based targeted delivery. Synthesis and *in vivo* delivery studies, *J. Med. Chem.*, **51**, 3867-3877, doi: 10.1021/jm800125a.
 46. Nwahara, N., Abrahams, G., Prinsloo, E., and Nyokong, T. (2021) Folic acid-modified phthalocyanine-nanozyme loaded liposomes for targeted photodynamic therapy, *Photodiagnosis Photodyn. Ther.*, **36**, 102527, doi: 10.1016/j.pdpdt.2021.102527.

47. Liang, X., Xie, Y., Wu, J., Wang, J., Petković, M., et al. (2021) Functional titanium dioxide nanoparticle conjugated with phthalocyanine and folic acid as a promising photosensitizer for targeted photodynamic therapy *in vitro* and *in vivo*, *J. Photochem. Photobiol. B*, **215**, 112122, doi: 10.1016/j.jphotobiol.2020.112122.
48. Akbarzadeh, F., Khoshgard, K., Arkan, E., Hosseinzadeh, L., and Hemati Azandaryani, A. (2018) Evaluating the photodynamic therapy efficacy using 5-aminolevulinic acid and folic acid-conjugated bismuth oxide nanoparticles on human nasopharyngeal carcinoma cell line, *Artif. Cells Nanomed. Biotechnol.*, **46**, 514–523, doi: 10.1080/21691401.2018.1501376.
49. Hwang, J. W., Jung, S. J., Cheong, T. C., Kim, Y., Shin, E. P., et al. (2019) Smart hybrid nanocomposite for photodynamic inactivation of cancer cells with selectivity, *J. Phys. Chem. B*, **123**, 6776–6783, doi: 10.1021/acs.jpcc.9b04301.
50. Son, J., Yang, S. M., Yi, G., Roh, Y. J., Park, H., et al. (2018) Folate-modified PLGA nanoparticles for tumor-targeted delivery of pheophorbide a *in vivo*, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **498**, 523–528, doi: 10.1016/j.bbrc.2018.03.013.
51. Bharathiraja, S., Moorthy, M. S., Manivasagan, P., Seo, H., Lee, K. D., et al. (2017) Chlorin e6 conjugated silica nanoparticles for targeted and effective photodynamic therapy, *Photodiagnosis Photodyn. Ther.*, **19**, 212–220, doi: 10.1016/j.pdpdt.2017.06.001.
52. Hilgenbrink, A. R., and Low, P. S. (2005) Folate receptor-mediated drug targeting: from therapeutics to diagnostics, *J. Pharm. Sci.*, **94**, 2135–2146, doi: 10.1002/jps.20457.
53. Scaranti, M., Cojocaru, E., Banerjee, S., and Banerji, U. (2020) Exploiting the folate receptor α in oncology, *Nat. Rev. Clin. Oncol.*, **17**, 349–359, doi: 10.1038/s41571-020-0339-5.
54. Juillerat-Jeanneret, L., and Schmitt, F. (2007) Chemical modification of therapeutic drugs or drug vector systems to achieve targeted therapy: looking for the Grail, *Med. Res. Rev.*, **27**, 574–590, doi: 10.1002/med.20086.
55. Pan, X., Xie, J., Li, Z., Chen, M., Wang, M., et al. (2015) Enhancement of the photokilling effect of aluminum phthalocyanine in photodynamic therapy by conjugating with nitrogen-doped TiO₂ nanoparticles, *Colloids Surf. B Biointerfaces*, **130**, 292–298, doi: 10.1016/j.colsurfb.2015.04.028.
56. Yang, S. W., Jeong, Y. I., Kook, M. S., and Kim, B. H. (2022) Reactive oxygen species and folate receptor-targeted nanophotosensitizers composed of folic acid-conjugated and poly(ethylene glycol)-chlorin e6 tetramer having diselenide linkages for targeted photodynamic treatment of cancer cells, *Int. J. Mol. Sci.*, **23**, 3117, doi: 10.3390/ijms23063117.
57. Salomon, D. S., Brandt, R., Ciardiello, F., and Normanno, N. (1995) Epidermal growth factor-related peptides and their receptors in human malignancies, *Crit. Rev. Oncol. Hematol.*, **19**, 183–232, doi: 10.1016/1040-8428(94)00144-i.
58. Vieira, A. V., Lamaze, C., and Schmid, S. L. (1996) Control of EGF receptor signaling by clathrin-mediated endocytosis, *Science*, **274**, 2086–2089, doi: 10.1126/science.274.5295.2086.
59. Lutsenko, S. V., Feldman, N. B., Finakova, G. V., Posypanova, G. A., Severin, S. E., et al. (1999) Targeting phthalocyanines to tumor cells using epidermal growth factor conjugates, *Tumor Biol.*, **20**, 218–224, doi: 10.1159/000030066.
60. Gijssens, A., Missiaen, L., Merlevede, W., and De Witte, P. (2000) Epidermal growth factor-mediated targeting of chlorin e₆ selectively potentiates its photodynamic activity, *Cancer Res.*, **60**, 2197–2202.
61. Castilho, M. L., Jesus, V. P. S., Vieira, P. F. A., Hewitt, K. C., and Raniero, L. (2021) Chlorin e₆–EGF conjugated gold nanoparticles as a nanomedicine based therapeutic agent for triple negative breast cancer, *Photodiagnosis Photodyn. Ther.*, **33**, 102186, doi: 10.1016/j.pdpdt.2021.102186.
62. Tsai, W.-H., Yu, K.-H., Huang, Y.-C., and Lee, C.-I. (2018) EGFR-targeted photodynamic therapy by curcumin-encapsulated chitosan/TPP nanoparticles, *Int. J. Nanomed.*, **13**, 903–916, doi: 10.2147/IJN.S148305.
63. Liu, Q., Pang, M., Tan, S., Wang, J., Chen, Q., et al. (2018) Potent peptide-conjugated silicon phthalocyanines for tumor photodynamic therapy, *J. Cancer*, **9**, 310–320, doi: 10.7150/jca.22362.
64. Wu, J., Lin, Y., Li, H., Jin, Q., and Ji, J. (2017) Zwitterionic stealth peptide-capped 5-aminolevulinic acid prodrug nanoparticles for targeted photodynamic therapy, *J. Colloid Interf. Sci.*, **485**, 251–259, doi: 10.1016/j.jcis.2016.09.012.
65. Kamarulzaman, E. E., Gazzali, A. M., Acherar, S., Frochot, C., Barberi-Heyob, M., et al. (2015) New peptide-conjugated chlorin-type photosensitizer targeting neuropilin-1 for anti-vascular targeted photodynamic therapy, *Int. J. Mol. Sci.*, **16**, 24059–24080, doi: 10.3390/ijms161024059.
66. Thomas, N., Bechet, D., Becuwe, P., Tirand, L., Vanderesse, R., et al. (2009) Peptide-conjugated chlorin-type photosensitizer binds neuropilin-1 *in vitro* and *in vivo*, *J. Photochem. Photobiol. B*, **96**, 101–108, doi: 10.1016/j.jphotobiol.2009.04.008.
67. Yan, S., Tang, D., Hong, Z., Wang, J., Yao, H., et al. (2021) CD133 peptide-conjugated pyropheophorbide-a as a novel photosensitizer for targeted photodynamic therapy in colorectal cancer stem cells, *Biomater. Sci.*, **9**, 2020–2031, doi: 10.1039/d0bm01874k.
68. El-Akra, N., Noirot, A., Faye, J. C., and Souchard, J. P. (2006) Synthesis of estradiol–pheophorbide a conjugates: evidence of nuclear targeting, DNA damage and improved photodynamic activity in human breast cancer and vascular endothelial cells,

- Photochem. Photobiol. Sci.*, **5**, 996-999, doi: 10.1039/b606117f.
69. Swamy, N., Purohit, A., Fernandez-Gacio, A., Jones, G. B., and Ray, R. (2006) Nuclear estrogen receptor targeted photodynamic therapy: selective uptake and killing of MCF-7 breast cancer cells by a C17 α -alkynylestradiol-porphyrin conjugate, *J. Cell. Biochem.*, **99**, 966-977, doi: 10.1002/jcb.20955.
 70. Khan, E. H., Ali, H., Tian, H., Rousseau, J., Tessier, G., et al. (2003) Synthesis and biological activities of phthalocyanine-estradiol conjugates, *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **13**, 1287-1290, doi: 10.1016/s0960-894x(03)00120-3.
 71. Fernandez-Gacio, A., Fernandez-Marcos, C., Swamy, N., Dunn, D., and Ray, R. (2006) Photodynamic cell-kill analysis of breast tumor cells with a tamoxifen-pyropheophorbide conjugate, *J. Cell. Biochem.*, **99**, 665-670, doi: 10.1002/jcb.20932.
 72. Iqbal, J., Ginsburg, O. M., Wijeratne, T. D., Howell, A., Evans, G., et al. (2012) Endometrial cancer and venous thromboembolism in women under age 50 who take tamoxifen for prevention of breast cancer: a systematic review, *Cancer Treat. Rev.*, **38**, 318-328, doi: 10.1016/j.ctrv.2011.06.009.
 73. Dong, C., and Chen, L. (2014) Second malignancies after breast cancer: the impact of adjuvant therapy, *Mol. Clin. Oncol.*, **2**, 331-336, doi: 10.3892/mco.2014.250.
 74. Díaz, M., Lobo, F., Hernández, D., Amesty, Á., Valdés-Baizabal, C., et al. (2021) FLT3L: a novel tamoxifen derivative endowed with antiestrogenic, fluorescent, and photosensitizer properties, *Int. J. Mol. Sci.*, **22**, 5339, doi: 10.3390/ijms22105339.
 75. Pawar, S., Koneru, T., McCord, E., Tatiparti, K., Sau, S., et al. (2021) LDL receptors and their role in targeted therapy for glioma: a review, *Drug Discov. Today*, **26**, 1212-1225, doi: 10.1016/j.drudis.2021.02.008.
 76. Floeth, M., Elges, S., Gerss, J., Schwöppe, C., Kessler, T., et al. (2021) Low-density lipoprotein receptor (LDLR) is an independent adverse prognostic factor in acute myeloid leukaemia, *Br. J. Haematol.*, **192**, 494-503, doi: 10.1111/bjh.16853.
 77. Jori, G., and Reddi, E. (1993) The role of lipoproteins in the delivery of tumour-targeting photosensitizers, *Int. J. Biochem.*, **25**, 1369-1375, doi: 10.1016/0020-711x(93)90684-7.
 78. Zhou, C., Milanesi, C., and Jori, G. (1988) An ultrastructural comparative evaluation of tumors photosensitized by porphyrins administered in aqueous solution, bound to liposomes or to lipoproteins, *Photochem. Photobiol.*, **48**, 487-492, doi: 10.1111/j.1751-1097.1988.tb02850.x.
 79. Hamblin, M. R., and Newman, E. L. (1994) Photosensitizer targeting in photodynamic therapy. II. Conjugates of haematoporphyrin with serum lipoproteins, *J. Photochem. Photobiol.*, **26**, 147-157, doi: 10.1016/1011-1344(94)07036-9.
 80. Polo, L., Valduga, G., Jori, G., and Reddi, E. (2002) Low-density lipoprotein receptors in the uptake of tumour photosensitizers by human and rat transformed fibroblasts, *Int. J. Biochem. Cell Biol.*, **34**, 10-23, doi: 10.1016/s1357-2725(01)00092-9.
 81. Song, L., Li, H., Sunar, U., Chen, J., Corbin, I., et al. (2007) Naphthalocyanine-reconstituted LDL nanoparticles for *in vivo* cancer imaging and treatment, *Int. J. Nanomedicine*, **2**, 767-774.
 82. Wang, C., Zhao, X., Jiang, H., Wang, J., Zhong, W., et al. (2021) Transporting mitochondrion-targeting photosensitizers into cancer cells by low-density lipoproteins for fluorescence-feedback photodynamic therapy, *Nanoscale*, **13**, 1195-1205, doi: 10.1039/d0nr07342c.
 83. Cao, W., Ng, K. K., Corbin, I., Zhang, Z., Ding, L., et al. (2009) Synthesis and evaluation of a stable bacteriochlorophyll-analog and its incorporation into high-density lipoprotein nanoparticles for tumor imaging, *Bioconjug. Chem.*, **20**, 2023-2031, doi: 10.1021/bc900404y.
 84. Fujita, M., Lee, B.-S., Khazenzon, N. M., Penichet, M. L., Wawrowsky, K. A., et al. (2007) Brain tumor tandem targeting using a combination of monoclonal antibodies attached to biopoly(β -L-malic acid), *J. Control Release*, **122**, 356-363, doi: 10.1016/j.jconrel.2007.05.032.
 85. Savellano, P., and Hasan, T. (2005) Photochemical targeting of epidermal growth factor receptor: a mechanistic study, *Clin. Can. Res.*, **11**, 1658-1668, doi: 10.1158/1078-0432.CCR-04-1902.
 86. Low, K. P., Bhuvaneswari, R., Thong, P. S., Bunte, R. M., and Soo, K. C. (2016) Novel delivery of Chlorin e6 using anti-EGFR antibody tagged virosomes for fluorescence diagnosis of oral cancer in a hamster cheek pouch model, *Eur. J. Pharm. Sci.*, **83**, 143-154, doi: 10.1016/j.ejps.2015.12.023.
 87. Nishie, H., Kataoka, H., Yano, S., Yamaguchi, H., Nomoto, A., et al. (2018) Excellent anti-tumor effects for gastrointestinal cancers using photodynamic therapy with a novel glucose conjugated chlorin e6, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **496**, 1204-1209, doi: 10.1016/j.bbrc.2018.01.171.
 88. Osaki, T., Hibino, S., Yokoe, I., Yamaguchi, H., Nomoto, A., et al. (2019) A basic study of photodynamic therapy with glucose-conjugated chlorin e6 using mammary carcinoma xenografts, *Cancers (Basel)*, **11**, 636, doi: 10.3390/cancers11050636.
 89. Desroches, M. C., Kasselouri, A., Meyniel, M., Fontaine, P., Goldmann, M., et al. (2004) Incorporation of glycoconjugated porphyrin derivatives into phospholipid monolayers: a screening method for the evaluation of their interaction with a cell membrane, *Langmuir*, **20**, 11698-11705, doi: 10.1021/la0482610.
 90. Bautista-Sanchez, A., Kasselouri, A., Desroches, M. C., Blais, J., Maillard, P., et al. (2005) Photophysical properties of glucoconjugated chlorins and porphyrins and their associations with cyclodextrins, *J. Photochem.*

Photobiol. B Biol., **81**, 154-162, doi: 10.1016/j.jphotobiol.2005.05.013.

91. Soyama, T., Sakuragi, A., Oishi, D., Kimura, Y., Aoki, H., et al. (2021) Photodynamic therapy

exploiting the anti-tumor activity of mannose-conjugated chlorin e6 reduced M2-like tumor-associated macrophages, *Transl. Oncol.*, **14**, 101005, doi: 10.1016/j.tranon.2020.101005.

BIOCHEMICAL BASIS OF SELECTIVE ACCUMULATION AND TARGETED DELIVERY OF PHOTOSENSITIZERS INTO TUMOR TISSUES

Review

V. I. Ivanova-Radkevich

*Peoples' Friendship University of Russia (RUDN University),
117198 Moscow, Russia; e-mail: ivanova-radkevich-vi@rudn.ru*

The basis of the method of photodynamic therapy of malignant neoplasms is the selectivity of the accumulation of photosensitizers in the tumor tissue. Insufficient selectivity of photosensitizers in relation to pathologically altered tissues and generalized distribution throughout the body leads to the development of severe toxic effects, including skin phototoxicity. The mechanisms of selectivity of photosensitizers for tumor tissue include selective binding to blood proteins and lipoproteins, the number of receptors for which is increased on tumor cell membranes, uptake by macrophages, better solubility at low pH, characteristic of tumor cells, and other mechanisms. At present, the increase in the efficiency of photodynamic therapy is largely associated with the additional targeting of photosensitizers to tumor tissues. Targeted delivery strategies are based on differences in metabolism and expression profiles of tumor and healthy cells. In these cells, receptors, proteases, or transmembrane transporters may be expressed differently. In particular, accelerated metabolism in many types of tumors leads to overexpression of receptors for epidermal growth factor, folic acid, transferrin, and a number of other compounds. This review considers the biochemical basis for the selective accumulation of various classes of photosensitizers in tumors (chlorins, phthalocyanines, 5-aminolevulinic acid derivatives, etc.) and discusses various targeted delivery strategies with an emphasis on conjugation of photosensitizers with receptor ligands overexpressed in tumor cells.

Keywords: photodynamic therapy, photosensitizer, targeted delivery, selectivity, chlorine, aminolevulinic acid

УДК 577.11

ТЕРМОДИНАМИКА И КИНЕТИКА РАЗВОРАЧИВАНИЯ АНТИПАРАЛЛЕЛЬНЫХ G-КВАДРУПЛЕКСОВ В АПТАМЕРАХ К ТРОМБИНУ

© 2022 В.А. Спиридонова, Ю.О. Наумова, П.А. Николаева,
Т.М. Новикова, Г.Я. Коломийцева*

*НИИ физико-химической биологии имени А.Н. Белозерского
Московского государственного университета имени М.В. Ломоносова,
119992 Москва, Россия; электронная почта: kolom@genebee.msu.ru*

Поступила в редакцию 28.05.2022

После доработки 09.09.2022

Принята к публикации 09.09.2022

Изучен процесс разворачивания G-квадруплекса ДНК-аптамера RE31 и его комплекса с тромбином под действием флуоресцентно-меченных комплементарных олигонуклеотидов разной длины с образованием двуспиральных структур. Предполагается, что разворачивание G-квадруплекса идет через образование промежуточного комплекса с олигонуклеотидом. Кинетические и термодинамические параметры разворачивания свободного аптамера и его комплекса с тромбином различаются. Удлинение комплементарной последовательности G-квадруплекса на два нуклеотида, захватывающее так называемую «шарнирную область», практически не влияло на конформационный переход G-квадруплекса свободного аптамера, тогда как для комплекса аптамера с белком наблюдался отчетливо выраженный эффект. Наиболее вероятной причиной этих различий является индуцируемая тромбином конформационная перестройка аптамера, затрагивающая шарнирную область.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: ДНК-аптамеры, тромбин, G-квадруплекс, антидот.

DOI: 10.31857/S0320972522110021, **EDN:** LVCTQU

ВВЕДЕНИЕ

Одним из актуальных направлений молекулярной медицины является создание лекарственных препаратов на основе нуклеиновых кислот. Методом SELEX (Systematic Evolution of Ligands by EXponential enrichment) отбирают эффективные синтетические олигонуклеотиды (в том числе модифицированные), обладающие высоким сродством к белковой мишени. Было показано, что полученные олигонуклеотиды, называемые аптамерами, можно использовать не только для ингибирования активности белка, но и для регулирования клеточных процессов. В последние годы данные молекулы привлекают все больше внимания исследователей, ввиду потенциальных возможностей их применения в биотехнологии и медицине, а также при решении ряда фундаментальных научных проблем молекулярной биологии.

Наиболее известны и уже основательно изучены аптамеры к тромбину, которые могут снижать его избыточную активность. Тромбин – сериновая протеиназа семейства химотрипсина, центральный белок системы свертывания крови человека и животных. Его избыточная активность может приводить к внутрисосудистому тромбообразованию, что чревато такими заболеваниями, как инсульт, инфаркт миокарда, нестабильная стенокардия. Аптамеры к тромбину – это однотяжелые ДНК- или РНК-олигонуклеотиды длиной до нескольких десятков мономерных единиц, специфически связывающие белок. Они представляют собой перспективные соединения для разработки лекарственных препаратов [1, 2]. Одним из наиболее исследуемых ингибиторов тромбина является открытый еще в 1992 г. аптамер 15TBA [3], на основе которого были синтезированы аптамеры второго поколения,

Принятые сокращения: FAM – 6-карбоксифлуоресцеин; 15TBA – ДНК-аптамер первого поколения; RE31 – ДНК-аптамер второго поколения.

* Адресат для корреспонденции.

включающие в свою структуру различные дополнительные олигонуклеотидные последовательности на 3'- и 5'-концах G-квадруплексов. Их взаимодействие с белками изучалось в сравнении с 15ТВА. Удачно выбранная вторичная структура некоторых из них и комплементарность дополнительных олигонуклеотидных последовательностей обеспечили высокое сродство к тромбину. Если аптамер 15ТВА уже детально исследован, то для аптамеров второго поколения, к которым относится аптамер RE31, полученная информация весьма ограничена [4, 5].

Структура комплекса аптамера RE31 с тромбином была определена методом рентгеноструктурного анализа [6]. G-Квадруплекс, образованный аптамером RE31, содержит одну петлю TGT и две петли TT, причем последние взаимодействуют с экзосайтом I тромбина. За счет этого предотвращается связывание экзосайта I с фибриногеном и рецепторами на поверхности тромбоцитов, что приводит к стимуляции тромбином образования фибрина из фибриногена и агрегации тромбоцитов [5].

Особая роль G-квадруплекса в функционировании ДНК-аптамера связана с тем, что он может как образовываться, так и разрушаться при изменении условий или под действием определенных экзогенных факторов. G-Квадруплексы отличаются высокой термодинамической стабильностью и образуются путем стэкинг-взаимодействий гуаниновых кватетов. Каждый G-кватет скреплен восемью водородными связями, образованными с Уотсон-Криковской стороны одного гуанинового основания с Хугстиновской стороной другого. За образованием и разрушением G-квадруплексов наблюдают по спектрам кругового дихроизма (КД) [7, 8], УФ-спектроскопии [9, 10], дифференциальной сканирующей калориметрии [11, 12], флуоресцентной спектроскопии (FRET) [13–16], ЯМР-спектроскопии [17, 18], рентгеноструктурным анализом (РСА) [19, 20] и др. Аптамер RE31 исследовался только спектрами КД и РСА [4, 6]. Показано, что только аптамеры, образующие G-квадруплекс, могут формировать устойчивый комплекс с тромбином [4]. Однако данных о стабильности

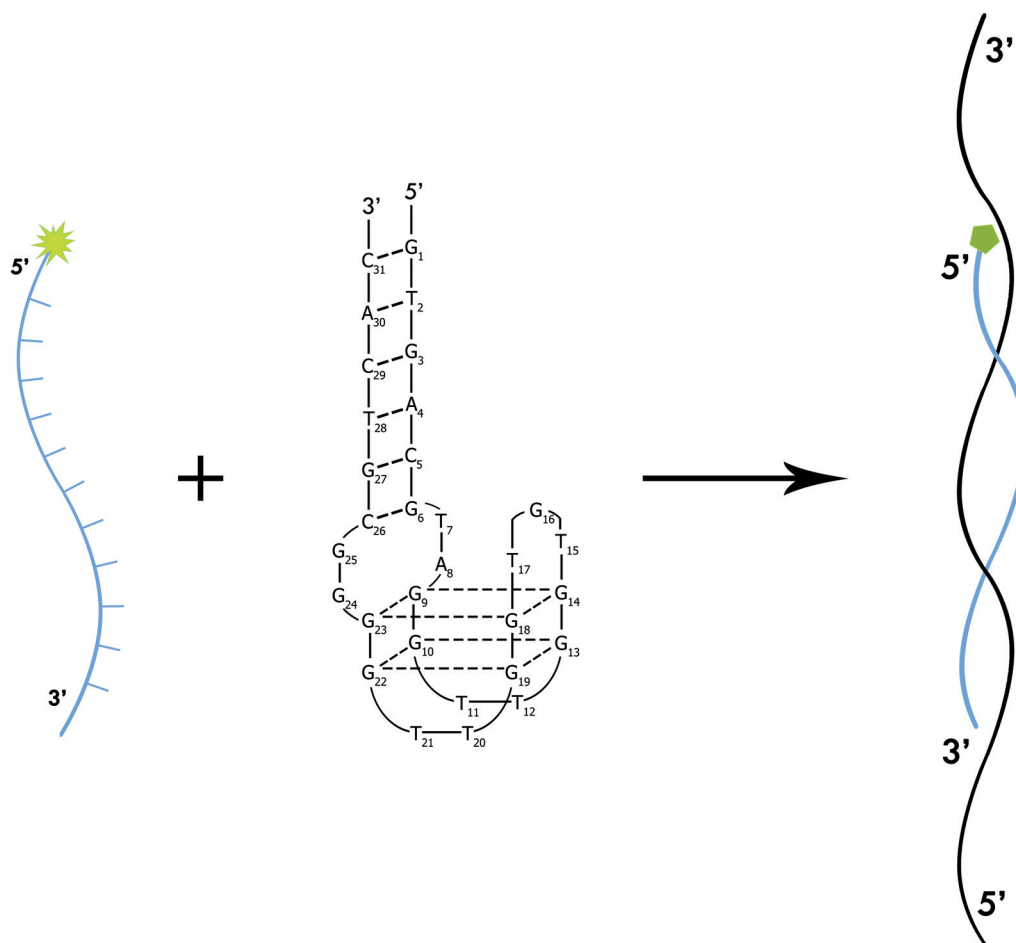


Рис. 1. Схема разворачивания аптамера RE31 несущим FAM-метку олигонуклеотидом FAMcompl15, комплементарным G-квадруплексному мотиву от G9 до G23

G-квадруплекса аптамера RE31 в комплексе с белком не так много [21].

Целью настоящего исследования стало изучение разворачивания G-квадруплексов в составе свободного аптамера RE31 и в аптамер-белковом комплексе под действием различных комплементарных олигонуклеотидов, меченных 6-карбоксихлорофлуоресцеином (FAM) на конце. Для решения этой задачи в нашем исследовании был использован оригинальный кинетический подход, предложенный Mendoza et al. [22]. Авторы обнаружили, что связывание комплементарных олигонуклеотидов с аптамером и вызванное этим разрушение G-квадруплексной структуры приводит к параллельному уменьшению интенсивности флуоресценции FAM-метки. Считается, что тушение флуоресценции происходит из-за спаривания 2'-дезоксцитидина, несущего метку, с концевым 2'-дезоксигуанозином развернутого G-квадруплекса (рис. 1).

В нашу задачу входило определение кинетических и термодинамических параметров (ТП) реакции образования-разворачивания антипараллельного G-квадруплекса в аптамере RE31 и в его комплексе с белком тромбином под действием различных по последовательности комплементарных олигонуклеотидов.

В дальнейшем понятие «комплементарный олигонуклеотид» будет применяться ко всем флуоресцентно-меченым олигомерам, комплементарным не только G-квадруплексному мотиву, но и шарнирной зоне аптамера RE31.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В работе использовали 100 мкМ раствор аптамера RE31 (5'-GTGACGTAGGTTGGTGTG GTTGGGGCGTCAC-3'). В качестве олигонуклеотидов, комплементарных к разным участкам аптамера, использовали меченые 15-звенный FAMcompl15 (5'-FAM-ССААССАСА ССААСС-3') и 17-звенный FAMcompl17 (5'-FAM-ССССААССАСАССААСС-3'). FAMcompl15 полностью комплементарен только G-квадруплексному мотиву, тогда как FAMcompl17 комплементарен как G-квадруплексу, так и начальной области шарнира, соединяющего квадруплексный и дуплексный домены. Олигонуклеотиды синтезированы и предоставлены в лиофилизированном виде фирмой «Синтол», Россия.

Комплекс аптамера с тромбином готовили в объеме 50 мкл, концентрация аптамера в реакционной смеси составляла 20 мкМ. Аптамеры подвергали стандартной предварительной пробоподготовке [23]. Раствор аптамера пред-

варительно прогревали при 90 °С в течение 5 мин, затем резко охлаждали во льду и добавляли 150 мкМ тромбина. Было также показано, что тромбин не влияет на флуоресценцию комплементарного олигонуклеотида. Смесь инкубировали при 5 °С в течение 2 ч. Комплексы аптамера с тромбином были охарактеризованы с помощью электрофореза в 8%-ном полиакриламидном геле (ПААГ) в неденатурирующих условиях и поверхностного плазмонного резонанса.

Инкубацию проводили в среде, содержащей 20 мМ Hepes-KOH, 140 мМ NaCl, 5 мМ KCl, pH 7,4 (буфер А) или 20 мМ Tris-HCl, 140 мМ NaCl, 5 мМ KCl, pH 7,2 (буфер Б). Буферы готовили при комнатной температуре (25 °С). Буфер А использовался при формировании комплексов аптамера RE31 с FAM-содержащим олигонуклеотидом. Буфер Б использовался для получения спектров кругового дихроизма.

Флуоресценция. Флуоресценцию измеряли на приборе CLARIOstar («BMG LABTECH», Германия). Длины волн возбуждения и испускания флуоресценции составляли 494 и 550 нм соответственно. В ячейки планшета последовательно добавляли 100 мкл буфера А с FAM-олигонуклеотидом, последовательность которого была комплементарна образующей G-квадруплекс последовательности аптамера. Далее вносили 2 мкл раствора аптамера или 5 мкл комплекса аптамера с тромбином так, чтобы конечная концентрация аптамера в реакционной смеси составляла 2 мкМ, а концентрация FAM-олигонуклеотида – в 10 раз меньше (0,2 мкМ).

Круговой дихроизм. В качестве контроля для подтверждения присутствия G-квадруплекса в составе аптамера RE31 в условиях реакции были приготовлены 2,5 мкМ растворы аптамеров или 3 мкМ растворы комплексов аптамеров с тромбином в буфере Б. Спектры КД регистрировали при различных температурах на спектрометре Chirascan («Applied Photophysics Ltd», Англия), оснащенном термоконтроллером. Плавление производили в интервале 10–90 °С со скоростью 1 °С в мин. Спектры регистрировали каждые 5 °С в диапазоне длин волн 220–360 нм. Скорость изменения длины волны составляла 1 нм/с. Спектр буфера, не содержащего олигонуклеотиды, был принят в качестве базовой линии. Величину молярного абсорбционного коэффициента в $\text{см}^{-1} \cdot \text{M}^{-1}$ рассчитывали по уравнению $\Delta\epsilon = \Delta A / (c \cdot l)$, где ΔA – разность поглощений света, регистрируемая прибором, c – концентрация (моль/литр), l – длина оптического пути в см.

Поверхностный плазмонный резонанс (ППР).

Измерения проводили на оптическом биосенсоре Biosore X («GE Healthcare», США). Тромбин был иммобилизован из 100 нМ раствора через NH₂-группу на поверхности чипа Sensor Chip CM5. Проточную ячейку заполняли буфером А. Для образования белково-нуклеинового комплекса раствор аптамера (0,1–350 нМ) вводили порциями по 30 мкл со скоростью 10 мкл/мин при комнатной температуре. После добавления каждой порции аптамера ячейку промывали 10 мкл 2 М раствора NaCl. Полученные сенсограммы обрабатывали, используя пакет программ BIACOREX.

Обработка результатов. Константу скорости k для реакции первого порядка определяли из наклона графика зависимости логарифма интенсивности флуоресценции от времени. Энергию активации E_a определяли согласно уравнению Аррениуса (1) из наклона графика зависимости натурального логарифма k от обратной абсолютной температуры T . В уравнении (1) A — предэкспоненциальный множитель, R — универсальная газовая постоянная:

$$k = A \cdot e^{-\frac{E_a}{RT}} \quad (1)$$

Термодинамические параметры образования переходного состояния (изменения энтальпии ΔH^\ddagger и энтропии ΔS^\ddagger) были рассчитаны по уравнению Эйринга (2):

$$k = \frac{k_B T}{h} \cdot e^{-\frac{\Delta G}{RT}} \quad (2)$$

преобразованного в логарифмическую форму (3):

$$\frac{\ln k}{T} = \frac{\ln k_B}{h} - \frac{\Delta H}{RT} + \frac{\Delta S}{R} \quad (3)$$

где k_B — постоянная Больцмана, h — постоянная Планка. Значения ΔH^\ddagger и ΔS^\ddagger получали из наклона графика линейной зависимости логарифма k/T от $1/T$ и отсекаемого им на оси ординат отрезка. Линейную регрессию проводили в программе «Microsoft Excel».

Для построения рисунков использовали программу «OriginPro 8.5».

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

На рис. 2 приведены вторичные структуры наиболее известного аптамера 15ТВА и аптамера второго поколения RE31 к тромбину. Нуклеотидный мотив G9–G23 аптамера RE31 способен складываться в G-квадруплекс, который соединен шарнирной областью из четырех

нуклеотидов T7, A8, G24 и G25 с дуплексным районом из шести пар нуклеотидов.

Методом КД была подтверждена топология G-квадруплексов, образуемых изучаемыми аптамерами. На рис. 3 приведены контрольные эксперименты с использованием КД, которые показали, что в составе ДНК аптамеров присутствует G-квадруплекс. Спектры КД аптамеров представлены в широком диапазоне температур в буфере Б. Два положительных пика при 240 нм и 295 нм и один отрицательный пик при 260 нм свидетельствуют об образовании антипараллельного G-квадруплекса [7]. С повышением температуры интенсивность пика при 295 нм падает, что свидетельствует о термическом разрушении квадруплексной структуры. Температуры плавления ($T_{пл}$) G-квадруплексов составили 35 °С для 15ТВА и 39,5 °С — для RE31. Большая величина $T_{пл}$ для RE31 объясняется наличием дополнительной двутяжевой последовательности, обнаруженной методами рентгеноструктурного анализа [6], УФ-спектроскопии и КД [4]. Наличие изобестической точки при 280 нм в спектре КД при плавлении аптамеров подтверждает, что процесс термической денатурации (по крайней мере в первом приближении) может быть рассмотрен как смещение равновесия между структурированной и развернутой формами аптамера.

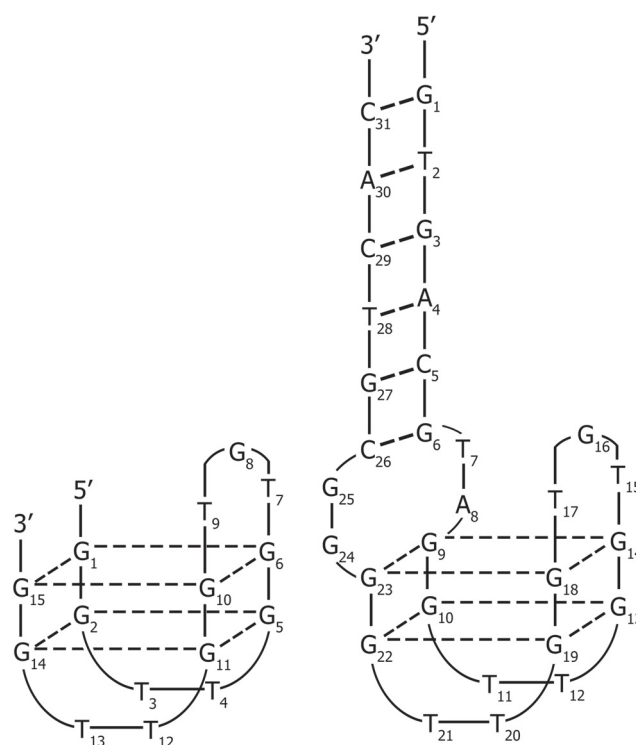


Рис. 2. Вторичная структура аптамеров 15ТВА (слева) и RE31 (справа). G-Квадруплекс 15ТВА: G1–G15; G-квадруплекс RE31: G9–G23

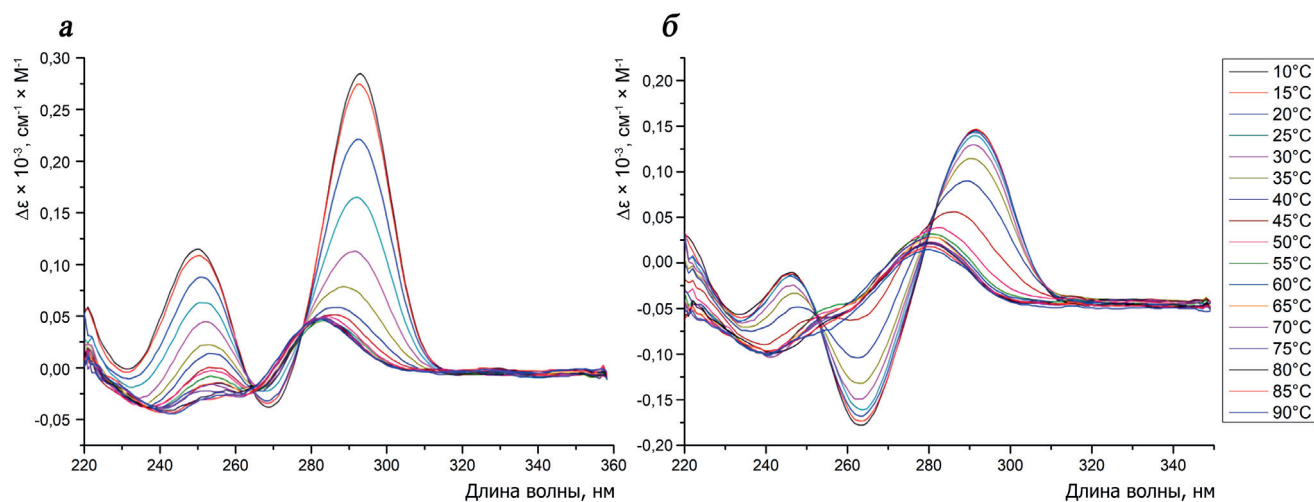


Рис. 3. Спектры КД аптамеров при разных температурах в буфере Б: а – аптамер 15TVA; б – аптамер RE31

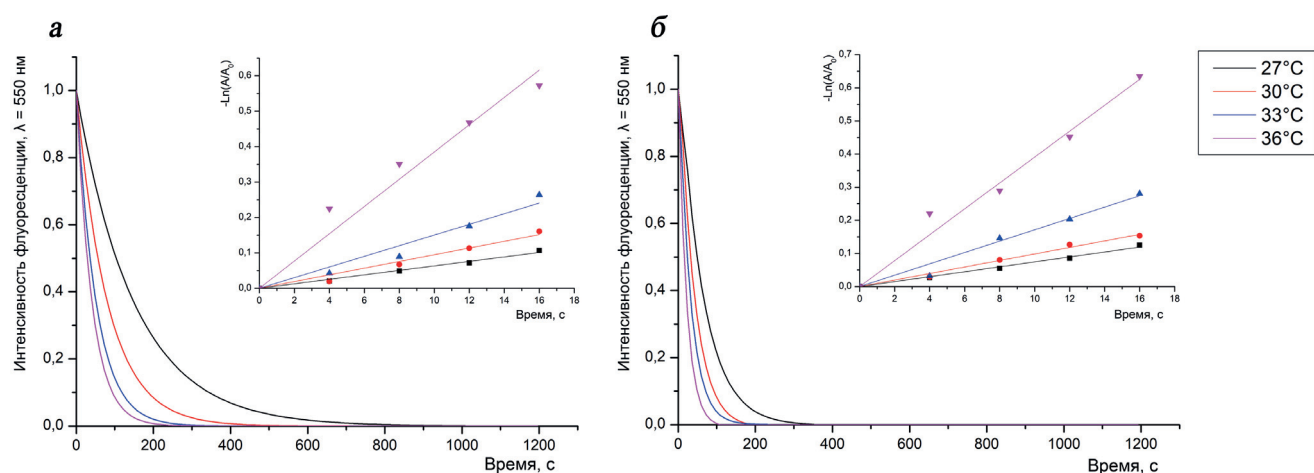


Рис. 4. Кинетика изменения интенсивности флуоресценции комплементарных олигонуклеотидов FAMcomp115 (а) и FAMcomp17 (б) при взаимодействии с аптамером RE31 при четырех температурах. Во врезке представлены данные в полулогарифмических координатах

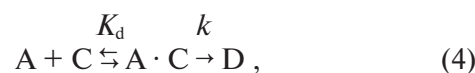
На основании данных КД описанные ниже кинетические измерения проводили при температурах 27, 30, 33 и 36 °С, при которых денатурация не превышала 10%. Это важно, поскольку взаимодействие однострочного олигонуклеотида с денатурированной ДНК происходит мгновенно, что могло сказаться на начальной интенсивности флуоресценции и привести к ошибкам. Кроме того, температура 36 °С является предельной физиологической температурой для теплокровных животных, что приближает наши эксперименты и сделанные на их основании выводы к условиям *in vivo*.

Взаимодействие комплементарных олигонуклеотидов со свободными аптамерами. При инкубации аптамеров с несущими флуоресцентную метку 15-звенным олигонуклеотидом, комплементарным образующему G-квадруплекс мотиву, и 17-звенным олигомером, взаимодействующим также с двумя нуклеотидами шарнирной последовательности аптамера, на-

блюдалось падение интенсивности флуоресценции во времени (рис. 4).

Из рисунка следует, что обе комплементарные последовательности действительно разрушают G-квадруплекс (наблюдается тушение флуоресценции), причем скорость этой реакции для обоих G-квадруплексов возрастает с увеличением температуры.

Экспериментальные кривые рис. 4 были обработаны в соответствии со схемой реакции, предполагающей разворачивание G-квадруплекса через образование промежуточного комплекса:



где А – аптамер, С – комплементарный олигонуклеотид, А · С – промежуточный комплекс, D – дуплекс, K_d – константа равновесия, k – константа скорости реакции превращения промежуточного продукта в дуплекс.

Таблица 1. Значения констант скоростей реакций разрушения G-квадруплекса модифицированными FAM-меткой комплементарными олигонуклеотидами в буфере А

Компоненты реакции	$k \times 10^3, \text{c}^{-1}$			
	27 °C	30 °C	33 °C	36 °C
RE31 + FAMcomp115	$6,6 \pm 0,2$	$10,4 \pm 0,2$	$16,5 \pm 0,5$	$34,7 \pm 0,5$
RE31 + FAMcomp117	$7,7 \pm 0,2$	$10,1 \pm 0,3$	$18,3 \pm 0,6$	$37,5 \pm 0,3$
RE31 + FAMcomp115/тромбин	$6,1 \pm 0,2$	$11,5 \pm 0,2$	$15,5 \pm 0,5$	$15,1 \pm 0,4$
RE31 + FAMcomp117/тромбин	$10,7 \pm 0,3$	$17,9 \pm 0,2$	$21,1 \pm 0,3$	$34,0 \pm 0,2$

Данная схема основана на том, что разворачивание G-квадруплексов в отличие от дуплексов практически всегда происходит с образованием квазиравновесных промежуточных метастабильных структур [24, 25]. В рамках этой схемы зависимость измеряемой константы скорости превращения G-квадруплекса в дуплекс (k_{app}) от концентрации А имеет вид:

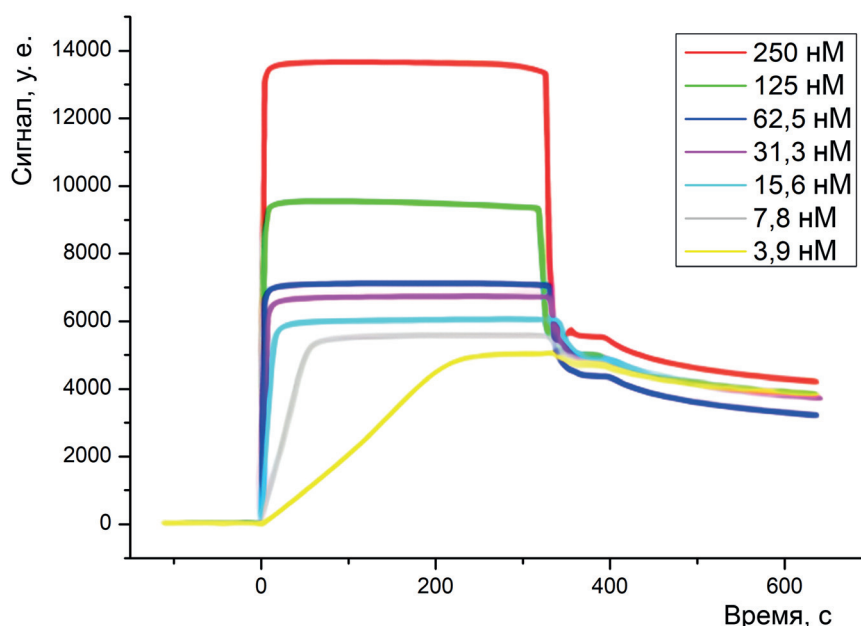
$$k_{\text{app}} = k / (1 + K_d / [A]). \quad (5)$$

Отсутствие зависимости k_{app} от концентрации аптамера при $[A] \geq 2$ мкМ (данные не приведены) означало, что эти концентрации являются насыщающими, то есть существенно превышают K_d , вследствие чего практически весь олигонуклеотид связан с аптамером и измеряемая величина k_{app} в пределах ошибки определения совпадает с величиной k .

В табл. 1 приведены значения констант скоростей реакций двух комплементарных

олигонуклеотидов с аптамером RE31. Все эксперименты проводили при концентрации ионов калия 5 мМ, которая, по литературным данным, является оптимальной для реакций разворачивания G-квадруплекса [22]. Видно, что введение двух дополнительных нуклеотидов в комплементарный олигонуклеотид слабо влияло на константу скорости во всем диапазоне температур.

Взаимодействие комплементарных олигонуклеотидов с комплексами аптамер–тромбин. С помощью контрольных экспериментов, таких как электрофорез в ПААГ [23] и методом поверхностного плазмонного резонанса (рис. 5), было подтверждено образование комплексов аптамер RE31–тромбин в реакционной смеси. Рассчитанная из сенсограмм константа диссоциации (K_d) для комплекса аптамера RE31 с тромбином составила 0,56 нМ [21]. Такое низкое значение K_d позволяет считать, что весь аптамер связан с тромбином в присут-

**Рис. 5.** Сенсограммы образования комплекса тромбин–аптамер RE31 при указанных на рисунке концентрациях тромбина. Температура – 25 °C

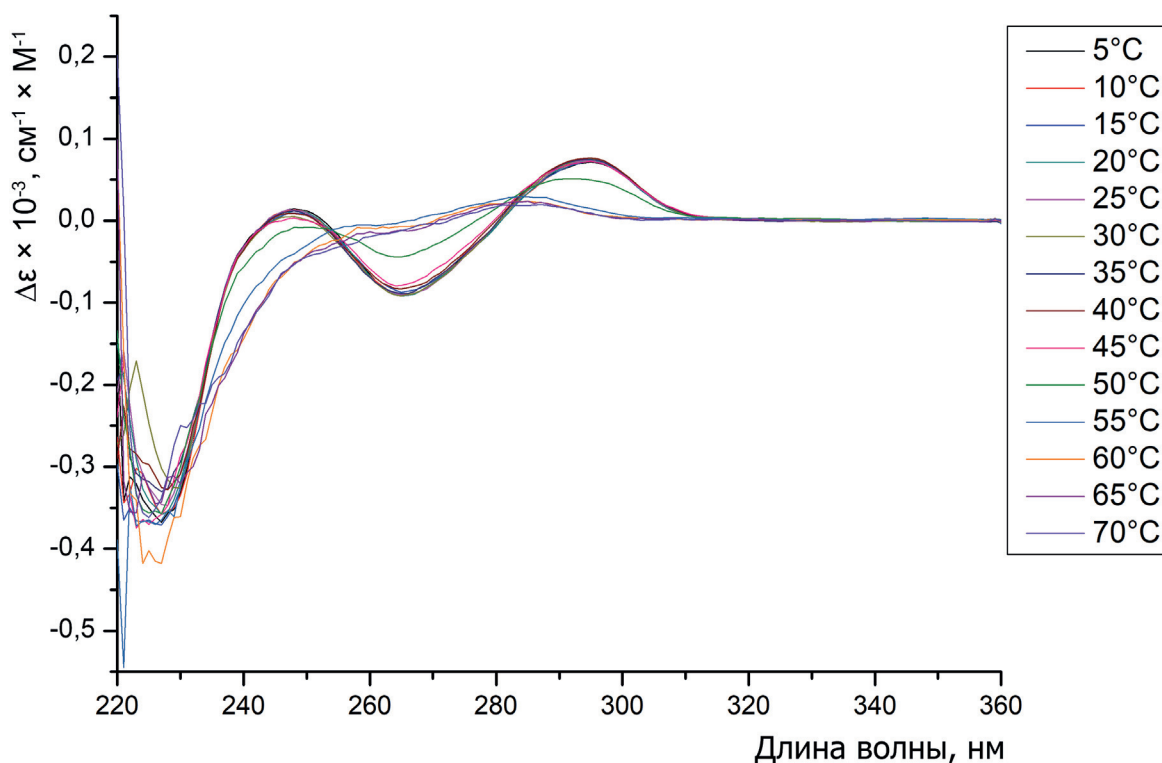


Рис. 6. Спектры КД аптамера RE31 в комплексе с тромбином при разных температурах

ствии избытка белка при получении белкового комплекса, и реакция с комплементарным олигонуклеотидом может идти только с комплексом G-квадруплекса и тромбина.

Использование метода КД дополнительно подтвердило как образование комплекса тромбин–аптамер, так и наличие G-квадруплекса в составе комплексов. На рис. 6 впервые представлены спектры КД аптамера RE31 в комплексе с тромбином при различных температурах. Интенсивность полосы при 295 нм (характерной для антипараллельного G-квадруплекса) резко падает по сравнению с индивидуальным аптамером, что подтверждает влияние тромбина на данную структуру.

Этот вывод подтвердился при анализе кинетики падения флуоресценции в опытах, аналогичных проиллюстрированным на рис. 4: наблюдали существенные, хотя и небольшие

различия в константах скорости для связанного и не связанного с тромбином аптамера (табл. 1). Повышение температуры и в этом случае увеличивало скорость реакций. Сравнение констант скоростей для разных комплементарных олигонуклеотидов однозначно свидетельствовало о том, что реакция аптамера RE31 с FAMcompl17 протекает быстрее, чем с FAMcompl15 при всех температурах.

Контрольные эксперименты показали, что при отсутствии аптамеров флуоресценция FAM-меченного олигонуклеотида не меняется ни от времени наблюдения, ни от температуры, ни от присутствия только белка, ни от концентрации комплементарной последовательности в диапазоне 1–10 мкМ.

Сравнение этих констант скоростей для двух отличающихся комплементарных олигонуклеотидных последовательностей одно-

Таблица 2. Значения термодинамических параметров реакции превращения промежуточных продуктов для свободного аптамера RE31 и в комплексе с тромбином в буфере А

Компоненты реакции	E_a , кДж/моль	ΔH^\ddagger , кДж/моль	ΔS^\ddagger , кДж/(моль·К)
RE31 + FAMcompl15	$139,5 \pm 7,9$	$136,9 \pm 8,1$	$-0,7 \pm 0,2$
RE31 + FAMcompl17	$136,9 \pm 8,2$	$134,4 \pm 8,6$	$-0,7 \pm 0,3$
RE31 + FAMcompl15/тромбин	$78,0 \pm 9,1$	$75,5 \pm 9,3$	$-0,5 \pm 0,4$
RE31 + FAMcompl17/тромбин	$93,2 \pm 9,5$	$90,7 \pm 9,4$	$-0,6 \pm 0,4$

значно свидетельствует о том, что реакция аптамера RE31 с FAMcompl17 протекает с более высокими константами, чем с FAMcompl15 при всех температурах. И при этом существуют явные, хотя и не столь выраженные, отличия от констант для реакций со свободным аптамером.

Константы скорости реакции при разных температурах использовали для расчета энергии активации Аррениуса (E_a) для превращения промежуточного комплекса в энергетически устойчивый дуплекс, а также изменения энтальпии и энтропии активации. Найденные значения приведены в табл. 2.

Рассматривая реакции разворачивания G-квадруплекса через образование метастабильного промежуточного комплекса, отмечаем, что в случае белкового комплекса энергетический барьер, требующийся для достижения переходного состояния реакций разворачивания, выше для FAMcompl17, чем для FAMcompl15. К такому же выводу можно прийти и относительно ΔH^\ddagger промежуточных комплексов. Из сравнения реакции разворачивания свободного аптамера с реакцией разворачивания его комплекса с тромбином значения первых оказались существенно выше для E_a и ΔH^\ddagger (табл. 2).

Как следует из полученных нами результатов, инкубация как свободного аптамера RE31, так и его комплекса с тромбином с флуоресцентно-мечеными комплементарными последовательностями FAMcompl17 и FAMcompl15 сопровождается уменьшением флуоресценции, свидетельствующим о разворачивании G-квадруплексов и превращении их в дуплексы. Удовлетворительное фиттирование экспериментальных кривых для реакции первого порядка для RE31 подтверждает высказанное Mendoza et al. [15] для ряда аптамеров предположение, что реакция разворачивания квадруплекса идет через образование промежуточных продуктов, распад которых и является скоростью-определяющей стадией.

Если для G-квадруплексов с одонитчатым привеском с 5'-конца Mendoza et al. [15] достаточно убедительно доказали, что реакция разворачивания комплементарной олигонуклеотидной последовательности двухстадийная, то для структур без одонитчатой добавки механизм разворачивания менее ясен. Авторы полагают, что образование интермедиата имеет место и в этом случае, то есть сначала происходит локальное взаимодействие комплементарной последовательности, такое, как образование пар через частичное перекрытие G-квадруплекса комплементом. Это и будет первичный

промежуточный продукт в реакции разворачивания. Термодинамическое описание интермедиатов в различных системах позволяет предполагать некоторые их особенности.

В наших экспериментах, в отличие от работы Mendoza et al. [15], менялась длина комплементарной последовательности, используемой для разворачивания G-квадруплекса, без изменений в последовательности самого аптамера. Интересно заметить, что если для свободного аптамера RE31 значения констант и ТП переходных промежуточных продуктов практически совпали для обоих комплементарных олигонуклеотидов, то для комплекса с белком кинетические и термодинамические параметры отличаются как между собой, так и от данных для свободных аптамеров.

Возможно, в свободном аптамере RE31 шарнирная область оказалась недоступной, и расширение области комплементарности на два нуклеотида не сказалось на эффективности реакции, но связывание белка изменило ее положение и сделало возможным и выгодным взаимодействие с более длинной олигонуклеотидной последовательностью. Образовался измененный промежуточный продукт. Что касается свободного аптамера, промежуточный продукт, скорее всего, образуется непосредственно исключительно с G-квадруплексом.

Обращает на себя внимание разница в значениях энергии активации. Энергетический барьер для превращения G-квадруплекса в составе белкового комплекса оказывается ниже, чем для свободного аптамера, хотя определяемые значения констант скоростей находятся выше для случая с FAMcompl17. Это обстоятельство может быть вызвано тем, что общая схема реакции с белковым комплексом гораздо сложнее, чем использованная нами, а определяемая константа скорости является кажущейся, а не истинной.

Таким образом, полученные результаты указывают на важность структурного соответствия во взаимодействии аптамера RE31 с комплементарными олигонуклеотидами FAMcompl15 и FAMcompl17 для последующего разворачивания G-квадруплекса.

Вклад авторов. В.А. Спиридонова – концепция и руководство работой, написание текста; Ю.О. Наумова – проведение экспериментов по измерению флуоресценции, обработка результатов, подготовка текста статьи и рисунков; П.А. Николаева – проведение экспериментов КД и ППР; Т.М. Новикова – подготовка комплексов аптамера, проведение пробоподготовки; Г.Я. Коломийцева – руко-

водство работой, расчет термодинамических параметров и констант, написание текста.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

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

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Keefe, A. D., Pai, S., and Ellington, A. (2010) Aptamers as therapeutics, *Nat. Rev. Drug Discov.*, **9**, 537-550, doi: 10.1038/nrd3141.
- Tan, S. Y., Acquah, C., Sidhu, A., Ongkudon, C. M., Yon, L. S., et al. (2016) SELEX modifications and bioanalytical techniques for aptamer–target binding characterization, *Crit. Rev. Anal. Chem.*, **46**, 521-537, doi: 10.1080/10408347.2016.1157014.
- Bock, L. C., Griffin, L. C., Latham, J. A., Vermaas, E. H., and Toole, J. J. (1992) Selection of single-stranded DNA molecules that bind and inhibit human thrombin, *Nature*, **355**, 564-566, doi: 10.1038/355564a0.
- Dolinnaya, N. G., Yuminova, A. V., Spiridonova, V. A., Arutyunyan, A. M., and Kopylov, A. M. (2012) Coexistence of G-quadruplex and duplex domains within the secondary structure of 31-mer DNA thrombin-binding aptamer, *J. Biomol. Struct. Dynamics*, **30**, 524-531, doi: 10.1080/07391102.2012.687518.
- Spiridonova, V. A., Novikova, T. M., Sizov, V. A., Shashkovskaya, V. S., Titaeva, E. V., et al. (2019) DNA aptamers to thrombin exosite I. structure-function relationships and antithrombotic effects, *Biochemistry (Moscow)*, **84**, 1521-1528, doi: 10.1134/S0006297919120113.
- Russo Krauss, I., Spiridonova, V., Pica, A., Napolitano, V., and Sica, F. (2016) Different duplex/quadruplex junctions determine the properties of anti-thrombin aptamers with mixed folding, *Nucleic Acids Res.*, **44**, 983-991, doi: 10.1093/nar/gkv1384.
- Vorlickova, M., Kejnovska, I., Sagi, J., Renciuik, D., Bednarova, K., et al. (2012) Circular dichroism and guanine quadruplexes, *Methods*, **57**, 64-75, doi: 10.1016/j.jymeth.2012.03.011.
- Olsen, C. M., and Marky, L. A. (2010) Monitoring the temperature unfolding of G-quadruplexes by UV and circular dichroism spectroscopies and calorimetry techniques, *Methods Mol. Biol.*, **608**, 147-158, doi: 10.1007/978-1-59745-363-9_10.
- Karsisiotis, A. I., Hessari, N. M., Novellino, E., Spada, G. P., Randazzo, A., et al. (2011) Topological characterization of nucleic acid G-quadruplexes by UV absorption and circular dichroism, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, **50**, 10645-10648, doi: 10.1002/anie.201105193.
- Tran, P. L., Mergny, J. L., and Alberti, P. (2011) Stability of telomeric G-quadruplexes, *Nucleic Acids Res.*, **39**, 3282-3294, doi: 10.1093/nar/gkq1292.
- Shek, Y. L., Noudeh, G. D., Nazari, M., Heerklotz, H., Abu-Ghazalah, R. M., et al. (2014) Folding thermo-dynamics of the hybrid-1 type intramolecular human telomeric G-quadruplex, *Biopolymers*, **101**, 216-227, doi: 10.1002/bip.22317.
- Petraccone, L., Spink, C., Trent, J. O., Garbett, N. C., Mekmaysy, C. S., et al. (2011) Structure and stability of higher-order human telomeric quadruplexes, *J. Am. Chem. Soc.*, **133**, 20951-20961, doi: 10.1021/ja209192a.
- De Rache, A., and Mergny, J. L. (2015) Assessment of selectivity of G-quadruplex ligands via an optimised FRET melting assay, *Biochimie*, **115**, 194-202, doi: 10.1016/j.biochi.2015.06.002.
- Kwok, C. K., Sherlock, M. E., and Bevilacqua, P. C. (2013) Effect of loop sequence and loop length on the intrinsic fluorescence of G-quadruplexes, *Biochemistry*, **52**, 3019-3021, doi: 10.1021/bi400139e.
- Mendoza, O., Gueddouda, N. M., Boule, J. B., Bourdoncle, A., and Mergny, J. L. (2015) A fluorescence-based helicase assay: application to the screening of G-quadruplex ligands, *Nucleic Acids Res.*, **43**, e71, doi: 10.1093/nar/gkv193.
- Kreig, A., Calvert, J., Sanoica, J., Cullum, E., Tipanna, R., et al. (2015) G-quadruplex formation in double strand DNA probed by NMM and CV fluorescence, *Nucleic Acids Res.*, **43**, 7961-7970, doi: 10.1093/nar/gkv749.
- Adrian, M., Heddi, B., and Phan, A. T. (2012) NMR spectroscopy of G-quadruplexes, *Methods*, **57**, 11-24, doi: 10.1016/j.jymeth.2012.05.003.
- Lim, K. W., Ng, V. C., Martin-Pintado, N., Heddi, B., and Phan, A. T. (2013) Structure of the human telomere in Na⁺ solution: an antiparallel (2+2) G-quadruplex scaffold reveals additional diversity, *Nucleic Acids Res.*, **41**, 10556-10562, doi: 10.1093/nar/gkt771.
- Russo Krauss, I., Pica, A., Merlino, A., Mazzarella, L., and Sica, F. (2013) Duplex-quadruplex motifs in a peculiar structural organization cooperatively contribute to thrombin binding of a DNA aptamer, *Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr.*, **69**, 2403-2411, doi: 10.1107/S0907444913022269.
- Troisi, R., Napolitano, V., Spiridonova, V., Russo Krauss, I., and Sica, F. (2018) Several structural motifs cooperate in determining the highly effective anti-thrombin activity of NU172 aptamer, *Nucleic Acids Res.*, **46**, 12177-12185, doi: 10.1093/nar/gky990.
- Spiridonova, V. A., Barinova, K. V., Glinkina, K. A., Melnichuk, A. V., Gainutdinov, A. A., et al. (2015) A family of DNA aptamers with varied duplex region length that forms complexes with thrombin and prothrombin, *FEBS Lett.*, **589**, 2043-2049, doi: 10.1016/j.febslet.2015.06.020.

22. Mendoza, O., Elezgaray, J., and Mergny, J. (2015) Kinetics of quadruplex to duplex conversion, *Biochimie*, **118**, 225-233, doi: 10.1016/j.biochi.2015.09.031.
23. Spiridonova, V. A., Glinkina, K. A., Gainutdinov, A. A., and Arutyunyan, A. M. (2014) Production of thrombin complexes with DNA aptamers containing G-quadruplex and different duplexes, *J. Nephrol. Ther.*, **4**, 149-154, doi: 10.4172/2161-0959.1000149.
24. Hardin, C. C., Perry, A. G., and White, K. (2000) Thermodynamic and kinetic characterization of the dissociation and assembly of quadruplex nucleic acids, *Biopolymers*, **56**, 147-194, doi: 10.1002/1097-0282(2000/2001)56:3<147::AID-BIP10011>3.0.CO;2-N.
25. Bončina, M., Lah, J., Prislan, I., and Vesnaver, G. (2012) Energetic basis of human telomeric DNA folding into G-quadruplex structures, *J. Am. Chem. Soc.*, **134**, 9657-9663, doi: 10.1021/ja300605n.

THERMODYNAMICS AND UNFOLDING KINETICS OF ANTIPARALLEL G-QUADRUPLEXES IN APTAMERS TO THROMBIN

V. A. Spiridonova, Yu. O. Naumova, P. A. Nikolaeva,
T. M. Novikova, and G. Ya. Kolomijtseva*

*Belozersky Institute of Physico-Chemical Biology, Lomonosov Moscow State University,
119991 Moscow, Russia; e-mail: kolom@belozersky.msu.ru*

The process G-quadruplex unfolding of RE31 DNA-aptamer and its complex with thrombin by fluorescently labeled complementary oligonucleotides of varying length and entailing the formation of double-helix structures has been studied. G-quadruplex unfolding has been suggested to involve the formation of an intermediate complex with the oligonucleotide. Kinetic and thermodynamic parameters of the unfolding of the free aptamer and its complex with thrombin differ. Two nucleotide elongation of the complementary G-quadruplex sequence, capturing the so-called "hinge region", had little impact on the conformational transition of G-quadruplex of the free aptamer. However, for the aptamer-protein complex a pronounced effect has been observed. The most probable cause for these differences is thrombin-induced aptamer conformational transition involving the hinge region.

Keywords: DNA-aptamers, thrombin, G-quadruplex, antidote

НОВЫЙ ВЗГЛЯД НА РОЛЬ АРИЛ-УГЛЕВОДОРОДНОГО РЕЦЕПТОРА В КАНЦЕРОГЕНЕЗЕ ЛЕГКОГО

Обзор

© 2022 Д.А. Ахметова^{1*}, В.В. Козлов^{2,3}, Л.Ф. Гуляева^{1,2}

¹ Новосибирский национальный исследовательский государственный университет,
630090 Новосибирск, Россия; электронная почта: dinara.arturovna@gmail.com

² ФИЦ ФТМ, Научно-исследовательский институт молекулярной биологии и биофизики СО РАН,
630117 Новосибирск, Россия

³ ГБУЗ НСО «Новосибирский областной клинический онкологический диспансер»,
онкологическое отделение №3 (торакальное), 630108 Новосибирск, Россия

Поступила в редакцию 24.06.2022

После доработки 01.09.2022

Принята к публикации 13.09.2022

Рак легкого (РЛ) занимает лидирующие позиции как по частоте, так и по показателям высокой смертности среди других злокачественных заболеваний человека. Курение является фактором риска развития почти всех гистологических типов РЛ. Бензо[а]пирен (БП), один из основных компонентов сигаретного дыма, относится к канцерогенам группы 1, т.е. может вызывать рак у человека. На сегодня установлено, что его токсическое действие может осуществляться по двум основным механизмам: генотоксическому (образование аддуктов с ДНК) и негенотоксическому или эпигенетическому. Последний менее изучен, хотя известно, что БП активирует арил-углеводородный рецептор (AhR), который регулирует транскрипцию многих генов-мишеней, включая микроРНК, что может приводить к инициации и усилению злокачественной трансформации клеток. Недавние исследования показали роль AhR в регуляции контрольных точек иммунного ответа, так как сигаретный дым и БП индуцировали AhR-регулируемую экспрессию *PD-L1 (CD274)* в эпителиальных клетках легкого *in vitro* и *in vivo*. Кроме того, установлено, что метаболит триптофана кинуренин, активируя AhR, стимулирует экспрессию *PD-1 (CD279)* в цитотоксических Т-лимфоцитах. Современные исследования подтверждают важную роль AhR, экспрессируемого в злокачественных клетках, в подавлении противоопухолевого иммунитета. Все это заставляет по-новому рассматривать роль AhR в канцерогенезе легкого и исследовать механизмы его активации экзогенными и эндогенными лигандами. В данном обзоре освещаются современные представления о функциональных особенностях AhR и его роли в патогенезе РЛ.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: рак легкого, AhR, сигаретный дым, бензо[а]пирен, PD-1, PD-L1.

DOI: 10.31857/S0320972522110033, **EDN:** LVDZOU

ВВЕДЕНИЕ

Рак легкого (РЛ) продолжает занимать лидирующие позиции по смертности от рака во всем мире. По данным Всемирной организации здравоохранения (ВОЗ) за 2020 г., от РЛ умерло 1 800 000 человек [1]. Курение является риском развития почти всех гистологических типов РЛ [2]. Компоненты сигаретного дыма

содержат полициклические ароматические углеводороды (ПАУ), нитрозамины и радиоактивные элементы, способствующие развитию злокачественной неоплазии легкого [3].

Согласно данным IARC (International Agency for Research on Cancer), бензо[а]пирен (БП), входящий в состав сигаретного дыма, относится к канцерогенам группы 1, т.е. может вызывать рак у человека [4]. Токсическое дей-

Принятые сокращения: БП – бензо[а]пирен; НМКРЛ – немелкоклеточный РЛ; РЛ – рак легкого; ПАУ – полициклические ароматические углеводороды; ТХДД – 2,3,7,8-тетрахлордибензо-*p*-диоксин; AhR – арил-углеводородный рецептор; ARNT – ядерный транслокатор AhR; DRE – элементы диоксинового ответа; Куп – кинуренин; miR – микроРНК, PAS – семейство транскрипционных факторов спираль-поворот-спираль; PD-1 – белок программируемой гибели клеток 1; PD-L1 – лиганд белка PD-1; XRE – элементы ответов на ксенобиотики.

* Адресат для корреспонденции.

стве БП осуществляется по двум основным механизмам: генотоксический (окисление БП с образованием электрофильных метаболитов, способных связываться с ДНК) и негенотоксический (связывание с арил-углеводородным рецептором (AhR) с последующей активацией генов-мишеней). Как правило, такие гены имеют на своих дистальных промоторах элементы ответов на ксенобиотики (*XRE*), изначально известные как элементы диоксинового ответа (*DRE*).

БП-опосредованная активация AhR приводит к индукции генов, кодирующих комплекс цитохрома P450, а именно: *CYP1A* и *CYP1B*. Раннее изучение AhR в канцерогенезе РЛ сводится к его центральной роли в инициации РЛ за счет активации генов комплекса цитохрома P450. Другим предполагаемым механизмом было AhR-зависимое образование ДНК-аддуктов. Более того, акцентировалось внимание на роли AhR в формировании хронического воспаления, способствующего развитию рака [5].

На сегодняшний день показано, что БП сигаретного дыма, помимо «классических» генов-мишеней AhR (*CYP1A*, *CYP1B*), индуцирует экспрессию иммунных контрольных точек, которые представляют собой систему ингибиторных механизмов, регулирующих аутоиммунные процессы. К ним относятся белок программируемой гибели клеток 1 (PD-1, programmed cell death 1, CD279) и его лиганд (PD-L1, programmed cell death 1 ligand, CD274). Взаимодействие PD-L1 и PD-1 способствует нейтрализации Т-клеток и ингибированию выработки цитокинов [6].

Изначально связь между AhR и иммунной системой была исследована через зависимую от 2,3,7,8-тетрахлордибензо-*p*-диоксин (ТХДД) активацию AhR, которая оказывает супрессивное действие на Т-клетки животных и людей [7, 8]. Недавно было показано, что кинуренин (Куп), метаболит триптофана, также может активировать AhR и приводить к экспрессии PD-1 в цитотоксических CD8⁺ Т-клетках, что может способствовать ускользанию опухоли от иммунологического надзора и усилению злокачественного фенотипа [9]. Следовательно, активация AhR помогает выживать трансформированным злокачественным клеткам через блокирование противоопухолевого иммунитета.

Многие исследования по изучению AhR ушли далеко за рамки токсикологии. В литературе появляется все больше данных, показывающих эпигенетические и иммунологические функции данного рецептора. В настоящем обзоре представлены новые данные о роли AhR в канцерогенезе легкого, показана связь AhR

с противоопухолевым иммунным ответом, и сообщается об AhR-регулируемых микроРНК, которые могут служить потенциальными биомаркерами РЛ.

ВКЛАД КУРЕНИЯ В РАЗВИТИЕ РАКА ЛЕГКОГО

Наиболее распространенными гистологическими типами РЛ являются мелкоклеточный и немелкоклеточный РЛ. Мелкоклеточный РЛ, распространенность которого составляет 15% от всех случаев РЛ, имеет наиболее неблагоприятный прогноз. Выживаемость в течение 5 лет составляет менее 5%, а для пациентов, не получающих лечения, средний срок жизни составляет 2–4 месяца [10]. На немелкоклеточный РЛ (НМКРЛ) приходится до 85% всех случаев РЛ. Пятилетняя выживаемость пациентов составляет примерно 15%. НМКРЛ в зависимости от клеточного состава и локализации онкологического процесса подразделяется на три основных подтипа: аденокарцинома, плоскоклеточный рак и крупноклеточный рак [2].

Одним из основных факторов риска НМКРЛ считается курение сигарет [2]. Известно, что в смоле сигаретного дыма содержатся такие канцерогенные соединения, как БП, метилхолантрен, табакоспецифичные *N*-нитроزامины, *N*-метил-*N*-нитрозомочевина, а также металлы (никель, мышьяк, свинец, хром) и радиоактивные элементы (²¹⁰полоний, ²²⁸торий, ²¹⁰свинец) [3].

БП является одним из наиболее изученных канцерогенов сигаретного дыма. По данным IARC, содержание БП в дыме от одной сигареты составляет 22,92–26,27 нг [4]. БП способен связываться с AhR и активировать его [11]. Результатом такой активации является транслокация AhR в ядро и индукция транскрипции AhR-зависимых генов-мишеней, например генов комплекса цитохрома P450 (*CYP1A1*, *CYP1A2*) и других. Такое взаимодействие может приводить к активации канцерогенов [12], образованию бензо[*a*]пирен-7,8-диол-9,10-эпоксид-*N*²-дезоксигуанозина (BPDE-dG) в бронхиальных клетках человека [13], а также может способствовать окислительному стрессу и воспалению [14].

В случае пониженной активности ферментов второй фазы метаболизма ксенобиотиков, эпоксиметаболиты БП будут связываться с ДНК и образовывать аддукты [15], что может привести к иницированию канцерогенеза в легочной ткани. Более того, БП-зависимая активация AhR стимулирует сигнальный

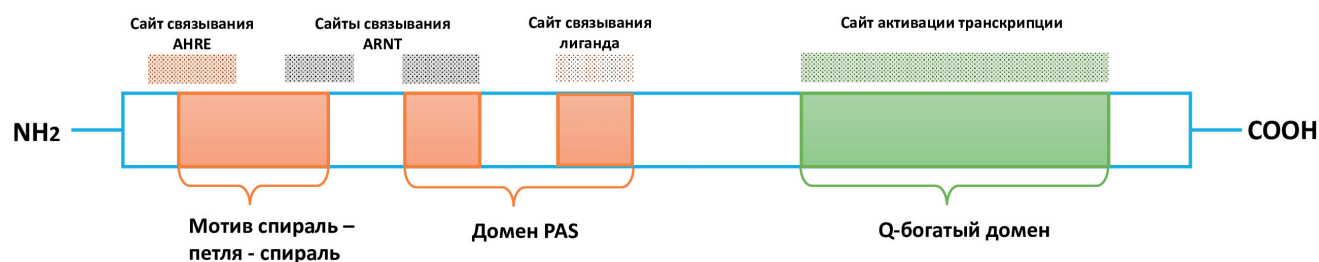


Рис. 1. Функциональная структура AhR. N-конец рецептора, включающий мотив спираль-петля-спираль и домен PAS, обеспечивает гетеродимеризацию AhR со своим ядерным транслокатором ARNT, а также способствует связыванию AhR с промоторной областью генов-мишеней. Мотив спираль-петля-спираль обеспечивает связывание AhR (в сайте связывания AHRE) и ARNT, приводящее к последующему связыванию AhR с промоторной областью. Домен PAS отвечает за поддержание вторичного взаимодействия с белками, такими как ARNT, и способствует формированию гетеродимера AhR/ARNT; более того, домен содержит сайт связывания лигандов AhR. Q-богатый домен ответственен за активацию транскрипции

каскад MAPK, нарушение которого приводит к индукции таких клеточных процессов, как пролиферация, дифференциация и апоптоз [16].

Таким образом, входящие в состав сигаретного дыма вещества изменяют метаболизм клеток легкого, а также активируют и/или нарушают передачу клеточных сигналов от рецепторов, что способствует развитию злокачественной неоплазии легкого.

СТРУКТУРА И ФУНКЦИИ AhR

AhR входит в состав семейства транскрипционных факторов спираль-поворот-спираль (PAS, Per-ARNT-Sim) [17, 18] и состоит из трех функциональных частей: мотив спираль-петля-

спираль, домен PAS (A и B) и богатый глутамином Q-домен (рис. 1).

Инициировать активацию AhR могут как экзогенные, так и эндогенные лиганды. К экзогенным лигандам относятся ПАУ, пищевые фитохимические соединения, например индол-3-карбинол и индолы, продуцируемые микробиотой [13]. Среди эндогенных лигандов можно выделить эйкозоноиды, например липоксин A4, билирубин, метаболиты триптофана: 6-формилиндоло[3,2-b]карбазол и Куп [19].

После связывания с лигандом рецептор транслоцируется в ядро, где происходит его гетеродимеризация с ARNT. Гетеродимер AhR/ARNT отвечает за экспрессию множества генов, в числе которых гены комплекса цитохрома P450 (*CYP1A1*, *CYP1A2*, *CYP1B1*),

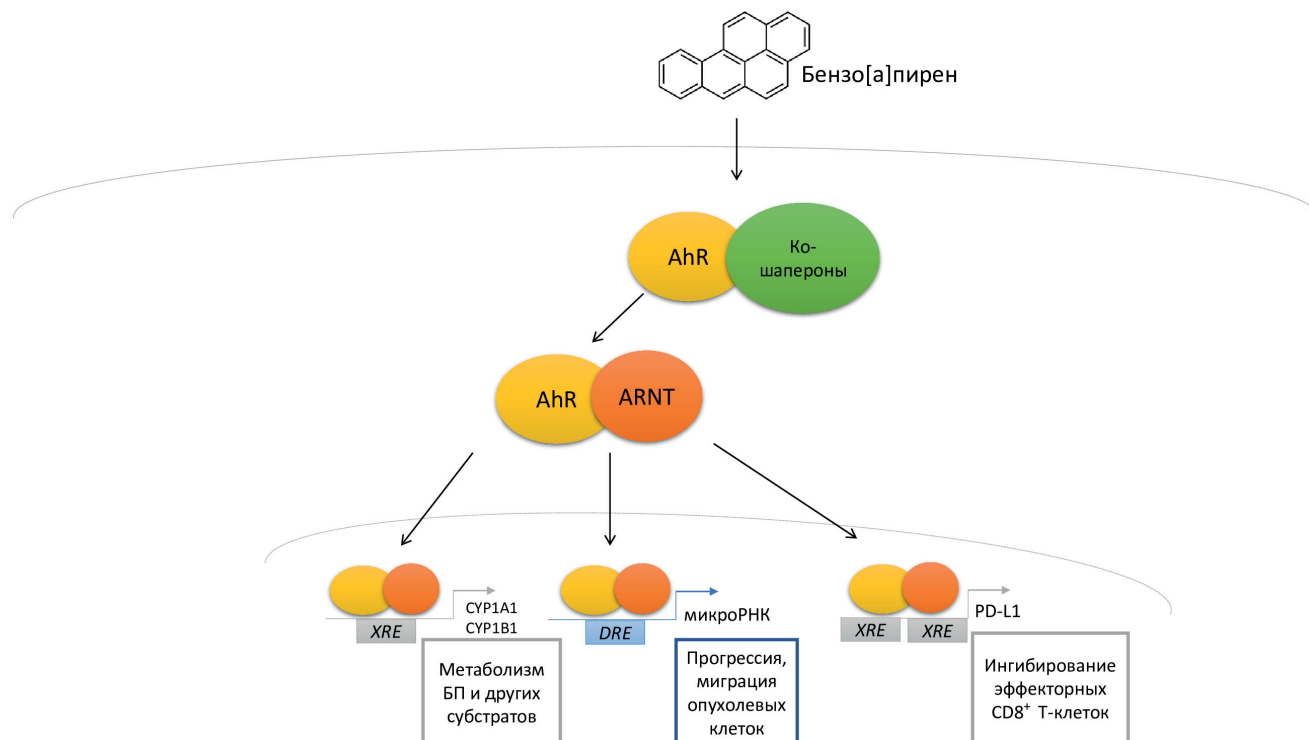


Рис. 2. Механизм активации AhR под действием БП

ген *TIPARP*, кодирующий TCDD-индуцируемую поли[АДФ-рибоза]-полимеразу (TCDD Inducible Poly[ADP-Ribose] Polymerase), а также многие другие. Экспрессия генов-мишеней регулируется за счет взаимодействия с каноническим (5'-TNGCGTG-3') и неканоническим сайтами связывания рецептора (рис. 2). Эти сайты связывания названы элементами ответа на ксенобиотики (*XRE*) или элементами диоксинового ответа (*DRE*) [17].

Наивысший уровень экспрессии AhR регистрируется в плаценте человека, за ней следуют легкие, сердце, поджелудочная железа и печень, тогда как в почках, головном мозге и скелетных мышцах он экспрессируется на низком уровне [20].

AhR отвечает за дифференцировку субпопуляций Т- и В-лимфоцитов, активирует продукцию провоспалительных цитокинов, регулирует экспрессию транскрипционных факторов STAT3 и NF-κB, модулирует ответ на микробные, вирусные патогены, а также участвует в метаболизме и биоактивации ксенобиотиков [18]. В результате регуляции дифференцировки Т-клеток AhR играет важную роль в патогенезе хронической обструктивной болезни легких (ХОБЛ) и астме. AhR увеличивает продукцию муцина в клеточной линии NCI-H₂₉₂ при хроническом бронхите [5]. Было показано, что AhR подавляет, вызванное сигаретным дымом, острое воспаление легких [21]. Следовательно, AhR контролирует иммунные, воспалительные, гомеостатические и токсические ответы клетки на эндогенные и экзогенные воздействия.

Существует противоречивая точка зрения о роли AhR в инициации и прогрессировании рака. Некоторые исследования показали, что при определенных обстоятельствах AhR может быть супрессором опухоли. Так, например, сообщается, что в определенной дозе ТХДД-зависимая активация AhR может подавлять пролиферацию раковых клеток [22]. Однако исследования на клеточной линии аденокарциномы человека A549 показали, что AhR, предположительно во взаимодействии с ARNT, активирует синтез ДНК и последующую клеточную пролиферацию этих клеток [23].

Глобальный ChIP-анализ экспрессии генов в печени мышей выявил 14 446 и 974 области, обогащенные сайтами связывания AhR (коэффициент ложного обнаружения – 1%), через 2 и 24 часа после введения ТХДД соответственно [24].

В геноме человека идентифицировано 3915 AhR-связывающих сайтов [25]. Многие из этих сайтов связывания требуют экспериментального подтверждения, что позволит выявить

гены, регулируемые AhR, и выяснить их роль в биологических процессах.

Благодаря своей структуре и особенностям сайтов связывания AhR выполняет множество биологических функций, необходимых для нормальной жизнедеятельности организма. Особое внимание привлекает его роль в канцерогенезе и развитии РЛ, требующая понимания молекулярных механизмов этого процесса.

ЭКСПРЕССИЯ ГЕНОВ-МИШЕНЕЙ AhR В ОПУХОЛЯХ ЛЕГКОГО

В первую очередь AhR известен как ксенобиотический сенсор, который активируется высокоаффинными низкомолекулярными соединениями и индуцирует свои гены-мишени. Поступление в организм ПАУ-содержащих веществ индуцирует, прежде всего, экспрессию AhR-зависимых ферментов I и II фаз метаболизма ксенобиотиков, таких как CYP1A1, CYP1A2, CYP1B, глутатион S трансфераза, глюкуронилтрансфераза, НАДФН хиноноксидоредуктаза, альдокеторедуктаза и эпоксидгидролаза [15].

Известно, что CYP1A1, окисляя ПАУ, играет важную роль в активации канцерогенов с образованием высоко реакционноспособных эпоксидов в легких [12]. Ряд исследований показывают связь полиморфных вариантов гена *CYP1A1*, а именно: аллельные варианты *CYP1A1* * 3 (T3205C) и *CYP1A1* * 4 (Thr461Asn) с повышенной активностью фермента, приводящей к увеличению образования ДНК-аддуктов и, как следствие, к РЛ [12, 26]. Различные варианты одного и того же аллеля проявляются в определенных подтипах РЛ. Например, показана связь аллеля *CYP1A1* * 4 (Thr461Asn) с риском развития мелкоклеточного РЛ в испанской популяции [12, 27], также имеются данные о связи аллелей *CYP1A1* * 2A (3801T → C) и *CYP1A1* * 2C (2455A → G) с НМКРЛ [26].

CYP1A2 способен активировать проканцерогены сигаретного дыма. Аллели *CYP1A2* * 1D и *CYP1A2* * 1F ассоциируются с плоскоклеточным РЛ [28]. Имеются различные данные относительно аллельного варианта *CYP1A2* (163C → A). В одном исследовании показана его связь с аденокарциномой у курящих [29], а в метаанализе 2013 г. аллельный вариант *CYP1A2* (163C → A) связывают с риском плоскоклеточным РЛ у европеоидной расы [30].

AhR может регулировать экспрессию *CYP1B1*, который опосредует биоактивацию проканцерогенных веществ табака и канцерогенных эстрогенов, способствуя их превращению в реактивные промежуточные

метаболиты, которые, в свою очередь, могут повреждать ДНК с образованием аддуктов. Изменение экспрессии *CYP1B1* наблюдается при различных гистологических типах НМКРЛ [31]. Аллельный вариант *CYP1B1* Leu432Val связывают с повышением риска РЛ у курящих [32].

ЭКСПРЕССИЯ AhR-РЕГУЛИРУЕМЫХ микроРНК

AhR способен регулировать экспрессию микроРНК, малых некодирующих РНК длиной 18–22 нуклеотида, нарушение регуляции которых может приводить к возникновению рака [33]. Активация AhR берберинном приводит к увеличению онкогенной miR-21-3p в клеточной линии рака молочной железы [34]. Было показано, что AhR контролирует базальную экспрессию miR-196a в фибробластах легких мышей. Более того, на мышцах с нокаутом гена, кодирующего *AhR*, было продемонстрировано, что данный рецептор играет важную роль в регуляции микроРНК, экспрессируемых в легких. Так, AhR подавляет экспрессию онкогенной miR-96, уровень которой увеличивается при хроническом воздействии сигаретного дыма [35].

В промоторах некоторых межгенных микроРНК, а также их генов-хозяев имеются *DRE*-элементы – сайты связывания AhR. Ранее считалось, что AhR осуществляет некоторые защитные функции от вредного воздействия сигаретного дыма в обход классического связывания с *DRE* [35]. С помощью методов *in silico* был проведен поиск таких элементов в геномах крыс, мышей, человека, и найдено 154 гена с *DRE* в геноме человека [36]. Следовательно, AhR-зависимая регуляция экспрессии микроРНК может осуществляться через связывание с *DRE*-элементами. Для подтверждения такого механизма необходимы дальнейшие экспериментальные исследования. Так, было показано, что при длительном воздействии БП экспрессия miR-22, miR-29a, miR-126a и miR-193b значительно повышалась в легких самцов крыс, в то время как уровень miR-483 увеличивался у самок. Исходя из данных исследований, было предположено, что в основе зависимых от пола эпигенетических эффектов БП может лежать различная экспрессия микроРНК, потенциально регулируемых AhR [37].

Изменение уровня микроРНК в ответ на сигаретный дым может приводить к прогрессированию РЛ. AhR в данном случае способен выполнять роль негативного регулятора, так, пониженный уровень AhR приводит к повы-

шению экспрессии miR-96. Было показано, что хроническое воздействие сигаретного дыма у мышей AhR^{-/-} приводит к резкому увеличению miR-96 [35]. Исследование китайских коллег показывает снижение уровня miR-335 в ответ на опосредованное сигаретным дымом увеличение уровня AhR [38]. Следовательно, AhR может выступать в качестве «обоюдоострого меча», увеличение или уменьшение уровня которого может способствовать нарушению регуляции таких важных мишеней, как микроРНК. В то же время AhR может выступать в качестве репрессора некоторых онкогенных микроРНК.

РОЛЬ AhR В ФОРМИРОВАНИИ ИММУНОЛОГИЧЕСКОГО СТАТУСА ОПУХОЛИ

На сегодняшний день для лечения РЛ, особенно плоскоклеточного РЛ, применяется иммунотерапия. Иммунотерапия представляет собой тип лечения рака, при котором используются вещества, полученные из живых организмов. В случае лечения РЛ используются моноклональные антитела против цитотоксического Т-лимфоцит-ассоциированного белка 4 (CTLA-4, cytotoxic T-lymphocyte-associated protein 4), PD-1 и PD-L1 [39]. Такие антитела блокируют процесс ингибирования Т-клеток, тем самым способствуя противоопухолевому иммунному ответу.

Одними из важных генов-мишеней AhR являются гены иммунных контрольных точек *PD-1* и *PD-L1* [6, 9, 39]. PD-1 непосредственно экспрессируется в Т- и В-клетках, а его лиганд PD-L1 – чаще всего экспрессируется в нейтрофилах, эпителиальных и стромальных клетках, а также в опухолях [39]. Взаимодействие PD-1 и PD-L1 приводит к ингибированию противоопухолевого иммунного ответа, и, как следствие, к усилению злокачественности опухоли.

Исследования последних лет показали, что лиганды AhR могут усиливать экспрессию генов иммунных контрольных точек. Клинические наблюдения показали, что курящие пациенты с диагнозом НМКРЛ лучше реагируют на иммунотерапию, чем некурящие [39]. Эти наблюдения привели к пониманию увеличения уровня экспрессии PD-L1 в эпителиальных клетках легких *in vitro* и *in vivo* при воздействии сигаретного дыма и БП [6]. Иммунотерапия с помощью моноклональных антител к PD-L1 или дефицит AhR значительно подавляли БП-индуцированный РЛ у мышей. Дальнейшее исследование образцов опухоли выявило, что у 37 пациентов с НМКРЛ, полу-

чавших анти-PD-1 терапию пембролизумабом, 13/16 (81,3%) больных, достигших частичного ответа или стабилизации заболевания, показывали высокие уровни AhR, тогда как 12/16 (75%) пациентов с прогрессированием заболевания обнаруживали низкие уровни AhR в опухолевых тканях. Ингибиторы AhR проявили значительную противоопухолевую активность и синергизм с антителами против PD-L1 в моделях РЛ на мышах [6].

Эти результаты продемонстрировали, что табачный дым позволяет эпителиальным клеткам легкого уходить от адаптивного иммунитета для стимуляции онкогенеза, а AhR предсказывает реакцию на иммунотерапию и представляет собой привлекательную терапевтическую мишень.

Другим механизмом AhR-опосредованной иммуносупрессии может быть синтез избыточного количества Куп, который катализируется ферментом IDO (indoleamine 2,3-dioxygenase). Как и в злокачественных клетках, Куп может усиливать экспрессию PD-L1 в макрофагах, дендритных и других иммунокомпетентных клетках, где AhR активен [40]. Так, недавно было показано участие AhR в IFN γ -контролируемой экспрессии PD-L1 и IDO в клетках плоскоклеточного рака полости рта [9]. Более того, на дистальном промоторе гена *PD-L1* находятся 2 *XRE*-подобных элемента связывания AhR, что способствует активации экспрессии данного гена лигандами AhR [39].

Похожие механизмы показаны и для такого аутоиммунного заболевания, как системная красная волчанка (СКВ). Недавно было показано участие PD-1 и PD-L1 в патогенезе и развитии СКВ через активацию AhR. В данном случае значительную роль играет кинуренин, который повышается в сыворотке больных СКВ. AhR важен для поддержания иммунной толерантности и развития различных иммунных субпопуляций, что подчеркивает потенциальную роль AhR в иммунобиологии PD-1 [41].

Для плоскоклеточного РЛ характерно частое увеличение уровня PD-L1, что помогает опухоли избегать иммунного надзора [42]. Было показано, что дефицит фосфатазы и гомолога тензина (PTEN) и/или p53 способствует сверхэкспрессии PD-L1 [6]. В рамках этого механизма можно рассматривать результаты, показавшие, что TRC (tumor-repopulating cells) стимулируют активацию PD-1 в цитотоксических CD8⁺ Т-клетках через межклеточный обмен Куп, который активирует AhR [9].

IFN γ , продуцируемый CD8⁺ Т-клетками, стимулирует высвобождение высоких концентраций этого метаболита триптофана, продуци-

руемого TRC, который переносится в соседние CD8⁺ Т-клетки через транспортеры SLC7A8 и PAT4. Куп индуцирует и активирует AhR и тем самым повышает экспрессию PD-1. Путь Куп–AhR подтвержден как у мышей с опухолями, так и у больных раком, и его блокада может повысить эффективность противоопухолевой адаптивной Т-клеточной терапии [9]. Следовательно, такой механизм активации PD-1 может иметь потенциальное иммунотерапевтическое применение.

Необходимо отметить сложные сигнальные взаимодействия оси AhR–микроРНК–PD-L1, так как микроРНК, в особенности AhR-регулируемые микроРНК, принимают непосредственное участие в регуляции иммунных контрольных точек и могут способствовать росту и прогрессированию опухоли. Так, AhR-зависимые онкогенные miR-193 и miR-93 нацеливаются на мРНК PD-L1 и регулируют его уровень в клетке [37, 43]. Нарушение уровня экспрессии данных микроРНК может приводить к развитию рака, в том числе РЛ. Сигаретный дым приводит к значительному снижению многих онкогенных микроРНК, в том числе микроРНК, регулирующих мРНК PD-L1, что приводит к инициации и дальнейшей прогрессии РЛ [44].

Таким образом, AhR, регулируя экспрессию PD-1 и PD-L1, играет важную роль в ингибировании противоопухолевого иммунитета. Иммуносупрессивная роль AhR в опухолях может способствовать развитию новой терапевтической стратегии лечения РЛ.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Научные открытия, сделанные за последнее десятилетие, существенно дополнили наши представления о роли AhR в канцерогенезе легкого. Традиционно считалось, что этот фактор транскрипции играет ключевую роль на начальных этапах канцерогенеза, когда он активируется лигандами экзогенного происхождения, такими как БП, и другими ПАУ, что сопровождается усилением экспрессии его генов-мишеней, прежде всего, цитохрома P450 семейства 1. Результатом таких событий является образование электрофильных метаболитов ПАУ, приводящее к возникновению аддуктов с ДНК и, как следствие, к возникновению мутаций. Активное исследование лигандов AhR привело к выявлению новых эндогенных соединений, таких как метаболит триптофана кинуренин, что существенно расширило наше понимание роли данного рецептора, особенно в иммунном ответе. Исследование

экспрессии AhR-регулируемых генов позволило расширить знания о роли AhR в физиологических процессах. Среди таких генов важно отметить гены иммунных контрольных точек *PD-1* и *PD-L1*, которые содержат *DRE*-элементы, следовательно, могут активироваться AhR. Экспериментально доказано, что курение, приводящее к активации данного рецептора, способствует «ускользанию» опухоли от иммунного надзора. Так как иммунотерапия с применением ингибиторов PD-1 и PD-L1 является на сегодня одним из терапевтических подходов в лечении РЛ, понимание роли AhR в формировании иммунологического статуса опухоли будет способствовать улучшению терапии рака и открытию новых перспективных методов лечения.

Вклад авторов. Д.А. Ахметова, Л.Ф. Гуляева – концепция обзорной статьи; Д.А. Ахметова, В.В. Козлов, Л.Ф. Гуляева – сбор и анализ литературы, написание и редактирование текста обзора; Д.А. Ахметова – создание иллюстраций.

Финансирование. Работа выполнена при поддержке Российского научного фонда (грант № 22-15-00065 – «Поиск новых мишеней для диагностики и терапии плоскоклеточного рака легких»).

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

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

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- World health organization (WHO) (2020) Estimated number of deaths in 2020, worldwide, both sexes, all ages (excl. NMSC), *Glob. Cancer Obs.*, **144**.
- Molina, J. R., Yang, P., Cassivi, S. D., Schild, S. E., and Adjei, A. A. (2008) Non-small cell lung cancer: epidemiology, risk factors, treatment, and survivorship, *Mayo Clin. Proc.*, **83**, 584-594, doi: 10.4065/83.5.584.
- Дюбкова Т. П. (2008) Химический состав табачного дыма: токсические и канцерогенные эффекты на организм человека, *Медицинская Панорама*, 38.
- International Agency for Research on Cancer (IARC) (2014) Chemical agents and related occupations, *IARC Monogr.*, **100**, 423-428.
- Tsay, J. J., Tchou-Wong, K. M., Greenberg, A. K., Pass, H., and Rom, W. N. (2013) Aryl hydrocarbon receptor and lung cancer, *Anticancer Res.*, **33**, 1247-1256.
- Wang, G. Z., Zhang, L., Zhao, X. C., Gao, S. H., Qu, L. W., et al. (2019) The Aryl hydrocarbon receptor mediates tobacco-induced PD-L1 expression and is associated with response to immunotherapy, *Nat. Commun.*, **10**, 1125, doi: 10.1038/S41467-019-08887-7.
- Xue, P., Fu, J., and Zhou, Y. (2018) The aryl hydrocarbon receptor and tumor immunity, *Front. Immunol.*, **3**, 9-28, doi: 10.3389/fimmu.2018.00286.
- Disner, G. R., Lopes-Ferreira, M., and Lima, C. (2021) Where the aryl hydrocarbon receptor meets the microRNAs: literature review of the last 10 years, *Front. Mol. Biosci.*, **8**, doi: 10.3389/fmolb.2021.725044.
- Liu, Y., Liang, X., Dong, W., Fang, Y., Lv, J., et al. (2018) Tumor-repopulating cells induce PD-1 expression in CD8⁺ T cells by transferring kynurenine and AhR activation, *Cancer Cell*, **33**, 480-494, doi: 10.1016/J.CCELL.2018.02.005.
- Yang, S., Zhang, Z., and Wang, Q. (2019) Emerging therapies for small cell lung cancer, *J. Hematol. Oncol.*, **12**, 47, doi: 10.1186/S13045-019-0736-3.
- Yoshikawa, Y., Izawa, T., Hamada, Y., Takenaga, H., Wang, Z., et al. (2021) Roles for B[a]P and FICZ in subchondral bone metabolism and experimental temporomandibular joint osteoarthritis via the AhR/Cyp1a1 axis, *Sci. Rep.*, **11**, 14927, doi: 10.1038/s41598-021-94470-4.
- San Jose, C., Cabanillas, A., Benitez, J., Carrillo, J. A., Jimenez, M., et al. (2010) CYP1A1 gene polymorphisms increase lung cancer risk in a high-incidence region of Spain: a case control study, *BMC Cancer*, **10**, 463, doi: 10.1186/1471-2407-10-463.
- Alexandrov, K., Rojas, M., and Satarug, S. (2010) The critical DNA damage by benzo(a)pyrene in lung tissues of smokers and approaches to preventing its formation, *Toxicol. Lett.*, **198**, 63-68, doi: 10.1016/j.toxlet.2010.04.009.
- Hanyu, S., Jie, L., and Haiqing, G. (2021) Benzo(α)pyrene induces oxidative stress and inflammation in human vascular endothelial cells through AhR and NF-κB pathways, *Microvasc. Res.*, **137**, 104179, doi: 10.1016/j.mvr.2021.104179.
- Moorthy, B., Chu, C., and Carlin, D. J. (2015) Polycyclic aromatic hydrocarbons: from metabolism to lung cancer, *Toxicol. Sci.*, **145**, 5-15, doi: 10.1093/TOXSCI/KFV040.
- Vázquez-Gómez, G., Rocha-Zavaleta, L., Rodríguez-Sosa, M., Petrosyan, P., and Rubio-Lightbourn, J. (2018) Benzo[a]pyrene activates an AhR/Src/ERK axis that contributes to CYP1A1 induction and stable DNA adducts formation in lung cells, *Toxicol. Lett.*, **289**, 54-62, doi: 10.1016/j.toxlet.2018.03.012.
- Nebert, D. W. (2017) Aryl hydrocarbon receptor (AHR): 'pioneer member' of the basic-helix/loop/helix per-arnt-sim (bHLH/PAS) family of 'sensors' of foreign and endogenous signals, *Prog. Lipid Res.*, **67**, 38-57, doi: 10.1016/J.PLIPRES.2017.06.001.

18. Shinde, R., and McGaha, T. L. (2018) The aryl hydrocarbon receptor: connecting immunity to the microenvironment, *Trends Immunol.*, **39**, 1005-1020, doi: 10.1016/j.it.2018.10.010.
19. Bock, K. W. (2019) Aryl hydrocarbon receptor (AHR): from selected human target genes and crosstalk with transcription factors to multiple AHR functions, *Biochem. Pharmacol.*, **168**, 65-70, doi: 10.1016/J.BCP.2019.06.015.
20. Zhu, K., Meng, Q., Zhang, Z., Yi, T., He, Y., et al. (2019) Aryl hydrocarbon receptor pathway: role, regulation and intervention in atherosclerosis therapy, *Mol. Med. Rep.*, **20**, 4763, doi: 10.3892/MMR.2019.10748.
21. Thatcher, T. H., Maggirwar, S. B., Baglolle, C. J., Lakatos, H. F., Gasiewicz, T. A., et al. (2007) Aryl hydrocarbon receptor-deficient mice develop heightened inflammatory responses to cigarette smoke and endotoxin associated with rapid loss of the nuclear factor-kappaB component RelB, *Am. J. Pathol.*, **170**, 855-864, doi: 10.2353/ajpath.2007.060391.
22. Wang, K., Li, Y., Jiang, Y. Z., Dai, C. F., Patankar, M. S., et al. (2013) An endogenous aryl hydrocarbon receptor ligand inhibits proliferation and migration of human ovarian cancer cells, *Cancer Lett.*, **340**, 63-71, doi: 10.1016/j.canlet.2013.06.026.
23. Shimba, S., Komiyama, K., Moro, I., and Tezuka, M. (2002) Overexpression of the aryl hydrocarbon receptor (AhR) accelerates the cell proliferation of A549 cells, *J. Biochem.*, **132**, 795-802, doi: 10.1093/oxfordjournals.jbchem.a003289.
24. Dere, E., Lo, R., Celius, T., Matthews, J., and Zacharewski, T. R. (2011) Integration of genome-wide computation DRE search, AhR ChIP-chip and gene expression analyses of TCDD-elicited responses in the mouse liver, *BMC Genomics*, **12**, 365, doi: 10.1186/1471-2164-12-365.
25. Yang, S. Y., Ahmed, S., Satheesh, S. V., and Matthews, J. (2018) Genome-wide mapping and analysis of aryl hydrocarbon receptor (AHR)- and aryl hydrocarbon receptor repressor (AHRR)-binding sites in human breast cancer cells, *Arch. Toxicol.*, **92**, 225-240, doi: 10.1007/S00204-017-2022-X.
26. Wright, C. M., Larsen, J. E., Colosimo, M. L., Barr, J. J., Chen, L., et al. (2010) Genetic association study of CYP1A1 polymorphisms identifies risk haplotypes in nonsmall cell lung cancer, *Eur. Respir. J.*, **1**, 152-159, doi: 10.1183/09031936.00120808.
27. Schwarz, D., Kisselev, P., Cascorbi, I., Schunck, W. H., and Roots, I. (2001) Differential metabolism of benzo[a]pyrene and benzo[a]pyrene-7,8-dihydrodiol by human CYP1A1 variants, *Carcinogenesis*, **22**, 453-459, doi: 10.1093/carcin/22.3.453.
28. Singh, A. P., Pant, M. C., Ruwali, M., Shah, P. P., Prasad, R., et al. (2010) Polymorphism in cytochrome P450 1A2 and their interaction with risk factors in determining risk of squamous cell lung carcinoma in men, *Cancer Biomark*, **8**, 351-359, doi: 10.3233/CBM-2011-0224.
29. B'chir, F., Pavanello, S., Knani, J., Boughattas, S., Arnaud, M. J., et al. (2009) CYP1A2 genetic polymorphisms and adenocarcinoma lung cancer risk in the Tunisian population, *Life Sci.*, **84**, 779-784, doi: 10.1016/j.lfs.2009.03.008.
30. Deng, S. Q., Zeng, X. T., Wang, Y., Ke, Q., and Xu, Q. L. (2013) Meta-analysis of the CYP1A2-163C>A polymorphism and lung cancer risk, *Asian Pacific J. Cancer Prev.*, **14**, 3155-3158, doi: 10.7314/APJCP.2013.14.5.3155.
31. Elfaki, I., Mir, R., Almutairi, F. M., and Abu Duhier, F. M. (2018) Cytochrome P450: polymorphisms and roles in cancer, diabetes and atherosclerosis, *Asian Pac. J. Cancer Prev.*, **19**, 2057-2070, doi: 10.22034/APJCP.2018.19.8.2057.
32. Chen, P. F., He, X. F., Huang, G. H., Wang, W., and Qiu, Z. H. (2016) Association between the CYP1B1 polymorphisms and lung cancer risk: a meta-analysis, *Technol. Cancer Res. Treat.*, **15**, 73-82, doi: 10.1177/1533034615598866.
33. Lin, S., and Gregory, R. I. (2015) MicroRNA biogenesis pathways in cancer, *Nat. Rev. Cancer*, **15**, 321-333, doi: 10.1038/nrc3932.
34. Lo, S. N., Wang, C. W., Chen, Y. S., Huang, C. C., Wu, T. S., et al. (2017) Berberine activates aryl hydrocarbon receptor but suppresses CYP1A1 induction through miR-21-3p stimulation in MCF-7 breast cancer cells, *Molecules*, **2017**, 22, doi: 10.3390/molecules22111847.
35. Rogers, S., Souza, A. R., Zago, M., Iu, M., Guerrina, N., et al. (2017) Aryl hydrocarbon receptor (AhR)-dependent regulation of pulmonary miRNA by chronic cigarette smoke exposure, *Sci Rep.*, **7**, 40539, doi: 10.1038/srep40539.
36. Ovchinnikov, V. Y., Antonets, D. V., and Gulyaeva, L. F. (2018) The search of CAR, AhR, ESRs binding sites in promoters of intronic and intergenic microRNAs, *J. Bioinform. Comput. Biol.*, **16**, 1-20, doi: 10.1142/S0219720017500299.
37. Filippov, S. V., Yarushkin, A. A., Yakovleva, A. K., Kozlov, V. V., and Gulyaeva, L. F. (2020) The effect of benzo[a]pyrene on the expression of AhR-regulated microRNA in lungs of female and male rats, *Biochemistry (Moscow), Supplement Series B: Biomedical Chemistry*, **14**, 347-355, doi: 10.1134/S199075082004006X.
38. Zhang, S., Kim, K. H., Jin, U. H., Pfent, C., Cao, H., et al. (2012) Aryl hydrocarbon receptor agonists induce microRNA-335 expression and inhibit lung metastasis of estrogen receptor negative breast cancer cells, *Mol. Cancer Ther.*, **11**, 108-118, doi: 10.1158/1535-7163.MCT-11-0548.
39. Alsaab, H. O., Sau, S., Alzhrani, R., Tatiparti, K., Bhise, K., et al. (2017) PD-1 and PD-L1 checkpoint signaling inhibition for cancer immunotherapy: mechanism, combinations, and clinical outcome, *Front. Pharmacol.*, **8**, 561, doi: 10.3389/fphar.2017.00561.
40. Kenison, J. E., Wang, Z., Yang, K., Snyder, M., Quintana, F. J., et al. (2021) The aryl hydrocarbon

- receptor suppresses immunity to oral squamous cell carcinoma through immune checkpoint regulation, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **118**, e2012692118, doi: 10.1073/pnas.2012692118.
41. Curran, C. S., Gupta, S., Sanz, I., and Sharon, E. (2019) PD-1 immunobiology in systemic lupus erythematosus, *J. Autoimmun.*, **97**, 1-9, doi: 10.1016/j.jaut.2018.10.025.
42. Bylicki, O., Paleiron, N., Rousseau-Bussac, G., and Chouaïd, C. (2018) New PDL1 inhibitors for non-small cell lung cancer: focus on pembrolizumab, *Oncotargets Ther.*, **11**, 4051-4064, doi: 10.2147/OTT.S154606.
43. Fan, J., Yin, Z., Xu, J., Wu, F., Huang, Q., et al. (2020) Circulating microRNAs predict the response to anti-PD-1 therapy in non-small cell lung cancer, *Genomics*, **112**, 2063-2071, doi: 10.1016/J.YGENO.2019.11.019.
44. Iqbal, M. A., Arora, S., Prakasam, G., Calin, G. A., and Syed, M. A. (2019) MicroRNA in lung cancer: role, mechanisms, pathways and therapeutic relevance, *Mol. Aspects Med.*, **70**, 3-20, doi: 10.1016/J.MAM.2018.07.003.

A NEW INSIGHT AT THE ROLE OF AhR IN LUNG CARCINOGENESIS

Review

D. A. Akhmetova^{1*}, V. V. Kozlov^{2,3}, and L. F. Gulyaeva^{1,2}

¹ Novosibirsk National Research State University, 630090 Novosibirsk, Russia; e-mail: dinara.arturovna@gmail.com

² Research Institute of Molecular Biology and Biophysics, Federal Research Center for Fundamental and Translational Medicine, 630117 Novosibirsk, Russia

³ Department of Thoracic Oncology № 3, Novosibirsk Regional Clinical Oncology Center, 630108 Novosibirsk, Russia

Lung cancer (LC), one of the most common malignant neoplasms, is the leading cause of high cancer mortality worldwide. Smoking is a risk factor for almost all histological types of LC. Benzo(a)pyrene (BP), one of the main constituents of cigarette smoke, can cause cancer. It has been established that its toxic effect can develop in the following ways: genotoxic (formation of adducts with DNA) and non-genotoxic or epigenetic. The latter is less known, although it is known that BP activates aryl hydrocarbon receptor (AhR), which regulate the transcription of many target genes, including microRNAs, which can lead to the initiation and enhancement of malignant cell transformation. Recent studies are evaluating the role of AhR in the regulation of immune checkpoints, as cigarette smoke and BP induce AhR-regulated expression of *PD-L1* in lung epithelial cells *in vitro* and *in vivo*. In addition, kynurenine (a metabolite of tryptophan) has been found to stimulate *PD-1* expression in cytotoxic CD8⁺ T cells by activating AhR. Current research is of great importance for AhR-mediated suppression of antitumor immunity expressed in malignant cells. All this makes us rethink the role of AhR in lung carcinogenesis and investigate the mechanisms of its activation by exogenous and endogenous ligands. This review highlights the current understanding of the functional features of AhR and its role in the pathogenesis of LC.

Keywords: lung cancer, AhR, cigarette smoke, benzo[a]pyrene, PD-1, PD-L1

УДК 577.25

ИЗМЕНЕНИЯ ЭКСПРЕССИИ ГЕНОВ СИСТЕМЫ ИНСУЛИН/ИНСУЛИНОПОДОБНЫХ ФАКТОРОВ РОСТА В ПОЛЕ CA1 И ЗУБЧАТОЙ ФАЦИИ ГИППОКАМПА ПРИ ПРЕДЪЯВЛЕНИИ НОВОГО КОНТЕКСТА

© 2022 А.М. Швадченко, М.Н. Волобуева, В.О. Иванова, А.П. Белецкий,
Г.Р. Смирнова, Н.В. Баль, П.М. Балабан*

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки
Институт высшей нервной деятельности и нейрофизиологии РАН,
117485 Москва, Россия; электронная почта: pmbalaban@gmail.com

Поступила в редакцию 20.05.2022

После доработки 19.09.2022

Принята к публикации 19.09.2022

Формирование памяти – это сложный процесс, основанный на механизмах регуляции как функционирования синапсов, так и экспрессии генов, кодирующих инсулиноподобные факторы роста. Мы проанализировали изменения в уровне экспрессии генов, кодирующих белки системы инсулин/инсулиноподобных факторов роста в ранний период обучения, в дорсальной и вентральной CA1-области и зубчатой фации гиппокампа у мышей через час после предъявления нового контекста как с негативным подкреплением (модель контекстного условно-рефлекторного замирания), так и без подкрепления. Обнаружено, что при предъявлении нового контекста, независимо от сочетания с негативным подкреплением, наряду с изменением уровня экспрессии хорошо известных ранних генов *c-Fos* (во всех исследованных областях гиппокампа) и *Arc* (в дорсальной и вентральной областях CA1 и дорсальной зубчатой фации), изменяется и уровень экспрессии гена субстрата инсулинового рецептора 2, *Irs2*, в дорсальной области CA1 и вентральной зубчатой фации, что свидетельствует об участии системы инсулина/IGFs в ранних стадиях активации нейронов при предъявлении нового контекста.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: обучение, память, *Irs2*, гиппокамп, транскриптом, условно-рефлекторное замирание.

DOI: 10.31857/S0320972522110045, **EDN:** LVITLP

ВВЕДЕНИЕ

В настоящее время общепринятым является представление о том, что формирование памяти – это сложный процесс, включающий изменения в уровнях экспрессии генов, которые приводят к долговременным функциональным изменениям в нейронах. Внимание нейробиологов привлечено в последнее время к исследованию роли инсулин/инсулиноподобных факторов роста (insulin-like growth factors, IGFs) в обучении и памяти. IGF-инсулиновая система состоит из многих компонентов, включая:

- лиганды: инсулин, инсулиноподобные факторы роста 1 и 2 (IGF1, IGF2);

- рецепторы: инсулиновый рецептор IR (изоформы IR-A и IR-B), рецепторы инсулиноподобных факторов роста 1 и 2 (IGF1R, IGF2R);

- различные компоненты сигнальных путей инсулина и инсулиноподобных факторов, включая субстраты инсулиновых рецепторов (IRS1 и IRS2);

- различные вспомогательные белки, например, IGF-связывающие белки (IGFBPs).

Для некоторых из них показано участие в механизмах обучения и памяти. Так, в работе Chen et al. [1] было показано, что уровень экспрессии гена *Igf2* увеличивается через 20 ч после обучения у крыс. Кроме того, показано, что оверэкспрессия *Igf2* в мозге приводила к улучшению памяти у мышей в модели болезни Альцгеймера [2].

В работе Agis-Balboa et al. [3] продемонстрировано, что во время тестирования памяти, которое можно рассматривать как старт реконсолидации памяти, наблюдается увеличение

Принятые сокращения: IGFs – инсулиноподобные факторы роста; IGFBPs – IGF-связывающие белки; IR – инсулиновый рецептор; IRS1 и IRS2 – субстраты инсулиновых рецепторов.

* Адресат для корреспонденции.

уровня экспрессии гена *Igf2* через час после напоминания о негативном контексте. При этом авторы отметили, что увеличение уровня экспрессии гена *Igf2* в зубчатой фасции и в целом гиппокампе не совпадает по своей динамике, что может свидетельствовать о регион-специфичной регуляции экспрессии генов [3]. Также была показана регион-специфичная экспрессия гена инсулинового рецептора, *Ir*, в разных отделах гиппокампа после обучения: пространственное обучение вызывало увеличение уровня экспрессии гена *Ir* в СА1-области гиппокампа и снижение – в области СА3 [4].

Помимо этих генов, в литературе существуют данные о роли других компонентов IGF-инсулиновой системы, таких как *Irs1* [5], *Irs2* [6, 7], *Igfbp2* [8] в регуляции работы нервной системы, памяти и синаптической пластичности.

Однако нами не было найдено работ по сравнению регион-специфичной экспрессии генов, вовлечённых в IGF-инсулиновую систему в гиппокампе в первые часы после обучения.

Поэтому цель работы состояла в изучении уровня экспрессии генов IGF-инсулиновой системы в разных отделах гиппокампа через час после обучения и после предъявления нового контекста. В качестве исследуемых отделов гиппокампа были выбраны область СА1 и зубчатая фасция, поскольку для них неоднократно показана вовлечённость в процессы обучения и памяти [9, 10]. Кроме того, эти структуры можно быстро и надёжно выделить под биноклярным микроскопом. Рассматриваемые отделы гиппокампа были также разделены на дорсальную и вентральную части, поскольку существуют данные о том, что эти зоны функционально различны между собой [11–16].

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Обучение животных и подготовка материала.

У 54 самцов мышей линии C57Bl/6 возрастом

3–4 месяца вырабатывали обстановочный условно-оборонительный рефлекс пассивного избегания. Экспериментальных мышей (относящихся к группе с обучением, т.е. с предъявлением нового контекста и электрокожной стимуляцией) помещали в камеру на 2 мин для ознакомления с обстановкой, после чего на решетку, на которой находились животные, подавался ток силой 0,8 мА и длительностью 2 с, вызывающий сильную пассивно-оборонительную реакцию, а через 28 с животных извлекали из камеры. Контрольными животными были мыши из домашней клетки (пассивный контроль) и мыши, которых помещали в экспериментальную обстановку, но не подвергали воздействию тока (активный контроль). Через час после обучения мышь усыпляли высокой дозой изофлурана, затем в холодном фосфатно-солевом буфере (0,01 М; pH 7,2–7,6) на льду из левого полушария мозга извлекали гиппокамп и вручную под биноклярным микроскопом выделяли из него дорсальную и вентральную области СА1 и дорсальную и вентральную зубчатые фасции. Образцы замораживали в жидком азоте и хранились при –80 °С.

Часть образцов была исключена из эксперимента из-за низкого качества или малого количества выделенной РНК. В табл. 1 содержатся данные по количеству образцов в каждой исследуемой структуре.

Выделение РНК. РНК выделяли методом гуанидин-тиоцианатной фенол-хлороформной экстракции, с модификациями [17]. К замороженным пробам добавляли по 500 мкл реагента Qiazol («Qiagen», США) и измельчали с помощью гомогенизатора TissueRaptor («Qiagen»), после чего инкубировали 10–15 мин. Далее образцы центрифугировали 10 мин (12 000 g) при 4 °С. Затем переносили супернатант в новые пробирки, добавляли 100 мкл хлороформа, инкубировали 3–5 мин при комнатной температуре, периодически перемешивая. После инкубации образцы центрифугировали 15 мин

Таблица 1. Общее количество образцов, используемых в экспериментальных группах для анализа экспрессии генов

Экспериментальная группа	Исследуемая структура			
	вентральная область СА1	дорсальная область СА1	вентральная зубчатая фасция	дорсальная зубчатая фасция
Контроль (пассивный контроль)	21	15	20	18
Новый контекст (активный контроль)	16	12	16	15
Новый контекст и электрокожная стимуляция (обучение)	16	13	15	12

Примечание. Общее количество экспериментальных животных – 54: пассивный контроль (21), активный контроль (17), обучение (16).

(16 000 g) при 4 °С. Водную фазу переносили в новые пробирки и добавляли 250 мкл изопропанола, 1 мкл гликогена («Thermo Fisher Scientific», США) и инкубировали 10 мин при комнатной температуре, периодически перемешивая. Полученную смесь оставляли на ночь при –80 °С. На следующий день смесь размораживали и центрифугировали 30 мин (21 000 g) при 4 °С. Полученный осадок дважды промывали 80%-ным этанолом с центрифугированием в течение 15 мин (16 000 g) при 4 °С. После удаления этанола полученный осадок высушивали на воздухе и добавляли 12 мкл деионизированной воды. Полученный раствор инкубировали 5 мин при 55 °С. Концентрацию РНК измеряли на спектрофотометре NanoDrop 2000 («Thermo Fisher Scientific»).

Обратная транскрипция. Перед обратной транскрипцией из полученной РНК удаляли следовые количества ДНК. На реакцию брали 1 мкг РНК, 1 мкл буфера для DNase I (Mg²⁺) («Thermo Fisher Scientific»), 1 мкл DNase I (1 ед./мкл) («Thermo Fisher Scientific») и доводили конечный объём смеси деионизированной водой до 10 мкл. Инкубировали 30 мин при 37 °С. Для остановки реакции добавляли 1 мкл ЭДТА (50 мМ) и инкубировали 10 мин при 65 °С. Обратную транскрипцию проводили с помощью обратной транскриптазы MMLV («Евроген», Россия) по инструкции производителя, используя смесь случайных (dN10)-праймеров и oligo-dT15-праймеров в присутствии ингибитора РНКаз (RNase Inhibitor Murine, «New England BioLabs», Англия). Полученные пробы разводили в 16 раз для проведения ПЦР в реальном времени.

ПЦР в реальном времени. Для проведения ПЦР в реальном времени на одну пробу брали по 4 мкл образца, по 0,56 мкл прямого и обратного праймера (10 мкМ), 2,8 мкл смеси qPCRMix-HS SYBR + LowROX («Евроген») и

доводили до общего объёма (14 мкл) деионизированной водой. Для проведения реакции использовали амплификатор CFX 384 Real Time PCR («BioRad», США). На основе данных по секвенированию, в качестве референсных генов, которые продемонстрировали стабильную экспрессию в исследуемых областях гиппокампа, были выбраны ген *Hprt* (кодирующий гипоксантин-гуанинфосфорибозилтрансферазу-1) и ген *Gpm6a* (кодирующий нейрональный мембранный гликопротеин М6-а). Последовательности праймеров для каждого гена представлены в табл. 2.

Статистическая обработка данных ПЦР в реальном времени. Для каждого гена в контрольной группе определяли значение медианы порогового цикла, которое служило нормировочным значением в остальных группах серии для определения относительной разницы в циклах (ΔCt). Затем для всех генов интереса (*Igf2*, *c-Fos*, *Arc*, *Akt1* и *Irs2*) в каждом отдельном образце было определено изменение уровня экспрессии относительно среднего геометрического значения, полученного от референсных генов *Hprt* и *Gpm6a* методом $Eff^{-\Delta Ct}$. Эффективность реакции (Eff) для каждого гена составляла от 1,8 до 2,1.

Формула расчёта относительной экспрессии исследуемых генов:

$$\text{Относительная экспрессия} = \frac{Eff(\text{целевой ген})^{-\Delta Ct}}{\text{Геом. среднее}(Eff(Hprt)^{-\Delta Ct}; Eff(Gpm6a)^{-\Delta Ct})}$$

В ходе анализа данные, полученные от групп с предъявлением новой обстановки и с предъявлением нового контекста и электрокожной стимуляцией были объединены в одну группу. При статистическом анализе экспрессии каждого гена сравнивали две группы – контрольную группу животных из домашней клетки

Таблица 2. Последовательности праймеров (5'→3'), используемые для ПЦР в реальном времени

Ген	Прямой праймер	Обратный праймер
<i>Hprt</i>	GCA GTC CCA GCG TCG TG	TAA TCC AGC AGG TCA GCA AAG AAC
<i>Gpm6a</i>	GTG CTT CGA GTG CTG CAT TA	GTG TGT CTC CAG CAG TCC TT
<i>Igf2</i>	CCC TCA GCA AGT GCC TAA AG	TTA GGG TGC CTC GAG ATG TT
<i>Fos</i>	CCA GAG CGC CCC ATC CTT A	CTG CAG CCA TCT TAT TCC GTT CC
<i>Arc</i>	TGG GTG GAG TTC AAG AAG GA	AGC GTC CAC ATA CAG TGT CT
<i>Irs2</i>	TGG GGC AGC TGG TGG TAG TCA TA	GGG CTC TTG GGC TCT GTG GGT A
<i>Akt1</i>	TGG ACT ACT TGC ACT CCG AGA A	TCA TAG TGG CAC CGT CCT TGA T

Таблица 3. Количество образцов для полногеномного секвенирования

Группа	Левая дорсальная область СА1	Левая вентральная область СА1	Левая дорсальная зубчатая фасция	Левая вентральная зубчатая фасция
Контрольная группа	2	3	3	3
Экспериментальная группа	3	3	4	3

Примечание. Контрольная группа – домашняя клетка; экспериментальная группа – предъявление нового контекста с электрокожной стимуляцией.

и экспериментальную группу животных, помещаемых в новую обстановку. Выбросы, выявленные после анализа, были исключены из дальнейших расчётов. Построение графиков и предобработка данных проводилась с помощью библиотек Pandas, Matplotlib и Seaborn, языка программирования Python. Парное сравнение между группами проводили методом Манна–Уитни.

Секвенирование РНК и биоинформатический анализ. Для секвенирования на платформе Illumina NovaSeq были подготовлены 24 библиотеки кДНК (табл. 3). По завершении секвенирования полученные данные были очищены от адаптерных последовательностей и участков с низким качеством прочтения (программа BBMap, тримминг до Qscore > 20 с 3'-конца) и далее картированы на геном мыши (версия Gencode) программой STAR. Среднее количество прочтений на образец составило около 15 млн, 2/3 из которых после выравнивания составили уникальные (достоверные) прочтения.

Для подсчёта количества выравниваний в пределах генов использовалась программа FeatureCounts с указанием цепь-специфичности.

Дальнейший статистический анализ осуществлялся с помощью библиотек R: DESeq2 (анализ дифференциальной экспрессии), ggplot2. Порог значимости дифференциальной экспрессии генов был установлен на уровне 0,1. В качестве дополнительного источника данных о геной онтологии использовался ресурс Metascape. Список генов, вовлечённых в IGF-инсулиновый сигнальный путь, получен с помощью geneontology.org.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

Уровень экспрессии гена *Igf2* не меняется через час после обучения в разных отделах гиппокампа. Мы сравнили уровень экспрессии гена *Igf2* в разных отделах гиппокампа у мышей через час после обучения и предъявления новой

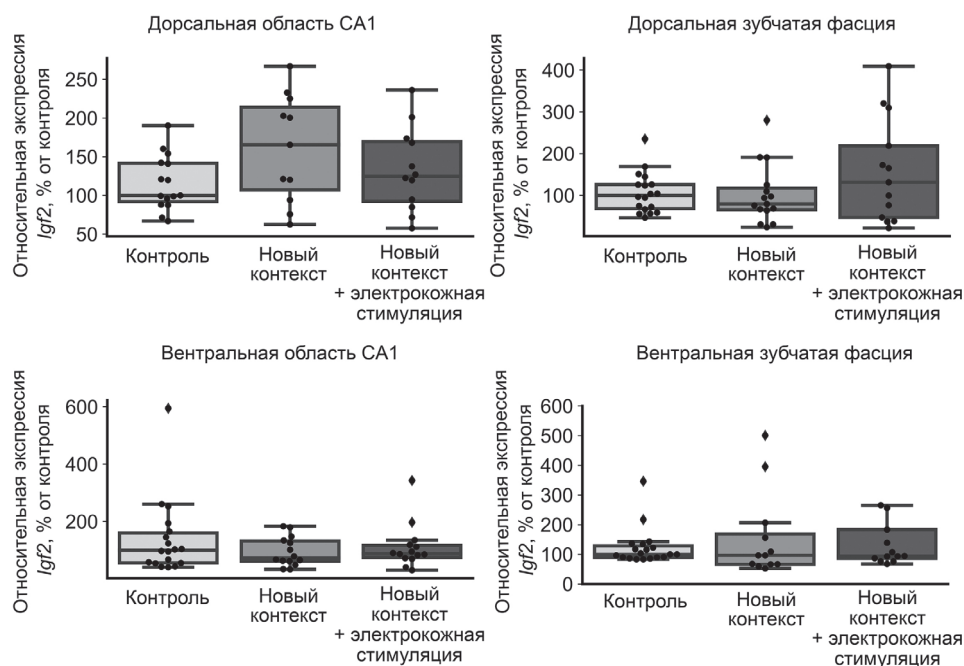


Рис. 1. Экспрессия гена *Igf2* в исследуемых структурах гиппокампа. Относительный уровень экспрессии указан в %, где значение медианы, полученное в контрольной группе, принято за 100%. Черными точками обозначены выбросы. При сравнении уровня экспрессии гена *Igf2* между экспериментальными и контрольными группами статистически значимых различий обнаружено не было (тест Манна–Уитни)

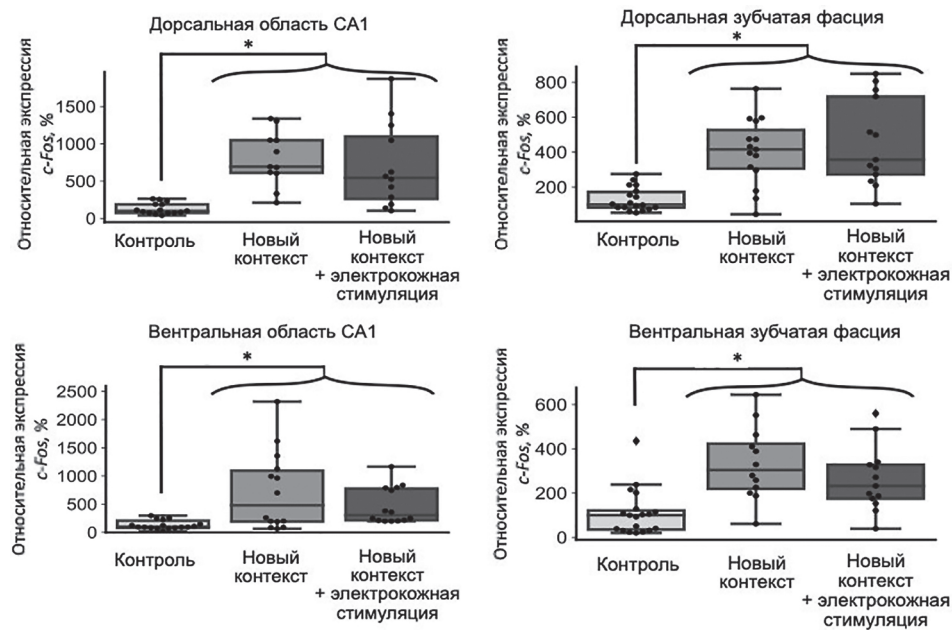


Рис. 2. Экспрессия гена *c-Fos* в исследуемых структурах гиппокампа. Относительный уровень экспрессии указан в %, где значение медианы, полученное в контрольной группе, принято за 100%. Во всех областях между контрольной группой и объединённой группой наблюдаются достоверные отличия, * $p < 0,001$; тест Манна–Уитни

обстановки. Уровень экспрессии гена *Igf2* достоверно не менялся после обучения ни в одной из изолированных областей CA1 или зубчатой фасции. Значимых различий в уровне экспрессии этого гена обнаружено не было (рис. 1).

Экспрессия немедленного раннего гена *c-Fos* увеличивается во всех исследованных областях гиппокампа через час после предъявления нового контекста вне зависимости от сочетания с электрокожной стимуляцией. Чтобы проверить, влияло ли предъявление нового контекста с негативным подкреплением или без него на экспрессию генов, мы оценили уровень экспрессии хорошо изученного немедленного раннего гена *c-Fos* в рассматриваемых нами отделах гиппокампа. В ряде работ для этого гена показано увеличение экспрессии в разных областях мозга после обучения [18].

Обнаружено, что предъявление новой обстановки вызывает достоверное увеличение уровня экспрессии гена *c-Fos* во всех изучаемых отделах гиппокампа. Стоит отметить, что сочетание новой обстановки с электрокожной стимуляцией не оказало дополнительного эффекта по сравнению с предъявлением только новой обстановки, поэтому статистический анализ проводился между контрольной группой мышей и мышами, которым был предъявлен новый контекст вне зависимости от сочетания с электрокожной стимуляцией (рис. 2).

Экспрессия немедленного раннего гена *Arc* увеличивается в некоторых областях гиппокампа через час после предъявления нового контекста.

Также мы проверили экспрессию другого известного раннего гена *Arc* в разных структурах гиппокампа. Уровень экспрессии этого гена увеличивается во всех исследованных областях гиппокампа, кроме вентральной зубчатой фасции, через час после предъявления нового контекста, также вне зависимости от сочетания с электрокожной стимуляцией (рис. 3).

Анализ экспрессии генов с помощью полногеномного секвенирования РНК в отдельных областях гиппокампа показал изменения в уровне экспрессии ряда генов IGF-инсулинового пути. Чтобы найти гены, участвующие в IGF-инсулиновом сигнальном пути, которые меняют уровень экспрессии во время обучения, мы провели пилотное секвенирование образцов гиппокампа через час после обучения. Обнаружено, что изменение уровня экспрессии многих генов наблюдается в первую очередь в дорсальной области CA1, в то время как в других областях наблюдается изменение уровня экспрессии только отдельных генов.

На рис. 4, а показано, что гены, уровень экспрессии которых меняется через час после обучения в дорсальной области CA1 гиппокампа, относятся к различным сигнальным каскадам и биологическим процессам, в том числе к mTOR-зависимому сигнальному пути, являющемуся компонентом других сигнальных путей (в том числе IGF-инсулиновой системы). Для того чтобы среди всех дифференциально экспрессируемых генов найти те, что относятся к IGF-инсулиновой системе, мы загрузили спи-

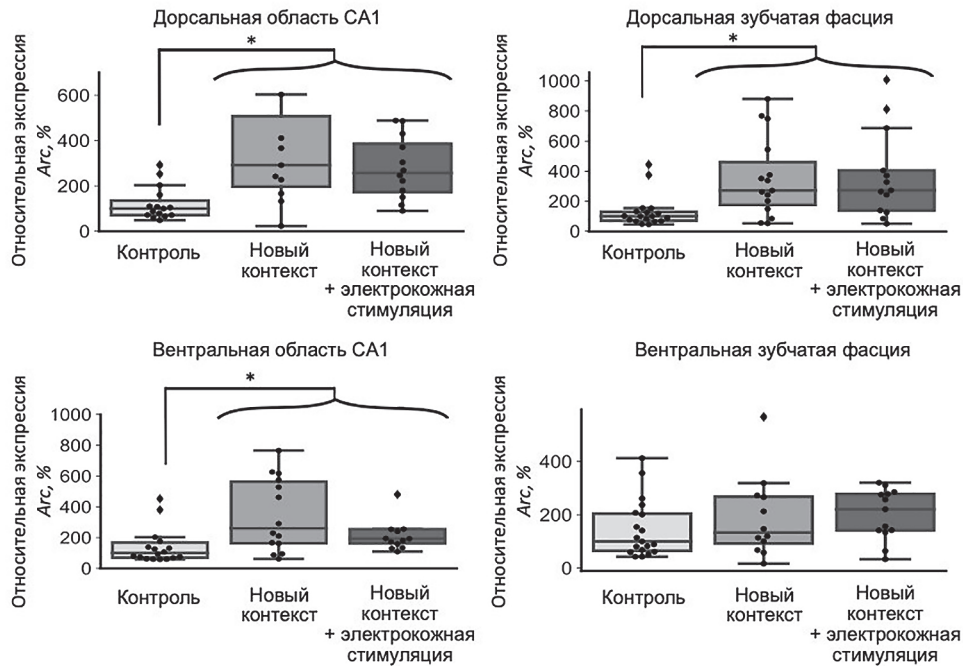


Рис. 3. Экспрессия гена *Arc* в исследуемых структурах гиппокампа. Относительный уровень экспрессии указан в %, где значение медианы, полученное в контрольной группе, принято за 100%. Во всех областях, кроме вентральной зубчатой фасции, между контрольной группой и объединённой группой наблюдаются достоверные различия, * $p < 0,001$; тест Манна–Уитни. Черными точками обозначены выбросы

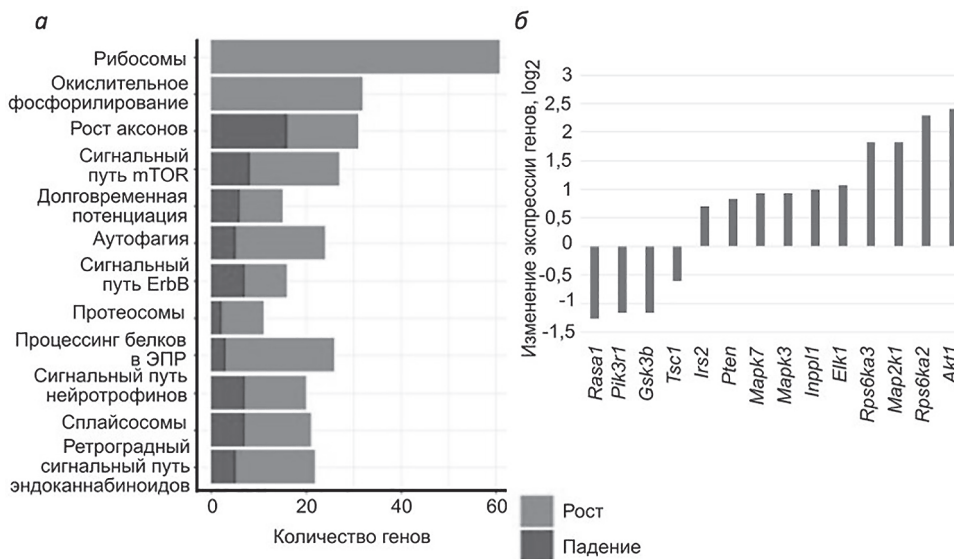


Рис. 4. Анализ генной онтологии дифференциально экспрессируемых генов в дорсальной области CA1 гиппокампа после предъявления нового контекста с электрокожной стимуляцией. *a* – Анализ вовлечённости дифференциально-экспрессируемых генов в различные биологические процессы и сигнальные каскады (значение $p < 0,1$ после поправки на множественное сравнение). Данные получены с помощью ресурса Metascape. *b* – Изменение уровня экспрессии генов, вовлечённых в IGF-инсулин-зависимые сигнальные каскады (значение $p < 0,1$ после поправки на множественное сравнение). Данные получены с помощью ресурса geneontology

сок всех генов (по порогу скорректированного значения $p < 0,1$) в базу данных geneontology.org. Таким образом, были отобраны гены, входящие в IGF-инсулин-связанные сигнальные пути. Уровень экспрессии этих генов показан на рис. 4, б.

Для дальнейшего анализа с помощью ПЦР в реальном времени на большей выборке жи-

вотных (табл. 1) были отобраны два гена – *Irs2* и *Akt1*. *Irs2* – ген субстрата инсулинового рецептора 2, является специфичным компонентом IGF-инсулинового пути, в то время как многие другие компоненты являются общими для разных нейротрофических путей. *Akt1* – ген внутриклеточного фермента семейства протеинкиназ В, вовлечённый в регуляцию

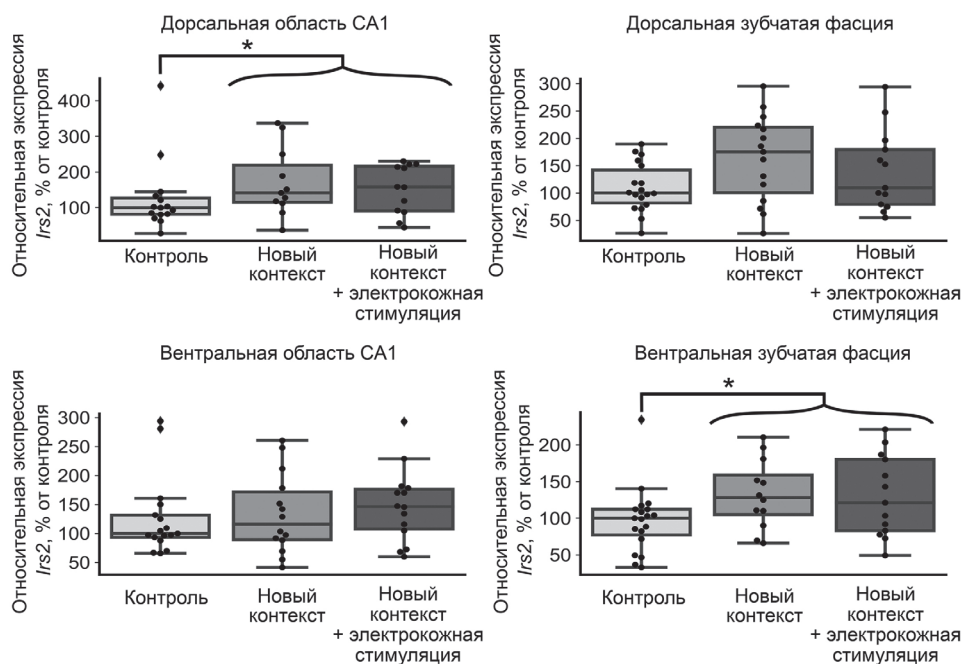


Рис. 5. Экспрессия гена *Irs2* в исследуемых структурах гиппокампа. Относительный уровень экспрессии указан в %, где значение медианы, полученное в контрольной группе, принято за 100%. В дорсальной области CA1 и в вентральной зубчатой фасции между контрольной и объединённой группами наблюдаются достоверные различия, * $p < 0,05$; тест Манна–Уитни. Черными точками указаны выбросы

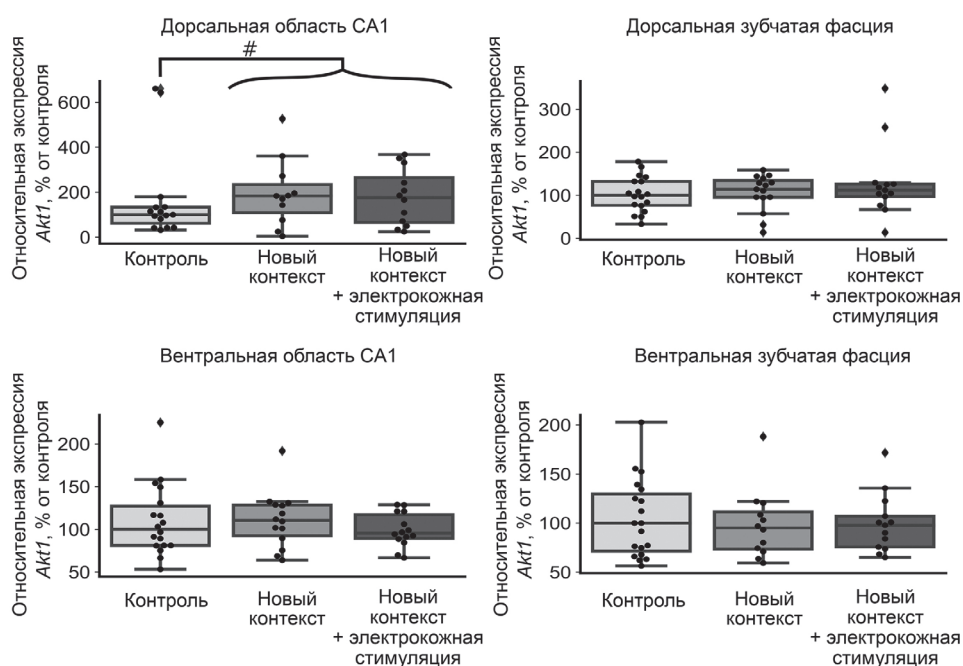


Рис. 6. Экспрессия гена *Akt1* в исследуемых структурах гиппокампа. Относительный уровень экспрессии указан в %, где значение медианы, полученное в контрольной группе принято за 100%. В дорсальной области CA1 между контрольной группой и объединённой группой с предъявлением нового контекста наблюдается тенденция к увеличению, # $p < 0,1$; тест Манна–Уитни

пролиферации, роста и выживания клеток, участвующий также в активации mTOR-зависимого сигнального пути. Данный ген показал наибольшее изменение уровня экспрессии в дорсальной области CA1 гиппокампа среди других генов IGF-инсулиновой системы после анализа данных секвенирования (рис. 4, б).

Уровень экспрессии гена *Irs2* увеличивается в дорсальной области CA1 и в вентральной зубчатой фасции через час после предъявления новой обстановки. Мы обнаружили, что уровень экспрессии гена *Irs2* достоверно увеличивается при предъявлении нового контекста в дорсальной области CA1 и в вентральной зубчатой

фасции, но не в других исследуемых областях гиппокампа (рис. 5).

Уровень экспрессии гена *Akt1* не меняется достоверно в изолированных областях CA1 и зубчатых фасциях через час после предъявления новой обстановки. Мы не обнаружили достоверных изменений экспрессии гена *Akt1* в исследуемых областях гиппокампа, хотя наблюдается тенденция к увеличению экспрессии гена *Akt1* в дорсальной области CA1 (скорректированное значение $p = 0,07$; рис. 6).

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Гиппокамп – это многокомпонентный отдел мозга, в котором наблюдаются морфофункциональные различия как вдоль дорсо-вентральной оси, что обусловлено различными связями дорсальной и вентральной частей гиппокампа с другими отделами мозга, так и вдоль поперечной оси, что обусловлено хорошо описанной структурированностью гиппокампа и делением его на области CA1, CA2, CA3 и зубчатую фасцию [9, 19, 20]. Разные области гиппокампа отличаются нейрохимическими изменениями при стрессе и нейропатологиях [11].

Однако при исследовании экспрессии генов функциональные различия между областями гиппокампа часто не учитываются [21], хотя в некоторых работах авторы наблюдали различия в уровне экспрессии генов в отдельных частях гиппокампа в ходе экспериментов с обучением и модификацией памяти [3, 22, 23]. Например, в работе по изучению динамики накопления белков *c-Fos* и *Arc* в клетках мозга мышей после обучения были показаны временные различия в увеличении экспрессии этих белков для разных областей гиппокампа (области CA1, CA3 и зубчатой фасции) [24]. Подобные различия в количестве *c-Fos*-положительных клеток после обучения (электрокожной стимуляции) были показаны и для ряда областей гиппокампа у крыс, в частности, для области CA1 и зубчатой фасции [25]. Также в одной из работ с помощью метода гибридизации *in situ* было показано различие в накоплении клетками мРНК гена *Arc* в дорсальной и вентральной частях CA1, CA3 и DG-областях гиппокампа через 30 мин после обучения с помощью электрокожной стимуляции. Полученные в статье данные говорят о достоверном увеличении экспрессии гена *Arc* лишь в дорсальных областях гиппокампа [26].

В настоящей работе мы показали, что экспрессия генов *c-Fos* и *Arc* меняется после обучения как в модели условно-рефлекторного

страха, так и после предъявления новой обстановки почти во всех исследуемых отделах гиппокампа. В работе Heroux et al. [27] также было показано, что предъявление новой обстановки без дополнительной стимуляции изменяло экспрессию гена *c-Fos* в дорсальном гиппокампе. Интересно, что мы не заметили отличий между предъявлением новой обстановки и сочетанием новой обстановки с электрокожной стимуляцией, поэтому обе эти экспериментальные группы были объединены в одну в процессе анализа полученных данных. Возможно, отсутствие различий между описанными выше группами связано с особенностями протокола эксперимента, в частности, слабым уровнем приучения мышей.

Поскольку было показано, что при консолидации памяти и при напоминании происходит активация одних и тех же генов, например гена *c-Fos*, мы решили проверить, будут ли наблюдаться подобные изменения во время обучения и в уровне экспрессии гена *Igf2*, так как ранее подобные изменения наблюдались через час после напоминания [3]. Мы не обнаружили достоверных различий в уровне экспрессии этого гена между группами через час после обучения или предъявления нового контекста. Анализ экспрессии других генов IGF-инсулинового пути с помощью исследования транскриптома показал, что уровень экспрессии некоторых генов меняется через час после обучения в модели условно-рефлекторного страха в первую очередь в дорсальной области CA1.

Дальнейший анализ уровня экспрессии генов с помощью ПЦР в реальном времени на выборке из 54 животных продемонстрировал достоверное повышение уровня экспрессии гена субстрата инсулинового рецептора 2 в дорсальной области CA1 и вентральной зубчатой фасции.

Ряд данных указывает на участие гена *Irs2* в процессе формирования памяти и развитии мозговых структур. Мыши с полным нокаутом *Irs2* в мозге демонстрировали улучшение пространственной памяти после предъявления нового контекста в сочетании с электрокожной стимуляцией. В той же работе было показано, что при полной делеции гена *Irs2* в головном мозге увеличивалась экспрессия белка-маркера активных синапсов и плотность дендритных шипиков в области CA1 гиппокампа, что может оказывать положительный эффект на формирование памяти. Из этих данных авторы выдвигают предположение о негативном влиянии *Irs2* на процесс обучения [7]. Однако в другой работе, где рассматривалось влияние нокаута гена *Irs2* на эмбриональное развитие мышей, отмечались морфологические изменения мозга, проявлявшиеся в уменьшении размера не-

которых структур мозга, из чего было выдвинуто предположение об уменьшении скорости пролиферации нейронов в ходе развития мозга у нокаутных мышей [6].

Интересно, что регуляторные участки гена *Irs2* содержат области, которые могут регулировать его индуцибельную экспрессию. В частности, в работе Persaud et al. [28] демонстрируется, что каскад активации Ca^{2+} /CaMK(IV)/CREB регулирует экспрессию гена *Irs2*, но не *Irs1* в бета-клетках поджелудочной железы. Таким образом, ген *Irs2* может быть мишенью для кальций-зависимой регуляции. В другой работе было показано, что изменение уровня экспрессии гена *Irs2* после напоминания в модели активного избегания наблюдалось лишь в зубчатой фасции гиппокампа, но не в поле CA1 [22].

В настоящей работе мы обнаружили, что несмотря на сходство в активации ряда исследуемых генов, таких как *c-Fos* и *Arc*, экспрессия гена *Irs2* носит более локальный характер. Это можно объяснить как особенностями коннектома этих областей, так и различиями в физиологии пирамидальных клеток области CA1, гранулярных и других клеток зубчатой фасции.

Таким образом, нам удалось показать достоверные изменения уровня экспрессии гена *Irs2* в отдельных областях гиппокампа в одной временной точке.

Полученные результаты требуют дальнейшего изучения с увеличением числа исследуемых образцов и вовлечением других временных точек для более полного понимания процессов, происходящих в отдельных областях гиппокампа при предъявлении новой обстановки и обучения.

Вклад авторов. Н.В. Баль, П.М. Балабан – концепция и руководство работой; А.М. Швадченко, М.В. Волобуева, В.О. Иванова, Г.Р. Смирнова, Н.В. Баль – проведение экспериментов; А.П. Белецкий, Н.В. Баль – статистический анализ; А.М. Швадченко, М.В. Волобуева, Н.В. Баль, А.П. Белецкий, П.М. Балабан – обсуждение результатов исследования; Н.В. Баль, А.М. Швадченко – написание текста; П.М. Балабан, Н.В. Баль, А.М. Швадченко – редактирование текста статьи.

Финансирование. Работа поддержана Министерством науки и образования РФ (грант № 075-15-2020-801) и Российским научным фондом (грант № 18-75-10112, исследование гена *Irs2*).

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Соблюдение этических норм. Все принятые международные, национальные и институциональные принципы ухода и использования животных были соблюдены.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Chen, D. Y., Stern, S. A., Garcia-Osta, A., Saunier-Rebori, B., Pollonini, G., et al. (2011) A critical role for IGF-II in memory consolidation and enhancement, *Nature*, **469**, 491-497, doi: 10.1038/nature09667.
2. Pascual-Lucas, M., Viana da Silva, S., Di Scala, M., Garcia-Barroso, C., González-Aseguinolaza, G., et al. (2014) Insulin-like growth factor 2 reverses memory and synaptic deficits in APP transgenic mice, *EMBO Mol. Med.*, **6**, 1246-1262, doi: 10.15252/emmm.201404228.
3. Agis-Balboa, R. C., Arcos-Diaz, D., Wittnam, J., Govindarajan, N., Blom, K., et al. (2011) A hippocampal insulin-growth factor 2 pathway regulates the extinction of fear memories, *EMBO J.*, **30**, 4071-4083, doi: 10.1038/emboj.2011.293.
4. Dou, J. T., Chen, M., Dufour, F., Alkon, D. L., and Zhao, W. Q. (2005) Insulin receptor signaling in long-term memory consolidation following spatial learning, *Learn Mem.*, **12**, 646-655, doi: 10.1101/lm.88005.
5. Zhao, W. Q., Chen, H., Quon, M. J., and Alkon, D. L. (2004) Insulin and the insulin receptor in experimental models of learning and memory, *Eur. J. Pharmacol.*, **490**, 71-81, doi: 10.1016/j.ejphar.2004.02.045.
6. Schubert, M., Brazil, D., Burks, D., Kushner, J., Ye, J., et al. (2003) Insulin receptor substrate-2 deficiency impairs brain growth and promotes tau phosphorylation, *J. Neurosci.*, **23**, 7084-7092, doi: 10.1523/JNEUROSCI.23-18-07084.2003.
7. Irvine, E. E., Drinkwater, L., Radwanska, K., Al-Qassab, H., Smith, M. A., et al. (2011) Insulin receptor substrate 2 is a negative regulator of memory formation, *Learn. Mem.*, **18**, 375-383, doi: 10.1101/lm.2111311.
8. Khan, S. (2019) IGFBP-2 signaling in the brain: from brain development to higher order brain functions, *Front. Endocrinol. (Lausanne)*, **10**, 822, doi: 10.3389/fendo.2019.00822.
9. Gilbert, P., Kesner, R., and Lee, I. (2001) Dissociating hippocampal subregions: a double dissociation between dentate gyrus and CA1, *Hippocampus*, **11**, 626-636, doi: 10.1002/hipo.1077.
10. Hunsaker, M., and Kesner, R. (2008) Evaluating the differential roles of the dorsal dentate gyrus, dorsal CA3, and dorsal CA1 during a temporal ordering for spatial locations task, *Hippocampus*, **18**, 955-964, doi: 10.1002/hipo.20455.

11. Gulyaeva, N. V. (2019) Functional neurochemistry of the ventral and dorsal hippocampus: stress, depression, dementia and remote hippocampal damage, *Neurochem. Res.*, **44**, 1306-1322, doi: 10.1007/S11064-018-2662-0.
12. Strange, B., Witter, M., Lein, E., and Moser, E. (2014) Functional organization of the hippocampal longitudinal axis, *Nat. Rev. Neurosci.*, **15**, 655-669, doi: 10.1038/nrn3785.
13. Bannerman, D., Rawlins, J., McHugh, S., Deacon, R., Yee, B. K., et al. (2004) Regional dissociations within the hippocampus – memory and anxiety, *Neurosci. Biobehav. Rev.*, **28**, 273-283, doi: 10.1016/j.neubiorev.2004.03.004.
14. Fanselow, M., and Dong, H., (2010) Are the dorsal and ventral hippocampus functionally distinct structures? *Neuron*, **65**, 7-19, doi: 10.1016/j.neuron.2009.11.031.
15. Moser, M., and Moser, E. (1998) Functional differentiation in the hippocampus, *Hippocampus*, **8**, 608-619, doi: 10.1002/(SICI)1098-1063(1998)8:6<608::AID-HIPO3>3.0.CO;2-7.
16. Kenney, J., Raybuck, J., and Gould, T. (2012) Nicotinic receptors in the dorsal and ventral hippocampus differentially modulate contextual fear conditioning, *Hippocampus*, **22**, 1681-1690, doi: 10.1002/hipo.22003.
17. Chomczynski, P., and Sacchi, N. (1987) Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction, *Anal. Biochem.*, **162**, 156-159, doi: 10.1006/abio.1987.9999.
18. Анохин К. В. (1992) «Ранние гены» в механизмах обучения и памяти, Дисс. докт. биол. наук, МГУ, Москва.
19. Aimone, J., Deng, W., and Gage, F. (2011) Resolving new memories: a critical look at the dentate gyrus, adult neurogenesis, and pattern separation, *Neuron*, **70**, 589-596, doi: 10.1016/J.NEURON.2011.05.010.
20. Cembrowski, M., Wang, L., Sugino, K., Shields, B., and Spruston, N. (2016) Hipposeq: a comprehensive RNA-seq database of gene expression in hippocampal principal neurons, *Elife*, **5**, e14997, doi: 10.7554/ELIFE.14997.
21. Cho, J., Yu, N., Choi, J.-H., Sim, S., Kang, S. J., et al. (2015) Multiple repressive mechanisms in the hippocampus during memory formation, *Science*, **350**, 82-87, doi: 10.1126/science.aac7368.
22. Harris, R. M., Kao, H.-Y., Alarcón, J. M., Fenton, A. A., and Hofmann, H. A. (2020) Transcriptome analysis of hippocampal subfields identifies gene expression profiles associated with long-term active place avoidance memory, *bioRxiv*, 2020.02.05.935759, doi: 10.1101/2020.02.05.935759.
23. Katzman, A., Khodadadi-Jamayran, A., Kapeller-Libermann, D., Ye, X., Tsigirgos, A., et al. (2021) Distinct transcriptomic profiles in the dorsal hippocampus and prelimbic cortex are transiently regulated following episodic learning, *J. Neurosci.*, **41**, 2601-2614, doi: 10.1523/JNEUROSCI.1557-20.2021.
24. Ivashkina, O., Toropova, K., Ivanov, A., Chekhov, S., and Anokhin, K. (2016) Waves of c-Fos and Arc proteins expression in neuronal populations of the hippocampus in response to a single episode of new experience, *Bull. Exp. Biol. Med.*, **160**, 729-732, doi: 10.1007/S10517-016-3296-3.
25. Murawski, N., Klintsova, A., and Stanton, M. (2012) Neonatal alcohol exposure and the hippocampus in developing male rats: effects on behaviorally induced CA1 c-Fos expression, CA1 pyramidal cell number, and contextual fear conditioning, *Neuroscience*, **206**, 89-99, doi: 10.1016/J.NEUROSCIENCE.2012.01.006.
26. Chawla, M., Sutherland, V., and Olson, K. (2018) Behavior-driven Arc expression is reduced in all ventral hippocampal subfields compared to CA1, CA3 and dentate gyrus in rat dorsal hippocampus, *Hippocampus*, **28**, 178-185, doi: 10.1002/hipo.22820.
27. Heroux, N., Osborne, B., Miller, L., Kawan, M., Buban, K., et al. (2018) Differential expression of the immediate early genes c-Fos, Arc, Egr-1, and Npas4 during long-term memory formation in the context preexposure facilitation effect (CPFE), *Neurobiol. Learn. Mem.*, **147**, 128-138, doi: 10.1016/J.NLM.2017.11.016.
28. Persaud, S., Liu, B., Sampaio, H., Jones, P., and Muller, D. (2011) Calcium/calmodulin-dependent kinase IV controls glucose-induced Irs2 expression in mouse beta cells via activation of cAMP response element-binding protein, *Diabetologia*, **54**, 1109-1120, doi: 10.1007/S00125-011-2050-7.

NEW CONTEXT SIGNIFICANTLY CHANGES EXPRESSION OF *Irs2* GENE IN HIPPOCAMPAL AREAS

A. M. Shvadchenko, M. N. Volobueva, V. O. Ivanova, A. P. Beletskiy,
G. R. Smirnova, N. V. Bal, and P. M. Balaban*

*Institute of Higher Nervous Activity and Neurophysiology, Russian Academy of Sciences,
117485 Moscow, Russia; E-mail: pmbalaban@gmail.com*

Memory formation is a complex process involving changes in the synaptic activity and gene expression encoding the insulin-like growth factors. We analyzed changes in the expression of genes encoding the insulin/insulin-

like growth factors' proteins at the early period of learning in the CA1 region and dentate gyrus of the dorsal and ventral hippocampus in mice 1 hour after presentation of a new context (contextual fear conditioning) with and without negative reinforcement. It was found that in addition to changes in the expression of immediate early genes *c-Fos* (in all studied hippocampal fields) and *Arc* (in dorsal and ventral CA1, as well as in dorsal dentate gyrus), exposure to a new context significantly altered expression of the insulin receptor substrate 2 gene (*Irs2*) in dorsal CA1 and ventral dentate gyrus irrespectively of the negative reinforcement, which suggests participation of the insulin/IGF system in the early stages of neural activation during learning.

Keywords: learning, memory, *Irs2*, hippocampus, transcriptome, fear conditioning

РОЛЬ ОНКСУПРЕССОРА PTEN И ЕГО РЕГУЛЯЦИЯ ПРИ ЗЛОКАЧЕСТВЕННОЙ ТРАНСФОРМАЦИИ ЭНДОМЕТРИЯ

Обзор

© 2022 А.М. Первалова^{1*}, В.С. Кобелев², В.Г. Сисакян³,
Л.Ф. Гуляева^{1,2}, В.О. Пустыльняк^{1,2}

¹ Новосибирский национальный исследовательский государственный университет,
630090 Новосибирск, Россия; электронная почта: a.perw@yandex.ru

² Федеральный исследовательский центр фундаментальной и трансляционной медицины,
630117 Новосибирск, Россия

³ Новосибирский областной клинический онкологический диспансер, 630108 Новосибирск, Россия

Поступила в редакцию 02.05.2022

После доработки 24.08.2022

Принята к публикации 19.09.2022

Онкосупрессорные свойства белка PTEN хорошо известны, однако всё больше данных говорит о том, что они не ограничиваются его традиционной способностью ингибировать проонкогенный сигнальный путь PI3K/AKT. Особенности строения PTEN позволяют ему взаимодействовать с субстратами различной природы и проявлять свою активность различными путями и в цитоплазме, и в ядрах клеток, что даёт возможность более широко взглянуть на его способность подавлять рост опухолей. Возможные причины потери влияния PTEN клеткой также разнообразны – известно множество механизмов регуляции количества и активности белка PTEN, при этом значимость каждого из них для развития злокачественных опухолей только предстоит изучить. Ниже мы просуммируем имеющиеся данные как о структуре и функциях белка PTEN, так и об изменениях в активности механизмов регуляции PTEN, наблюдаемых при развитии злокачественных изменений в клетках, на примере одного из наиболее чувствительных к потере PTEN видов злокачественных опухолей – рака эндометрия.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: PTEN, рак эндометрия, гиперплазия эндометрия, регуляция генов.

DOI: 10.31857/S0320972522110057, **EDN:** LVLTLTD

ВВЕДЕНИЕ. ОБЩИЕ СВЕДЕНИЯ О PTEN

Определение. PTEN (phosphatase and tensin homolog deleted on chromosome 10) – белок, в настоящее время широко известный своими онкосупрессорными свойствами. Это продукт гена *PTEN*, расположенного на длинном плече 10-й хромосомы (10q23) в области, где часто выявляются мутации в случае многих видов злокачественных новообразований [1]. Наиболее известная функция этого белка в клетке заключается в его способности проявлять фосфатазную активность в отношении липидов и

белков. Благодаря этому он способен негативно влиять на про-пролиферативные сигнальные каскады, снижая пролиферативную активность клеток. Также предполагается, что PTEN способен влиять на жизнедеятельность клетки и с помощью других различных механизмов, в том числе участвуя в поддержании стабильности генома. При этом даже небольшое снижение уровня активного PTEN в клетке может способствовать прогрессированию ряда злокачественных новообразований [2].

Структура PTEN. На данный момент в литературе имеется ряд сведений о строении белка PTEN и связи структуры с его функциями.

Принятые сокращения: РЭ – рак эндометрия; АКТ – протеинкиназа В, серин/треониновая протеин-киназа; АН/Е1N – атипичная гиперплазия/эндометриальная интраэпителиальная неоплазия; ВН – доброкачественная гиперплазия; С2 – кальций-независимый домен типа II; СТТ – карбокси-терминальный хвост; DUSP – фосфатаза двойной специфичности; РВМ – Р1P2-связывающий мотив; PDZ-ВМ – PDZ-связывающий мотив; Р1P3 – фосфатидилинозитол-3,4,5-трифосфат; PTEN – гомолог фосфатазы и тензина; TCGA – Атлас ракового генома (The Cancer Genome Atlas).

* Адресат для корреспонденции.

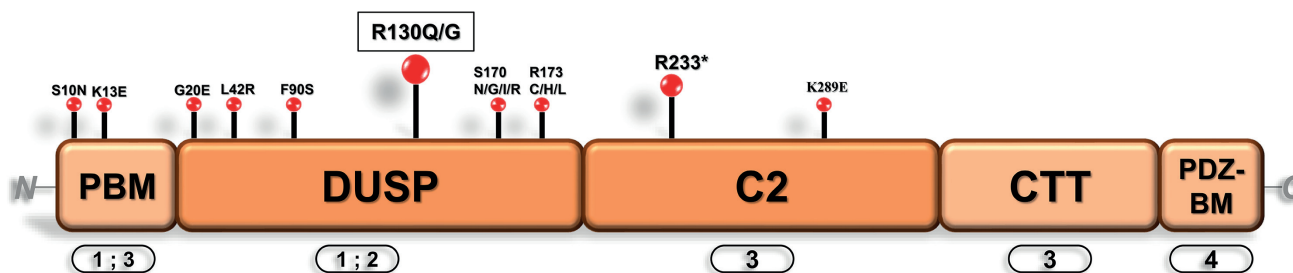


Рис. 1. Доменная организация белка PTEN. 1 – Содержит участки, ответственные за каталитическую активность PTEN в отношении липидов; 2 – содержит участки, ответственные за каталитическую активность в отношении белков; 3 – содержит участки, ответственные за структуру белка и его взаимодействие с мембраной; 4 – содержит участки, ответственные за взаимодействие с белками, содержащими PDZ-домен. Сверху отмечены положения часто встречающихся точечных мутаций в гене *PTEN*. Названия доменов: PBM – PIP2-связывающий мотив; DUSP – фосфатаза двойной специфичности; C2 – кальций-независимый домен типа II; CTT – карбокси-терминальный хвост; PDZ-ВМ – PDZ-связывающий мотив

Ниже постараемся осветить наиболее важные из них. Сам белок состоит из 403 аминокислотных остатков и содержит в своей структуре несколько доменов. Среди них выделяют два основных глобулярных домена, DUSP (фосфатаза двойной специфичности, dual-specificity phosphatase; 15–185 а.о.) и C2 (кальций-независимый домен типа II, type II calcium-independent C2 domain; 192–353 а.о.), которые находятся в окружении других, меньших по размеру и менее упорядоченных доменов – PBM (PIP2-связывающий мотив, PIP2-binding motif), CTT (карбокси-терминальный хвост) и PDZ-ВМ (PDZ-связывающий мотив, PDZ-binding motif) [3, 4]. Дадим краткую характеристику указанным выше участкам белка PTEN (рис. 1).

Домен DUSP важен для обеспечения ферментативной активности PTEN, из-за чего также называется фосфатазным. В своём строении он имеет несколько петель, расположенных между другими более массивными участками. Петли формируют активный центр белка и обозначаются как P-, WPD- и TI-петли. P- и WPD-петли важны для протекания реакции, а TI-петля определяет размер каталитического кармана. На петле P расположены аминокислотные остатки, критически важные для осуществления ферментативной функции белка – цистеин (C124) и аргинин (R130). Было показано, что мутации, затрагивающие участок C124, приводят к полной инактивации PTEN [3, 4].

Домен C2, аналогично фосфатазному, также содержит в своей структуре различные петли, и они важны как для взаимодействия всего белка с мембраной, так и для взаимодействия доменов PTEN между собой [3]. Участки, обеспечивающие взаимодействие доменов друг с другом и отвечающие за правильное сворачивание белка, также важны для сохранения активности PTEN,

при этом они часто содержат мутации в случае злокачественных новообразований [3, 4].

Другой домен, PBM (PIP2-связывающий мотив), определяет связывание PTEN с анионными липидами и регулирует PIP3-фосфатазную активность. Мутация в участке K13E, принадлежащем к этому домену, не только делает невозможным такой механизм активации, но и также снижает способность PTEN связываться с мембраной [3].

Следующий домен – CTT (карбокси-терминальный хвост). Его посттрансляционные модификации важны для регулирования активности PTEN, а мутации, приводящие к его отсутствию, были определены как онкогенные [3]. Этот домен, взаимодействуя с другими, способен осуществлять аутоингибирование активности белка – фосфорилирование его сериновых и треониновых аминокислотных остатков способствует изменению конформации, приводя PTEN в «закрытое» состояние. Такое состояние белка менее активное, но более стабильное, так как при этом расположенные на этом участке последовательности PEST становятся менее доступны для убиквитин-лигаз [3, 4]. Дефосфорилирование этого участка, напротив, приводит его к «открытой» конформации и повышает активность PTEN.

Последний участок, PDZ-ВМ, составляют три аминокислоты (Thr-Val-Lys). Роль его в развитии опухолей изучена не до конца, однако считается, что PDZ-домен принимает участие в осуществлении белок-белковых взаимодействий [3, 4]. Более полное и наглядное представление о трёхмерной структуре белка можно получить, обратившись к современным интернет-ресурсам. Ресурсы с данными о структуре PTEN, а также о других его особенностях обобщены в табл. 1.

Было показано, что, кроме классической формы PTEN, существуют и другие его изо-

Таблица 1. Ресурсы, содержащие современные данные о PTEN

Данные	URL
Структура PTEN [97]	https://www.rcsb.org/3d-sequence/1D5R?assemblyId=1
Изменения PTEN в онкологических заболеваниях [94, 95, 96]	мутации https://bit.ly/3PGCzbY ; количество РНК: https://www.proteinatlas.org/ENSG00000171862-PTEN/pathology , http://ualcan.path.uab.edu/cgi-bin/Pan-cancer.pl?genenam=PTEN ; количество белка (RPPA): https://bit.ly/3Np21QU ; количество белка (протеомный анализ): https://pdc.cancer.gov/pdc/browse
Белок-белковые взаимодействия PTEN [98]	https://string-db.org/network/homo_sapiens/PTEN

формы, хоть они синтезируются и в меньшем количестве [2, 3, 5]. Это становится возможным благодаря наличию альтернативных сайтов инициации трансляции, что приводит к синтезу удлиненных вариантов белка. Среди них наиболее известны изоформы PTEN- α (PTEN-L) и PTEN- β , которые обладают рядом особенностей. PTEN- α , благодаря наличию в своей структуре дополнительных последовательностей, способен покинуть клетку и проникать в соседние [3, 5]. Предположительно, это может приводить к дополнительному подавлению в них активности сигнального пути PI3K/AKT, однако данные по этому вопросу остаются противоречивыми [3, 5]. PTEN- α был найден и в митохондриях, где он, взаимодействуя с классической формой PTEN, способен увеличивать активность киназы PINK1 и влиять на энергетический обмен [6]. PTEN- β , в свою очередь, был обнаружен в ядрышках клеток, где он, дефосфорилируя нуклеолин, способен ингибировать синтез пре-рРНК и образование рибосом [7]. Предполагается, что альтернативные изоформы способны влиять на убиквитинирование и взаимодействовать с гистонами в ядре клетки [5].

Таким образом, сведения о строении PTEN позволяют сделать некоторые выводы о его основных функциях. Благодаря особенностям в структуре белка, в частности, благодаря строению и размерам его каталитического кармана, PTEN способен выступать в роли фосфатазы с двойной субстратной специфичностью. Это значит, что он способен дефосфорилировать как фосфопептиды, так и фосфолипиды, в том числе такие большие молекулы, как PIP3 (фосфатидилинозитол-3-фосфат) [4]. Также известно, что благодаря наличию в своей структуре определенного участка (PDZ-ВМ, упомянутый ранее), PTEN способен вступать и в белок-белковые взаимодействия. Этот участок выступает в качестве мишени для других, содержащих PDZ-домен, белков, многие из которых проявляют скаффолдную активность и

регулируют протекание внутриклеточных сигнальных путей [3]. Ниже рассмотрим известные функции PTEN более подробно.

Функции PTEN в клетке. Функции в цитозоле. Основная и наиболее изученная функция PTEN – ингибирование активности сигнального пути PI3K/AKT/mTOR. Эта функция обусловлена его способностью дефосфорилировать молекулы липидной природы, в частности PIP3, являющийся одним из ключевых участников данного сигнального каскада. Кратко остановимся на происходящих при этом взаимодействиях.

Активация AKT-сигнального пути начинается с взаимодействия различных лигандов (факторов роста, цитокинов и гормонов) с их рецепторами на поверхности клетки [8, 9]. Среди таких рецепторов обычно выделяют рецепторные тирозинкиназы (RTKs), интегрины и рецепторы, связанные с G-белком [8–10]. Взаимодействие лиганда с RTKs различными путями приводит к активации PI3K (фосфатидилинозитол-3-фосфат-киназа), которые затем катализируют фосфорилирование мембранного PIP2 (фосфатидилинозитол-4,5-дифосфата) с превращением его в PIP3 [8, 10]. PIP3 затем запускает каскад молекулярных взаимодействий, приводящих к двойному фосфорилированию AKT-киназы и её воздействию на множество нижележащих мишеней (например, GSK3 β , FOXO, mTORC1 и др.), ответственных за такие процессы, как пролиферация клеток, их рост, выживаемость, прогрессирование клеточного цикла, метаболизм глюкозы, ингибирование апоптоза и стимуляция ангиогенеза [1, 8, 11, 12]. PTEN же выступает как антагонист PI3K и дефосфорилирует PIP3 обратно в PIP2, тем самым негативно регулируя этот сигнальный путь [8]. Известно, что гиперактивацию AKT-сигнального пути связывают с развитием целого ряда злокачественных опухолей и некоторых предопухолевых состояний [13]. При этом потерю ингибирующего влияния PTEN

относят к числу наиболее известных механизмов, способных приводить к такой гиперактивности. Потеря PTEN в таком случае приводит к накоплению в клетке PIP3 и неконтролируемой активации его нижележащих мишеней, что отражается в прогрессировании опухолей.

Помимо влияния на АКТ-сигнальный путь, обусловленного фосфатазной активностью в отношении липидов, PTEN способен проявлять и другие свои свойства. Так, например, он проявляет фосфатазную активность в отношении белков FAK и SHC, благодаря чему может регулировать сигнальные пути, отвечающие за развитие у клеток способности к миграции [12]. Также имеются сведения о способности PTEN проявлять свои онкосупрессорные свойства с помощью дефосфорилирования белков CREB1 (cAMP responsive element binding protein 1), IRS1 (insulin receptor substrate 1) и др. [14, 15].

Имеются данные и о других неканоничных функциях PTEN. Так, предполагается, что он способен регулировать активность инозитол-трифосфатных рецепторов (IP3Rs) и управлять Ca²⁺-зависимым апоптозом [16]. Такие сведения только подтверждают способность нормально функционирующего белка PTEN негативно влиять на рост опухолей, оказывая влияние на множество отличных друг от друга процессов.

Функции в ядре. В настоящий момент известно, что белок PTEN в значимых количествах выявляется и в ядрах клеток [17]. Предполагается, что белок способен попадать туда из цитозоля с помощью различных механизмов, среди которых – пассивная диффузия, транспорт белками MVP и RAN и механизмы, зависящие от моноубиквитинирования и сумоилирования самого PTEN [18–20]. Известно, что PTEN, находясь в ядре, способен участвовать в таких процессах, как поддержание стабильности центромер, восстановление двуцепочечных разрывов ДНК, ремоделирование хроматина, арест клеточного цикла и некоторых других [1, 2, 12, 17, 21]. Ниже приведём основные сведения о взаимодействиях, лежащих в основе таких функций.

Считается, что в ядре PTEN способен осуществлять ряд белок-белковых взаимодействий. Так, благодаря непосредственному взаимодействию с белком CENP-C (centromere specific binding protein C), он участвует в поддержании стабильности центромерных районов, а разрушение этой связи приводит к преждевременному их разделению. PTEN также способен влиять на стабильность и транскрипционную активность белка p53, как с помощью непосредственного взаимодействия с ним,

так и опосредованно, совместно с белком p300, влияя на его ацетилирование [22, 23]. Взаимодействие PTEN с транскрипционным фактором E2F-1 связывают с усилением транскрипции генов, кодирующих белки семейства Rad51, участвующих в репарации двуцепочечных разрывов ДНК [24]. Известны и другие белок-белковые взаимодействия с участием PTEN. Показано, что ядерный PTEN, образуя комплекс с гистоном H1 и белком гетерохроматина HP1 α , способствует конденсации хроматина и подавлению транскрипции онкогенов. При отсутствии PTEN эти белки не связываются с хроматином, что провоцирует развитие событий, приводящих к деконденсации хроматина и последующей транскрипции таких генов. PTEN способен подавлять транскрипцию онкогенов и другим путём, способствуя образованию комплекса гистона H3.3 с его шапероном DAXX. При отсутствии влияния PTEN наблюдается противоположный эффект [21].

Помимо вышеперечисленного, PTEN в ядре способен принимать участие в регулировании клеточного цикла. Известно, что активность ядерного PTEN способна приводить к дефосфорилированию киназы MAP и последующему подавлению экспрессии циклина D1 [25, 26]. Однако остаётся неясным, связаны ли эти процессы напрямую со способностью PTEN дефосфорилировать белки. PTEN способен негативно влиять на продвижение клеток по клеточному циклу и с помощью непосредственного взаимодействия с комплексом APC/C (anaphase-promoting complex/cyclosome), что приводит к его активации и последующему разрушению различных онкогенных субстратов [27].

Показано, что в ядре клетки может обнаруживаться как классическая форма PTEN, так и альтернативный вариант – PTEN- β . PTEN- β обычно обнаруживают в ядрышках, и его функции, как считается, ограничиваются влиянием на синтез рРНК и сборку рибосом [7].

Имеются сведения о способности PTEN стимулировать протеасомную деградацию белка CHD1 (chromodomain-helicase-DNA-binding protein 1), что предотвращает развитие событий, приводящих к активации онкогенного сигнального пути NF- κ B [28].

В настоящий момент особенности функционирования PTEN в ядре всё ещё продолжают изучаться. Но и на основе уже имеющихся данных можно сделать вывод о наличии существенного вклада PTEN в поддержание стабильности генома и оказании противоопухолевого эффекта на уровне ядра клетки. Описанные выше взаимодействия с участием PTEN представлены на рис. 2.

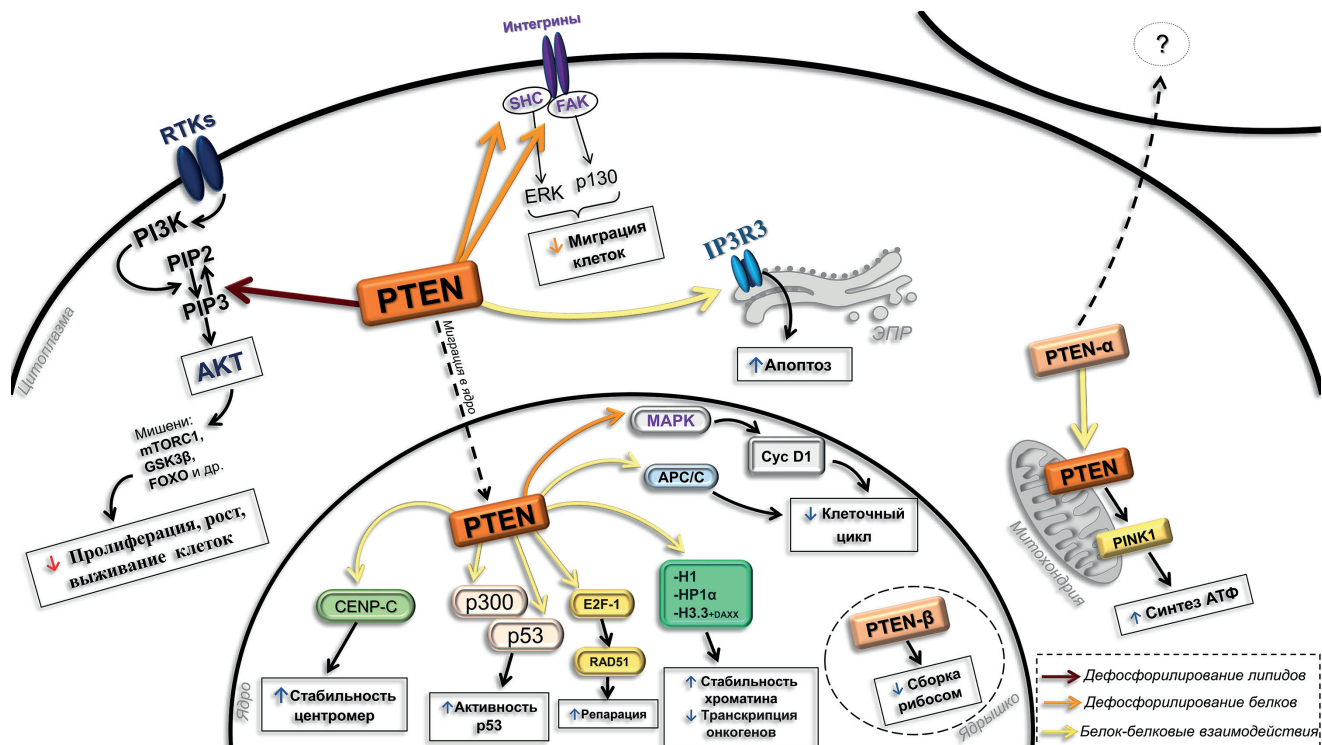


Рис. 2. Распределение функций PTEN в цитоплазме и ядре клетки. Пояснения в тексте

Итак, можно заключить, что функции белка PTEN в живой клетке достаточно разнообразны и не ограничиваются одним лишь негативным регулированием сигнального пути PI3K/AKT. Однако большинство из них так или иначе связаны со способностью PTEN предотвращать развитие процессов, способных привести клетку к злокачественной трансформации. Исходя из этого, важно понимать возможные молекулярные механизмы, способные привести к потере онкосупрессорных функций PTEN, и, как следствие, ускоренному росту и развитию опухолей.

Уровни регулирования PTEN. Известны различные генетические, транскрипционные, посттранскрипционные и посттрансляционные механизмы, которые способны регулировать количество и активность белка PTEN в клетке [2, 9, 29]. Остановимся на них подробнее.

Первый уровень регуляции – генетический. Для PTEN известны различные герминативные и соматические мутации, среди которых отмечают миссенс- и нонсенс-мутации, мутации, приводящие к сдвигу рамки считывания, а также делеции, инсерции и мутации сайтов сплайсинга [2, 9]. Выявлены мутации, при которых белок PTEN становится усечённым, а его функциональная активность – плохо предсказуемой и сравнимой с моноаллельной делецией PTEN [2]. Последняя часто обнаруживается в случаях рака эндометрия,

простаты и глиобластомы [30]. Чаще всего мутациям подвергаются домены DUSP и C2, что отражается в последующем снижении именно фосфатазной активности белка [9, 31]. В настоящий момент выявлены различные генетические варианты PTEN, различающиеся как набором возможных функций белка, так и его способностью подвергаться различным посттрансляционным модификациям [32]. Известно множество точечных мутаций PTEN, ассоциированных с развитием злокачественных опухолей – позиции часто встречающихся обозначены на рис. 1 [19, 33, 34]. Однако известно, что некоторые мутации PTEN сопровождаются как частичным, так и полным сохранением каталитической функции белка [35, 36]. Они могут влиять на другие участки, ответственные, например, за сохранение структуры белка или его локализацию [19, 37]. Это даёт возможность подозревать наличие сопутствующего вклада в развитие опухолей и других возможных механизмов инактивации PTEN.

Следующие возможные механизмы регуляции активности PTEN – транскрипционные и посттранскрипционные (рис. 3). Установлено, что с промотором гена PTEN могут связываться различные транскрипционные факторы, способные усиливать его экспрессию – среди них p53, PPAR γ , EGR1 и ATF2 [38–41]. Считается, что p53 способен усиливать экспрессию PTEN благодаря взаимодействию с его промотором,

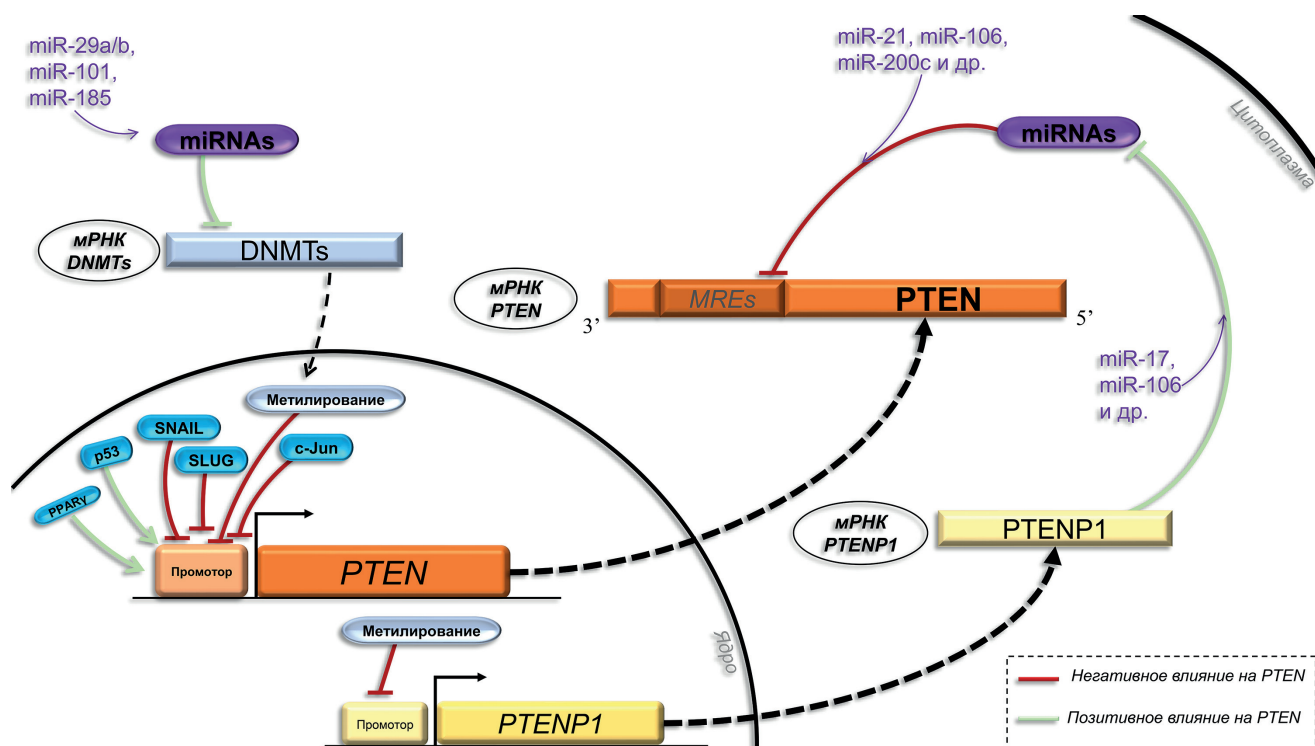


Рис. 3. Транскрипционная и посттранскрипционная регуляция уровня PTEN в клетке. Пояснения в тексте. *PTENP1* (Phosphatase and Tensin Homolog Pseudogene 1) – псевдоген *PTEN*; DNMTs (DNA methyltransferases) – ДНК-метилтрансферазы

в то время как белок PTEN также способен опосредованно усиливать экспрессию гена *p53* через регулирование транскрипции *MDM2* [9, 42]. PTEN и *p53* способны непосредственно взаимодействовать и на уровне белка, осуществляя тем самым взаимные влияния на стабильность и активность друг друга [43, 44].

Промотор гена *PTEN* является потенциальной мишенью для некоторых репрессоров транскрипции, таких как Snail1, SLUG, c-Jun и Bmi-1 [45–48]. Предполагается, что на экспрессию *PTEN* может как позитивно, так и негативно влиять сигнальный путь NOTCH [49, 50]. В ряде опухолей было обнаружено и гиперметилирование промотора *PTEN*, которое часто наблюдалось в подтипах опухолей с низким числом мутаций [9, 51–53]. Наконец, возможен и другой механизм снижения экспрессии *PTEN*, происходящий благодаря взаимодействию с промотором гена транскрипционного фактора *SALL4* и белкового комплекса NuRD, известного своим влиянием на ремоделирование хроматина и деацетилирование гистонов [54].

Другой уровень регуляции PTEN – посттранскрипционный. Такая регуляция осуществляется с помощью различных некодирующих РНК. В настоящий момент хорошо известно, что мРНК *PTEN* является мишенью для целого ряда микроРНК, повышение уровня многих из которых было ассоциировано с

развитием ряда злокачественных новообразований, а также некоторых лимфопролиферативных и аутоиммунных заболеваний [2, 55, 56]. Воздействие микроРНК заключается в их связывании с мРНК *PTEN* в областях, связывающих микроРНК (MREs, miRNA response elements), расположенных на её 3'-нетранслируемой области (3'-UTR), и дальнейшей деградации мРНК [57]. Регулировать уровень PTEN таким образом способны такие микроРНК, как miR-21, miR-106b, miR-19, miR-200c и многие другие [55, 58–60]. Предполагается, что вклад тех или иных микроРНК в канцерогенез может зависеть от конкретного типа опухоли [9]. Влияние микроРНК может осуществляться и опосредованно, например, с помощью влияния на экспрессию генов факторов транскрипции [61]. Воздействие микроРНК может приводить и к повышению уровней PTEN. Так, было показано, что miR-29a, miR-29b, miR-101 и miR-185 способны негативно влиять на уровень ДНК-метилтрансфераз (DNMTs) в клетке, что приводит к снижению метилирования промотора гена *PTEN* и отражается в повышении его экспрессии [62–65].

Регулировать количество PTEN в клетке могут и длинные некодирующие РНК (lncRNA) [56]. Подобное регулирование может быть связано как с активностью нацеливающихся на мРНК *PTEN* микроРНК, так и с метили-

рованием промотора *PTEN*. Из таких LncRNA наиболее известен транскрипт гена *PTENP1*, являющегося высококонсервативным псевдогеном *PTEN*. Благодаря наличию большого числа гомологичных последовательностей он способен связывать различные микроРНК, препятствуя их связыванию с мРНК *PTEN* и последующему её разрушению [66]. Имеются данные о ряде других LncRNA, способных схожим образом предотвращать снижение уровня *PTEN* [55].

Последний уровень регуляции – посттрансляционный. Для белка *PTEN* известен целый ряд возможных посттрансляционных модификаций (рис. 4). Под действием различных факторов возможны его ингибирующее и активирующее фосфорилирование, ацетилирование, убиквитинирование, метилирование, сумоилирование, рибозилирование, окисление и нитрозилирование [67].

Ключевой модификацией считается фосфорилирование белка *PTEN*. С помощью него происходит регулирование конформации, активности, стабильности и внутриклеточной локализации белка [67]. Известен целый ряд возможных сайтов фосфорилирования. Часто оно происходит по различным сериновым и треониновым остаткам, расположенным на карбокси-терминальном хвосте белка, и опосредуется

влиянием киназ *CK2*, *GSK3β* и *ATM* [2, 68–70]. Фосфорилирование белка в этом участке приводит к взаимодействию *CTT* с другими доменами, из-за чего *PTEN* принимает «закрытое» конформационное состояние. В результате *PTEN*, хоть и становится более стабильным из-за меньшей доступности убиквитин-лигаз, снижает свою активность и в меньшей степени локализуется на мембране клетки. Фосфорилирование *CTT* также может приводить к снижению активности белок-белковых взаимодействий, к изменению распределения *PTEN* внутри клетки с тенденцией к накоплению его в ядре, а также к усилению аккумуляции его на хроматине [70–74]. Возможно фосфорилирование и других участков *PTEN*. Для домена *C2* известен ряд возможных сайтов, фосфорилирование которых может приводить как к повышению активности белка, так и к её снижению [67]. Такие данные свидетельствуют о том, что эффект от фосфорилирования *PTEN* может различаться в зависимости от сайта фосфорилирования и типа клеток [2, 67].

Другим способом регуляции *PTEN* является его убиквитинирование на уровне белка, влияющее на его стабильность, каталитическую активность и локализацию в клетке [75]. Убиквитинирование *PTEN* может происходить двумя путями. Показано, что моноубиквити-

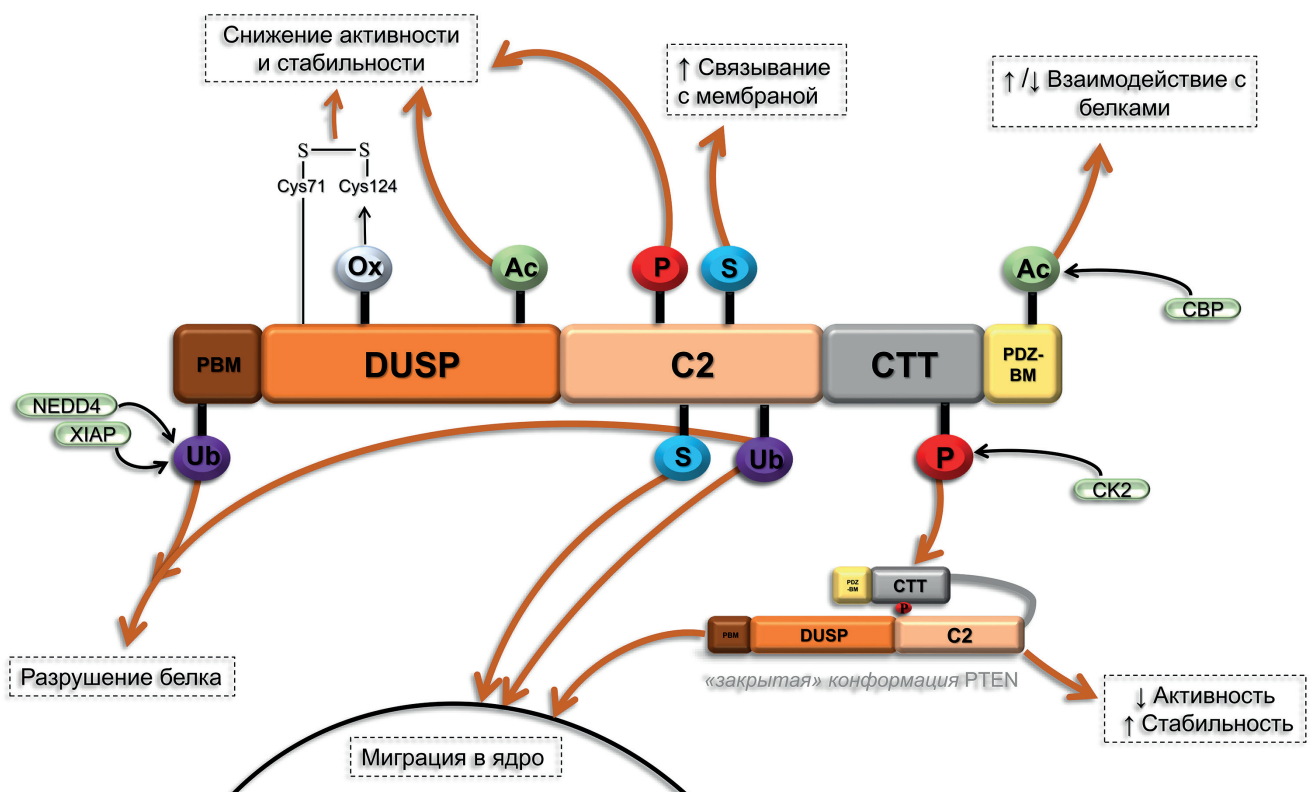


Рис. 4. Посттрансляционные модификации *PTEN* и их эффекты. P – фосфорилирование; Ub – убиквитинирование; S – сумоилирование; Ox – окисление; Ac – ацетилирование

нирование остатков Lys13 и Lys289 влияет на перемещение PTEN в ядро, в то время как полиубиквитинирование приводит к удержанию белка в цитоплазме и дальнейшей его деградации [19]. На эти процессы оказывает влияние E3 убиквитин-лигаза NEDD4-1, а также лигазы XIAP, CHIP и др. [75–78]. Данные процессы могут быть обратимы с помощью различных деубиквитинов [79–81].

PTEN также может подвергаться модификациям с помощью убиквитин-подобного белка SUMO (small ubiquitin-related modifier). В зависимости от участка сумоилирования происходит либо облегченное взаимодействие PTEN с мембраной благодаря электростатическим взаимодействиям, либо перемещение белка в ядро и участие в репарации ДНК [70, 82, 83].

Снижение активности PTEN может происходить из-за обратимого окисления его цистеиновых остатков и последующего образования между ними дисульфидной связи [84]. Предполагается, что окисление может являться физиологическим механизмом регуляции PTEN, управляемым эндогенными активными формами кислорода [85]. Осуществлять защиту от окисления могут Prdx1 (peroxidase peroxiredoxin 1) [86] и AIF (apoptosis-inducing factor) [87].

Ингибирование липидно-фосфатазной активности может происходить из-за ацетилирования участков PTEN, расположенных в каталитическом кармане. Этот процесс управляется ацетилтрансферазой PCAF, влияние которой на ацетилирование PTEN происходит в присутствии факторов роста [88]. Ацетилирование другого участка, расположенного на PDZ-DM, происходит благодаря воздействию белка CBP (p300-CREB-binding protein) и приводит к изменению активности белок-белковых взаимодействий [89, 90]. Ацетилирование PTEN также способно влиять на локализацию белка и смену его конформации [91, 92].

В дополнение к перечисленному, в негативном регулировании PTEN могут принимать участие и другие механизмы – самостоятельно либо с помощью влияния на его убиквитинирование. Среди них выделяют S-нитрозилирование, метилирование и рибозилирование PTEN [67]. Кроме этого, регуляция, как негативная, так и позитивная, может осуществляться с помощью непосредственных взаимодействий PTEN с различными белками [2, 67]. Сведения об основных посттрансляционных модификациях PTEN представлены на рис. 4.

Итак, можно заключить, что возможные механизмы регуляции PTEN достаточно разнообразны, и интенсивность их может часто

различаться в зависимости от типа изучаемых клеток. Ввиду уже известной нам способности PTEN влиять на жизнедеятельность клеток на различных уровнях, важным представляется дальнейшее изучение особенностей регуляции экспрессии и функциональной активности PTEN в различных тканях. Понимание таких особенностей поможет приблизиться к формированию представлений о возможных способах управления активностью PTEN в опухолевых тканях различной локализации.

Предлагается использование PTEN в качестве прогностического или предиктивного биомаркера, однако его значимость для определения прогноза может быть различной и зависеть не только от типа злокачественной опухоли, но и от используемого метода исследования [93]. Такие различия, предположительно, объясняются разнообразием уровней регуляции PTEN, что можно проследить на примере рака эндометрия (РЭ), обсуждаемого в настоящей статье. Так, согласно данным Атласа ракового генома (TCGA), на уровне гена *PTEN* (для пациенток с РЭ с более низкой выживаемостью) достоверно связано наличие вариаций числа копий гена (CNV – Copy Number Variation) отдаленно от его мутаций, изолированный анализ которых, парадоксально, показывает противоположную картину [94]. На уровне мРНК и белка, при рассмотрении данных с порталов cBioPortal и The Human Protein Atlas, прогностическая значимость PTEN становится менее очевидной и больше зависит от конкретного анализа [94, 95]. При этом снижение уровней как мРНК, так и белка PTEN в тканях РЭ в настоящий момент уже показано, и значимость PTEN как биомаркера на этих уровнях продолжает обсуждаться. К примеру, определение количества мРНК *PTEN* уже предлагалось использовать в качестве раннего диагностического маркера РЭ [93, 96]. Сведения об изменении уровня PTEN при онкологических заболеваниях, а также структуру белка PTEN и его возможные белок-белковые взаимодействия можно проанализировать, обратившись к ресурсам, содержащим современные широкомасштабные данные (табл. 1) [94–98].

PTEN И ЭНДОМЕТРИЙ

Среди многих видов злокачественных новообразований рак эндометрия, в особенности его эндометриоидные подтипы, характеризуется достаточно выраженной дисфункцией PTEN. Согласно данным cBioPortal, РЭ характеризуется наивысшей частотой мутаци-

рования *PTEN* по сравнению с остальными типами рака [94]. Кроме этого, в основе дисфункции *PTEN* могут лежать как мутации в его гене, так и снижение уровня белка [99].

Потеря влияния *PTEN* считается ранним событием в развитии рака эндометрия, а определение его уровня в клетках обсуждается в качестве прогностического маркера для более персонализированного подхода к пациентам [100–103]. Однако уровень белка *PTEN* и его активность в эндометрии могут снижаться и в предраковых его состояниях, и, кроме того, несколько изменяться и в нормальной ткани.

Актуальность изучения роли *PTEN* в развитии РЭ и общий интерес исследователей к данной теме находит отражение и в увеличении количества публикаций, размещённых в базах PubMed и Scopus, в течение последнего десятилетия.

Ниже рассмотрим, какие закономерности изменений уровня *PTEN* в разных состояниях эндометрия человека уже изучены.

***PTEN* и нормальный эндометрий.** Показано, что количество *PTEN* в эндометрии может изменяться и при нормальном его состоянии в зависимости от фазы менструального цикла. Так, в нескольких исследованиях было проведено сравнение уровней *PTEN* в образцах тканей нормального эндометрия в различных фазах менструального цикла [104–106]. Результаты показали, что количество белка *PTEN* в клетках эндометрия повышается в секреторную фазу цикла и снижается – в пролиферативную, что могло бы происходить под влиянием физиологических гормональных колебаний [104, 105]. Кроме этого, на культурах клеток нормального эндометрия было показано увеличение количества белка *PTEN* после обработки клеток прогестероном [105, 106]. Высказывается предположение, что колебания как уровня белка *PTEN*, так и его активности могут происходить из-за влияния эстрадиола и прогестерона на процессы его фосфорилирования и дефосфорилирования соответственно. Было показано увеличение количества неактивной фосфорилированной формы *PTEN* при обработке культур клеток эндометрия эстрадиолом [105]. Существуют данные и о циклических колебаниях активности АКТ-сигнального пути, являющегося одной из основных мишеней *PTEN*. Так, увеличение количества *PTEN* после воздействия прогестерона на клетки нормального эндометрия сопровождалось последующим снижением количества фосфорилированной формы АКТ-киназы и, следовательно, активности АКТ-сигнального пути [106]. При воздействии же эстрадиола на клетки нор-

мального эндометрия активность АКТ-сигнального пути, напротив, увеличивалась [107]. Основываясь на таких данных, можно предположить вовлечённость *PTEN* и его воздействие на АКТ-сигнальный путь при регулировании циклических колебаний пролиферативной активности клеток нормального эндометрия.

Было показано, что циклические изменения уровня *PTEN* в эндометрии могут по-разному проявляться в различных типах клеток. Так, в клетках стромы нормального эндометрия уровень белка *PTEN* оказался в целом выше, чем в клетках железистого эпителия [104, 105]. В клетках же железистого эпителия количество *PTEN* выявляется менее постоянным – в соседних клетках уровень белка мог значительно отличаться, что объяснялось, предположительно, высокой частотой соматических мутаций [105]. В свете преимущественного происхождения злокачественных опухолей эндометрия именно из эпителиальных клеток обсуждается значимость подсчёта количества *PTEN*-негативных и *PTEN*-позитивных желёз для дифференцирования нормального эндометрия от его гиперпластических и неопластических состояний [100, 103, 108].

Отмечаются некоторые колебания и в распределении *PTEN* между ядром и цитоплазмой клеток. При иммуногистохимическом исследовании образцов тканей нормального эндометрия было выявлено, что в пролиферативной фазе цикла в клетках стромы ядерный сигнал оказывается гораздо ярче цитоплазматического, но к секреторной фазе количество *PTEN* в цитоплазме этих клеток заметно увеличивается [104, 105]. В клетках же железистого эпителия, несмотря на более слабый сигнал по сравнению с клетками стромы, также отмечается усиление цитоплазматического сигнала от клеток при переходе к секреторной фазе цикла [105]. Итак, отмечаются некоторые циклические изменения уровня *PTEN*, наблюдающиеся в цитоплазме клеток и происходящие независимо от его уровня в ядре. Такие изменения могли бы говорить о сохранении в нормальных клетках относительного постоянства ядерных функций *PTEN* при сохранении его способности изменять свой уровень в цитоплазме, тем самым циклически влияя на пролиферативную активность клеток эндометрия. Также при обработке клеток эндометрия эстрадиолом было выявлено увеличение количества фосфорилированной формы *PTEN* в их ядрах, на основе чего было высказано предположение о том, что эстрадиол может влиять на снижение активности *PTEN* через активацию его фосфорилирования и последующей миграции белка в ядро [105].

Таким образом, можно сделать вывод о существовании некоторых циклических изменений в количестве белка PTEN, его активности и распределении внутри клеток нормального эндометрия, имеющих, по-видимому, гормональную природу. Существуют некоторые свидетельства способности эстрадиола влиять на инактивирующее фосфорилирование PTEN в клетках нормального эндометрия, а также способности прогестерона влиять на увеличение количества белка PTEN в клетке и на его дефосфорилирование. Однако конкретные молекулярные механизмы, с помощью которых могли бы осуществляться такие влияния, требуют дальнейшего изучения.

Существуют данные и о других циклических изменениях в нормальном эндометрии. Установлено, что относительные уровни ряда микроРНК в клетках эндометрия могут изменяться в зависимости от фазы менструального цикла [109–112]. Среди них есть и те микроРНК, которые, согласно данным TargetScan, могут нацеливаться на мРНК *PTEN* [113]. Так, были выявлены достоверные изменения в уровнях таких микроРНК, как miR-29b, miR-29c, miR-30b, miR-30d, miR-345, miR-200c, и более десяти других. Однако уровни большинства из них повышались в секреторной фазе цикла, когда уровень PTEN в клетках эндометрия не снижается, а, напротив, становится максимальным. Исходя из этого, на данный момент не удаётся сделать какие-либо убедительные выводы о наличии влияния микроРНК на циклические изменения уровня PTEN в нормальном эндометрии. Можно предположить, что, вероятно, некоторые из этих микроРНК всё же могут опосредованно влиять на повышение уровня PTEN. Так, для обсуждавшейся выше miR-29b, в клетках печени уже была показана способность приводить к повышению уровня PTEN в клетке, негативно влияя на метилирование промотора его гена [62]. Стоит отметить, что при исследовании нормального эндометрия в клетках стромы и люминального эпителия обнаруживалось повышение экспрессии псевдогена *PTENP1* в секреторной фазе цикла [114]. Ингибирующее влияние его транскрипта на связывание различных микроРНК с мРНК *PTEN* могло бы влиять на повышение уровня PTEN в секреторной фазе цикла, однако для полного понимания требуется больше сведений о конкретных микроРНК, которые могли бы быть вовлечены в такой механизм. Таким образом, вопрос посттранскрипционных влияний на изменения уровня PTEN в нормальном эндометрии остаётся изученным не до конца.

Итак, можно заключить, что в настоящий момент наиболее изученной причиной циклических изменений уровня PTEN в тканях нормального эндометрия являются влияния эстрадиола и прогестерона. Механизмы таких воздействий остаются не ясными, однако можно предполагать как изменение экспрессии гена *PTEN*, так и фосфорилирование белка PTEN с изменением его активности и локализации в клетке. В данный момент не представляется возможным однозначно судить, существует ли вклад других механизмов регуляции уровня PTEN, хотя этому и можно найти некоторые косвенные свидетельства. Например, существуют сведения о повышении в клетках эндометрия в пролиферативной фазе уровня фактора транскрипции c-Jun [115]. Как было замечено выше, считается, что он способен выступать в качестве репрессора транскрипции гена *PTEN*, и такое влияние на транскрипцию могло бы согласовываться со снижением уровня PTEN в пролиферативной фазе. Также имеются некоторые сведения и о вкладе в циклические изменения эндометрия сигнального пути NOTCH, способного влиять и на PTEN [116]. Однако для более четкого понимания всех механизмов и определения вклада каждого из них требуется больше данных.

PTEN и гиперплазия эндометрия. В настоящее время считается, что количество PTEN в клетках эндометрия снижается не только в случае злокачественной их трансформации, но также и при предраковых состояниях, таких как гиперплазия эндометрия. Установлено, что в случае гиперплазии эндометрия уровень PTEN значимо снижается по сравнению с нормальной тканью [101, 117, 118]. Обнаружены существенные различия между доброкачественной гиперплазией (ВН) и атипической гиперплазией (АН/ЕIN), при которой уровень PTEN в клетках может иметь мало отличий от его уровня в клетках рака эндометрия [117, 118]. При этом известно, что именно в случае атипической гиперплазии потеря PTEN ассоциирована с риском развития рака эндометрия, превышающим 50% [119]. Такие факты позволяют многим исследователям рассматривать потерю PTEN клетками эндометрия как одно из ранних событий в канцерогенезе [100]. Обсуждается возможность использования методик, позволяющих определить уровень PTEN в клетках эндометрия, для различия этих двух состояний и определения прогноза [119, 120].

Одной из возможных причин потери PTEN в случае гиперплазии эндометрия считается возникновение мутаций в его гене. При анализе мутаций в образцах с гиперплазией эндометрия

было выявлено, что ген *PTEN* поражается наиболее часто, хотя общая частота мутаций в случае гиперплазии обнаруживается меньшей, чем в случае рака эндометрия [121–123]. При сравнении же частоты мутаций между доброкачественной и атипической гиперплазией эндометрия выявляются выраженные отличия с более высокой частотой в случаях с атипией [122, 123]. Наиболее часто поражается участок R130, необходимый для каталитической активности белка [121]. Однако следует отметить, что мутации *PTEN* могут выявляться и в гистологическом нормальном эндометрии [124].

Существуют сведения об изменениях уровней некоторых микроРНК, способных нацеливаться на мРНК *PTEN*, в образцах гиперплазии эндометрия. Такие различия обнаруживаются как при сравнении образцов гиперплазии с нормой, так и при сравнении образцов доброкачественной и атипической гиперплазии между собой. Имеющиеся литературные данные об

изменениях уровней таких микроРНК в разных состояниях эндометрия представлены в табл. 2.

Стоит заметить, что уровни некоторых микроРНК в образцах гиперплазии эндометрия оказывались промежуточными между такими уровнями в образцах нормального эндометрия и образцах эндометриоидной аденокарциномы, а повышение уровней miR-205, miR-200b и miR-200a можно проследить на протяжении всего ряда представленных состояний, от нормального эндометрия и доброкачественной гиперплазии к атипической гиперплазии и раку эндометрия (табл. 2) [125–127]. Такие данные позволяют задуматься о наличии закономерности между постепенным ростом уровней таких микроРНК и прогрессированием гиперпластических изменений в клетках эндометрия с развитием в них злокачественных процессов. Однако как точные мишени таких микроРНК, так и механизмы, реализуемые с их помощью в клетках эндометрия, требуют дальнейшего изучения.

Таблица 2. Изменения уровней микроРНК, нацеливающихся на мРНК *PTEN*, в разных состояниях эндометрия

miRNA	Повышение уровня в АН/EIN		Повышение уровня в РЭ		Ссылки
	сравнение с NE	сравнение с ВН	сравнение с NE	сравнение с АН/EIN	
miR-141	+		+	+	[113, 125]
miR-18a	–		+	+	[113, 125]
miR-200a	+	+	+	+	[113, 125, 127]
miR-200b	+	+	+	+	[113, 125, 127]
miR-200c	–		+	+	[113, 125]
miR-205	+	+	+	+	[113, 125, 127]
miR-421	–		+	+	[113, 125]
miR-429	+		+	+	[113, 125]
miR-605	–		+	+	[113, 125]
miR-9	+		+	+	[113, 125]
miR-936	+		+	–	[113, 125]
miR-96	–		+	+	[96, 113, 125]
miR-577		+	+		[96, 113, 126]
miR-182		+	+		[96, 113, 126]
miR-183		+	+		[96, 113, 127]
miR-194		+	+		[96, 113, 127]

Примечание. Знаком «+» обозначено повышение уровня микроРНК, «–» – снижение, пустой ячейкой – отсутствие данных. NE – нормальный эндометрий; ВН – гиперплазия без атипии; АН/EIN – атипическая гиперплазия; РЭ – рак эндометрия.

Обнаружены и другие изменения, происходящие при развитии в эндометрии гиперпластических процессов. Так, существуют сведения об изменении уровня метилирования псевдогена *PTENP1* в разных состояниях эндометрия. Было показано, что уровень его метилирования в тканях с доброкачественной и атипической гиперплазией эндометрия по сравнению с нормальной тканью значительно повышается и сохраняется таким же высоким в тканях рака эндометрия [128, 129]. Снижение экспрессии этого псевдогена могло бы, усиливая воздействие различных микроРНК, вносить вклад в потерю *PTEN* при развитии гиперплазии эндометрия. Однако высказываются предположения о том, что изменения в метилировании *PTENP1* могут отражать возрастные изменения и быть не связаны напрямую с развитием патологических изменений эндометрия [130].

В литературе имеются сведения и о других изменениях, способных оказывать влияние на потерю *PTEN* при гиперплазии эндометрия. Например, при сравнении образцов нормального эндометрия с образцами гиперплазии без атипии было выявлено увеличение количества белковой формы фактора транскрипции Slug, способного выступать в качестве репрессора транскрипции для *PTEN* [131]. Существуют данные и о фосфорилировании белка *PTEN* в случае гиперплазии эндометрия. Предположительно, в тканях с гиперплазией и раком эндометрия *PTEN* может быть инактивирован с помощью фосфорилирования по Ser380 [132]. Однако, ввиду отсутствия достаточного количества данных, не представляется возможным сделать однозначные выводы о наличии или отсутствии вклада каких-либо других известных механизмов регуляции в потерю *PTEN* при гиперплазии эндометрия.

PTEN и рак эндометрия. Наиболее заметной потерей влияния *PTEN* становится, конечно, при злокачественной трансформации клеток эндометрия. Обнаруживается статистически значимая связь между потерей *PTEN* и риском развития рака эндометрия у пациенток с имеющейся гиперплазией [133]. Однако выраженность такой потери *PTEN* может отличаться в разных группах опухолей. Для лучшего понимания кратко остановимся на известных классификациях РЭ.

В классической классификации выделяется 2 группы опухолей в зависимости от их клинико-патологических, молекулярных и иных характеристик. При этом в первой группе, включающей преимущественно эндометриоидные, ассоциированные с ожирением и гиперэстро-

генемией опухоли, ген *PTEN* оказывается мутирован наиболее часто — в 52–78% случаев. Во второй же группе (не эндометриоидные опухоли, преимущественно серозные, не ассоциированные с эстрогенами и ожирением) мутации *PTEN* встречаются гораздо реже — в 1–11% случаев [134].

Существует и другая, более современная классификация, предложенная TCGA [135]. В ней опухоли эндометрия предложено делить на 4 кластера, различающихся между собой по гистологическому строению и частоте мутаций. При этом в трёх из четырёх кластеров (группы гистологически эндометриоидных опухолей: POLE-ultramutated, MSI-hypermuted, Copy-number low) инактивирующие мутации в *PTEN* достаточно распространены — частота их для этих групп составляет 94%, 88% и 77% соответственно [134, 135]. 22% всех мутаций *PTEN* выявлялись в R130, что в опухолях эндометрия встречается в несколько раз чаще, чем в других опухолях с высокой частотой мутаций этого гена, таких как, например, глиобластома. Стоит заметить, что в случае РЭ мутациями поражается гораздо больше участков гена *PTEN*, чем в случае гиперплазии эндометрия [121]. В трёх вышеназванных группах, выделенных TCGA, также снижалось количество мРНК *PTEN* и повышалась активность АКТ-сигнального пути. В четвёртой же группе опухолей (copy-number high), с низкой частотой мутаций *PTEN*, активность этого сигнального пути, напротив, уменьшалась [135]. Важно заметить, что не все случаи потери *PTEN* в случае РЭ согласуются с возникновением мутаций в его гене — при иммуногистохимическом исследовании выявляются случаи потери *PTEN*, не объясняющиеся при проведении анализа последовательностей [136]. Такие сведения дают возможность предполагать влияние на потерю *PTEN* в случае РЭ и других механизмов.

Согласно данным TCGA, уровень метилирования промотора гена *PTEN* в случае эндометриоидной карциномы тела матки не отличается от такого уровня в нормальной ткани [96]. Однако в некоторых исследованиях все же обнаруживалось повышение метилирования промотора *PTEN* [137]. Высказываются предположения о том, что такое повышение может объясняться ложноположительными результатами из-за использования методов, не позволяющих отличить *PTEN* от его псевдогена *PTENP1* [138]. Для *PTENP1*, в свою очередь, характерно повышение метилирования промотора в случае гиперплазии и рака эндометрия [128].

Имеются сведения о влиянии на развитие РЭ упомянутого ранее транскрипционно-

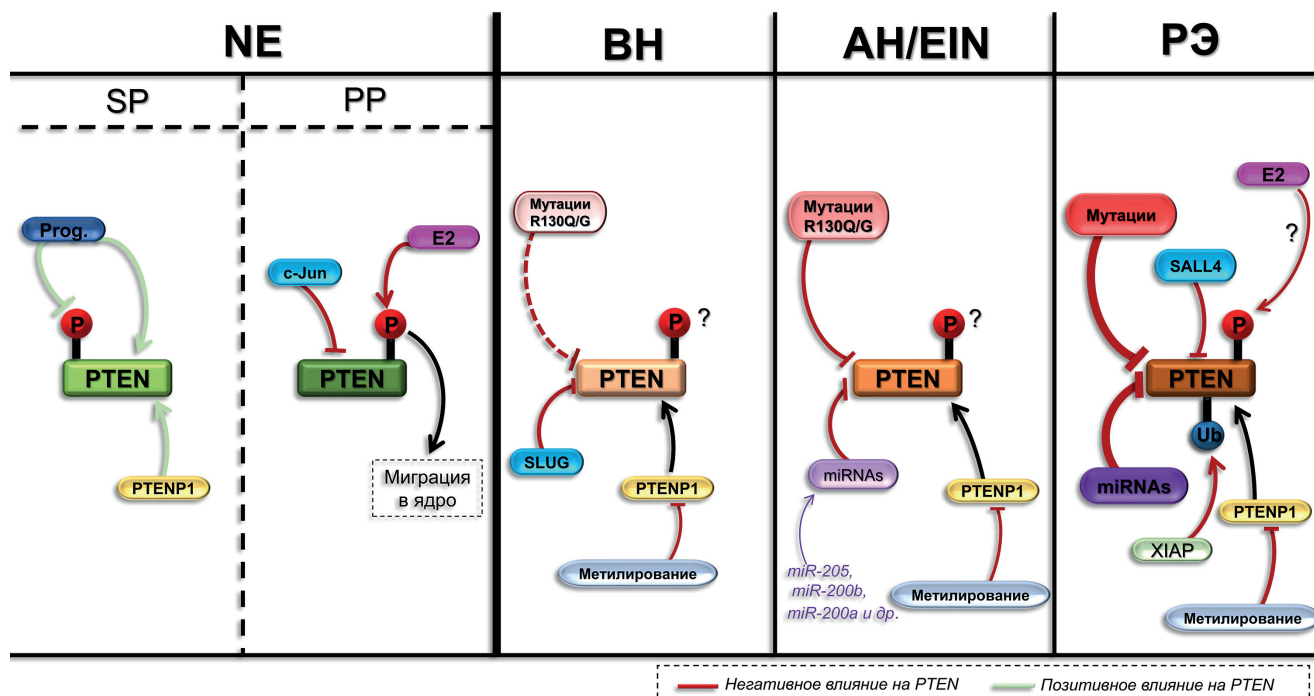


Рис. 5. Имеющиеся сведения о регуляции уровня *PTEN* в эндометрии. Усиление влияния соответствующих механизмов обозначено увеличением толщины указателей – как частота мутаций *PTEN*, так и относительные уровни некоторых онкогенных микроРНК в случае гиперплазии эндометрия оказываются промежуточными между нормальным эндометрием и РЭ (пояснения в тексте). NE – нормальный эндометрий; SP – секреторная фаза; PP – пролиферативная фаза; BH – гиперплазия без атипии; AH/EIN – атипичическая гиперплазия; РЭ – рак эндометрия

го фактора *SALL4*, способного снижать экспрессию *PTEN*. Увеличение количества белка *SALL4* при иммуногистохимическом исследовании было характерно только для образцов рака эндометрия, чего не было обнаружено в образцах нормального и гиперпластически измененного эндометрия. Кроме этого, наличие в образце РЭ патологической экспрессии гена *SALL4* коррелировало с более агрессивными свойствами опухоли, худшим прогнозом, более высоким риском метастазирования и развития лекарственной устойчивости [139].

При сравнении образцов нормального эндометрия и РЭ выявляется изменение уровней множества различных микроРНК, в том числе тех, которые способны нацеливаться на мРНК *PTEN* (табл. 2). По данным TCGA, из 10 микроРНК с наиболее выраженным повышением уровня в образцах РЭ, 8 потенциально способны нацеливаться на мРНК *PTEN*, согласно TargetScan, например, miR-205, miR-182 и др. [96, 113]. Некоторые из таких микроРНК предлагается использовать в качестве диагностических и прогностических маркеров [140]. Выявляется большое количество микроРНК, уровни которых в случае РЭ как достоверно повышаются, так и достоверно снижаются [109, 125, 141]. Однако все молекулярные механизмы, на которые они способны оказывать влияние в таких клетках, а также их значение

для развития и прогрессирования РЭ, требуют дальнейшего изучения.

Существуют некоторые данные и о посттрансляционных воздействиях на *PTEN*. Было показано, что при обработке культур клеток РЭ эстрадиолом количество фосфорилированной формы белка *PTEN* в них возрастает, при этом предполагается, что в данном процессе может принимать участие протеинкиназа *CK2α* [142]. Предполагается и влияние инактивирующего фосфорилирования по Ser380 [132]. Однако, по данным СРТАС, при сравнении с нормой образцов эндометриоидной аденокарциномы не наблюдается увеличения количества фосфорилированной формы белка *PTEN* [143]. Таким образом, сведения о фосфорилировании *PTEN* при РЭ остаются противоречивыми и не дают возможности судить однозначно, насколько существенен вклад фосфорилирования в потерю *PTEN* при прогрессировании злокачественных процессов в клетках эндометрия.

Предполагается и вклад убиквитинирования в потерю функционирующего белка *PTEN* клетками рака эндометрия. На клеточных линиях РЭ было показано опосредованное воздействием TGF- β влияние белка XIAP на полиубиквитинирование белка *PTEN* и снижение его уровня в клетке [144]. Также была показана роль мутантной формы белка p85 α в потере *PTEN* клетками РЭ. Предполагается, что

укороченный мутантный вариант E160* препятствует связыванию обычной формы этого белка (WT p85 α) с PTEN, тем самым делая его более доступным для убиквитинирования [145].

Таким образом, в настоящее время известны различные механизмы, вносящие вклад в потерю влияния PTEN клетками эндометрия в процессе развития РЭ (рис. 5). Вклад мутаций PTEN представляется достаточно значимым, однако, исходя из имеющихся данных, такое влияние нельзя назвать единственным. Известны воздействия, происходящие на всех известных уровнях регуляции – как генетических, так и транскрипционных, посттранскрипционных и посттрансляционных. Некоторые из таких влияний уже наблюдаются в случае гиперплазии и, по-видимому, усиливаются при развитии РЭ, например, возникновение мутаций или влияние микроРНК.

Другие же, в свою очередь, могут впервые обнаруживаться только в случае РЭ. В таком свете можно рассматривать потерю влияния PTEN клетками рака эндометрия как процесс, происходящий постадийно, усиливающийся при добавлении новых воздействий и приводящий к потере функций PTEN на различных уровнях.

Вклад авторов. А.М. Перевалова, В.С. Кобелев, В.Г. Сисакян – поиск и анализ литературы; А.М. Перевалова – написание текста; Л.Ф. Гуляева, В.О. Пустыльняк – редактирование текста статьи.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

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

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Chen, C. Y., Chen, J., He, L., and Stiles, B. L. (2018) PTEN: tumor suppressor and metabolic regulator, *Front. Endocrinol. (Lausanne)*, **9**, 338, doi: 10.3389/fendo.2018.00338.
- Lee, Y. R., Chen, M., and Pandolfi, P. P. (2018) The functions and regulation of the PTEN tumour suppressor: new modes and prospects, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, **19**, 547-562, doi: 10.1038/s41580-018-0015-0.
- Masson, G. R., and Williams, R. L. (2020) Structural Mechanisms of PTEN Regulation, *Cold Spring Harb. Perspect. Med.*, **10**, doi: 10.1101/cshperspect.a036152.
- Tu, T., Chen, J., Chen, L., and Stiles, B. L. (2020) Dual-specific protein and lipid phosphatase PTEN and its biological functions, *Cold Spring Harb. Perspect. Med.*, **10**, a036301, doi: 10.1101/cshperspect.a036301.
- Taylor, J., and Abdel-Wahab, O. (2019) PTEN isoforms with dual and opposing function, *Nat. Cell Biol.*, **21**, 1306-1308, doi: 10.1038/s41556-019-0405-3.
- Liang, H., He, S., Yang, J., Jia, X., Wang, P., et al. (2014) PTENalpha, a PTEN isoform translated through alternative initiation, regulates mitochondrial function and energy metabolism, *Cell Metab.*, **19**, 836-848, doi: 10.1016/j.cmet.2014.03.023.
- Liang, H., Chen, X., Yin, Q., Ruan, D., Zhao, X., et al. (2017) PTENbeta is an alternatively translated isoform of PTEN that regulates rDNA transcription, *Nat. Commun.*, **8**, 14771, doi: 10.1038/ncomms14771.
- Shi, X., Wang, J., Lei, Y., Cong, C., Tan, D., and Zhou, X. (2019) Research progress on the PI3K/AKT signaling pathway in gynecological cancer (Review), *Mol. Med. Rep.*, **19**, 4529-4535, doi: 10.3892/mmr.2019.10121.
- Alvarez-Garcia, V., Tawil, Y., Wise, H. M., and Leslie, N. R. (2019) Mechanisms of PTEN loss in cancer: it's all about diversity, *Semin. Cancer Biol.*, **59**, 66-79, doi: 10.1016/j.semcancer.2019.02.001.
- Xie, Y., Shi, X., Sheng, K., Han, G., Li, W., et al. (2019) PI3K/Akt signaling transduction pathway, erythropoiesis and glycolysis in hypoxia (Review), *Mol. Med. Rep.*, **19**, 783-791, doi: 10.3892/mmr.2018.9713.
- Bell, D. W., and Ellenson, L. H. (2019) Molecular genetics of endometrial carcinoma, *Annu. Rev. Pathol.*, **14**, 339-367, doi: 10.1146/annurev-pathol-020117-043609.
- Milella, M., Falcone, I., Conciatori, F., Cesta Incani, U., Del Curatolo, A., et al. (2015) PTEN: multiple functions in human malignant tumors, *Front. Oncol.*, **5**, 24, doi: 10.3389/fonc.2015.00024.
- Noorolyai, S., Shajari, N., Baghbani, E., Sadreddini, S., and Baradaran, B. (2019) The relation between PI3K/AKT signalling pathway and cancer, *Gene*, **698**, 120-128, doi: 10.1016/j.gene.2019.02.076.
- Gu, T., Zhang, Z., Wang, J., Guo, J., Shen, W. H., and Yin, Y. (2011) CREB is a novel nuclear target of PTEN phosphatase, *Cancer Res.*, **71**, 2821-2825, doi: 10.1158/0008-5472.CAN-10-3399.
- Shi, Y., Wang, J., Chandarlapaty, S., Cross, J., Thompson, C., et al. (2014) PTEN is a protein tyrosine phosphatase for IRS1, *Nat. Struct. Mol. Biol.*, **21**, 522-527, doi: 10.1038/nsmb.2828.
- Kuchay, S., Giorgi, C., Simoneschi, D., Pagan, J., Missirollo, S., et al. (2017) PTEN counteracts FBXL2 to promote IP3R3- and Ca²⁺-mediated apoptosis limiting tumour growth, *Nature*, **546**, 554-558, doi: 10.1038/nature22965.
- Planchon, S. M., Waite, K. A., and Eng, C. (2008) The nuclear affairs of PTEN, *J. Cell Sci.*, **121**, 249-253, doi: 10.1242/jcs.022459.

18. Chung, J. H., Ginn-Pease, M. E., and Eng, C. (2005) Phosphatase and tensin homologue deleted on chromosome 10 (PTEN) has nuclear localization signal-like sequences for nuclear import mediated by major vault protein, *Cancer Res.*, **65**, 4108-4116, doi: 10.1158/0008-5472.CAN-05-0124.
19. Trotman, L. C., Wang, X., Alimonti, A., Chen, Z., Teruya-Feldstein, J., et al. (2007) Ubiquitination regulates PTEN nuclear import and tumor suppression, *Cell*, **128**, 141-156, doi: 10.1016/j.cell.2006.11.040.
20. Song, M. S., Salmena, L., and Pandolfi, P. P. (2012) The functions and regulation of the PTEN tumour suppressor, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, **13**, 283-296, doi: 10.1038/nrm3330.
21. Yang, J., and Yin, Y. (2020) PTEN in chromatin remodeling, *Cold Spring Harb. Perspect. Med.*, **10**, a036160, doi: 10.1101/cshperspect.a036160.
22. Li, A. G., Piluso, L. G., Cai, X., Wei, G., Sellers, W. R., et al. (2006) Mechanistic insights into maintenance of high p53 acetylation by PTEN, *Mol. Cell*, **23**, 575-587, doi: 10.1016/j.molcel.2006.06.028.
23. Freeman, D. J., Li, A. G., Wei, G., Li, H. H., Kertesz, N., et al. (2003) PTEN tumor suppressor regulates p53 protein levels and activity through phosphatase-dependent and -independent mechanisms, *Cancer Cell*, **3**, 117-130, doi: 10.1016/s1535-6108(03)00021-7.
24. Shen, W. H., Balajee, A. S., Wang, J., Wu, H., Eng, C., et al. (2007) Essential role for nuclear PTEN in maintaining chromosomal integrity, *Cell*, **128**, 157-170, doi: 10.1016/j.cell.2006.11.042.
25. Chung, J. H., Ostrowski, M. C., Romigh, T., Minaguchi, T., Waite, K. A., et al. (2006) The ERK1/2 pathway modulates nuclear PTEN-mediated cell cycle arrest by cyclin D1 transcriptional regulation, *Hum. Mol. Genet.*, **15**, 2553-2559, doi: 10.1093/hmg/ddl177.
26. Chung, J. H., and Eng, C. (2005) Nuclear-cytoplasmic partitioning of phosphatase and tensin homologue deleted on chromosome 10 (PTEN) differentially regulates the cell cycle and apoptosis, *Cancer Res.*, **65**, 8096-8100, doi: 10.1158/0008-5472.CAN-05-1888.
27. Song, M. S., Carracedo, A., Salmena, L., Song, S. J., Egia, A., et al. (2011) Nuclear PTEN regulates the APC-CDH1 tumor-suppressive complex in a phosphatase-independent manner, *Cell*, **144**, 187-199, doi: 10.1016/j.cell.2010.12.020.
28. Zhao, D., Lu, X., Wang, G., Lan, Z., Liao, W., et al. (2017) Synthetic essentiality of chromatin remodelling factor CHD1 in PTEN-deficient cancer, *Nature*, **542**, 484-488, doi: 10.1038/nature21357.
29. Bermudez Brito, M., Goulielmaki, E., and Papanikolaou, E. A. (2015) Focus on PTEN regulation, *Front. Oncol.*, **5**, 166, doi: 10.3389/fonc.2015.00166.
30. Salmena, L., Carracedo, A., and Pandolfi, P. P. (2008) Tenets of PTEN tumor suppression, *Cell*, **133**, 403-414, doi: 10.1016/j.cell.2008.04.013.
31. Mighell, T. L., Evans-Dutson, S., and O'Roak, B. J. (2018) A saturation mutagenesis approach to understanding PTEN lipid phosphatase activity and genotype-phenotype relationships, *Am. J. Hum. Genet.*, **102**, 943-955, doi: 10.1016/j.ajhg.2018.03.018.
32. Hasle, N., Matreyek, K. A., and Fowler, D. M. (2019) The impact of genetic variants on PTEN molecular functions and cellular phenotypes, *Cold Spring Harb. Perspect. Med.*, **9**, doi: 10.1101/cshperspect.a036228.
33. Nussinov, R., Zhang, M., Tsai, C. J., and Jang, H. (2021) Phosphorylation and driver mutations in PI3Kalpha and PTEN autoinhibition, *Mol. Cancer Res.*, **19**, 543-548, doi: 10.1158/1541-7786.MCR-20-0818.
34. Tate, J. G., Bamford, S., Jubb, H. C., Sondka, Z., Beare, D. M., et al. (2019) COSMIC: the catalogue of somatic mutations in cancer, *Nucleic Acids Res.*, **47**, D941-D947, doi: 10.1093/nar/gky1015.
35. Han, S. Y., Kato, H., Kato, S., Suzuki, T., Shibata, H., et al. (2000) Functional evaluation of PTEN missense mutations using in vitro phosphoinositide phosphatase assay, *Cancer Res.*, **60**, 3147-3151.
36. Leslie, N. R., and Longy, M. (2016) Inherited PTEN mutations and the prediction of phenotype, *Semin. Cell Dev. Biol.*, **52**, 30-38, doi: 10.1016/j.semcdb.2016.01.030.
37. Sun, Z., Huang, C., He, J., Lamb, K. L., Kang, X., et al. (2014) PTEN C-terminal deletion causes genomic instability and tumor development, *Cell Rep.*, **6**, 844-854, doi: 10.1016/j.celrep.2014.01.030.
38. Stambolic, V., MacPherson, D., Sas, D., Lin, Y., Snow, B., et al. (2001) Regulation of PTEN transcription by p53, *Mol. Cell*, **8**, 317-325, doi: 10.1016/s1097-2765(01)00323-9.
39. Patel, L., Pass, I., Coxon, P., Downes, C. P., Smith, S. A., and Macpherson, C. H. (2001) Tumor suppressor and anti-inflammatory actions of PPARgamma agonists are mediated via upregulation of PTEN, *Curr. Biol.*, **11**, 764-768, doi: 10.1016/s0960-9822(01)00225-1.
40. Virolle, T., Adamson, E. D., Baron, V., Birle, D., Mercola, D., et al. (2001) The Egr-1 transcription factor directly activates PTEN during irradiation-induced signalling, *Nat. Cell. Biol.*, **3**, 1124-1128, doi: 10.1038/ncb1201-1124.
41. Shen, Y. H., Zhang, L., Gan, Y., Wang, X., Wang, J., et al. (2006) Up-regulation of PTEN (phosphatase and tensin homolog deleted on chromosome ten) mediates p38 MAPK stress signal-induced inhibition of insulin signaling. A cross-talk between stress signaling and insulin signaling in resistin-treated human endothelial cells, *J. Biol. Chem.*, **281**, 7727-7736, doi: 10.1074/jbc.M511105200.
42. Nakanishi, A., Kitagishi, Y., Ogura, Y., and Matsuda, S. (2014) The tumor suppressor PTEN interacts with p53 in hereditary cancer (Review), *Int. J. Oncol.*, **44**, 1813-1819, doi: 10.3892/ijo.2014.2377.
43. Tang, Y., and Eng, C. (2006) p53 down-regulates phosphatase and tensin homologue deleted on chromosome 10 protein stability partially through caspase-mediated degradation in cells with

- proteasome dysfunction, *Cancer Res.*, **66**, 6139-6148, doi: 10.1158/0008-5472.CAN-06-0772.
44. Tang, Y., and Eng, C. (2006) PTEN autoregulates its expression by stabilization of p53 in a phosphatase-independent manner, *Cancer Res.*, **66**, 736-742, doi: 10.1158/0008-5472.CAN-05-1557.
 45. Escriva, M., Peiro, S., Herranz, N., Villagrasa, P., Dave, N., et al. (2008) Repression of PTEN phosphatase by Snail1 transcriptional factor during gamma radiation-induced apoptosis, *Mol. Cell Biol.*, **28**, 1528-1540, doi: 10.1128/MCB.02061-07.
 46. Uygur, B., Abramo, K., Leikina, E., Vary, C., Liaw, L., et al. (2015) SLUG is a direct transcriptional repressor of PTEN tumor suppressor, *Prostate*, **75**, 907-916, doi: 10.1002/pros.22974.
 47. Hettinger, K., Vikhanskaya, F., Poh, M. K., Lee, M. K., de Belle, I., et al. (2007) c-Jun promotes cellular survival by suppression of PTEN, *Cell Death Differ.*, **14**, 218-229, doi: 10.1038/sj.cdd.4401946.
 48. Song, L. B., Li, J., Liao, W. T., Feng, Y., Yu, C. P., et al. (2009) The polycomb group protein Bmi-1 represses the tumor suppressor PTEN and induces epithelial-mesenchymal transition in human nasopharyngeal epithelial cells, *J. Clin. Invest.*, **119**, 3626-3636, doi: 10.1172/JCI39374.
 49. Palomero, T., Sulis, M. L., Cortina, M., Real, P. J., Barnes, K., et al. (2007) Mutational loss of PTEN induces resistance to NOTCH1 inhibition in T-cell leukemia, *Nat. Med.*, **13**, 1203-1210, doi: 10.1038/nm1636.
 50. Whelan, J. T., Forbes, S. L., and Bertrand, F. E. (2007) CBF-1 (RBP-J kappa) binds to the PTEN promoter and regulates PTEN gene expression, *Cell Cycle*, **6**, 80-84, doi: 10.4161/cc.6.1.3648.
 51. Kang, Y. H., Lee, H. S., and Kim, W. H. (2002) Promoter methylation and silencing of PTEN in gastric carcinoma, *Lab. Invest.*, **82**, 285-291, doi: 10.1038/labinvest.3780422.
 52. Goel, A., Arnold, C. N., Niedzwiecki, D., Carethers, J. M., Dowell, J. M., et al. (2004) Frequent inactivation of PTEN by promoter hypermethylation in microsatellite instability-high sporadic colorectal cancers, *Cancer Res.*, **64**, 3014-3021, doi: 10.1158/0008-5472.can-2401-2.
 53. Luo, S., Chen, J., and Mo, X. (2016) The association of PTEN hypermethylation and breast cancer: a meta-analysis, *Onco Targets Ther.*, **9**, 5643-5650, doi: 10.2147/OTT.S111684.
 54. Lu, J., Jeong, H. W., Kong, N., Yang, Y., Carroll, J., et al. (2009) Stem cell factor SALL4 represses the transcriptions of PTEN and SALL1 through an epigenetic repressor complex, *PLoS One*, **4**, e5577, doi: 10.1371/journal.pone.0005577.
 55. Sellars, E., Gabra, M., and Salmena, L. (2020) The complex landscape of PTEN mRNA regulation, *Cold Spring Harb. Perspect. Med.*, **10**, a036236, doi: 10.1101/cshperspect.a036236.
 56. Li, W., Zhang, T., Guo, L., and Huang, L. (2018) Regulation of PTEN expression by noncoding RNAs, *J. Exp. Clin. Cancer Res.*, **37**, 223, doi: 10.1186/s13046-018-0898-9.
 57. Bartel, D. P. (2009) MicroRNAs: target recognition and regulatory functions, *Cell*, **136**, 215-233, doi: 10.1016/j.cell.2009.01.002.
 58. Poliseno, L., Salmena, L., Riccardi, L., Fornari, A., Song, M. S., et al. (2010) Identification of the miR-106b~25 microRNA cluster as a proto-oncogenic PTEN-targeting intron that cooperates with its host gene MCM7 in transformation, *Sci. Signal.*, **3**, ra29, doi: 10.1126/scisignal.2000594.
 59. Mu, P., Han, Y. C., Betel, D., Yao, E., Squatrito, M., et al. (2009) Genetic dissection of the miR-17~92 cluster of microRNAs in Myc-induced B-cell lymphomas, *Genes Dev.*, **23**, 2806-2811, doi: 10.1101/gad.1872909.
 60. Chen, P., Guo, X., Zhang, L., Zhang, W., Zhou, Q., et al. (2017) MiR-200c is a cMyc-activated miRNA that promotes nasopharyngeal carcinoma by downregulating PTEN, *Oncotarget*, **8**, 5206-5218, doi: 10.18632/oncotarget.14123.
 61. Hill, M., and Tran, N. (2021) miRNA interplay: mechanisms and consequences in cancer, *Dis. Model Mech.*, **14**, dmm047662, doi: 10.1242/dmm.047662.
 62. Yang, Y. L., Wang, F. S., Li, S. C., Tiao, M. M., and Huang, Y. H. (2017) MicroRNA-29a alleviates bile duct ligation exacerbation of hepatic fibrosis in mice through epigenetic control of methyltransferases, *Int. J. Mol. Sci.*, **18**, 192, doi: 10.3390/ijms18010192.
 63. Zheng, J., Wu, C., Lin, Z., Guo, Y., Shi, L., et al. (2014) Curcumin up-regulates phosphatase and tensin homologue deleted on chromosome 10 through microRNA-mediated control of DNA methylation – a novel mechanism suppressing liver fibrosis, *FEBS J.*, **281**, 88-103, doi: 10.1111/febs.12574.
 64. Wang, L., Yao, J., Sun, H., He, K., Tong, D., et al. (2017) MicroRNA-101 suppresses progression of lung cancer through the PTEN/AKT signaling pathway by targeting DNA methyltransferase 3A, *Oncol. Lett.*, **13**, 329-338, doi: 10.3892/ol.2016.5423.
 65. Qadir, X. V., Han, C., Lu, D., Zhang, J., and Wu, T. (2014) miR-185 inhibits hepatocellular carcinoma growth by targeting the DNMT1/PTEN/Akt pathway, *Am. J. Pathol.*, **184**, 2355-2364, doi: 10.1016/j.ajpath.2014.05.004.
 66. Haddadi, N., Lin, Y., Travis, G., Simpson, A. M., Nassif, N. T., et al. (2018) PTEN/PTENP1: “Regulating the regulator of RTK-dependent PI3K/Akt signalling”, new targets for cancer therapy, *Mol. Cancer*, **17**, 37, doi: 10.1186/s12943-018-0803-3.
 67. Kotelevets, L., Trifault, B., Chastre, E., and Scott, M. G. H. (2020) Posttranslational regulation and conformational plasticity of PTEN, *Cold Spring Harb. Perspect. Med.*, **10**, doi: 10.1101/cshperspect.a036095.
 68. Cordier, F., Chaffotte, A., Terrien, E., Prehaud, C., Theillet, F. X., et al. (2012) Ordered phosphorylation

- events in two independent cascades of the PTEN C-tail revealed by NMR, *J. Am. Chem. Soc.*, **134**, 20533-20543, doi: 10.1021/ja310214g.
69. Al-Khoury, A. M., Ma, Y., Togo, S. H., Williams, S., and Mustelin, T. (2005) Cooperative phosphorylation of the tumor suppressor phosphatase and tensin homologue (PTEN) by casein kinases and glycogen synthase kinase 3beta, *J. Biol. Chem.*, **280**, 35195-35202, doi: 10.1074/jbc.M503045200.
 70. Bassi, C., Ho, J., Srikumar, T., Dowling, R. J., Gorrini, C., et al. (2013) Nuclear PTEN controls DNA repair and sensitivity to genotoxic stress, *Science*, **341**, 395-399, doi: 10.1126/science.1236188.
 71. Vazquez, F., Grossman, S. R., Takahashi, Y., Rokas, M. V., Nakamura, N., et al. (2001) Phosphorylation of the PTEN tail acts as an inhibitory switch by preventing its recruitment into a protein complex, *J. Biol. Chem.*, **276**, 48627-48630, doi: 10.1074/jbc.C100556200.
 72. Odriozola, L., Singh, G., Hoang, T., and Chan, A. M. (2007) Regulation of PTEN activity by its carboxyl-terminal autoinhibitory domain, *J. Biol. Chem.*, **282**, 23306-23315, doi: 10.1074/jbc.M611240200.
 73. Chen, J. H., Zhang, P., Chen, W. D., Li, D. D., Wu, X. Q., et al. (2015) ATM-mediated PTEN phosphorylation promotes PTEN nuclear translocation and autophagy in response to DNA-damaging agents in cancer cells, *Autophagy*, **11**, 239-252, doi: 10.1080/15548627.2015.1009767.
 74. Choi, B. H., Pagano, M., and Dai, W. (2014) Plk1 protein phosphorylates phosphatase and tensin homolog (PTEN) and regulates its mitotic activity during the cell cycle, *J. Biol. Chem.*, **289**, 14066-14074, doi: 10.1074/jbc.M114.558155.
 75. Maccario, H., Perera, N. M., Gray, A., Downes, C. P., and Leslie, N. R. (2010) Ubiquitination of PTEN (phosphatase and tensin homolog) inhibits phosphatase activity and is enhanced by membrane targeting and hyperosmotic stress, *J. Biol. Chem.*, **285**, 12620-12628, doi: 10.1074/jbc.M109.072280.
 76. Wang, X., Trotman, L. C., Koppie, T., Alimonti, A., Chen, Z., et al. (2007) NEDD4-1 is a proto-oncogenic ubiquitin ligase for PTEN, *Cell*, **128**, 129-139, doi: 10.1016/j.cell.2006.11.039.
 77. Van Themsche, C., Leblanc, V., Parent, S., and Asselin, E. (2009) X-linked inhibitor of apoptosis protein (XIAP) regulates PTEN ubiquitination, content, and compartmentalization, *J. Biol. Chem.*, **284**, 20462-20466, doi: 10.1074/jbc.C109.009522.
 78. Ahmed, S. F., Deb, S., Paul, I., Chatterjee, A., Mandal, T., et al. (2012) The chaperone-assisted E3 ligase C terminus of Hsc70-interacting protein (CHIP) targets PTEN for proteasomal degradation, *J. Biol. Chem.*, **287**, 15996-16006, doi: 10.1074/jbc.M111.321083.
 79. Yuan, L., Lv, Y., Li, H., Gao, H., Song, S., et al. (2015) Deubiquitylase OTUD3 regulates PTEN stability and suppresses tumorigenesis, *Nat. Cell Biol.*, **17**, 1169-1181, doi: 10.1038/ncb3218.
 80. Zhang, J., Zhang, P., Wei, Y., Piao, H. L., Wang, W., et al. (2013) Deubiquitylation and stabilization of PTEN by USP13, *Nat. Cell Biol.*, **15**, 1486-1494, doi: 10.1038/ncb2874.
 81. Song, M. S., Salmena, L., Carracedo, A., Egia, A., Lo-Coco, F., et al. (2008) The deubiquitylation and localization of PTEN are regulated by a HAUSP-PML network, *Nature*, **455**, 813-817, doi: 10.1038/nature07290.
 82. Huang, J., Yan, J., Zhang, J., Zhu, S., Wang, Y., et al. (2012) SUMO1 modification of PTEN regulates tumorigenesis by controlling its association with the plasma membrane, *Nat. Commun.*, **3**, 911, doi: 10.1038/ncomms1919.
 83. Gonzalez-Santamaria, J., Campagna, M., Ortega-Molina, A., Marcos-Villar, L., de la Cruz-Herrera, C. F., et al. (2012) Regulation of the tumor suppressor PTEN by SUMO, *Cell Death Dis.*, **3**, e393, doi: 10.1038/cddis.2012.135.
 84. Lee, S. R., Yang, K. S., Kwon, J., Lee, C., Jeong, W., et al. (2002) Reversible inactivation of the tumor suppressor PTEN by H₂O₂, *J. Biol. Chem.*, **277**, 20336-20342, doi: 10.1074/jbc.M111899200.
 85. Leslie, N. R., Bennett, D., Lindsay, Y. E., Stewart, H., Gray, A., et al. (2003) Redox regulation of PI 3-kinase signalling via inactivation of PTEN, *EMBO J.*, **22**, 5501-5510, doi: 10.1093/emboj/cdg513.
 86. Cao, J., Schulte, J., Knight, A., Leslie, N. R., Zagazdson, A., et al. (2009) Prdx1 inhibits tumorigenesis via regulating PTEN/AKT activity, *EMBO J.*, **28**, 1505-1517, doi: 10.1038/emboj.2009.101.
 87. Shen, S. M., Guo, M., Xiong, Z., Yu, Y., Zhao, X. Y., et al. (2015) AIF inhibits tumor metastasis by protecting PTEN from oxidation, *EMBO Rep.*, **16**, 1563-1580, doi: 10.15252/embr.201540536.
 88. Okumura, K., Mendoza, M., Bachoo, R. M., DePinho, R. A., Cavenee, W. K., et al. (2006) PCAF modulates PTEN activity, *J. Biol. Chem.*, **281**, 26562-26568, doi: 10.1074/jbc.M605391200.
 89. Ikenoue, T., Inoki, K., Zhao, B., and Guan, K. L. (2008) PTEN acetylation modulates its interaction with PDZ domain, *Cancer Res.*, **68**, 6908-6912, doi: 10.1158/0008-5472.CAN-08-1107.
 90. Jane, P., Gogl, G., Kostmann, C., Bich, G., Girault, V., et al. (2020) Interatomic affinity profiling by holdup assay: acetylation and distal residues impact the PDZome-binding specificity of PTEN phosphatase, *PLoS One*, **15**, e0244613, doi: 10.1371/journal.pone.0244613.
 91. Meng, Z., Jia, L. F., and Gan, Y. H. (2016) PTEN activation through K163 acetylation by inhibiting HDAC6 contributes to tumour inhibition, *Oncogene*, **35**, 2333-2344, doi: 10.1038/onc.2015.293.
 92. Chae, H. D., and Broxmeyer, H. E. (2011) SIRT1 deficiency downregulates PTEN/JNK/FOXO1 pathway to block reactive oxygen species-induced apoptosis in mouse embryonic stem cells, *Stem Cells Dev.*, **20**, 1277-1285, doi: 10.1089/scd.2010.0465.

93. Bazzichetto, C., Conciatori, F., Pallocca, M., Falcone, I., Fanciulli, M., et al. (2019) PTEN as a prognostic/predictive biomarker in cancer: an unfulfilled promise? *Cancers (Basel)*, **11**, 435, doi: 10.3390/cancers11040435.
94. Cerami, E., Gao, J., Dogrusoz, U., Gross, B. E., Sumer, S. O., et al. (2012) The cBio cancer genomics portal: an open platform for exploring multidimensional cancer genomics data, *Cancer Discov.*, **2**, 401-404, doi: 10.1158/2159-8290.CD-12-0095.
95. Karlsson, M., Zhang, C., Mear, L., Zhong, W., Digre, A., et al. (2021) A single-cell type transcriptomics map of human tissues, *Sci. Adv.*, **7**, eabh2169, doi: 10.1126/sciadv.abh2169.
96. Chandrashekar, D. S., Bashel, B., Balasubramanya, S. A. H., Creighton, C. J., Ponce-Rodriguez, I., et al. (2017) UALCAN: a portal for facilitating tumor subgroup gene expression and survival analyses, *Neoplasia*, **19**, 649-658, doi: 10.1016/j.neo.2017.05.002.
97. Burley, S. K., Bhikadiya, C., Bi, C., Bittrich, S., Chen, L., et al. (2021) RCSB Protein Data Bank: powerful new tools for exploring 3D structures of biological macromolecules for basic and applied research and education in fundamental biology, biomedicine, biotechnology, bioengineering and energy sciences, *Nucleic Acids Res.*, **49**, D437-D451, doi: 10.1093/nar/gkaa1038.
98. Szklarczyk, D., Gable, A. L., Nastou, K. C., Lyon, D., Kirsch, R., et al. (2021) The STRING database in 2021: customizable protein-protein networks, and functional characterization of user-uploaded gene/measurement sets, *Nucleic Acids Res.*, **49**, D605-D612, doi: 10.1093/nar/gkaa1074.
99. Zhang, Y., Kwok-Shing Ng, P., Kucherlapati, M., Chen, F., Liu, Y., et al. (2017) A pan-cancer proteogenomic atlas of PI3K/AKT/mTOR pathway alterations, *Cancer Cell*, **31**, 820-832.e823, doi: 10.1016/j.ccell.2017.04.013.
100. Yang, H. P., Meeker, A., Guido, R., Gunter, M. J., Huang, G. S., et al. (2015) PTEN expression in benign human endometrial tissue and cancer in relation to endometrial cancer risk factors, *Cancer Causes Control*, **26**, 1729-1736, doi: 10.1007/s10552-015-0666-5.
101. Erkanli, S., Kayaselcuk, F., Kuscu, E., Bagis, T., Bolat, F., et al. (2006) Expression of survivin, PTEN and p27 in normal, hyperplastic, and carcinomatous endometrium, *Int. J. Gynecol. Cancer*, **16**, 1412-1418, doi: 10.1111/j.1525-1438.2006.00541.x.
102. Hutt, S., Taylor, A., Ellis, P., Michael, A., Butler-Manuel, S., et al. (2019) The role of biomarkers in endometrial cancer and hyperplasia: a literature review, *Acta Oncol.*, **58**, 342-352, doi: 10.1080/0284186X.2018.1540886.
103. Rao, A. C., Arya, G., and Padma, P. J. (2011) Immunohistochemical phospho tensin tumor suppressor gene staining patterns in endometrial hyperplasias: a 2-year study, *Ind. J. Pathol. Microbiol.*, **54**, 264-268, doi: 10.4103/0377-4929.81588.
104. Mutter, G. L., Lin, M. C., Fitzgerald, J. T., Kum, J. B., and Eng, C. (2000) Changes in endometrial PTEN expression throughout the human menstrual cycle, *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, **85**, 2334-2338, doi: 10.1210/jcem.85.6.6652.
105. Guzeloglu-Kayisli, O., Kayisli, U. A., Al-Rejjal, R., Zheng, W., Luleci, G., et al. (2003) Regulation of PTEN (phosphatase and tensin homolog deleted on chromosome 10) expression by estradiol and progesterone in human endometrium, *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, **88**, 5017-5026, doi: 10.1210/jc.2003-030414.
106. Choi, J., Jo, M., Lee, E., Hwang, S., and Choi, D. (2017) Aberrant PTEN expression in response to progesterone reduces endometriotic stromal cell apoptosis, *Reproduction*, **153**, 11-21, doi: 10.1530/REP-16-0322.
107. Guzeloglu Kayisli, O., Kayisli, U. A., Luleci, G., and Arici, A. (2004) *In vivo* and *in vitro* regulation of Akt activation in human endometrial cells is estrogen dependent, *Biol. Reprod.*, **71**, 714-721, doi: 10.1095/biolreprod.104.027235.
108. Hubbard, S. A., and Gargett, C. E. (2010) A cancer stem cell origin for human endometrial carcinoma? *Reproduction*, **140**, 23-32, doi: 10.1530/REP-09-0411.
109. Tamaru, S., Kajihara, T., Mizuno, Y., Mizuno, Y., Tochigi, H., et al. (2020) Endometrial microRNAs and their aberrant expression patterns, *Med. Mol. Morphol.*, **53**, 131-140, doi: 10.1007/s00795-020-00252-8.
110. Kuokkanen, S., Chen, B., Ojalvo, L., Benard, L., Santoro, N., et al. (2010) Genomic profiling of microRNAs and messenger RNAs reveals hormonal regulation in microRNA expression in human endometrium, *Biol. Reprod.*, **82**, 791-801, doi: 10.1095/biolreprod.109.081059.
111. Grasso, A., Navarro, R., Balaguer, N., Moreno, I., Alama, P., et al. (2020) Endometrial liquid biopsy provides a miRNA roadmap of the secretory phase of the human endometrium, *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, **105**, 877-889, doi: 10.1210/clinem/dgz146.
112. Azhari, F., Pence, S., Hosseini, M. K., Balci, B. K., Cevik, N., et al. (2022) The role of the serum exosomal and endometrial microRNAs in recurrent implantation failure, *J. Matern. Fetal Neonatal. Med.*, **35**, 815-825, doi: 10.1080/14767058.2020.1849095.
113. McGeary, S. E., Lin, K. S., Shi, C. Y., Pham, T. M., Bisaria, N., et al. (2019) The biochemical basis of microRNA targeting efficacy, *Science*, **366**, eaav1741, doi: 10.1126/science.aav1741.
114. Takamura, M., Zhou, W., Rombauts, L., and Dimitriadis, E. (2020) The long noncoding RNA PTENP1 regulates human endometrial epithelial adhesive capacity in vitro: implications in infertility, *Biol. Reprod.*, **102**, 53-62, doi: 10.1093/biolre/ioz173.
115. Udou, T., Hachisuga, T., Tsujioka, H., and Kawarabayashi, T. (2004) The role of c-jun protein in proliferation and apoptosis of the endometrium

- throughout the menstrual cycle, *Gynecol. Obstet. Invest.*, **57**, 121-126, doi: 10.1159/000075701.
116. Jonusiene, V., and Sasnauskiene, A. (2021) Notch and endometrial cancer, *Adv. Exp. Med. Biol.*, **1287**, 47-57, doi: 10.1007/978-3-030-55031-8_4.
 117. Sarmadi, S., Izadi-Mood, N., Sotoudeh, K., and Tavangar, S. M. (2009) Altered PTEN expression; a diagnostic marker for differentiating normal, hyperplastic and neoplastic endometrium, *Diagn. Pathol.*, **4**, 41, doi: 10.1186/1746-1596-4-41.
 118. Lee, H., Choi, H. J., Kang, C. S., Lee, H. J., Lee, W. S., et al. (2012) Expression of miRNAs and PTEN in endometrial specimens ranging from histologically normal to hyperplasia and endometrial adenocarcinoma, *Mod. Pathol.*, **25**, 1508-1515, doi: 10.1038/modpathol.2012.111.
 119. Raffone, A., Travaglino, A., Saccone, G., Viggiani, M., Giampaolino, P., et al. (2019) PTEN expression in endometrial hyperplasia and risk of cancer: a systematic review and meta-analysis, *Arch. Gynecol. Obstet.*, **299**, 1511-1524, doi: 10.1007/s00404-019-05123-x.
 120. Travaglino, A., Raffone, A., Saccone, G., Mascolo, M., Pignatiello, S., et al. (2019) PTEN immunohistochemistry in endometrial hyperplasia: which are the optimal criteria for the diagnosis of precancer? *APMIS*, **127**, 161-169, doi: 10.1111/apm.12938.
 121. Russo, M., Newell, J. M., Budurlean, L., Houser, K. R., Sheldon, K., et al. (2020) Mutational profile of endometrial hyperplasia and risk of progression to endometrioid adenocarcinoma, *Cancer*, **126**, 2775-2783, doi: 10.1002/cncr.32822.
 122. Sun, H., Enomoto, T., Fujita, M., Wada, H., Yoshino, K., et al. (2001) Mutational analysis of the PTEN gene in endometrial carcinoma and hyperplasia, *Am. J. Clin. Pathol.*, **115**, 32-38, doi: 10.1309/7JX6-B9U9-3P0R-EQNY.
 123. Gbelcova, H., Bakes, P., Priscakova, P., Sisovsky, V., Hojsikova, I., et al. (2015) PTEN sequence analysis in endometrial hyperplasia and endometrial carcinoma in Slovak women, *Anal. Cell Pathol. (Amst)*, **2015**, 746856, doi: 10.1155/2015/746856.
 124. Lac, V., Nazeran, T. M., Tessier-Cloutier, B., Aguirre-Hernandez, R., Albert, A., et al. (2019) Oncogenic mutations in histologically normal endometrium: the new normal? *J. Pathol.*, **249**, 173-181, doi: 10.1002/path.5314.
 125. Snowdon, J., Zhang, X., Childs, T., Tron, V. A., and Feilolter, H. (2011) The microRNA-200 family is upregulated in endometrial carcinoma, *PLoS One*, **6**, e22828, doi: 10.1371/journal.pone.0022828.
 126. Tang, S., and Dai, Y. (2018) RNA sequencing reveals significant miRNAs in Atypical endometrial hyperplasia, *Eur. J. Obstet. Gynecol. Reprod. Biol.*, **225**, 129-135, doi: 10.1016/j.ejogrb.2018.03.025.
 127. Giglio, S., Annibali, V., Cirombella, R., Faruq, O., Volinia, S., et al. (2019) miRNAs as candidate biomarker for the accurate detection of atypical endometrial hyperplasia/endometrial intraepithelial neoplasia, *Front. Oncol.*, **9**, 526, doi: 10.3389/fonc.2019.00526.
 128. Kovalenko, T. F., Morozova, K. V., Ozolinya, L. A., Lapina, I. A., and Patrushev, L. I. (2018) The PTENP1 pseudogene, unlike the PTEN gene, is methylated in normal endometrium, as well as in endometrial hyperplasias and carcinomas in middle-aged and elderly females, *Acta Naturae*, **10**, 43-50, doi: 10.32607/20758251-2018-10-1-43-50.
 129. Kovalenko, T. F., Sorokina, A. V., Ozolinia, L. A., and Patrushev, L. I. (2013) Pseudogene PTENP1 5'-region methylation in endometrial cancer and hyperplasias [in Russian], *Bioorg. Khim.*, **39**, 445-453, doi: 10.1134/s1068162013040109.
 130. Kovalenko, T. F., Morozova, K. V., Pavlyukov, M. S., Anufrieva, K. S., Bobrov, M. Y., et al. (2021) Methylation of the PTENP1 pseudogene as potential epigenetic marker of age-related changes in human endometrium, *PLoS One*, **16**, e0243093, doi: 10.1371/journal.pone.0243093.
 131. Hu, M., Zhang, Y., Li, X., Cui, P., Li, J., et al. (2020) Alterations of endometrial epithelial-mesenchymal transition and MAPK signalling components in women with PCOS are partially modulated by metformin *in vitro*, *Mol. Hum. Reprod.*, **26**, 312-326, doi: 10.1093/molehr/gaaa023.
 132. Strissel, P. L., Ellmann, S., Loprich, E., Thiel, F., Fasching, P. A., et al. (2008) Early aberrant insulin-like growth factor signaling in the progression to endometrial carcinoma is augmented by tamoxifen, *Int. J. Cancer*, **123**, 2871-2879, doi: 10.1002/ijc.23900.
 133. Orbo, A., Nilsen, M. N., Arnes, M. S., Pettersen, I., and Larsen, K. (2003) Loss of expression of MLH1, MSH2, MSH6, and PTEN related to endometrial cancer in 68 patients with endometrial hyperplasia, *Int. J. Gynecol. Pathol.*, **22**, 141-148, doi: 10.1097/00004347-200304000-00005.
 134. Murali, R., Soslow, R. A., and Weigelt, B. (2014) Classification of endometrial carcinoma: more than two types, *Lancet Oncol.*, **15**, e268-278, doi: 10.1016/S1470-2045(13)70591-6.
 135. Levine, D., The Cancer Genome Atlas Research Network (2013) Integrated genomic characterization of endometrial carcinoma, *Nature*, **497**, 67-73, doi: 10.1038/nature12113.
 136. Djordjevic, B., Hennessy, B. T., Li, J., Barkoh, B. A., Luthra, R., et al. (2012) Clinical assessment of PTEN loss in endometrial carcinoma: immunohistochemistry outperforms gene sequencing, *Mod. Pathol.*, **25**, 699-708, doi: 10.1038/modpathol.2011.208.
 137. Salvesen, H. B., Stefansson, I., Kretzschmar, E. I., Gruber, P., MacDonald, N. D., et al. (2004) Significance of PTEN alterations in endometrial carcinoma: a population-based study of mutations, promoter methylation and PTEN protein expres-

- sion, *Int. J. Oncol.*, **25**, 1615-1623, doi: 10.3892/ijo.25.6.1615.
138. Zysman, M. A., Chapman, W. B., and Bapat, B. (2002) Considerations when analyzing the methylation status of PTEN tumor suppressor gene, *Am. J. Pathol.*, **160**, 795-800, doi: 10.1016/S0002-9440(10)64902-4.
139. Li, A., Jiao, Y., Yong, K. J., Wang, F., Gao, C., et al. (2015) SALL4 is a new target in endometrial cancer, *Oncogene*, **34**, 63-72, doi: 10.1038/onc.2013.529.
140. Wang, Q., Xu, K., Tong, Y., Dai, X., Xu, T., et al. (2020) Novel miRNA markers for the diagnosis and prognosis of endometrial cancer, *J. Cell Mol. Med.*, **24**, 4533-4546, doi: 10.1111/jcmm.15111.
141. Yoneyama, K., Ishibashi, O., Kawase, R., Kurose, K., and Takeshita, T. (2015) miR-200a, miR-200b and miR-429 are onco-miRs that target the *PTEN* gene in endometrioid endometrial carcinoma, *Anticancer Res.*, **35**, 1401-1410.
142. Scully, M. M., Palacios-Helgeson, L. K., Wah, L. S., and Jackson, T. A. (2014) Rapid estrogen signaling negatively regulates PTEN activity through phosphorylation in endometrial cancer cells, *Horm. Cancer*, **5**, 218-231, doi: 10.1007/s12672-014-0184-z.
143. Chen, F., Chandrashekar, D. S., Varambally, S., and Creighton, C. J. (2019) Pan-cancer molecular subtypes revealed by mass-spectrometry-based proteomic characterization of more than 500 human cancers, *Nat. Commun.*, **10**, 5679, doi: 10.1038/s41467-019-13528-0.
144. Van Themsche, C., Chaudhry, P., Leblanc, V., Parent, S., and Asselin, E. (2010) XIAP gene expression and function is regulated by autocrine and paracrine TGF-beta signaling, *Mol. Cancer*, **9**, 216, doi: 10.1186/1476-4598-9-216.
145. Cheung, L. W., Hennessy, B. T., Li, J., Yu, S., Myers, A. P., et al. (2011) High frequency of PIK3R1 and PIK3R2 mutations in endometrial cancer elucidates a novel mechanism for regulation of PTEN protein stability, *Cancer Discov.*, **1**, 170-185, doi: 10.1158/2159-8290.CD-11-0039.

ROLE OF TUMOR SUPPRESSOR PTEN AND ITS REGULATION IN MALIGNANT TRANSFORMATION OF ENDOMETRIUM

Review

A. M. Perevalova^{1*}, V. S. Kobelev², V. G. Sisakyan³, L. F. Gulyaeva^{1,2}, and V. O. Pustylnyak^{1,2}

¹ Novosibirsk State University, 630090 Novosibirsk, Russia; e-mail: a.perw@yandex.ru

² Federal Research Center of Fundamental and Translational Medicine, 630117 Novosibirsk, Russia

³ Novosibirsk Regional Oncology Center, 630108 Novosibirsk, Russia

PTEN tumor-suppressive effects are well-known, but many modern evidence suggest that they are not limited to its ability to inhibit the pro-oncogenic PI3K/AKT signaling pathway. PTEN's structure allow it to interact with substrates of different nature and display its activity in various ways both in the cytoplasm and in cell nuclei, which makes it possible to take a broader look at its ability to suppress tumor growth. The possible mechanisms of PTEN loss are also diverse – PTEN can be regulated at many levels, leading to change in protein activity or its amount in the cell, while their significance for the development of malignant tumors has yet to be studied. Here we summarize the current data on PTEN structure, its functions and changes in its regulatory mechanisms during the malignant transformation of cells, focusing on one of the most sensitive to PTEN loss types of malignant tumors – endometrial cancer.

Keywords: PTEN, endometrial cancer, endometrial hyperplasia, gene regulation

СВОЙСТВА СЕРДЕЧНОГО МИОЗИНА С КАРДИОМИОПАТИЧЕСКИМИ МУТАЦИЯМИ В СУЩЕСТВЕННЫХ ЛЁГКИХ ЦЕПЯХ

© 2022 Д.С. Ямпольская¹, Г.В. Копылова², Д.В. Щепкин², С.Ю. Бершицкий²,
А.М. Матюшенко¹, Д.И. Левицкий^{1*}

¹ ФИЦ «Фундаментальные основы биотехнологии» РАН, Институт биохимии им. А.Н. Баха,
119071 Москва, Россия; электронная почта: levitsky@inbi.ras.ru

² Институт иммунологии и физиологии УрО РАН, 620049 Екатеринбург, Россия

Поступила в редакцию 22.09.2022

После доработки 05.10.2022

Принята к публикации 05.10.2022

Исследовано влияние кардиомиопатических мутаций E56G, M149V и E177G в гене *MYL3*, кодирующем существенные лёгкие цепи миозина желудочков сердца человека (ELCv), на функциональные свойства сердечного миозина и его изолированной головки (субфрагмент 1 миозина, S1). Показано, что только одна мутация, M149V, заметно повышает активируемую актином АТРазную активность S1. Все мутации существенно повышали Ca²⁺-чувствительность скорости скольжения тонких филаментов по поверхности с иммобилизованным миозином в искусственной системе подвижности (*in vitro* motility assay). При этом мутации E56G и M149V почти в 2 раза снижали скорость скольжения нитей актина и регулируемых тонких филаментов, тогда как мутация E177G не меняла скорость скольжения. Таким образом, несмотря на то что все исследованные мутации в ELCv участвуют в развитии гипертрофической кардиомиопатии, механизмы их влияния на актин-миозиновое взаимодействие различны.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: миозин, существенные лёгкие цепи миозина, кардиомиопатические мутации, сердечная мышца, молекулярный механизм мышечного сокращения.

DOI: 10.31857/S0320972522110069, EDN: LVOCEK

ВВЕДЕНИЕ

В основе молекулярного механизма мышечного сокращения лежит циклическое взаимодействие головок миозина с актиновыми филаментами, сопряжённое с гидролизом АТФ. Молекула мышечного миозина состоит из двух тяжёлых и четырёх лёгких цепей; N-концевые области тяжёлых цепей образуют глобулярные головки, каждая из которых содержит активный центр АТРазы и участки связывания актина [1]. Изолированная миозиновая головка, называемая субфрагментом 1 миозина (S1), состоит из двух главных структурных доменов, известных как моторный (или каталитический) домен и регуляторный домен. Моторный домен

отвечает за гидролиз АТФ и связывание актина, тогда как регуляторный домен представляет собой длинную α-спираль, стабилизируемую нековалентными взаимодействиями с двумя лёгкими цепями – существенной (Essential Light Chain, ELC) и регуляторной (Regulatory Light Chain, RLC) [2]. Функционирование миозиновой головки в качестве молекулярного мотора включает поворот регуляторного домена относительно моторного домена, вызываемый глобальными конформационными перестройками, происходящими в моторном домене в процессе АТРазного цикла, при котором регуляторный домен действует как рычаг («lever arm») [1, 3]. Важную роль при этом играет ELC, стабилизирующая α-спираль регуляторного домена головки, с которой она ассоциирована своей C-концевой частью. Имеются данные о том, что при повороте регуляторного домена в процессе АТРазного цикла C-концевая часть ELC способна взаимодействовать с моторным доменом головки [4–7], а её уни-

Принятые сокращения: ELC – существенные лёгкие цепи миозина; ELCv – ELC желудочков сердца; HCM – гипертрофическая кардиомиопатия; RLC – регуляторные лёгкие цепи миозина; S1 – субфрагмент 1 миозина; Tn – тропонин; Tpm – тропомиозин.

* Адресат для корреспонденции.

кальная *N*-концевая часть – как с моторным доменом [8], так и с актином [9].

ELC играют важную роль в функционировании сердечного миозина. Изменение экспрессии изоформ ELC влияет на сократительную функцию миокарда [10]. Нарушения в первичной структуре ELC миозина желудочков сердца человека (ventricular ELC, ELC_v), вызываемые мутациями в гене *MYL3*, кодирующем ELC_v, связаны с развитием такого тяжёлого наследственного заболевания сердца человека, как гипертрофическая кардиомиопатия (HCM), которая характеризуется утолщением стенок левого желудочка, фиброзом и диастолической дисфункцией миокарда, что может приводить к нарушениям сердечного ритма вплоть до внезапной остановки сердца. К настоящему времени известно уже 13 аминокислотных замен в ELC_v человека, вызываемых мутациями в гене *MYL3*, которые ассоциированы с развитием HCM: E56G, A57G, R63C, V79I, R81H, G128C, E143K, M149V, E152K, R154H, H155D, M173V и E177G [11]. Важно отметить, что все эти замены расположены в той области ELC_v, которая взаимодействует с α -спиралью тяжёлой цепи регуляторного домена миозиновой головки [11]. При этом никаких мутаций, ассоциированных с HCM, не было обнаружено в области 52 *N*-концевых остатков ELC_v, где расположены функционально важные участки, ответственные за взаимодействие с актином [9, 11]. Некоторое исключение составляют, по-видимому, лишь мутации E56G и A57G, которые расположены довольно близко от *N*-концевого сегмента ELC_v.

Следует отметить, что для большинства мутаций в гене *MYL3*, ассоциированных с развитием HCM, почти ничего пока не известно об их влиянии на свойства сердечного миозина. Данные таких экспериментов, хотя и в небольшом количестве, имеются лишь для нескольких мутаций (E56G, A57G, M149V и M173V). Так, например, было показано, что мутация E56G резко снижает сродство ELC_v к участку её взаимодействия с тяжёлой цепью миозина в регуляторном домене миозиновой головки [12], а также снижает жёсткость молекулы миозина, изометрическую силу мышечных волокон и скорость скольжения актиновых филаментов по миозину в искусственной системе подвижности [13]. Помимо этого, интересные данные были получены методом FRET с высоким временным разрешением (Time-resolved fluorescence energy transfer, TR-FRET), который позволяет быстро измерять расстояния между головкой миозина и актином непосредственно в процессе АТРазного цикла актомиозина, при

переходах головки из состояния слабого связывания с актином в состояние сильного связывания и наоборот. Было показано, что при насыщающей концентрации АТР мутация E56G в ELC_v заметно сдвигает равновесие между состояниями слабого и сильного связывания в процессе АТРазного цикла в сторону сильного связывания, не оказывая при этом влияния на активируемую актином АТРазу сердечного S1 и на его сродство к актину. Авторы предположили, что именно такой сдвиг в равновесии может приводить к развитию фенотипа с повышенной сократимостью сердца у людей с кардиомиопатической мутацией E56G в гене *MYL3* [14].

Интересные данные были также получены при сравнении эффектов, вызываемых мутациями A57G и M173V в ELC_v миозина у трансгенных мышей. Было показано, что мутация A57G в ELC_v миозина повышает Ca^{2+} -чувствительность развития силы мышечными волокнами намного сильнее, чем мутация M173V; напротив, мутация M173V заметно снижает активируемую актином АТРадную активность сердечного миозина, тогда как мутация A57G не оказывает на неё никакого влияния [15]. И, наконец, нельзя не остановиться на свойствах сердечного миозина с мутацией M149V в ELC_v, которая раньше всех перечисленных выше была идентифицирована как мутация, приводящая к развитию HCM [16]. В изящных экспериментах, проведённых методом плазмонного резонанса, было показано, что эта мутация значительно снижает сродство ELC_v к рекомбинантному фрагменту тяжёлой цепи сердечного миозина, содержащему IQ-мотив для связывания ELC_v [12]. Помимо этого, было обнаружено, что мутация M149V в ELC_v повышает скорость скольжения актиновых филаментов по поверхности с иммобилизованным сердечным миозином в искусственной системе подвижности [16].

В настоящей работе мы сравнили свойства сердечного миозина и его изолированной головки (S1) с кардиомиопатическими мутациями E56G, M149V или E177G в ELC_v. Выбор этих мутаций не был случайным. Во-первых, высококонсервативные остатки, подвергавшиеся мутациям, расположены в разных областях первичной последовательности ELC_v: остаток E56 локализован в *N*-концевой части последовательности поблизости от уникального *N*-концевого сегмента ELC_v, тогда как остатки M149 и E177 расположены в *C*-концевой части последовательности (рис. 1, *a*). В пространстве остатки M149 и E177 локализованы далеко от остатка E56: они находятся в разных частях ELC_v, расположенных по разные сторо-

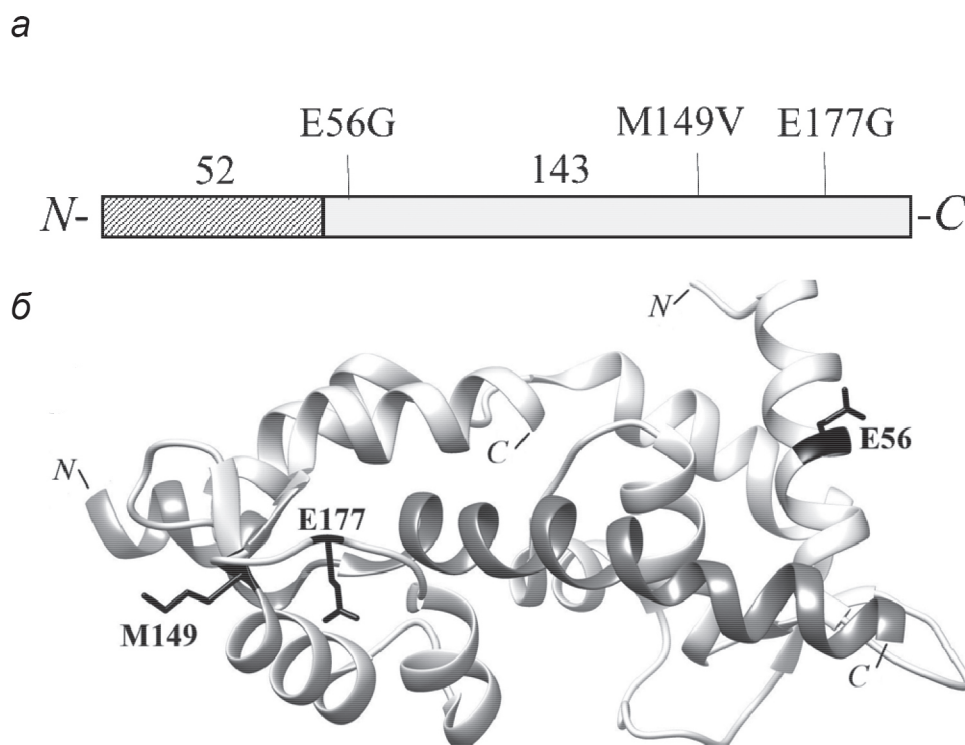


Рис. 1. *а* – Положение кардиомиопатических мутаций E56G, M149V и E177G в аминокислотной последовательности ELCv. *б* – Положение кардиомиопатических мутаций E56G, M149V и E177G на пространственной структуре ELCv (показана светло-серым цветом), ассоциированной с α -спиралью тяжёлой цепи миозина (с фрагментом тяжёлой цепи, включающим остатки 773–810, показан темно-серым цветом) в регуляторном домене миозиновой головки (PDB entry 5TVU). Остатки E56, M149 и E177 представлены в виде боковых цепей, показанных черным цветом. Гибкий *N*-концевой сегмент ELCv, включающий 52 *N*-концевых остатка, на панели *а* заштрихован, а на панели *б* – не показан

ны от α -спирали тяжёлой цепи регуляторного домена миозиновой головки (рис. 1, *б*). Во-вторых, мы старались сравнить мутации, влияние которых на свойства миозина было изучено ранее в совершенно разной степени. В этом отношении мутация E56G является одной из наиболее хорошо изученных [9, 11–14], несколько меньше известно о функциональных эффектах мутации M149V [11, 12, 16] и почти ничего не известно о мутации E177G, кроме того, что она была выявлена у 3-месячного младенца с тяжёлой прогрессирующей НСМ, приведшей к его смерти в возрасте 6 месяцев [17].

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Получение белков. Все препараты ELCv (ELC желудочков сердца человека), использованные в данной работе, были рекомбинантными белками, продуктами гена *MYL3* человека (UniProtKB P08590; MYL3_HUMAN), содержащими на *N*-конце 6-членный His-tag, необходимый для последующей очистки белков методом аффинной хроматографии. Для этого предварительно был проведён дизайн гена *MYL3*; в частности, в его нуклеотидную

последовательность были добавлены последовательности, кодирующие His-tag и специфический сайт для его последующего удаления при помощи специфической протеазы (Factor Xa). Модифицированный ген *MYL3* был клонирован в вектор pET-9a («Merck, Sigma-Aldrich», Германия) по сайтам рестрикции NdeI и BamHI. На основе кДНК этого гена методом сайт-направленного мутагенеза были получены молекулярно-генетические конструкции ELCv как дикого типа (WT), так и с мутациями E56G, M149V и E177G. Для этого предварительно был сделан дизайн перекрывающихся праймеров (прямого и обратного), которые были затем синтезированы («Евроген», Россия). И использованные в работе праймеры для получения молекулярно-генетических конструкций мутантных форм ELCv (мутантные кодоны подчёркнуты) представлены в табл. 1.

Все эти конструкции были использованы для бактериальной экспрессии рекомбинантных белков (ELCv WT, ELCv E56G, ELCv M149V и ELCv E177G) в клетках *Escherichia coli* BL21 (DE3). Рекомбинантные белки были выделены и очищены с помощью аффинной хроматографии на колонке HisTrap HP 5 мл («GE Healthcare», США). Кон-

Таблица 1. Праймеры, использованные в работе

Мутантные формы ELCv	Последовательности праймеров (5'→3')	
	прямой	обратный
ELCv E56G	TCTTAAGTTTCCTCGCAAGTA	TACTTGCGAGGAAACTTAAGA
ELCv M149V	ATGGCAACACCCACGCCTT	AAGGCGTGGGTGTTGCCAT
ELCv E177G	CCAGTCCCTCTGAGATTGC	GCAATCTCAGAGGGACTGG

центрацию препаратов ELCv определяли спектрофотометрически, используя коэффициент экстинкции $A^{1\%}$ при 280 нм, равный $0,2 \text{ см}^{-1}$.

Сердечные миозин и тропонин (Tn) получали по стандартным методикам [18, 19] из левых желудочков сердца свиньи. Тропомиозин (Tpm, сердечная изоформа Tpm1.1) представлял собой рекомбинантный белок, получение которого было подробно описано ранее [20, 21]. Актин получали стандартным методом из скелетных мышц кролика [22]. Актиновые филаменты (F-актин) полимеризовали, добавляя 4 мМ MgCl_2 и 100 мМ KCl к раствору мономерного G-актина. Для экспериментов в искусственной подвижной системе F-актин флуоресцентно метили, добавляя к нему двукратный молярный избыток TRITC-фаллоидина («Sigma Chemical Co.», США). Изолированные миозиновые головки (S1) получали, переваривая филаменты сердечного миозина α -химотрипсином, обработанным TLCK («Sigma Chemical Co.», [23]. Концентрацию S1 определяли спектрофотометрически, используя коэффициент экстинкции $A^{1\%}$ при 280 нм, равный $7,5 \text{ см}^{-1}$.

Замена собственных ELC в сердечных миозине и S1 на рекомбинантные ELCv. Методика реассоциации, т.е. замены одних ELC на другие в изолированной головке миозина (S1), неоднократно использовалась нами ранее в исследованиях на S1, полученном из миозина скелетных мышц кролика [7, 8]. Эту же методику мы использовали и для замены собственных ELC на рекомбинантные ELCv в S1, полученном из сердечного миозина. Вкратце, замену проводили, инкубируя S1 30 мин при 37°C с 8-кратным молярным избытком рекомбинантных ELCv в 50 мМ буфере имидазол-HCl (pH 7,0), содержащем 5 мМ DTT, 10 мМ MgATP и 100 мМ NaCl. Реакцию останавливали охлаждением во льду, после чего препарат S1 очищали с помощью хроматографии на колонке с SP-трисакрилом для отделения S1 от избытка свободных ELCv. Однако для замещения собственных ELC на рекомбинантные ELCv в целой молекуле сер-

дечного миозина, нерастворимого при низкой ионной силе, нам пришлось существенно модифицировать эту методику. Сердечный миозин (2 мг/мл, 4 мМ) смешивали с 10-кратным молярным избытком рекомбинантных ELCv (40 мМ) в 50 мМ буфере имидазол-HCl (pH 7,0), содержащем 5 мМ DTT, 10 мМ MgATP и 0,7 М KCl, и инкубировали в течение 1 часа при 37°C . Далее смесь миозина с ELC диализовали против буфера 50 мМ Tris-HCl (pH 8,0) для агрегации миозина и центрифугировали при 8000 g в течение 10 мин при 4°C , после чего осадок миозина ресуспендировали и диализовали против того же буфера, содержащего 1 М NaCl.

На последней стадии очистки миозина или S1 мы использовали металл-аффинную хроматографию на колонке His-Trap HP 1 мл («GE Healthcare»), на которой удерживаются лишь головки миозина, содержащие His-tag на ELCv. Хроматографию проводили в 50 мМ буфере Tris-HCl (pH 8,0), содержащем 300 мМ NaCl (в случае S1) или 1 М NaCl (для целого миозина), используя линейный градиент имидазола 15–500 мМ. Важно отметить, что при такой хроматографии молекулы миозина с заменами собственных ELC на рекомбинантные ELCv в обеих головках освобождались с колонки при более высоких концентрациях имидазола, чем молекулы, содержащие рекомбинантные ELCv лишь в одной из двух головок. Мы собирали с колонки лишь те фракции миозина, в которых собственные ELC были полностью заменены на рекомбинантные ELCv, содержащие N-концевой His-tag, электрофоретическая подвижность которых была ниже, чем у ELC, не содержащих His-tag. Именно эти фракции миозина с рекомбинантными ELCv в обеих головках молекулы использовались в последующих экспериментах. N-Концевой His-tag был впоследствии удалён из ELCv путём обработки специфической протеазой (Factor Xa protease, «NewEngland Biolabs», Великобритания) при 4°C , которую проводили в течение ночи и останавливали добавлением PMSF.

В результате нам удалось получить препараты сердечного миозина и S1, в которых собственные ELC были полностью заменены на рекомбинантные ELCv (как ELCv WT, так и ELCv с мутациями E56G, M149V или E177G).

Эксперименты в искусственной системе подвижности (*in vitro motility assay*). Использование этого метода позволяет исследовать скорость скольжения F-актина или реконструированных тонких филаментов (т.е. актиновых филаментов, содержащих Trm и Tn) по стеклянной поверхности с иммобилизованным на ней миозином, а в случае реконструированных тонких филаментов – определять зависимость скорости такого скольжения от концентрации ионов кальция. Ранее мы неоднократно применяли этот подход для изучения функциональных свойств Trm с кардиомиопатическими мутациями в различных областях молекулы [20, 21]. В настоящей работе мы использовали его для исследования свойств миозина, несущего в обеих головках рекомбинантные ELCv, в т.ч. с кардиомиопатическими мутациями E56G, M149V или E177G. Измерения проводили при 30 °С, как описано ранее [20, 21]. Вкратце, сердечный миозин (300 мкг/мл) с рекомбинантными ELCv загружали в экспериментальную проточную ячейку с внутренней поверхностью, покрытой нитроцеллюлозой. Регулируемые тонкие филаменты получали, добавляя сердечные Trm и Tn до конечных концентраций 100 нМ к раствору 10 нМ F-актина, меченного TRITC-фаллоидином, и помещали их в проточную ячейку с иммобилизованным миозином. Скорость скольжения филаментов измеряли в присутствии 2 мМ АТФ с помощью программы GMimPro [24] при различных концентрациях ионов Ca²⁺. Скорость скольжения F-актина измеряли в тех же условиях, но при отсутствии Trm, Tn и ионов Ca²⁺. Эксперименты с каждым миозином, содержащим в обеих головках рекомбинантные ELCv (как WT ELCv, так и ELCv с мутациями E56G, M149V или E177G), повторяли 3 раза (каждый раз – с заново приготовленным миозином) и полученные значения скоростей скольжения тонких филаментов или F-актина выражали как среднее ± SD. Кальциевую зависимость скорости скольжения тонких филаментов аппроксимировали уравнением Хилла, как описано ранее [20, 25].

Измерения АТФазной активности. Концентрация миозина, содержащего рекомбинантные ELCv, как и его количество, были слишком малы после всех стадий реассоциации и очистки белка, что не позволяло нам воспользоваться стандартной методикой определения АТФазной активности миозина по измерению

количества выделяемого неорганического фосфата, требующей значительно более высоких концентраций белка. Поэтому для определения АТФазной активности нам пришлось воспользоваться значительно более чувствительной методикой, позволяющей с высокой точностью измерять снижение количества АТФ в пробе непосредственно в процессе АТФазной реакции по снижению интенсивности люминесценции, измеряемой при помощи люциферин-люциферазной системы. В наших экспериментах мы использовали специальный коммерческий набор – смесь люциферина и люциферазы («Sigma-Aldrich», США), который позволяет детектировать пикомолярные концентрации АТФ в исследуемом образце. Однако даже этого оказалось недостаточно для измерения АТФазной активности целого миозина, содержащего рекомбинантные ELCv, концентрация которого была слишком уж мала для таких измерений. Поэтому все эксперименты по изучению актин-активируемой Mg²⁺-зависимой АТФазы проводились на препаратах изолированных головок сердечного миозина (S1), содержащих рекомбинантные ELCv. Образцы содержали 5 мМ имидазол (рН 7,0), 10 мМ MgCl₂, 87 нМ S1 и 4,7 мкМ F-актин. АТФазную реакцию инициировали добавлением 10 мМ АТФ. Поскольку люцифераза способна сама расщеплять АТФ (хотя и с невысокой скоростью) и вносить таким образом некоторые изменения в кинетику реакции, в качестве главного параметра скорости реакции мы использовали время полного тушения люминесценции. Измерения снижения интенсивности люминесценции проводили при 560 нм и 20 °С на планшетном ридере фирмы PerkinElmer (Multimode Plate Reader, «PerkinElmer», США).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Функциональные свойства миозина, содержащего в обеих головках рекомбинантные ELCv, изучали, используя метод искусственной системы подвижности. В первую очередь исследовали скорость скольжения актиновых филаментов (F-актина, не содержащего Trm и Tn) по поверхности, на которой был иммобилизован миозин. Оказалось, что мутация E177G в ELCv не оказывает влияния на скорость скольжения F-актина, тогда как мутации E56G и M149V снижают её почти в 2 раза (табл. 2). В случае мутации E56G полученные нами данные коррелируют с данными, известными из литературы и указывающими на то, что эта мутация в ELCv может заметно

Таблица 2. Влияние кардиомиопатических мутаций E56G, M149V и E177G в ELCv миозина на скорость скольжения F-актина и на характеристики кальциевой зависимости скорости скольжения регулируемых тонких филаментов, содержащих Trm и Tn, в искусственной системе подвижности

ELCv	Скорость скольжения F-актина, мкм/с	Характеристики кальциевой зависимости скорости скольжения тонких филаментов	
		pCa_{50}	V_{max} , мкм/с
WT ELCv	$1,9 \pm 0,07$	$6,00 \pm 0,01$	$1,8 \pm 0,1$
E177G ELCv	$1,9 \pm 0,1$	$6,40 \pm 0,01^*$	$2,0 \pm 0,1$
E56G ELCv	$1,0 \pm 0,05^*$	$6,21 \pm 0,01^*$	$1,1 \pm 0,1^*$
M149V ELCv	$1,1 \pm 0,1^*$	$6,33 \pm 0,01^*$	$1,0 \pm 0,1^*$

Примечание. Знаком * обозначены статистически значимые отличия характеристик миозина с ELCv, несущими кардиомиопатические мутации, от характеристик миозина с WT ELCv ($p < 0,05$).

(~ на 25%) снижать скорость скольжения F-актина по поверхности с иммобилизованным миозином [13]. Напротив, в случае мутации M149V в ELCv в литературе имеются данные о том, что она не снижает, а повышает почти на 40% скорость скольжения F-актина по поверхности с иммобилизованным миозином [16]. Такие различия в результатах можно объяснить получением препаратов миозина: в наших экспериментах мы использовали препараты миозина из сердца свиньи, которые различались лишь замещённой рекомбинантной ELCv, тогда как в экспериментах, описанных в работе Poetter et al. [16], сердечный миозин выделяли из биоптатов пациентов как с мутацией M149V

в ELCv, так и без неё. Препараты миозина, использованные в наших экспериментах и в работе Poetter et al. [16], различались не только по составу тяжёлых цепей сердечного миозина, но могли различаться и по иным параметрам (таким, например, как степень фосфорилирования ELCv в миозине, полученном из биоптатов, но не в полностью дефосфорилированных рекомбинантных ELCv).

Важно отметить, что мы исследовали в искусственной системе подвижности влияние мутаций в ELCv сердечного миозина не только на скорость скольжения F-актина, что делалось и ранее [13, 16], но впервые исследовали в этой системе влияние таких мутаций на скольжение ре-

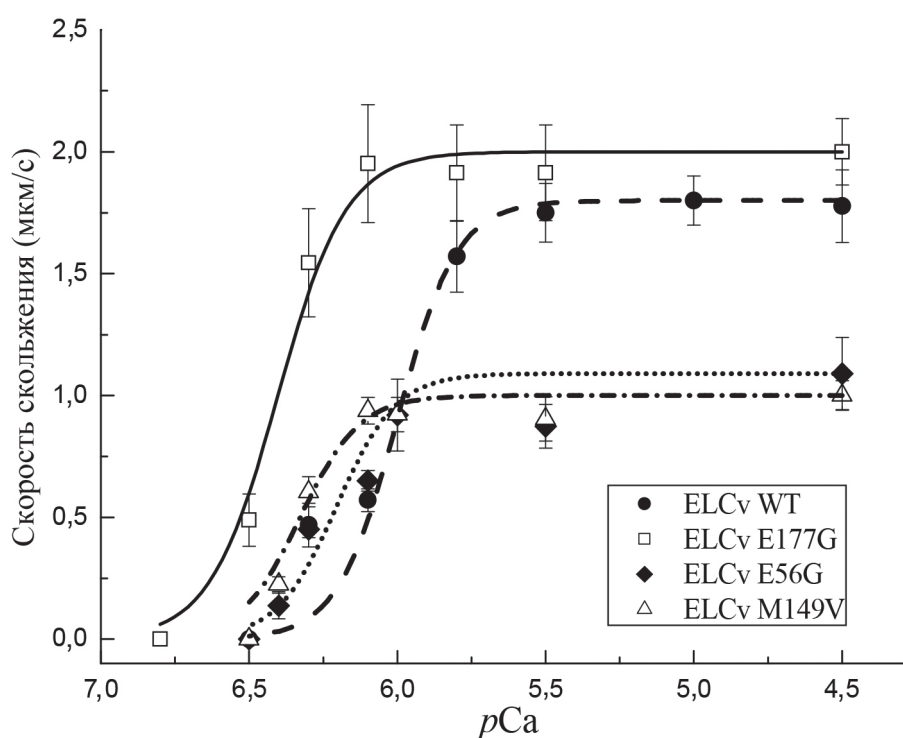


Рис. 2. Влияние кардиомиопатических мутаций E56G, M149V и E177G в ELCv миозина на кальциевую зависимость скорости скольжения регулируемых тонких филаментов по сердечному миозину в искусственной системе подвижности (*in vitro* motility assay). Экспериментальные значения скоростей (среднее \pm SD) аппроксимированы уравнением Хилла. Значения параметров уравнения Хилла представлены в табл. 2

конструированных тонких филаментов (т.е. актиновых филаментов, содержащих Trp и Tn), определяя при этом зависимость скорости такого скольжения от концентрации ионов кальция, т.е. выявляя влияние исследуемых мутаций на кальциевую регуляцию актин-миозинового взаимодействия, как возможного механизма развития HCM. Результаты этих исследований представлены на рис. 2 и в табл. 2. Сразу отметим, что максимальная скорость скольжения тонких филаментов (V_{max}), измеренная при высоких концентрациях Ca^{2+} (при pCa 4,5), почти не отличалась от скорости скольжения F-актина при отсутствии регуляторных белков (табл. 2). При этом все мутации в ELCv заметно повышали Ca^{2+} -чувствительность скорости скольжения тонких филаментов, смещая кривые зависимости скорости от pCa в сторону более низких концентраций Ca^{2+} (рис. 2) и снижая таким образом концентрацию Ca^{2+} , при которой достигается полумаксимальная скорость скольжения (pCa_{50}). Наиболее существенное повышение Ca^{2+} -чувствительности наблюдалось в случае ELCv с мутацией E177G (табл. 2). Важно отметить, что повышение Ca^{2+} -чувствительности взаимодействия миозина с актином является одним из характерных признаков HCM.

Мы также исследовали влияние кардиомиопатических мутаций E56G, M149V и E177G в ELCv миозина на активность АТРАЗы актомиозина. По ряду описанных выше причин (см. «Материалы и методы») мы не смогли использовать для этих целей ни традиционные методы измерения АТРАЗной активности, ни целый миозин с мутациями в ELCv обеих головок его молекулы. Поэтому мы использовали методику, позволяющую измерять снижение количества АТФ в пробе непосредственно в процессе АТРАЗной реакции S1 по снижению интенсивности люминесценции, измеряемой при помощи люциферин-люциферазной системы. Результаты проведенных экспериментов свидетельствуют о том, что среди исследованных мутаций в ELCv S1 лишь одна, M149V, заметно повышала АТРАЗную активность акто-S1, почти в 2 раза снижая время, необходимое для полного тушения люминесценции, которое составляло $26,0 \pm 1,2$ мин для S1 с ELCv WT и $15,3 \pm 1,9$ мин для S1 с мутацией M149V в ELCv (представлены данные 7 независимых измерений, среднее значение \pm SD). Две другие мутации в ELCv, E56G и E177G, не оказывали существенного влияния на АТРАЗную активность акто-S1; по времени, необходимому для полного тушения люминесценции ($26,5 \pm 2,3$ мин), препараты S1 с этими мутациями в ELCv практически не отличались от S1 с ELCv WT. В слу-

чае мутации E56G эти результаты хорошо соответствуют известным из литературы данным, указывающим на то, что мутация E56G в ELCv не оказывает влияния на актин-активируемую АТРАЗу S1 [14].

При сравнении эффектов, вызываемых мутациями E56G и M149V в ELCv, можно отметить их различие в зависимости от используемого метода исследования. Так, при экспериментах в искусственной системе подвижности обе мутации сходным образом снижали скорость скольжения F-актина и тонких филаментов (рис. 2, табл. 2), тогда как лишь одна из них, M149V, повышала АТРАЗную активность акто-S1, а другая, E56G, не оказывала на неё особого влияния. Это противоречие можно объяснить тем, что эксперименты в искусственной системе подвижности проводились на целом миозине с мутациями в ELCv, ассоциированных с обеими головками молекулы, а измерения АТРАЗной активности – на изолированных головках миозина (S1). В то же время имеются данные о том, что свойства целого миозина и S1 могут довольно сильно различаться. Это связано, во-первых, с кооперативным взаимодействием между двумя головками в молекуле миозина [26–28], а во-вторых – с возможным взаимодействием между ELC и RLC в головках целого миозина [29], но не в S1, который не содержит RLC.

Анализируя полученные данные, следует особо отметить эффект, оказываемый мутациями E56G и M149V в ELCv на скорость скольжения F-актина и тонких филаментов в искусственной системе подвижности, который выражается в двукратном снижении скорости (рис. 2, табл. 2). Этот эффект обусловлен, скорее всего, тем, что обе эти мутации снижают сродство ELCv к тяжёлой цепи миозина в регуляторном домене миозиновой головки [12], нарушая таким образом нормальное функционирование этого домена, важное для работы головки в качестве молекулярного мотора. Интересно также отметить, что такого эффекта не было обнаружено в случае мутации E177G (рис. 2, табл. 2), влияние которой на свойства сердечного миозина ранее вообще ещё не исследовалось. Не исключено, что влияние этой мутации на развитие HCM обусловлено не снижением скорости взаимодействия миозина с актином в сердечной мышце, а значительным повышением Ca^{2+} -чувствительности этого взаимодействия (табл. 2). Стоит также отметить, что аминокислотный остаток в положении 177 с мутацией E177G в структуре ELCv находится в неупорядоченной подвижной петле, тогда как аминокислотные остатки в

положениях 56 и 149 (мутации E56G и M149V) расположены либо в α -спирали (E56), либо в короткой петле, соединяющей участки β -складки и α -спирали (M149) [11] (см. рис. 1, б). Этим можно объяснить, хотя бы отчасти, тот факт, что мутация E177G не оказывает влияния на скорость взаимодействия миозина с актином, повышая при этом её Ca^{2+} -чувствительность, которая определяется наличием регуляторных белков, Trm и Tn, в реконструированных тонких филаментах.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Подводя итоги, следует сказать, что на основании проведённых экспериментов нам удалось получить новую информацию о влиянии кардиомиопатических мутаций E56G, M149V и E177G в гене *MYL3*, кодирующем ELCv, на функциональные свойства сердечного миозина и его изолированной головки (S1). В частности, при сравнительном анализе эффектов, вызываемых этими мутациями, нам удалось показать, что мутация E177G, эффекты которой на свойства миозина ранее не исследовались, заметно отличается от других исследованных мутаций, E56G и M149V, по её влиянию на скорость скольжения F-актина или реконструированных тонких филаментов в искусственной системе подвижности. Так, эта мутация не оказывала влияния на скорость скольжения F-актина и на максимальную скорость скольжения тонких филаментов при высокой концентрации ионов кальция, тогда как мутации E56G и M149V сни-

жали её почти в 2 раза. С другой стороны, мутация E177G повышала Ca^{2+} -чувствительность скорости скольжения тонких филаментов сильнее, чем другие исследованные мутации. Всё это позволяет предположить, что механизм развития гипертрофической кардиомиопатии, вызываемой кардиомиопатическими мутациями в ELCv, в случае мутации E177G отличается от такового для мутаций E56G и M149V.

Вклад авторов. Д.С. Ямпольская, А.М. Матюшенко и Д.И. Левицкий – концепция и руководство работой; Г.В. Копылова, Д.В. Щепкин и С.Ю. Бершицкий – проведение экспериментов в искусственной системе подвижности; Д.С. Ямпольская – проведение экспериментов по измерению АТФазной активности; Д.С. Ямпольская и Д.И. Левицкий – написание первоначального текста статьи. Все авторы принимали участие в обсуждении результатов исследования и редактировании окончательной версии статьи.

Финансирование. Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда (грант № 22-14-00059).

Благодарности. Авторы выражают глубокую благодарность Валентине Юрьевне Берг за помощь в проведении экспериментов в искусственной системе подвижности.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

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

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Levitsky, D. I. (2004) Actomyosin systems of biological motility, *Biochemistry (Moscow)*, **69**, 1177-1189, doi: 10.1007/s10541-005-0063-x.
- Rayment, I., Rypniewski, W., Schmidt-Base, K., Smith, R., Tomchick, D., et al. (1993) Three-dimensional structure of myosin subfragment 1: a molecular motor, *Science*, **261**, 50-58, doi: 10.1126/science.8316857.
- Rayment, I. (1996) The structural basis of the myosin ATPase activity, *J. Biol. Chem.*, **271**, 15850-15853, doi: 10.1074/jbc.271.27.15850.
- Milligan, R. A. (1996) Protein-protein interactions in the rigor actomyosin complex, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **93**, 21-26, doi: 10.1073/pnas.93.1.21.
- Dominguez, R., Freyzon, Y., Trybus, K. M., and Cohen, C. (1998) Crystal structure of a vertebrate smooth muscle myosin motor domain and its complex with the essential light chain: visualization of the pre-power stroke state, *Cell*, **94**, 559-571, doi: 10.1016/s0092-8674(00)81598-6.
- Borejdo, J., Ushakov, D. S., Moreland, R., Akopova, I., Reshetnyak, Y., et al. (2001) The power stroke causes changes in the orientation and mobility of the termini of essential light chain 1 of myosin, *Biochemistry*, **40**, 3796-3803, doi: 10.1021/bi002527u.
- Logvinova, D. S., Markov, D. I., Nikolaeva, O. P., Sluchanko, N. N., Ushakov, D. S., et al. (2015) Does interaction between the motor and regulatory domains of the myosin head occur during ATPase cycle? Evidence from thermal unfolding studies on myosin subfragment 1, *PLoS One*, **10**, e0137517, doi: 10.1371/journal.pone.0137517.
- Logvinova, D. S., Matyushenko, A. M., Nikolaeva, O. P., and Levitsky, D. I. (2018) Transient interaction

- between the N-terminal extension of the essential light chain-1 and motor domain of the myosin head during the ATPase cycle, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **495**, 163-167, doi: 10.1016/j.bbrc.2017.10.172.
9. Logvinova, D. S., and Levitsky, D. I. (2018) Essential light chains of myosin and their role in functioning of the myosin motor, *Biochemistry (Moscow)*, **83**, 944-960, doi: 10.1134/S0006297918080060.
 10. Schaub, M.C., Hefti, M. A., Zuellig, R. A., and Morano, I. (1998) Modulation of contractility in human cardiac hypertrophy by myosin essential light chain isoforms, *Cardiovasc. Res.*, **37**, 381-404, doi: 10.1016/s0008-6363(97)00258-7.
 11. Yadav, S., Sitbon, Y. H., Kazmierczak, K., and Szczesna-Cordary, D. (2019) Hereditary heart disease: pathophysiology, clinical presentation, and animal models of HCM, RCM, and DCM associated with mutations in cardiac myosin light chains, *Pflügers Arch. Eur. J. Physiol.*, **471**, 683-699, doi: 10.1007/s00424-019-02257-4.
 12. Lossie, J., Ushakov, D. S., Ferenczi, M. A., Werner, S., Keller, S., et al. (2012) Mutations of ventricular essential myosin light chain disturb myosin binding and sarcomeric sorting, *Cardiovasc. Res.*, **93**, 390-396, doi: 10.1093/cvr/cvr320.
 13. Lossie, J., Köhncke, C., Mahmoodzadeh, S., Steffen, W., Canepari, M., et al. (2014) Molecular mechanism regulating myosin and cardiac functions by ELC, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **450**, 464-469, doi: 10.1016/j.bbrc.2014.05.142.
 14. Guhathakurta, P., Prochniewicz, E., Roopnarine, O., Rohde, J. A., and Thomas, D. D. (2017) A cardiomyopathy mutation in the myosin essential light chain alters actomyosin structure, *Biophys. J.*, **113**, 91-100, doi: 10.1016/j.bpj.2017.05.027.
 15. Huang, W., and Szczesna-Cordary, D. (2015) Molecular mechanisms of cardiomyopathy phenotypes associated with myosin light chain mutations, *J. Muscle Res. Cell Motil.*, **36**, 433-445, doi: 10.1007/s10974-015-9423-3.
 16. Poetter, K., Jiang, H., Hassanzadeh, S., Master, S. R., Chang, A., et al. (1996) Mutations in either the essential or regulatory light chains of myosin are associated with a rare myopathy in human heart and skeletal muscle, *Nat. Genet.*, **13**, 63-69, doi: 10.1038/ng0596-63.
 17. Jay, A., Chikarmane, R., Poulik, J., and Misra, V. K. (2013) Infantile hypertrophic cardiomyopathy associated with a novel MYL3 mutation, *Cardiology*, **124**, 248-251, doi: 10.1159/000347138.
 18. Margossian, S. S., and Lowey, S. (1982) Preparation of myosin and its subfragments from rabbit skeletal muscle, *Methods Enzymol.*, **85**, 55-71, doi: 10.1016/0076-6879(82)85009-x.
 19. Potter, J. D. (1982) Preparation of troponin and its subunits, *Methods Enzymol.*, **85** (Part B), 241-263, doi: 10.1016/0076-6879(82)85024-6.
 20. Matyushenko, A. M., Shchepkin, D. V., Kopylova, G. V., Popruga, K. E., Artemova, N. V., et al. (2017) Structural and functional effects of cardiomyopathy-causing mutations in the troponin T-binding region of cardiac tropomyosin, *Biochemistry*, **56**, 250-259, doi: 10.1021/acs.biochem.6b00994.
 21. Matyushenko, A. M., Koubassova, N. A., Shchepkin, D. V., Kopylova, G. V., Nabiev, S. R., et al. (2019) The effects of cardiomyopathy-associated mutations in the head-to-tail overlap junction of α -tropomyosin on its properties and interaction with actin, *Int. J. Biol. Macromol.*, **125**, 1266-1274, doi: 10.1016/j.ijbiomac.2018.09.105.
 22. Pardee, J. D., and Spudich, J. A. (1982) Purification of muscle actin, *Methods Enzymol.*, **85**, 164-181, doi: 10.1016/0076-6879(82)85020-9.
 23. Weeds, A. G., and Taylor, R. S. (1975) Separation of subfragment-1 isoenzymes from rabbit skeletal muscle myosin, *Nature*, **257**, 54-56, doi: 10.1038/257054a0.
 24. Mashanov, G. I., and Molloy, J. E. (2007) Automatic detection of single fluorophores in live cells, *Biophys. J.*, **92**, 2199-2211, doi: 10.1529/biophysj.106.081117.
 25. Matyushenko, A. M., Artemova, N. V., Shchepkin, D. V., Kopylova, G. V., Bershitsky, S. Y., et al. (2014) Structural and functional effects of two stabilizing substitutions, D137L and G126R, in the middle part of α -tropomyosin molecule, *FEBS J.*, **281**, 2004-2016, doi: 10.1111/febs.12756.
 26. Schaub, M. C., Watterson, J. G., and Waser, P. G. (1977) Evidence for head-head interactions in myosin from cardiac and skeletal muscles, *Basic Res. Cardiol.*, **72**, 124-132, doi: 10.1007/BF01906350.
 27. Tyska, M. J., Dupuis, D. E., Guilford, W. H., Patlak, J. B., Waller, G. S., et al. (1999) Two heads of myosin are better than one for generating force and motion, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **96**, 4402-4407, doi: 10.1073/pnas.96.8.4402.
 28. Albet-Torres, N., Bloemink, M. J., Barman, T., Candau, R., Froölander, K., et al. (2009) Drug effect unveils inter-head cooperativity and strain-dependent ADP release in fast skeletal actomyosin, *J. Biol. Chem.*, **284**, 22926-22937, doi: 10.1074/jbc.M109.019232.
 29. Houdusse, A., and Cohen, C. (1996) Structure of the regulatory domain of scallop myosin at 2 Å resolution: implications for regulation, *Structure*, **4**, 21-32, doi: 10.1016/s0969-2126(96)00006-8.

**PROPERTIES OF CARDIAC MYOSIN
WITH CARDIOMYOPATHIC MUTATIONS IN ESSENTIAL LIGHT CHAINS**

**D. S. Yampolskaya¹, G. V. Kopylova², D. V. Shchepkin², S. Y. Bershitsky²,
A. M. Matyushenko¹, and D. I. Levitsky^{1*}**

¹ *Bach Institute of Biochemistry, Research Center of Biotechnology of the Russian Academy of Sciences,
119071 Moscow, Russia; e-mail: Levitsky@inbi.ras.ru*

² *Institute of Immunology and Physiology Ural Branch of the Russian Academy of Sciences,
620049 Yekaterinburg, Russia*

The effect of cardiomyopathic mutations E56G, M149V, and E177G in the *MYL3* gene, which encodes essential light chains of human ventricular myosin (ELC_v), on the functional properties of cardiac myosin and its isolated head (myosin subfragment 1, S1) was investigated. It has been shown that only one mutation, M149V, significantly increases the actin-activated ATPase activity of S1. All mutations significantly increased the Ca²⁺-sensitivity of the sliding velocity of thin filaments on the surface with immobilized myosin in the *in vitro* motility assay. At the same time, mutations E56G and M149V reduced the sliding velocity of actin filaments and regulated thin filaments by almost 2 times, while the mutation E177G in ELC_v did not have such an effect on the sliding velocity. Thus, despite the fact that all the studied mutations in ELC_v are involved in the development of hypertrophic cardiomyopathy, the mechanisms of their influence on actin-myosin interaction are different.

Keywords: myosin, essential light chains, cardiomyopathic mutations, cardiac muscle, molecular mechanism of muscle contraction

ПРОТЕОМНЫЙ АНАЛИЗ ПЕРЕКОДИРОВАНИЯ БЕЛКОВ *Danio rerio* ВСЛЕДСТВИЕ РЕДАКТИРОВАНИЯ МАТРИЧНОЙ РНК АДЕНОЗИНДЕЗАМИНАЗАМИ ADAR

© 2022 Ш.Ш. Насаев^{1,2}, А.С. Копейкина³, К.Г. Кузнецова⁴,
Л.И. Левицкий⁵, С.А. Мошковский^{1,3*}

¹ Федеральный научно-клинический центр физико-химической медицины ФМБА России,
119435 Москва, Россия; электронная почта: moshrrft@gmail.com

² НИИ биомедицинской химии имени В.Н. Ореховича, 119121 Москва, Россия

³ Российский национальный исследовательский медицинский университет
им. Н.И. Пирогова Минздрава России, 117997 Москва, Россия

⁴ Бергенский университет, NO-5020 Берген, Норвегия

⁵ Федеральный исследовательский центр химической физики им. Н.Н. Семенова РАН,
Институт энергетических проблем химической физики им. В.Л. Тальрозе, 119334 Москва, Россия

Поступила в редакцию 20.09.2022

После доработки 08.10.2022

Принята к публикации 08.10.2022

Редактирование РНК аденозиндезаминазами семейства ADAR может вести к перекодированию белков, поскольку преобразованный из аденозина инозин в составе мРНК комплементарен цитозину. При редактировании кодонов в транскрибируемые белки вносятся аминокислотные замены. Перекодирование протеомов может иметь функциональные последствия, что описано для многих животных, включая человека. С использованием базы данных перекодирования, предсказанной по полученным из литературы транскриптомным данным, в представленной работе впервые идентифицировали участки перекодирования в панорамных протеомах *Danio rerio*. В шести наборах протеомных данных примерно из ста предсказанных событий перекодирования удалось идентифицировать десять. Семь из них принадлежали к хорошо изученным и консервативным среди позвоночных участкам перекодирования в субъединицах глутаматных рецепторов АМРА-типа. Три были специфичными для белков *D. rerio*. Среди них участвующие в адгезии и сигнализации нервных клеток трансмембранные рецепторы астротактин 1 и нейрегулин 3b, а также белок пресинаптической мембраны, участвующий в высвобождении нейромедиаторов – продукт гена *rims2b*. Дальнейшие исследования требуются для выявления функции перекодирования указанных белков у *D. rerio*.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: протеогеномика, панорамная протеомика, *Danio rerio*, ADAR, РНК-зависимая аденозиндезаминаза, редактирование РНК.

DOI: 10.31857/S0320972522110070, **EDN:** LVQEEA

ВВЕДЕНИЕ

Аденозиндезаминазы семейства ADAR представлены в большинстве многоклеточных животных. Ферментативно активные изоформы ADAR дезаминируют остатки аденозина рибонуклеиновых кислот в положении 6 пуринового гетероцикла, в результате чего они преобразуются в неканонические остатки инозина. Эта естественная посттранскрипционная модификация РНК широко распространена в клетках животных [1].

Особенность работы указанных ферментов заключается в их зависимости от участков двухцепочечной РНК, для чего в их структуре, помимо ферментативного, присутствует связывающий соответствующие участки доменов. У грызунов и человека, как и у нескольких исследованных позвоночных других классов, активные формы ADAR делятся на 2 функциональные группы. У мыши и человека каждая из них включает по одному гену. Фермент ADAR1 (ген *ADAR* человека) редактирует протяженные участки регулярной двухцепочечной РНК, находящейся обычно в не кодирующей белки РНК или в некодирующей части мРНК.

* Адресат для корреспонденции.

Фермент ADAR2 (ген *ADARB1* человека) работает с небольшими и нерегулярными дуплексами, часто в кодирующих участках матричных РНК [2].

Каковы же функции этих двух типов активности ADAR? Двухцепочечные нуклеиновые кислоты в цитоплазме, будь то ДНК или дуплексы РНК, даже в достаточно низких концентрациях активируют неспецифический иммунитет, поскольку повышение уровня таких молекул там может означать вирусную атаку. Активность ADAR в отношении протяженных двухцепочечных структур РНК обладает способностью нейтрализовать их. Известно, что инозин, в отличие от аденозина, комплементарен в большей степени цитидину, нежели уридину. Поэтому дуплексные структуры РНК разрушаются после редактирования ADAR. Одна из основных функций ADAR1 – нейтрализация в ядре протяженных дуплексов, а при иммунном ответе интерферонов I-типа на такие дуплексы, проникшие в цитоплазму, – подавление этого ответа по принципу отрицательной обратной связи. Не случайно интерфероны у млекопитающих индуцируют синтез альтернативной, более протяженной изоформы ADAR1, которая транспортируется в цитоплазму, оказывая там противоинтерфероновое действие [3].

В отличие от ADAR1, фермент ADAR2 действует более локально, осуществляя тонкую настройку сплайсинга матричных РНК и, в ряде случаев, изменяя аминокислотную последовательность кодируемых им продуктов. Действительно, изменение комплементарности оснований в РНК может изменять смысл кодона при соответствующем положении в последовательности. Остаток инозина ведет себя как гуанозин, в результате чего в кодируемых белках возникают единичные аминокислотные замены, и, в редких случаях, пропуск стоп-кодона. Таким образом, редактирование РНК ферментами ADAR, причем в подавляющем числе случаев у позвоночных – изоформами ADAR2, производит перекодирование протеома [3].

В разных организмах масштаб этого явления различен. Например, у головоногих моллюсков описан значительный уровень перекодирования транскрипта и протеома с несколькими сотнями выявляемых на уровне протеома сайтов перекодирования у разных видов [4]. Плодовая мушка, которая имеет всего один ген, кодирующий ADAR, ортологичный генам, кодирующим ADAR2 позвоночных, также характеризуется интенсивным редактированием РНК и перекодированием протеома. На протеомном уровне удается подтвердить

около 70 аминокислотных замен [5]. Иная ситуация у млекопитающих, например, у приматов и грызунов – у них из транскрипта предсказывается значительно меньшее количество событий перекодирования по сравнению с моллюсками и насекомыми, а на уровне протеома надежно выявляется всего около двух десятков замен [6].

Несмотря на это, мутации, приводящие к потере функции продуктов гена, кодирующего ADAR2, у млекопитающих, как правило, летальны. У трансгенных мышей обратить летальный фенотип при нокауте гена *ADARB1* (ADAR2) удавалось, изменив единственный сайт редактирования – в гене субъединицы 2 ионотропного глутаматного рецептора АМРА-типа (*GRIA2*). В процессе развития эмбриона происходит редактирование с перекодированием остатка 607 субъединицы 2 с глутамин на аргинин, при 100%-ном перекодировании у взрослых особей. В итоге снижается проводимость соответствующего ионного канала, что необходимо для нормального функционирования головного мозга. Если при нокауте гена, кодирующего фермент, осуществить перекодирование (*Q607R*) за счет искусственной геномной мутации, удается «спасти» мышей от летальной мутации [7].

На клеточных и мышечных моделях охарактеризовано функциональное значение других участков перекодирования за счет редактирования РНК. Например, аминокислотная замена за счет перекодирования в филламине А (*FLNA*) влияет на тонус гладких мышц сосудов [8]. Консервативная на первый взгляд замена I→V в альфа-коамере (*COPA*), как оказалось, имеет онкосупрессорный эффект и играет роль при гепатоцеллюлярной карциноме человека [9].

Оценка масштабов перекодирования протеома за счет редактирования РНК ферментами ADAR долгое время осуществлялась по транскриптомным данным. Вопрос в том, какое количество событий редактирования, способных перекодировать последовательность аминокислот, доходит до стадии транслированных белков. Многие события редактирования, как предполагается, являются побочным эффектом действия ферментов и не имеют биологического значения [10]. Очевидно, что те случаи редактирования РНК, последствия которых могут быть обнаружены на протеомном уровне, имеют больше шансов быть функционально значимыми. Поэтому после проведения полнотранскриптомного анализа редактирования РНК ферментами ADAR данные такого анализа нередко используются для поиска об-

разующейся в результате полиморфизма аминокислотной последовательности уже в протеомных данных. Поскольку основным подходом к идентификации последовательностей белка служит поиск в масс-спектрах соответствия предсказанным из генома или транскриптома белкам, для идентификации событий перекодирования нужно дополнить теоретический протеом этими измененными последовательностями [11].

В литературе представлено несколько проектов, в которых осуществляют анализ таких участков в протеоме. В значимой для этой области работе, где был впервые показан значительный масштаб переустройства транскриптома головоногих моллюсков за счет активности ADAR, изменения также подтверждали в соответствующих протеомах [4]. Позднее нами был проведен поиск перекодированных белков в протеомах плодовой мушки [5], причем изменения в профиле перекодирования регистрировали на разных стадиях метаморфоза этого насекомого [12]. Кроме того, нами идентифицированы перекодированные участки в белках головного мозга мыши и человека [6]. В пределах этих двух видов млекопитающих они отличаются консерватизмом, практически не пересекаясь с участками перекодирования в нервной системе дрозофилы. В дополнение полномасштабному анализу были подвергнуты протеомы различных злокачественных опухолей человека, где также были выявлены перекодированные сайты [13].

В дополнение к хорошо описанному РНК-эдитому головоногих моллюсков, дрозофилы, мыши и человека, редактирование ферментами ADAR было подробно описано в транскриптом известной модельной позвоночной – рыбки *Danio rerio* или зебрафиш [14]. Эта пресноводная рыбка отряда карпообразных, происходящая из тропической Азии, с 1960-х гг. используется в лаборатории для широкого круга биомедицинских исследований и играет большую роль в биологии развития, нейронауках и в исследовании широкого круга патологий, присущих всем позвоночным [15]. Мы использовали представленные в указанной работе транскриптомные данные для запуска отработанной нами серии методов. Целью исследования была надежная идентификация участков перекодирования белков в протеомах *D. rerio*. Представленные на белковом уровне сайты перекодирования ценны для дальнейших исследований, поскольку они с большей вероятностью обладают функциональной значимостью по сравнению с участками, представленными только на уровне транскриптома.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Создание базы данных для протеомного поиска с предсказанными участками перекодирования белков вследствие редактирования РНК. Для анализа использовали референсный протеом *D. rerio* (инвентарный номер базы знаний Uniprot UP000000437_7955 [16]). Из работы Buchumenski et al. [14] получали предсказанные по материалам РНК-секвенирования несинонимичные замены в экзонах мРНК транскриптома *D. rerio*. Из указанных замен формировали vcf-файл. Последний аннотировали с использованием скрипта snpEff [17] и сборки генома *D. rerio* в версии GRCz11.99 [18]. Таким образом, перекодированные остатки синхронизировали с записями в протеомной базе данных. Всего были предсказаны замены в 116 положениях белков *D. rerio*, из них 63 положения имели по 2 альтернативных варианта замены.

С помощью написанных нами программ на языке Python последовательности белков преобразовывали в последовательности трипсиновых пептидов с одним возможным пропущенным участком расщепления трипсином. Далее, белки с перекодированием по тому же принципу преобразовывали в пептиды. В итоговой базе данных к геномным пептидам добавляли пептиды с перекодированием. Таким образом, на начальной стадии 116 сайтов с альтернативными заменами формировали 471 пептид с учетом одного пропуска расщепления. Особенности масс-спектрометрического анализа препятствуют идентификации слишком длинных и слишком коротких пептидов, поэтому в исходном списке оставляли те, длина которых составляла от 7 до 40 аминокислотных остатков включительно. После данной операции количество пептидов с вариантами сократилось до 332 с потерей 139 несовместимых с анализом пептидов.

С помощью библиотеки Pyteomics [19] в базу данных для поиска добавляли фальшивые (decoy) последовательности пептидов, а именно: обращенные пептиды с сохранением C-концевого остатка.

Наборы протеомных данных. Для переобработки с целью поиска участков перекодирования в репозитории Proteomexchange [20] выбрали 6 наборов панорамных протеомных данных тканей *D. rerio* [21–25]. Подробности о наборах данных представлены в табл. 1.

Протеомный поиск. С помощью программы ThermoRawFileParser [26] исходные RAW-файлы преобразовались в mzML-файлы. В поисковой машине IdentiPy [27] для каждого из наборов данных устанавливались следующие

Таблица 1. Доступные общественности данные протеомного анализа тканей *Danio rerio*, использованные для поиска участков перекодирования белков вследствие редактирования РНК ферментами ADAR

Инвентарный номер репозитория ProteomeXchange [20]	Биоматериал для анализа	Детектор для получения MS/MS
PXD005630 [21]	синапсомы, постсинаптическое уплотнение выделены из мозга взрослых рыб	LTQ (линейная ионная ловушка)
PXD009612* [22]	целый организм, мальки на 6-е сутки после оплодотворения	Orbitrap
PXD014228 [23]	головной мозг взрослых рыб	Orbitrap
PXD016847 [24]	головной мозг взрослых рыб	LTQ
PXD023967***	моторные нейроны взрослых рыб	Orbitrap
PXD030733 [25]	головной мозг взрослых рыб	LTQ

Примечание. Все данные получены авторами путем хроматомасс-спектрометрии фрагментов расщепленных трипсином белков с использованием детекторов с ловушкой Orbitrap, по крайней мере для анализа родительских ионов в тандемном анализе. Спектры MS/MS, полученные в линейной ионной ловушке, обладают примерно на порядок более низкой точностью определения m/z , чем полученные в ловушке Orbitrap. Поиск проводили с добавлением в поисковую базу данных участков перекодирования, взятых из статьи Vuchumenski et al. [14].

* Участков перекодирования белков, прошедших отбор по принципам, сформулированным в этой работе, в отобранных наборах данных не обнаружено.

** Данные доступны в репозитории, но отсутствуют в публикациях.

настройки файла конфигурации, в соответствии с условиями получения масс-спектров в оригинальных работах:

- PXD023967 – product accuracy: 0,01 Da, fixed: camC, variable: oxM, acetyl-;
- PXD030733 – product accuracy: 0,5 Da, fixed: camC, variable: oxM, acetyl-;
- PXD009612 – product accuracy: 0,01 Da, fixed: camC, variable: oxM;
- PXD005630 – product accuracy: 0,5 Da, fixed: camC, variable: oxM, camM;
- PXD016847 – product accuracy: 0,5 Da, fixed: camC, variable: oxM, acetyl-;
- PXD014228 – product accuracy: 20 ppm, fixed: camC, variable: oxM.

С помощью IdentiPy в режиме автооптимизации параметров проводили идентификацию пептидов. С помощью программы Scavenger [28] производилась валидация и группоспецифическая фильтрация перекодированных пептидов (FDR – 1%).

Визуализация масс-спектров. Результаты поиска визуализировали в программе просмотра масс-спектров xiSPEC [29]. Изображения подвергали экспертной оценке: в аннотированных масс-спектрах фрагментации определяли покрытие предполагаемого сайта перекодирования.

Аннотация участков перекодирования с точки зрения пространственной структуры белков. Информацию получали, комбинируя общедоступные ресурсы. Аннотировали перекодированные

белки по материалам баз знаний UniProt [16] и neXtProt [30]. Неохарактеризованные структурно белки *D. rerio* выравнивали на белки млекопитающих посредством Blastp [31]. Трехмерные структуры анализировали посредством программы для визуализации молекулярных структур PyMOL [32]. Влияние на стабильность структуры белков оценивали с помощью I-Mutant2.0 [33], MUpPro [34] и iStable [35].

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Наборы данных и фильтрация идентифицированных участков перекодирования. В отличие от данных по человеку и мыши, в свободном доступе находится не так много протеомов *D. rerio*. Кроме того, для оптимальной работы протеогеномной серии методов, использованных в этой и других наших работах [6], подходят данные, отвечающие определенным техническим требованиям. Так, для повторной обработки применяли данные панорамного протеомного анализа без использования метки, полученные на приборах с ловушкой Orbitrap (табл. 1). Из-за небольшого количества доступных протеомных данных использовали как данные, где тандемные спектры получали в детекторе с высоким разрешением, как это делается в большинстве работ последнего времени, так и данные более ранних приборов (Orbitrap Velos или Elite) с тандемными спек-

трами, полученными в линейной ионной ловушке (LTQ), совмещенной с Orbitrap. Спектры MS/MS последнего типа обладают менее высокой точностью, что отражается при задании параметров протеомного поиска.

В связи с тем, что *D. rerio* представляет собой предпочтительный объект для нейронаук, большая часть наборов данных, выбранных для исследования, представляла собой препараты головного мозга, в том числе разные фракции синапсов [21], а также культуру моторных нейронов. Кроме того, в исследование были включены данные одного исследования по протеому целых мальков рыбки в возрасте 6 суток [22] (табл. 1). С точки зрения существующих знаний о редактировании РНК, центральная нервная система – удачный объект, поскольку у позвоночных, как известно, большая часть событий редактирования с перекодированием белков происходит именно в соответствующих тканях, где высока экспрессия гена изоформы ADAR2 [3].

Наличие в составе данных масс-спектров с более низким разрешением MS/MS заставила нас особенно внимательно относиться к критериям фильтрации идентификаций перекодированных пептидов. К критериям включения отнесли идентификацию как минимум в двух наборах данных, идентификацию в двух пептидах разного состава, образовавшихся за счет неполного расщепления трипсином, или подтверждение идентификации путем экспертного просмотра масс-спектров, сформированных в программе для визуализации xiSPEC [29]. Кроме того, исключению подлежали пептиды с недорасщеплением трипсином без подтверждения полностью расщепленными пептидами. Недавно мы показали, что такие идентификации имеют повышенный уровень ложноположительных результатов (FDR) [36].

Большие интервалы, в которые могут попасть нужные значения m/z на тандемных масс-спектрах с более низким разрешением, делают сложным экспертный анализ визуализированных масс-спектров. Обычно такие масс-спектры, полученные путем хромато-масс-спектрометрии сложных смесей, содержат много пиков, нерелевантных целевому пептиду. Однако в ряде случаев интересующие нас пики выделяются по своей интенсивности. На рис. 1 проиллюстрировано убедительное доказательство идентичности масс-спектра и пептида субъединицы глутаматного рецептора *gria4b*. Из рис. 1 видно, что наиболее интенсивные пики в масс-спектре ассоциированы с молекулярными массами, предсказанными теоретически для MS/MS кодируемого в геноме пептида с заменой K→R. Остальные масс-спектры, идентичность которых с перекодированными пептидами подтверждали путем экспертной оценки, представлены на рис. S1 в Приложении.

Участки перекодирования, обнаруженные в протеомах *D. rerio*. В четырех из шести наборов данных, исследованных в данной работе, обнаружили перекодированные участки белков. Все протеомы с обнаруженным перекодированием относились к центральной нервной системе. Всего таких участков оказалось 10 (в одном из них обнаружены 2 варианта перекодирования, см. табл. 2) из 116 предсказанных из транскриптома [14], что даже меньше, чем было обнаружено в центральной нервной системе мыши и человека. В этих протеомах надежно идентифицировали 14 и 18 сайтов перекодирования соответственно [6]. Впрочем, база данных для поиска, состоящая из предсказанных по результатам секвенирования РНК участков перекодирования, в случае *D. rerio* была намного меньше. Кроме того, данные по млекопитающим были значительно объемнее по суммарному количеству полученных масс-спектров.

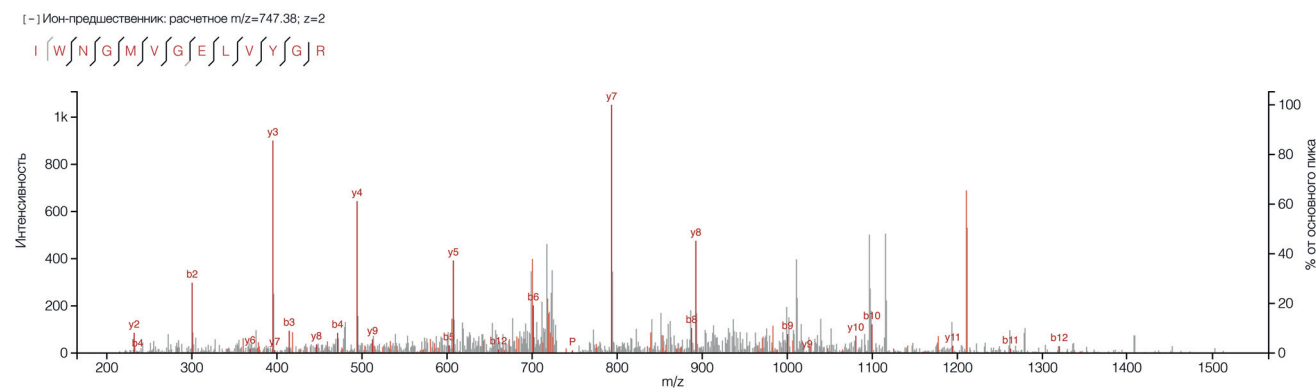


Рис. 1. Тандемный масс-спектр пептида субъединицы глутаматного рецептора *gria4b*, визуализированный в программе XiSpec [29]. Наиболее интенсивные пики в масс-спектре ассоциированы с молекулярными массами, предсказанными теоретически для MS/MS кодируемого в геноме пептида с заменой K→R

Таблица 2. Участки перекодирования белков *Danio rerio* в результате редактирования РНК ферментами ADAR, идентифицированные в данных панорамной протеомики

Название гена	Название белка	Аминокислотная замена при перекодировании	Идентифицированный пептид	Результат экспертного анализа масс-спектра	Данные, в которых найден участок (подробнее см. табл. 1)	Идентификация альтернативного участка, кодируемого в геноме
Участки перекодирования в субъединицах глутаматных рецепторов						
<i>gria2a</i> и/или <i>gria3b</i>	субъединица глутаматного рецептора (flor-изоформа)	R756G и/или R764G	GSAL[G]NAVNLA VLK, GYGVATPKGSAL[G]NAVNLA VLK	+	PXD014228 (мозг); PXD005630 (синапсомы, постсинаптическое уплотнение); PXD030733 (мозг)	+
<i>gria2a</i> и/или <i>gria3b</i>	субъединица глутаматного рецептора (flor-изоформа)	R756G и/или R764G	GSAL[G]TPVNLAVLK	+	PXD005630 (синапсомы, постсинаптическое уплотнение)	+
<i>gria2b</i>	субъединица глутаматного рецептора (flor-изоформа)	R760G	GSSL[G]TPVNLAVLK	+	PXD005630 (синапсомы, постсинаптическое уплотнение)	+
<i>gria2b</i>	субъединица глутаматного рецептора (flor-изоформа)	R760G	GSSL[G]NAVNLA VLK	+	PXD014228 (мозг)	+
<i>gria4a</i>	субъединица глутаматного рецептора (flor-изоформа)	R760G	GSQ[L]G]TPVNLAVLK	+	PXD014228 (мозг); PXD005630 (синапсомы, постсинаптическое уплотнение)	+
<i>gria4b</i>	субъединица глутаматного рецептора (flor-изоформа)	R766G	GSQ[L]G]SAVNLA VLK	+	PXD005630 (синапсомы, постсинаптическое уплотнение)	-
<i>gria4b</i>	субъединица глутаматного рецептора	K493R	IWNGMVGEIYVY[G]R]	+	PXD005630 (постсинаптическое уплотнение)	+
Участки перекодирования в прочих белках						
<i>astn1</i>	астрогактин 1	K935E	TLTYPAYIASLLDSGA[E]RMAAGVR	-	PXD005630 (синапсомы)	+
<i>astn1</i>	астрогактин 1	K935R	TLTYPAYIASLLDSGA[R]	-	PXD005630 (синапсомы, постсинаптическое уплотнение)	+
<i>nrg3b</i>	нейрегулин 3b	T10A	TAIGA[A] METMTLEEPGGEQASPRAPGPLR, MSERTALGA[A] METMTLEEPGGEQASPR	-	PXD005630 (синапсомы, постсинаптическое уплотнение); PXD030733 (мозг)	-
<i>rim2b</i>	регулятор экзоцитоза синаптической мембраны 2b	S489G	L[G]STYSMSVQSER, SSSDSDVSDVSAMSSASRL[G] STYSMSVQSER	+	PXD016847 (мозг); PXD005630 (постсинаптическое уплотнение)	-

Как указывалось выше, классический и наиболее хорошо изученный пример перекодирования белков млекопитающих — замены в субъединицах глутаматных рецепторов NMDA-типа, среди которых замена Q→R влияет на проводимость составляемых ими ионных каналов и является необходимой для развития и существования нервной системы организма. При этом существующие подходы к получению панорамных протеомов не дают возможности надежно зарегистрировать эту замену. Однако в генах глутаматных рецепторов указанного типа есть другие участки редактирования, которые хорошо выявлялись в протеомах млекопитающих [6].

Гомологичные белкам млекопитающих, местами идентичные по последовательности субъединицы рецепторов *D. rerio* также оказались перекодированными (7 из 10 обнаруженных участков перекодирования). В списке обнаруженных перекодированных сайтов имеются участки флип- и флоп-изоформ альтернативного сплайсинга [37] продуктов генов *gria2a*, *gria2b*, *gria4a* и *gria4b* (табл 2). Такие изоформы хорошо известны у разных позвоночных животных [37]. К обнаруженным заменам R→G, характерным для 760–766 положений парало-гов, в зависимости от конкретного гена, которые также хорошо детектировались у млекопитающих, добавилась замена K493R в продукте гена *gria4b* (масс-спектр представлен на рис. 1). Гомологичные сайты перекодирования не были выявлены в других организмах.

Что касается других участков перекодирования, наблюдаемых у млекопитающих, то у *D. rerio* в основном они не наблюдаются и на уровне транскриптома [14]. Исключением является замена Q→G в продукте гена *cadpsa*, наблюдаемая также в эдитомах и протеомах мыши и человека. Тем не менее в белках рыбки мы этой замены не нашли.

В эдитомах *D. rerio* ранее обнаружили много других кодирующих замен, отсутствовавших у млекопитающих [14]. Мы смогли надежно идентифицировать 3 таких участка в трех белках соответственно. Примечательно, что все 3 участка находились в тех частях молекул, которые не удалось разрешить с помощью систем предсказания пространственной структуры белковых молекул, таких как AlphaFold 2 [38] и Swiss-model [39], ввиду отсутствия достаточно-го сходства с экспериментально определенными структурами гомологов.

Астротактин 1 (*astn1*) характеризовался заменами лизина на аргинин или глутаминовую кислоту в положении 935. Этот трансмембранный рецептор представляет собой регулятор

адгезии нейронов, участвующий в миграции незрелых нейробластов во время развития головного мозга [40]. В составе внеклеточного участка рецептора имеются домены, подобные эпидермальному фактору роста, а также фибронектиновый домен. Участок, в котором содержится перекодированный остаток, располагается во внеклеточной части белка за пределами указанных доменов между двумя спиралями, предположительно, в участке, необходимом для взаимодействия с лигандами. На это косвенно указывает близкое расположение участков гликозилирования. Перекодированный остаток лизина экспонирован, не скрыт другими структурами. Интересно, что этот остаток более или менее консервативен и также находится в ортологах млекопитающих (чего тем не менее недостаточно для предсказания фолдинга этой части белка), но у них перекодированию не подлежит. Оценка влияния замены на стабильность с помощью трех использованных программ дала противоречивые, разнонаправленные результаты. Можно предположить, что замена лизина незначительно влияет на конформацию белка, однако может менять сродство взаимодействия с потенциальными лигандами.

Нейрегулин 3b (*neu3b*) — еще один нейрональный трансмембранный белок, участвующий в онтогенезе нервной ткани. Нейрегулин 3 также характеризуется некоторыми свойствами эпидермального фактора роста: у млекопитающих его ортолог связывает один из EGF-рецепторов [41]. Перекодирование T→A обнаружено в положении 10 в самом N-конце этой молекулы. Как это часто бывает, N-концевая часть молекулы нейрегулина характеризуется неструктурированностью. Она экспонирована во внеклеточное пространство. Два использованных метода предсказания влияния замены на структуру, MUPro [34] и i-Stable [35], указывали на уменьшение стабильности белка после замены. I-Mutant [33] указывал на отсутствие разницы в стабильности белка до и после замены. Наблюдаемая замена, по-видимому, как и в случае астротактина, существенно не влияет на пространственную структуру молекулы, но может воздействовать на межбелковые взаимодействия. В отличие от предыдущего случая перекодирования в астротактине, N-конец нейрегулина 3 не консервативен и отличается по последовательности ортологов млекопитающих.

Если астротактин 1 и нейрегулин 3 обладают некоторой общностью функций, обеспечивая адгезию и другие рецепторные взаимодействия развивающихся нейронов, то функции третьего перекодированного белка,

не относящегося к глутаматным рецепторам, отличаются. Продукт гена *rims2b* локализован вблизи пресинаптической мембраны, ассоциирован с пресинаптическими везикулами и, по-видимому, вовлечен в кальций-зависимый экзоцитоз, т.е. в работу синапса. Замена S489G находится в неконсервативном участке этого белка, отсутствующем у млекопитающих, поэтому информация по его трехмерной структуре отсутствует. Три использованных метода предсказания влияния замен на структуру белков указывали на высокую вероятность снижения стабильности белка после замены.

Интересно, что белки пресинаптической мембраны – участники того же каскада экзоцитоза, включая ортолог упомянутого выше продукта гена *cadpsa*, интенсивно перекодируются в нервной системе плодовой мушки [12]. Есть предположение, что редактирование РНК в этом пойкилотермном организме вносит вклад в адаптацию нервной системы к работе при изменяющихся температурах [42]. Гипотетически можно предполагать нечто подобное у пойкилотермного позвоночного *D. rerio*, хотя для проверки этой гипотезы требуются объемные эксперименты с трансгенными моделями *in vivo*.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Редактирование РНК ферментами ADAR – эволюционно древний клеточный процесс, присущий большинству эуметазоев. В процессе эволюции дезаминирование аденозинов, которое осуществляют ферменты, функционально разделилось по двум направлениям. Во-первых, это инактивация потенциально иммуногенных дуплексов РНК, а во-вторых – перекодирование некоторых белков с внесением аминокислотных замен в последовательность. Значимость этого перекодирования на первый взгляд вызывает удивление, ведь функциональные замены аминокислот могли бы сформироваться в процессе мутаций на геномном уровне, а для модулирования функции белка существует большое число посттрансляционных модификаций. Однако подобный способ модификации последовательности и функции некоторых белков закрепился в процессе эволюции и используется, например, для внесения регуляции по ходу онтогенеза.

Мы систематически исследуем перекодирование белков на уровне протеома в разных организмах. Всего 10 сайтов перекодирования

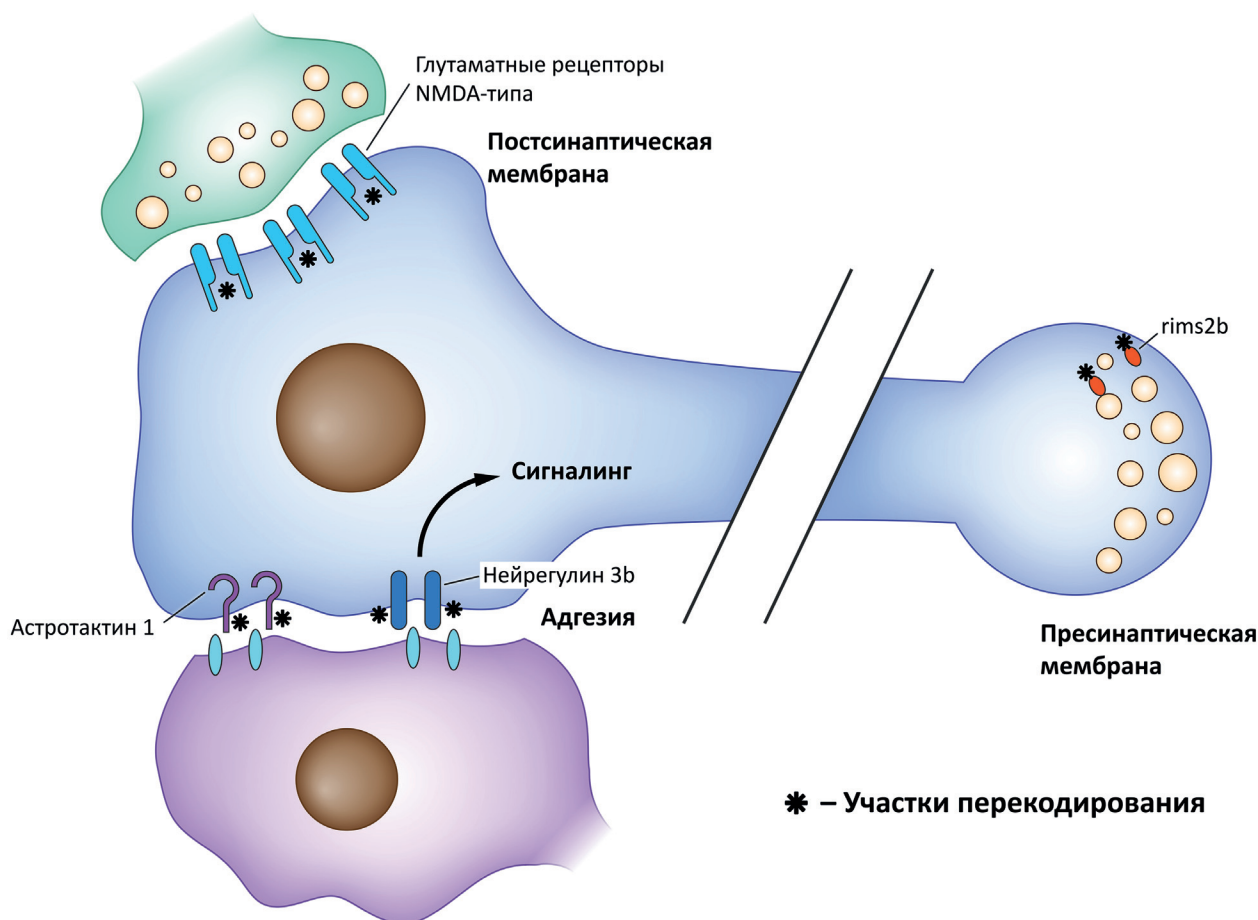


Рис. 2. Предполагаемая локализация перекодированных белков в нейроне *D. rerio*

обнаружены при анализе 6 наборов данных по модельной рыбке *D. rerio*. Отметим, что, судя по литературным данным, перекодирование мРНК в этом организме выражено несколько менее масштабно, чем у млекопитающих. Большая часть перекодирования обнаружена в субъединицах глутаматных рецепторов. Следует полагать, что перекодирование глутаматных рецепторов за счет редактирования РНК консервативно у позвоночных. В трех белках выявлены участки перекодирования, характерные, по имеющимся данным, только у *D. rerio*. Несмотря на то, что эти 3 аминокислотные замены вряд ли существенно меняют структуру белка, они могут быть функциональными, влияя на межмолекулярные взаимодействия. Свежим примером может быть незначимая на первый взгляд замена I→V в альфа-коагомере человека, модулирующая злокачественный потенциал рака печени [9]. Интересно, что все 3 специфичные для рыбы аминокислотные замены вследствие перекодирования оказались в неконсервативных в отношении остальных позвоночных частях белков. Вероятно, такое специфичное для таксона (впрочем, неизвестно, насколько консервативное, например, среди костных рыб) перекодирование более совместимо с эволюционно молодыми, изменяющимися частями белков. Отметим, что обоснованные суждения об эволюции в контексте редактирования РНК и связанного с ним перекодирования, все же следует оставить для транскриптомных работ, где у авторов больше возможностей сравнивать разные организмы [43]. Предполагаемое расположение перекодированных белков в нейроне *D. rerio* проиллюстрировано на рис. 2.

Продолжением данной работы может быть экспериментальная проверка гипотез о функциональной значимости найденных в белках адгезии и синаптической мембраны участков редактирования. Кроме того, для данного мо-

дельного объекта представлено мало объемных протеомных данных по сравнению, например, с данными по мышам и человеку, и в этом направлении также можно продолжить работу. К настоящему моменту наиболее результативным, с точки зрения редактирования РНК, был набор данных от выделенных компонентов синапса, к сожалению, полученный с низким разрешением тандемных спектров [21]. Получение более качественных протеомных данных по разным клеткам и тканям *D. rerio* может расширить наше представление о перекодировании белков рыбки за счет редактирования РНК ферментами ADAR.

Вклад авторов. Ш.Ш. Насаев, А.С. Копейкина – составление базы данных участков перекодирования для протеомного поиска, проведение поиска, анализ пространственной структуры, оформление результатов; К.Г. Кузнецова, Л.И. Левицкий – настройка серии поисковых методов повторной обработки данных, написание статьи; С.А. Мошковский – идея работы, экспертный анализ результатов, написание статьи.

Благодарности. Авторы благодарят Центр коллективного пользования Федерального научно-клинического центра физико-химической медицины за предоставление вычислительных ресурсов для данного исследования.

Финансирование. Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда (грант № 20-15-00072).

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

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

Дополнительные материалы. Приложение к статье опубликовано на сайте журнала «Биохимия» (<https://biochemistrymoscow.com>).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Goncharov, A. O., Shender, V. O., Kuznetsova, K. G., Kliuchnikova, A. A., and Moshkovskii, S. A. (2022) Interplay between A-to-I editing and splicing of RNA: A potential point of application for cancer therapy, *Int. J. Mol. Sci.*, **23**, 5240, doi: 10.3390/ijms23095240.
- Luciano, D. J., Mirsky, H., Vendetti, N. J., and Maas, S. (2004) RNA editing of a miRNA precursor, *RNA*, **10**, 1174-1177, doi: 10.1261/rna.7350304.
- Goncharov, A. O., Kliuchnikova, A. A., Nasaev, S. S., and Moshkovskii, S. A. (2019) RNA editing by ADAR adenosine deaminases: from molecular plasticity of neural proteins to the mechanisms of human cancer, *Biochemistry (Moscow)*, **84**, 896-904, doi: 10.1134/S0006297919080054.
- Liscovitch-Brauer, N., Alon, S., Porath, H. T., Elstein, B., Unger, R., et al. (2017) Trade-off between transcriptome plasticity and genome evolution in cephalopods, *Cell*, **169**, 191-202.e111, doi: 10.1016/j.cell.2017.03.025.
- Kuznetsova, K. G., Kliuchnikova, A. A., Pina, I. U., Chernobrovkin, A. L., Novikova, S. E., et al. (2018) Proteogenomics of adenosine-to-inosine RNA editing

- in the fruit fly, *J. Proteome Res.*, **17**, 3889-3903, doi: 10.1021/acs.jproteome.8b00553.
6. Levitsky, L. I., Kliuchnikova, A. A., Kuznetsova, K. G., Karpov, D. S., Ivanov, M. V., et al. (2019) Adenosine-to-inosine RNA editing in mouse and human brain proteomes, *Proteomics*, **19**, e1900195, doi: 10.1002/pmic.201900195.
 7. Higuchi, M., Maas, S., Single, F. N., Hartner, J., Rozov, A., et al. (2000) Point mutation in an AMPA receptor gene rescues lethality in mice deficient in the RNA-editing enzyme ADAR2, *Nature*, **406**, 78-81, doi: 10.1038/35017558.
 8. Jain, M., Weber, A., Maly, K., Manjaly, G., Deek, J., et al. (2022) A-to-I RNA editing of Filamin A regulates cellular adhesion, migration and mechanical properties, *FEBS J.*, **289**, 4580-4601, doi: 10.1111/febs.16391.
 9. Song, Y., An, O., Ren, X., Chan, T. H. M., Tay, D. J. T., et al. (2021) RNA editing mediates the functional switch of COPA in a novel mechanism of hepatocarcinogenesis, *J. Hepatol.*, **74**, 135-147, doi: 10.1016/j.jhep.2020.07.021.
 10. Buchumenski, I., Roth, S. H., Kopel, E., Katsman, E., Feiglin, A., et al. (2021) Global quantification exposes abundant low-level off-target activity by base editors, *Genome Res.*, **31**, 2354-2361, doi: 10.1101/gr.275770.121.
 11. Moshkovskii, S. A., Ivanov, M. V., Kuznetsova, K. G., and Gorshkov, M. V. (2018) Identification of single amino acid substitutions in proteogenomics, *Biochemistry (Moscow)*, **83**, 250-258, doi: 10.1134/S0006297918030057.
 12. Kliuchnikova, A. A., Goncharov, A. O., Levitsky, L. I., Pyatnitskiy, M. A., Novikova, S. E., et al. (2020) Proteome-wide analysis of ADAR-mediated messenger RNA editing during fruit fly ontogeny, *J. Proteome Res.*, **19**, 4046-4060, doi: 10.1021/acs.jproteome.0c00347.
 13. Peng, X., Xu, X., Wang, Y., Hawke, D. H., Yu, S., et al. (2018) A-to-I RNA editing contributes to proteomic diversity in cancer, *Cancer Cell*, **33**, 817-828 e817, doi: 10.1016/j.ccell.2018.03.026.
 14. Buchumenski, I., Holler, K., Appelbaum, L., Eisenberg, E., Junker, J. P., et al. (2021) Systematic identification of A-to-I RNA editing in zebrafish development and adult organs, *Nucleic Acids Res.*, **49**, 4325-4337, doi: 10.1093/nar/gkab247.
 15. Ribas, L., and Piferrer, F. (2014) The zebrafish (*Danio rerio*) as a model organism, with emphasis on applications for finfish aquaculture research, *Rev. Aquaculture*, **6**, 209-240, doi: 10.1111/raq.12041.
 16. UniProt, C. (2021) UniProt: the universal protein knowledgebase in 2021, *Nucleic Acids Res.*, **49**, D480-D489, doi: 10.1093/nar/gkaa1100.
 17. Cingolani, P., Platts, A., Wang, L. L., Coon, M., Nguyen, T., et al. (2012) A program for annotating and predicting the effects of single nucleotide polymorphisms, SnpEff: SNPs in the genome of *Drosophila melanogaster* strain w¹¹¹⁸; iso-2; iso-3, *Fly (Austin)*, **6**, 80-92, doi: 10.4161/fly.19695.
 18. Howe, K., Clark, M. D., Torroja, C. F., Tarrance, J., Berthelot, C., et al. (2013) The zebrafish reference genome sequence and its relationship to the human genome, *Nature*, **496**, 498-503, doi: 10.1038/nature12111.
 19. Goloborodko, A. A., Levitsky, L. I., Ivanov, M. V., and Gorshkov, M. V. (2013) Pyteomics – a Python framework for exploratory data analysis and rapid software prototyping in proteomics, *J. Am. Soc. Mass Spectrom.*, **24**, 301-304, doi: 10.1007/s13361-012-0516-6.
 20. Deutsch, E. W., Bandeira, N., Sharma, V., Perez-Riverol, Y., Carver, J. J., et al. (2020) The ProteomeXchange consortium in 2020: enabling “big data” approaches in proteomics, *Nucleic Acids Res.*, **48**, D1145-D1152, doi: 10.1093/nar/gkz984.
 21. Bayes, A., Collins, M. O., Reig-Viader, R., Gou, G., Goulding, D., et al. (2017) Evolution of complexity in the zebrafish synapse proteome, *Nat. Commun.*, **8**, 14613, doi: 10.1038/ncomms14613.
 22. Watchon, M., Luu, L., Robinson, K. J., Yuan, K. C., De Luca, A., et al. (2021) Sodium valproate increases activity of the sirtuin pathway resulting in beneficial effects for spinocerebellar ataxia-3 *in vivo*, *Mol. Brain*, **14**, 128, doi: 10.1186/s13041-021-00839-x.
 23. Faria, M., Prats, E., Gomez-Canela, C., Hsu, C. Y., Arick, M. A., 2nd, et al. (2019) Therapeutic potential of N-acetylcysteine in acrylamide acute neurotoxicity in adult zebrafish, *Sci. Rep.*, **9**, 16467, doi: 10.1038/s41598-019-53154-w.
 24. Nonnis, S., Angiulli, E., Maffioli, E., Frabetti, F., Negri, A., et al. (2021) Acute environmental temperature variation affects brain protein expression, anxiety and explorative behaviour in adult zebrafish, *Sci. Rep.*, **11**, 2521, doi: 10.1038/s41598-021-81804-5.
 25. Maffioli, E., Angiulli, E., Nonnis, S., Grassi Scalvini, F., Negri, A., et al. (2022) Brain proteome and behavioural analysis in wild type, BDNF^{+/-} and BDNF^{-/-} adult Zebrafish (*Danio rerio*) exposed to two different temperatures, *Int. J. Mol. Sci.*, **23**, 5606, doi: 10.3390/ijms23105606.
 26. Hulstaert, N., Shofstahl, J., Sachsenberg, T., Walzer, M., Barsnes, H., et al. (2020) ThermoRawFileParser: modular, scalable, and cross-platform RAW file conversion, *J. Proteome Res.*, **19**, 537-542, doi: 10.1021/acs.jproteome.9b00328.
 27. Levitsky, L. I., Ivanov, M. V., Lobas, A. A., Bubis, J. A., Tarasova, I. A., et al. (2018) IdentiPy: an extensible search engine for protein identification in shotgun proteomics, *J. Proteome Res.*, **17**, 2249-2255, doi: 10.1021/acs.jproteome.7b00640.
 28. Ivanov, M. V., Levitsky, L. I., Bubis, J. A., and Gorshkov, M. V. (2019) Scavenger: a versatile postsearch validation algorithm for shotgun proteomics based on gradient boosting, *Proteomics*, **19**, e1800280, doi: 10.1002/pmic.201800280.
 29. Kolbowski, L., Combe, C., and Rappsilber, J. (2018) xiSPEC: web-based visualization, analysis and

- sharing of proteomics data, *Nucleic Acids Res.*, **46**, W473-W478, doi: 10.1093/nar/gky353.
30. Lane, L., Argoud-Puy, G., Britan, A., Cusin, I., Duek, P. D., et al. (2012) neXtProt: a knowledge platform for human proteins, *Nucleic Acids Res.*, **40**, D76-83, doi: 10.1093/nar/gkr1179.
 31. Madden, T. L., Tatusov, R. L., and Zhang, J. (1996) Applications of network BLAST server, *Methods Enzymol.*, **266**, 131-141, doi: 10.1016/s0076-6879(96)66011-x.
 32. Schrödinger, L. L. C., and DeLano, W. *PyMOL*, URL: <https://www.pymol.org/pymol>.
 33. Capriotti, E., Fariselli, P., and Casadio, R. (2005) I-Mutant2.0: predicting stability changes upon mutation from the protein sequence or structure, *Nucleic Acids Res.*, **33**, W306-310, doi: 10.1093/nar/gki375.
 34. Cheng, J., Randall, A., and Baldi, P. (2006) Prediction of protein stability changes for single-site mutations using support vector machines, *Proteins*, **62**, 1125-1132, doi: 10.1002/prot.20810.
 35. Chen, C. W., Lin, J., and Chu, Y. W. (2013) iStable: off-the-shelf predictor integration for predicting protein stability changes, *BMC Bioinformatics*, **14** Suppl 2, S5, doi: 10.1186/1471-2105-14-S2-S5.
 36. Levitsky, L. I., Kuznetsova, K. G., Kliuchnikova, A. A., Ilina, I. Y., Goncharov, A. O., et al. (2022) Validating amino acid variants in proteogenomics using sequence coverage by multiple reads, *J. Proteome Res.*, **21**, 1438-1448, doi: 10.1021/acs.jproteome.2c00033.
 37. Pei, W., Huang, Z., and Niu, L. (2007) GluR3 flip and flop: differences in channel opening kinetics, *Biochemistry*, **46**, 2027-2036, doi: 10.1021/bi062213s.
 38. Jumper, J., Evans, R., Pritzel, A., Green, T., Figurnov, M., et al. (2021) Highly accurate protein structure prediction with AlphaFold, *Nature*, **596**, 583-589, doi: 10.1038/s41586-021-03819-2.
 39. Waterhouse, A., Bertoni, M., Bienert, S., Studer, G., Tauriello, G., et al. (2018) SWISS-MODEL: homology modelling of protein structures and complexes, *Nucleic Acids Res.*, **46**, W296-W303, doi: 10.1093/nar/gky427.
 40. Adams, N. C., Tomoda, T., Cooper, M., Dietz, G., and Hatten, M. E. (2002) Mice that lack astrotactin have slowed neuronal migration, *Development*, **129**, 965-972, doi: 10.1242/dev.129.4.965.
 41. Miyagi, T., Wada, T., Yamaguchi, K., Hata, K., and Shiozaki, K. (2008) Plasma membrane-associated sialidase as a crucial regulator of transmembrane signalling, *J. Biochem.*, **144**, 279-285, doi: 10.1093/jb/mvn089.
 42. Rieder, L. E., Savva, Y. A., Reyna, M. A., Chang, Y. J., Dorsky, J. S., et al. (2015) Dynamic response of RNA editing to temperature in *Drosophila*, *BMC Biol.*, **13**, 1, doi: 10.1186/s12915-014-0111-3.
 43. Moldovan, M., Chervontseva, Z., Bazykin, G., and Gelfand, M. S. (2020) Adaptive evolution at mRNA editing sites in soft-bodied cephalopods, *PeerJ*, **8**, e10456, doi: 10.7717/peerj.10456.

PROTEOMIC ANALYSIS OF ZEBRAFISH PROTEIN RECODING VIA MESSENGER RNA EDITING BY ADAR ADENOSINE DEAMINASES

S. S. Nasaev^{1,2}, A. S. Kopeykina³, K. G. Kuznetsova⁴, L. I. Levitsky⁵, and S. A. Moshkovskii^{1,3*}

¹ Federal Research and Clinical Center of Physical-Chemical Medicine, 119435 Moscow, Russia; e-mail: moshrfi@gmail.com

² Institute of Biomedical Chemistry, 119121 Moscow, Russia

³ Pirogov Russian National Research Medical University, 117997 Moscow, Russia

⁴ University of Bergen, NO-5020 Bergen, Norway

⁵ V. L. Talrose Institute for Energy Problems of Chemical Physics,

N.N. Semenov Federal Research Center for Chemical Physics, Russian Academy of Sciences, 119334 Moscow, Russia

RNA editing by adenosine deaminases of ADAR family may lead to protein recoding, since inosine converted from adenosine in mRNA is complementary to cytosine. Editing of codons introduces amino acid substitutions into translated proteins. Proteome recoding may have functional consequences, which are described in many animals including humans. Using protein recoding database derived from publicly available transcriptome data, recoding sites were identified for the first time in shotgun proteomes of zebrafish. Out of more than a hundred predicted recoding events, ten substitutions were identified in six datasets. Seven of them belonged to recoding sites in AMPA-type glutamate receptor subunits whose recoding is well-described and conservative among vertebrates. Three sites were specific for zebrafish proteins. Among them, there are transmembrane receptors astrotactin 1 and neuregulin 3b involved in neuronal adhesion and signalling, as well as *rim52b* gene product, a presynaptic membrane protein, which participated in neurotransmitter release. Further studies are needed to elucidate function of recoding said three proteins in zebrafish.

Keywords: proteogenomics, shotgun proteomics, zebrafish, ADAR, RNA-dependent adenosine deaminase, RNA editing

КАТИОННЫЙ КАНАЛЬНЫЙ РОДОПСИН ИЗ ВОДОРΟΣЛИ *Platymonas subcordiformis* КАК ПЕРСПЕКТИВНЫЙ ОПТОГЕНЕТИЧЕСКИЙ ИНСТРУМЕНТ

© 2022 О.С. Иджилова^{1,2}, Г.Р. Смирнова^{1,2}, Л.Е. Петровская³, Д.А. Колотова^{1,2},
М.А. Островский², А.Ю. Малышев^{1*}

¹ Институт высшей нервной деятельности и нейрофизиологии РАН,
117485 Москва, Россия; электронная почта: malyshev@ihna.ru

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

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

Поступила в редакцию 27.09.2022

После доработки 10.10.2022

Принята к публикации 10.10.2022

Развитие оптогенетики в значительной степени зависит от разработки новых молекулярных инструментов – светоактивируемых белков. Используя культивируемые нейроны гиппокампа, мы провели сравнение двух светоактивируемых катионных каналов: классического канального родопсина-2 из *Chlamydomonas reinhardtii* (CrChR2) и недавно описанного канального родопсина, выделенного из водоросли *Platymonas subcordiformis* (PsChR2). Мы показали, что PsChR2 способен обеспечить генерацию потенциалов действия при импульсной световой стимуляции нейронов вплоть до частот в 40–50 Гц, в то время как верхний предел для CrChR2 составляет 20–30 Гц. Важным преимуществом PsChR2 по сравнению с классическим CrChR2 является сдвиг спектра его возбуждения в синюю область. Это открывает возможность для эффективного использования PsChR2 в экспериментах, построенных по принципу «all-optical electrophysiology», для которых необходимо разнести максимумы спектров канальных родопсинов, используемых для стимуляции нейрона, и спектров возбуждения различных красных флуоресцентных зондов. Мы провели сравнение ответов нейронов (генерации потенциалов действия), экспрессирующих CrChR2 и PsChR2, на световые стимулы с длиной волны 530 и 550 нм – наиболее часто используемые для возбуждения красных флуоресцентных зондов. Было показано, что свет с длиной волны 530 нм для нейронов, экспрессирующих PsChR2, гораздо (в 3,7 раза) менее эффективен, чем для экспрессирующих классический CrChR2. Свет же с длиной волны 550 нм даже при использованной нами максимальной интенсивности вообще не стимулирует нейроны, экспрессирующие любой из изученных опсинов. Это означает, что канальный родопсин PsChR2, выделенный из водоросли *P. subcordiformis*, и по своим частотным характеристикам, и по возможности его использования для стимуляции нейрона коротковолновым (синим, 470 нм) светом и одновременной регистрации различных физиологических процессов с помощью флуоресцентных зондов может рассматриваться как весьма перспективный оптогенетический инструмент.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: оптогенетика, нейрон, бактериальный опсин, канальный родопсин, светоиндуцированный ток, пэтч-кламп, внутриклеточная регистрация, *Platymonas subcordiformis*.

DOI: 10.31857/S0320972522110082, EDN: LVZUMG

ВВЕДЕНИЕ

Микробные родопсины – светочувствительные ретиналь-содержащие белки – являются наиболее универсальными и широко применяемыми оптогенетическими инстру-

ментами [1]. При их экзогенной экспрессии в клетках млекопитающих они сохраняют свою функциональную активность и могут служить в качестве светуправляемых ионных каналов или насосов [2]. Благодаря использованию микробных родопсинов, в частности, стала

Принятые сокращения: ПД – потенциал действия; CrChR2 – канальный родопсин из *Chlamydomonas reinhardtii*; НЕК 293 – human embryonic kidney cells, иммортализованная модельная линия клеток эмбриональной почки человека; PsChR2 – канальный родопсин из *Platymonas subcordiformis*.

* Адресат для корреспонденции.

возможной малоинвазивная регуляция активности нейронов с высоким временным и пространственным разрешением как *in vitro* [3, 4], так и *in vivo* [5].

Канальный родопсин-2, клонированный из одноклеточной водоросли *Chlamydomonas reinhardtii* (*CrChR2*) [2], наиболее широко используется в оптогенетике. Он не нуждается для функционирования в дополнительных компонентах, обладает относительно быстрой кинетикой, высоким сродством с мембраной и практически не вызывает побочных эффектов. Однако во многих случаях всего этого оказывается недостаточно. За годы развития оптогенетики были созданы мутантные варианты канальных родопсинов, специализированные под конкретные задачи [6, 7]. Например, были созданы опсины с ускоренной кинетикой, сниженной десенситизацией или модифицированным спектром возбуждения. Особенно большой интерес представляют сообщения об открытии новых микробных опсинов, которые зачастую представляют собой практически готовые инструменты для эффективного решения тех или иных методических научных задач.

Сравнительно недавно был описан новый канальный родопсин, выделенный из другой хлорофитовой водоросли, *Platymonas subcordiformis* [8], который далее будем обозначать как *PsChR2*. Он отличается от *CrChR2* по двум существенным для нас параметрам: более быстрое восстановление пиковой амплитуды фототока и смещённый в коротковолновую область относительно *CrChR2* спектр поглощения [8]. Это делает *PsChR2* потенциальным кандидатом на роль оптогенетического инструмента в экспериментах, построенных по принципу «all-optical electrophysiology», в которых с помощью света осуществляется не только стимуляция нейронов, но одновременно и оптическая регистрация с применением флуоресцентных зондов [9]. Существенным условием в таких экспериментах является то, что спектры возбуждения опсина и флуоресцентного зонда или вовсе не должны перекрываться, или могут перекрываться в самой небольшой степени. В таком случае свет, активирующий зонд, не будет влиять на стимуляцию физиологической активности нейрона.

В данной работе мы исследовали функциональные свойства *PsChR2*, экспрессированного в первичных культурах нейронов гиппокампа, в сравнении с *CrChR2* в качестве контроля. Мы выяснили, что *PsChR2* в нейронах обеспечивает существенно лучшие частотные характеристики стимуляции по сравнению с *CrChR2* в диапазоне 20–50 Гц. Мы показали,

что обычно применяемый для возбуждения флуоресцентных зондов свет с длиной волны 530 нм способен стимулировать нейроны, экспрессирующие оба опсина – как *CrChR2*, так и *PsChR2*. В то же время более длинноволновый свет – 550 нм – не вызывал практически никакого ответа в нейронах, несущих оба изученных опсина. Это обстоятельство следует учитывать при планировании оптогенетических экспериментов.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Аденоассоциированные вирусы серотипа 2 (pAAV-CAG-*PsChR2*-Venus и pAAV-CAG-*CrChR2*-Venus) были синтезированы в ФГБУ Федеральном центре мозга и нейротехнологий ФМБА России. Титры вирусов составляли $5,5 \times 10^9$ геномов/мкл и $7,2 \times 10^9$ геномов/мкл соответственно.

Приготовление первичных нейронных культур выполнялось по стандартной методике [10] из гиппокампа новорождённых мышат линии ICR на 0–2 постнатальный день. Выделение гиппокампа производили в холодном растворе модифицированной базовой среды для культивации клеток млекопитающих (DMEM, «ThermoFisher Scientific» США) с 15 мМ Hepes («Sigma-Aldrich», США). Гиппокампы были механически измельчены и перенесены в 0,08%-ный (w/v) раствор трипсина в DMEM, после чего в течение 15 мин при 37 °С происходила ферментативная дезагрегация ткани. После её окончания и центрифугирования раствор заменяли на инкубационную среду (см. ниже), клетки несколько раз ресуспендировали. Полученную суспензию одиночных клеток распределяли по лункам культуральных планшетов на 12-мм покровные стекла, покрытые поли-D-лизином («Sigma-Aldrich»). Культуры содержались в стерильном инкубаторе в нейробазальной среде Neurobasal™-A medium с добавлением B27™ и GlutaMAX™, согласно рекомендациям производителя («ThermoFisher Scientific»). В инкубаторе поддерживалась температура 37 °С, содержание углекислого газа – 5% и относительная влажность – 95%.

Вирусную трансдукцию культур клеток производили на 5–6 сутки *in vitro*. Культуру инкубировали в течение суток в 0,1%-ном растворе (v/v) вируса в инкубационной среде. После окончания инкубации среда была полностью обновлена.

Электрофизиологическая регистрация активности нейронов производилась на 14–20 сутки методом пэтч-кламп в конфигурации «целая

клетка» при комнатной температуре в режиме фиксации тока или фиксации потенциала. Сигнал регистрировался с помощью усилителя Multiclamp™ 700B с преобразовательной головкой CV-7B («Molecular Devices»), оцифровывался с помощью АЦП (аналогово-цифрового преобразователя) Axon™ Digidata® 1550A («Molecular Devices») с частотой дискретизации 10 кГц и после фильтрации (фильтр низких частот Бесселя, частота среза – 10 кГц) записывался на компьютер при помощи программного обеспечения pCLAMP™ 10 («Molecular Devices»).

Ванночка с культурой была закреплена на предметном столике эпифлуоресцентного микроскопа Olympus BX51WI («Olympus Corporation», Япония) и заполнена стандартным буфером Хэнкса с глюкозой и Hepes: 10 mM Glc; 10 mM Hepes; 139 mM NaCl; 5,3 mM KCl; 1,26 mM CaCl₂·(2H₂O); 0,5 mM MgCl₂·(6H₂O); 4,16 mM NaHCO₃; 0,34 mM Na₂HPO₄; 0,44 mM KH₂PO₄; 0,4 mM MgSO₄·(7H₂O) (pH 7,4). Пэтч-пипетка из боросиликатного стекла была заполнена раствором, имитирующим внутриклеточный, следующего состава: 140 mM глюконата калия; 10 mM Hepes; 5 mM KCl; 10 mM фосфокреатина; 4 mM Mg-ATP и 0,3 mM Na₂-GTP (pH 7,31). Соппротивление регистрирующего электрода при этом составляло 4–7 МОм.

Присутствие в пирамидном нейроне продукта экспрессии определялось по сигналу флуоресценции белка Venus. Световая стимуляция производилась с помощью трёх светодиодов: M470L2 (максимум 470 нм), M530L3 (максимум 530 нм) («Thorlabs Inc.», США) и pE-100 (максимум 550 нм) («CoolLED Ltd.», Великобритания), через объектив микроскопа.

Интенсивность освещения под объективом при различных токах питания диодов была предварительно измерена с помощью PM16-130 («Thorlabs Inc.»), и были построены калибровочные кривые, которые затем использовали для установки тока питания диода для достижения требуемой мощности светового стимула.

Во всех экспериментах поперечный размер светового пучка был максимально ограничен (примерно до 100 мкм в диаметре) при закрытой полевой диафрагме микроскопа, а пятно отцентрировано на сому клетки, чтобы минимизировать нецелевую стимуляцию соседних трансфицированных нейронов в культуре.

Анализ данных был выполнен с использованием пакета программ pCLAMP™ 10 и Python [11]. Нейроны, мембранный потенциал которых превышал –40 мВ, а также клетки, не способные стабильно генерировать потенциалы действия (ПД) при инъекции тока, были исключены из анализа.

Для статистического анализа данных использовали критерий Манна–Уитни и *t*-критерии Уэлча и Стьюдента (для нормально распределённых данных); для оценки нормальности распределения использовался критерий Шапиро–Уилка. В качестве статистических оценок везде приведены средние значения ± стандартные ошибки среднего, если не указано иное.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

В культурах, трансдуцированных обоими вирусами, наблюдался высокий уровень экспрессии флуоресцентного продукта как в нейронах, так и в небольшом количестве глиальных клеток. Все зарегистрированные светящиеся нейронные клетки отвечали деполяризацией на стимуляцию световым стимулом с длиной волны 470 нм. Максимум поглощения PsChR2 составляет 445 нм [8], однако нам показалось интересным сравнить ответы обоих опсинов на стимуляцию светом с длиной волны 470 нм, поскольку таким источником света по умолчанию оснащаются эпифлуоресцентные микроскопы, на базе которых, как правило, создаются электрофизиологические установки для проведения оптогенетических экспериментов *in vitro*. Интенсивность светового стимула в первой серии экспериментов подбиралась индивидуально для каждого нейрона как максимально возможная интенсивность, при которой стимул не приводил к генерации ПД. Таким образом, мы компенсировали возможную разницу в уровне экспрессии опсинов в разных клетках. В этой серии регистрировался входящий светоиндуцированный ток, вызванный активацией канального родопсина, в режиме фиксации потенциала (voltage clamp). Средняя интенсивность таких стимулов составила для PsChR2 $0,20 \pm 0,16$ мкВт/мм² ($n = 19$) и для CrChR2 – $0,25 \pm 0,13$ мкВт/мм² ($n = 16$) ($p = 0,34$; *t*-критерий Стьюдента). Типичная форма фототока, вызываемого световой стимуляцией нейронов, экспрессирующих канальный родопсин, представлена на рис. 1, а и б.

Ответ включает в себя быстрый пиковый компонент и медленный стационарный. Максимальные амплитуды стационарного компонента фототока, измеренные во время непрерывной стимуляции, в двух экспериментальных группах нейронов были близки и достоверно не различались: 320 ± 30 пА – для PsChR2 ($n = 19$) и 300 ± 40 пА – для CrChR2 ($n = 16$) ($p = 0,73$; *t*-критерий Стьюдента). В то время как пиковые значения ответа были достоверно выше в нейронах, экспрессирующих CrChR2, по срав-

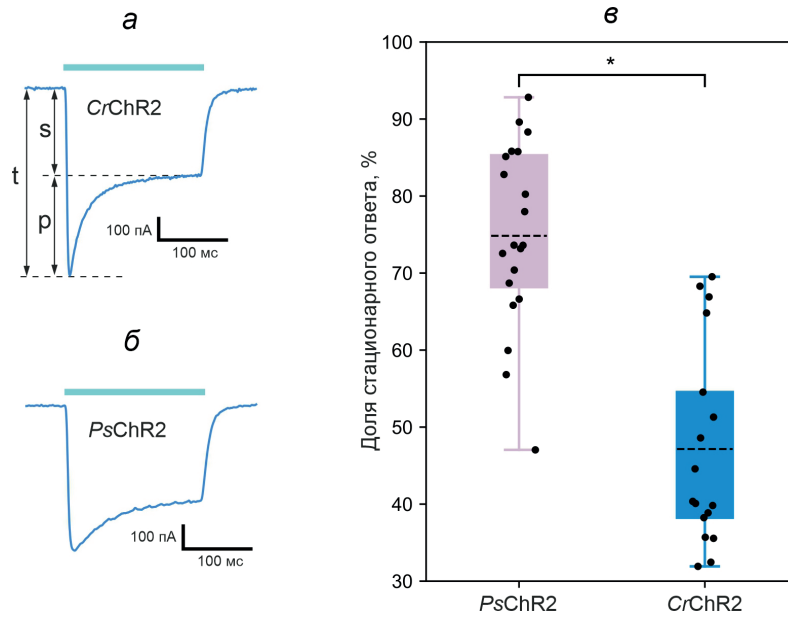


Рис. 1. Кинетические характеристики трансмембранных токов, индуцированных световой стимуляцией культивируемых нейронов гиппокампа, экспрессирующих родопсины *CrChR2* и *PsChR2*. *a* и *б* – Примеры внутриклеточной записи фототоков в нейронах, экспрессирующих каналы родопсины в ответ на световой стимул длительностью 200 мс с длиной волны 470 нм (стимул показан горизонтальной голубой полосой). *s* – Стационарный компонент ответа, *p* – пиковый компонент, *t* – весь ответ. *б* – Доля стационарного компонента фототока в общем ответе. Статистически достоверное различие, * $p < 0,001$; *t*-критерий Стьюдента

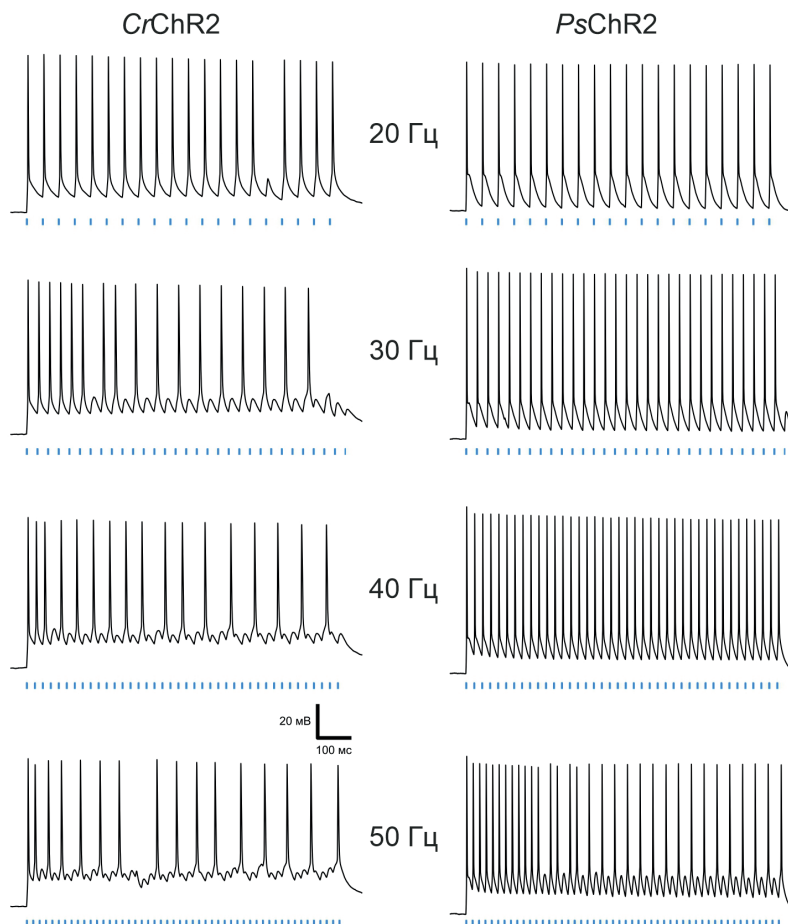


Рис. 2. Генерация потенциалов действия культивируемыми нейронами, экспрессирующими родопсины *CrChR2* и *PsChR2*, в ответ на импульсную стимуляцию короткими (3 мс) световыми импульсами, следующими с разной частотой (от 20 до 50 Гц). Световые импульсы схематически показаны синими вертикальными черточками

нению с ответами клеток с *PsChR2* (620 ± 80 пА и 420 ± 40 пА соответственно, $p < 0,05$; t -критерий Стьюдента). Такая разница обусловлена в том числе различным соотношением пиковой и стационарной компоненты ответа у двух исследованных нами канальных родопсинов (рис. 1, а и б). Вклад стационарной компоненты в общий ответ был значительно и достоверно выше у нейронов с *PsChR2* по сравнению с клетками с *CrChR2* ($75 \pm 3\%$ и $47 \pm 3\%$ соответственно, $p < 0,001$; t -критерий Стьюдента) (рис. 1, в). Следует отметить, что средние значения мембранных потенциалов покоя для этих групп клеток не различались (-59 ± 7 мВ – для *PsChR2* и -62 ± 8 мВ – для *CrChR2*, $p = 0,34$; t -критерий Стьюдента).

Импульсная стимуляция. Ранее было показано, что при стимуляции клеток НЕК 293 (иммортилизованная модельная линия клеток эмбриональной почки человека), экспрессирующих *PsChR2*, следующими друг за другом парными световыми стимулами ответ, вызванный вторым стимулом, восстанавливается гораздо лучше, чем при стимуляции клеток, экспрессирующих *CrChR2*, в широком диапазоне частот стимуляции [8]. В этой связи мы решили охарактеризовать максимальные частоты генерации потенциалов действия, которые можно индуцировать импульсной световой стимуляцией культивируемых нейронов гиппокампа, экспрессирующих *PsChR2*

и *CrChR2*. Интенсивность светового стимула в данных экспериментах подбиралась как пороговое для генерации ПД значение, умноженное на 2 (две реобазы). Нейроны обеих экспериментальных групп стабильно генерировали ПД в ответ на импульсную стимуляцию короткими световыми стимулами (3 мс) на частоте 5–20 Гц (рис. 2). При повышении частоты импульсов в ответах возникало всё больше и больше пропущенных ПД, причём в нейронах, экспрессирующих *PsChR2*, пропуски возникали при больших частотах следования световых стимулов (рис. 2). Частотные характеристики усреднённых ответов имели S-образную форму (рис. 3). В среднем частотном диапазоне (20–40 Гц) у нейронов, экспрессирующих *PsChR2*, доля успешных ПД была статистически значимо выше, чем у нейронов, экспрессирующих *CrChR2* ($p < 0,05$; критерий Манна–Уитни).

Ответы на световые стимулы зелёной области спектра. Существенной особенностью *PsChR2* является то, что спектр его возбуждения сдвинут в коротковолновую область по отношению к *CrChR2*, что делает его более подходящим кандидатом для проведения экспериментов, в которых стимуляция и регистрация активности нейронов на препарате происходит при помощи света с разной длиной волны. Поэтому мы задались целью проверить, насколько у нейронов, экспрессирующих *PsChR2* и *CrChR2*, раз-

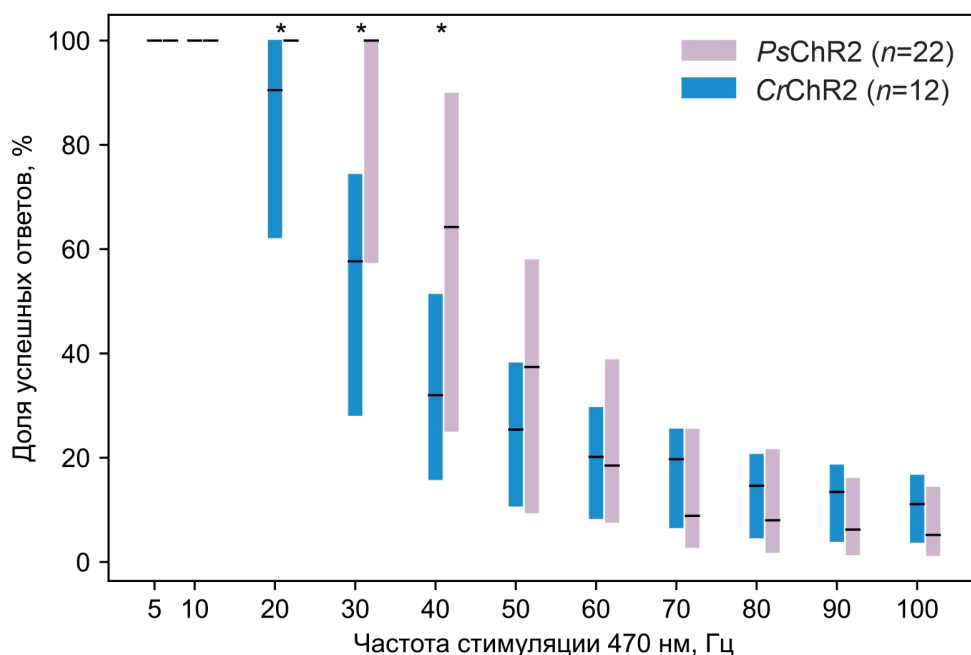


Рис. 3. Доля потенциалов действия, сгенерированных в ответ на импульсную стимуляцию, относительно общего количества поданных световых стимулов. Цветом закрашена область межквартильного размаха (ящик без усов), поперечные линии – медианы. Звёздочками отмечено наличие статистически значимого различия между распределениями по критерию Манна–Уитни ($p < 0,05$). При стимуляции на частотах 5 и 10 Гц все нейроны в обеих группах достигли 100%-ного количества «успешных» ответов

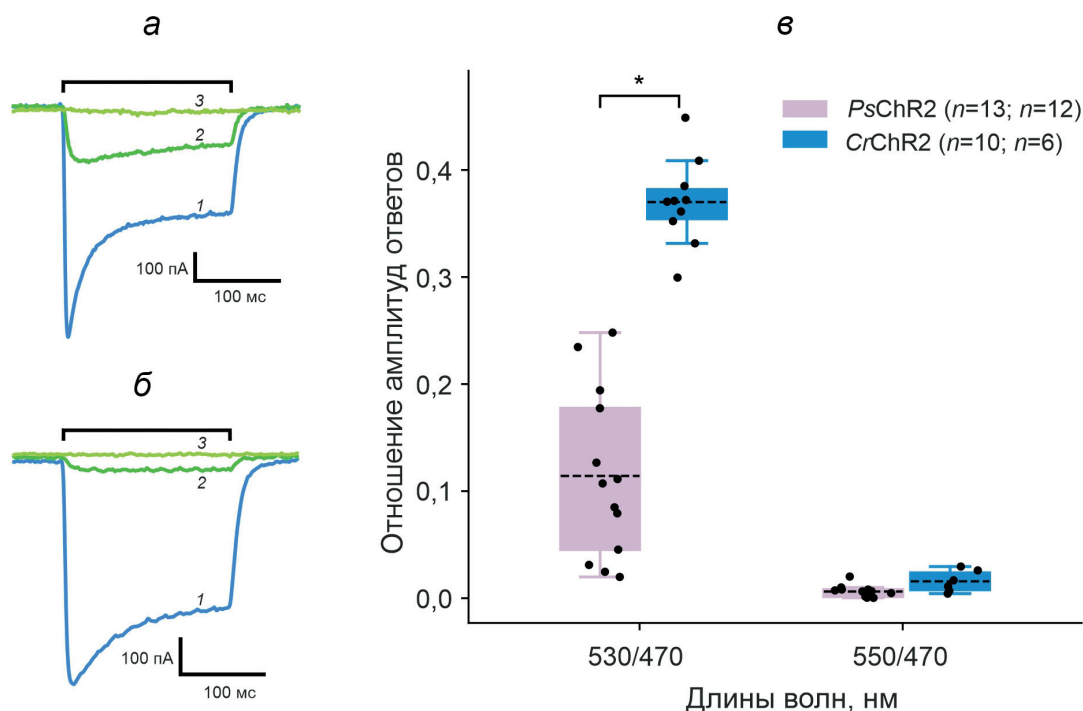


Рис. 4. Трансмембранные токи, индуцированные в культивируемых нейронах гиппокампа, экспрессирующих родопсины *CrChR2* и *PsChR2*, световыми стимулами с длиной волны 470, 530 и 550 нм одинаковой интенсивности. *a* и *б* – Примеры внутриклеточной записи фототоков в нейронах, экспрессирующих каналные родопсины, в ответ на световой стимул длительностью 200 мс с длинами волн 470 нм (1), 530 нм (2) и 550 нм (3) (в скобках указана цифра возле соответствующей кривой). Время светового стимула обозначено черной скобкой. *в* – Отношение амплитуд стационарного ответа на световые стимулы с длиной волны 530 нм и 550 нм к амплитуде ответа на стимул 470 нм. Статистически значимое различие, * $p < 0,01$; *t*-критерий Уэлча

личаются характеристики ответа на зелёный свет (530 нм и 550 нм), используемый обычно для имаджинга красных флуоресцентных белков, который для проведения вышеописанных экспериментов должен вызывать минимальную (или, в идеале, нулевую) активацию канального родопсина. Как и в предыдущей серии экспериментов, интенсивность светового стимула подбиралась индивидуально для каждого нейрона при длине волны 470 нм (как максимальная интенсивность, не вызывающая ПД), и затем стимул с той же абсолютной интенсивностью использовался при длине волны 530 и 550 нм. Фототоки регистрировались в режиме фиксации потенциала в ответ на световой стимул длительностью 200 мс.

Оказалось, что соотношение амплитуд 530/470 в группе *PsChR2* в 3,7 раза ниже, чем в группе *CrChR2* (*PsChR2*: $0,10 \pm 0,08$; *CrChR2*: $0,37 \pm 0,04$; $p < 0,01$; *t*-критерий Уэлча) (рис. 4). В данной серии экспериментов измерение амплитуды пикового ответа не проводилось, ввиду его практически полного отсутствия при стимуляции зелёным светом. При этом на стимуляцию светом с длиной волны 550 нм такой же интенсивности ответ клеток в обеих группах был минимальным (*PsChR2*: $0,006 \pm 0,005$; *CrChR2*: $0,014 \pm 0,009$; $p = 0,076$; *t*-критерий

Уэлча). Оба результата согласуются с измерениями спектров поглощения *CrChR2* и *PsChR2*, проведёнными ранее на клетках линии НЕК 293 [8]. Важно отметить, что при достаточно высокой интенсивности световой стимуляции (порядка 4–5 мкВт/мм²) удавалось индуцировать потенциалы действия в нейронах, экспрессирующих как *CrChR2*, так и *PsChR2*, в то время как свет с длиной волны 550 нм даже при максимальной интенсивности не приводил к надпороговой активации нейронов.

Апликация полностью-транс ретиналя не влияет на активность канальных родопсинов. В оригинальной статье, впервые описывающей свойства *PsChR2*, сообщалось, что культивирование нейронов, экспрессирующих данный канальный родопсин, в среде с повышенным содержанием полностью-транс ретиналя приводит к значительному увеличению амплитуды светоиндуцированного тока. В данной работе авторы, помимо 0,5 мкМ ацетата ретинила, который по умолчанию содержится в стандартной культуральной среде и служит для клеток источником полностью-транс ретиналя, дополнительно вносили в чашку ретиналь в полностью-транс форме до достижения его финальной концентрации 0,4 мкМ [8]. В этой связи мы решили проверить, не усиливает ли ответ

на свет нейронов, экспрессирующих канальные родопсины, добавление ретиналя непосредственно в культуральную чашку во время проведения электрофизиологического эксперимента, поскольку известно, что микробные родопсины способны быстро захватывать и ковалентно связывать ретиналь из окружающей среды [12]. Ответы нейронов на световой стимул с длиной волны 470 нм и длительностью 200 мс регистрировались до добавления 0,4 мкМ полностью-*транс* ретиналя, а также через 20 мин после добавления. Было найдено, что аппликация ретиналя значимо не повлияла на ответы клеток. Если принять амплитуду ответа, вызванного стимулом 470 нм, за единицу, то спустя 20 мин после аппликации полностью-*транс* ретиналя доля быстрого компонента ответа в нейронах, экспрессирующих *CrChR2*, составила $0,93 \pm 0,05$, тогда как в клетках с *PsChR2* — $0,87 \pm 0,05$. Доля постоянного медленного компонента ответа — $0,86 \pm 0,06$ и $0,82 \pm 0,06$ соответственно (все различия были статистически недостоверны, *t*-критерий Стьюдента).

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

PsChR2, предположительно, является одним из по крайней мере трёх типов рецепторов фототаксиса водоросли *P. subcordiformis*, и, как было показано ранее, по своей первичной структуре и свойствам этот белок схож с другими канальными родопсинами зелёных водорослей [8]. Тем не менее описанные здесь электрофизиологические свойства делают его особенным в этом ряду. Поэтому *PsChR2* и был выбран нами для изучения в целях дальнейшего применения в оптогенетических экспериментах. Мы показали, что, несмотря на сходство с «классическим» канальным родопсином *CrChR2*, *PsChR2* способен стабильно обеспечивать более высокую частоту потенциалов действия при импульсной световой стимуляции. По всей видимости, одним из объяснений этой особенности может являться ранее показанная в работе Govorunova et al. [8] пониженная десенситизация *PsChR2* в процессе освещения, что проявляется как меньшая доля быстрой компоненты в общем ответе на свет в наших экспериментах. При этом необходимо учитывать, что нейроны в культуре не являются зрелыми, поскольку их источником является мозг новорождённых животных, и по ряду причин они не могут развиваться полноценно. Как следствие, частоты генерации ПД свыше 50 Гц являются для них труднодостижимыми. Поэтому диапазон 20–50 Гц можно считать их

продуктивным рабочим диапазоном, и именно в этом диапазоне *PsChR2* обладает ощутимым преимуществом над *CrChR2*. Возможность световой стимуляции нейронов на этих частотах является ключевой для экспериментов с индукцией долговременной синаптической пластичности, а также для экспериментов по изучению особенностей и механизмов кодирования и передачи информации между нейронами.

Световые стимулы в нашей работе генерировались с помощью стандартного светодиода с максимумом излучения 470 нм и шириной спектра 40 нм, рутинно применяемого для активации *CrChR2* в оптогенетических экспериментах, в то время как максимум спектра активации *PsChR2*, измеренный в клетках НЕК 293, находится в области 445 нм [8]. Этим можно объяснить тот факт, что амплитуда светоиндуцированных токов в нейронах, экспрессирующих *PsChR2*, была практически такой же, как и в клетках с *CrChR2*. В то же время было показано, что при использовании светового стимула 440 нм *PsChR2* генерирует больший фототок, чем *CrChR2* при стимуляции светом с длиной волны 470 нм. Тем не менее мы показали, что, применяя стандартный диод 470 нм, всё равно можно успешно активировать *PsChR2*, достигая высоких частот генерации ПД.

Ранее на ооцитах *Xenopus laevis* было показано, что экзогенный канальный опсин *C. reinhardtii* более устойчив к деградации в присутствии связанного с ним хромофора полностью-*транс* ретиналя [13]. Длительное инкубирование клеток в среде с повышенной концентрацией ретиналя приводило к повышению уровня флуоресценции, связанной с опсином метки, а также к увеличению амплитуды фототока. Однако оставалось неизвестным, проявляется ли этот или сходный эффект другого механизма на более коротких временных масштабах инкубации, порядка десятков минут. Нам не удалось зафиксировать сколько-нибудь существенного влияния аппликации ретиналя на активность как *PsChR2*, так и *CrChR2*, экспрессируемых в культивируемых нейронах гиппокампа.

Одной из важных особенностей нового канального родопсина *PsChR2* является сдвиг спектра его возбуждения влево (в синюю область) по сравнению с классическим *CrChR2*. Это открывает возможности для использования *PsChR2* в экспериментах, построенных по принципу «all-optical electrophysiology», когда стимуляция и регистрация активности нейронов на препарате происходят при помощи света с разной длиной волны. В частности, в нейронной культуре можно стимулировать нейроны,

экспрессирующие канальный родопсин, при помощи световых стимулов 470 нм и при этом регистрировать высвобождение медиатора из синаптической везикулы при помощи красных флуоресцентных зондов, схожих с рН-флуорином. рН-Флуорин встраивается в синаптическую везикулу и меняет свой уровень флуоресценции при высвобождении везикулы вследствие разницы рН между содержимым везикулы и внеклеточной средой [14]. Другим вариантом возможного эксперимента, построенного по принципу «all-optical electrophysiology», является оптогенетическая стимуляция нейронов и одновременная оптическая регистрация изменения уровня кальция в клетке при помощи таких кальций-чувствительных красных флуоресцентных зондов, как R-GECO.

Для выяснения возможностей проведения подобного рода экспериментов с использованием рассматриваемых здесь канальных родопсинов мы сравнили ответы нейронов, экспрессирующих *CrChR2* и *PsChR2*, на освещение при помощи светодиодов с длиной волны 530 и 550 нм — наиболее часто используемых для возбуждения флуоресценции красных флуоресцентных белков. Оказалось, что амплитуда фототока, индуцированного в нейронах, экспрессирующих *PsChR2*, светом 530 нм, была существенно меньше, чем в клетках, экспрессирующих *CrChR2*. Тем не менее стимуляция светом с длиной волны 530 нм высокой интенсивности все-таки могла приводить к генерации потенциалов действия в нейронах с *PsChR2*, хотя частота ПД была ожидаемо ниже, чем в нейронах с *CrChR2*. В связи с этим мы изучили ответ нейронов на свет с длиной волны 550 нм. Оказалось, что световые стимулы этой длины волны даже при максимальной интенсивности не вызывают генерацию ПД в нейронах, экспрессирующих любой из изученных опсинов. Из этого следует, что свет с длиной волны 550 нм предпочтительней для возбуждения флуоресценции зонда.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, мы показали, что катионный канальный родопсин из одноклеточной водоросли *P. subcordiformis* по своим функциональным свойствам превосходит широко используемый в оптогенетике канальный родопсин-2 из *C. reinhardtii*. Во-первых, он обеспечивает возможность достижения более высоких частот стимуляции нейронов, и, во-вторых, *PsChR2* больше подходит для проведения экспериментов с одновременной световой стимуляцией трансфицированных нейронов и оптической регистрацией их ответов при помощи красных флуоресцентных зондов. Однако в этом случае для возбуждения флуоресценции красных зондов необходимо использовать свет с длиной волны 550 нм.

Вклад авторов. А.Ю. Малышев, М.А. Островский — концепция и руководство работой; Г.Р. Смирнова, Л.Е. Петровская — проведение молекулярно-биологических экспериментов; О.С. Иджилова и Д.А. Колотова — проведение электрофизиологических экспериментов; А.Ю. Малышев, О.С. Иджилова и М.А. Островский — написание и редактирование текста.

Финансирование. Работа выполнена при финансовой поддержке гранта Министерства науки и высшего образования Российской Федерации (соглашение № 075-15-2020-795, внутренний номер 13.1902.21.0027).

Благодарности. Авторы благодарят О.Г. Щербакову за предоставление плазмиды с *PsChR2*.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Соблюдение этических норм. Все процедуры, выполненные в исследованиях с участием животных, соответствовали этическим стандартам ФГБУН ИВНД и НФ РАН и утверждённым правовым актам РФ и международных организаций.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Montagni, E., Resta, F., Mascaro, A. L. A., and Pavone, F. S. (2019) Optogenetics in brain research: from a strategy to investigate physiological function to a therapeutic tool, *Photonics*, **6**, 92, doi: 10.3390/photonics6030092.
2. Nagel, G., Szellas, T., Huhn, W., Kateriya, S., Adeishvili, N., et al. (2003) Channelrhodopsin-2, a directly light-gated cation-selective membrane channel, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **100**, 13940-13945, doi: 10.1073/pnas.1936192100.
3. Boyden, E., Zhang, F., Bamberg, E., Nagel, G., and Deisseroth, K. (2005) Millisecond-timescale, genetically targeted optical control of neural activity, *Nat. Neurosci.*, **8**, 1263-1268, doi: 10.1038/nn1525.
4. Govorunova, E., Sineshchekov, O., Janz, R., Liu, X., and Spudich, J. (2015) Natural light-gated anion channels: a family of microbial rhodopsins for advanced optogenetics, *Science*, **349**, 647-650, doi: 10.1126/science.aaa7484.
5. Arenkiel, B., Peca, J., Davison, I., Feliciano, C., Deisseroth, K., et al. (2007) *In vivo* light-induced activation

- of neural circuitry in transgenic mice expressing channelrhodopsin-2, *Neuron*, **54**, 205-218, doi: 10.1016/j.neuron.2007.03.005.
6. Duan, X., Nagel, G., and Gao, S. (2019) Mutated channelrhodopsins with increased sodium and calcium permeability, *Appl. Sci.*, **9**, 664, doi: 10.3390/app9040664.
 7. Wietek, J., and Prigge, M. (2016) Enhancing channelrhodopsins: an overview, in *Methods in Molecular Biology* (Clifton, N. J., ed) **1408**, pp. 141-165, doi: 10.1007/978-1-4939-3512-3_10.
 8. Govorunova, E., Sineshchekov, O., Li, H., Janz, R., and Spudich, J. (2013) Characterization of a highly efficient blue-shifted channelrhodopsin from the marine alga *Platymonas subcordiformis*, *J. Biol. Chem.*, **288**, 29911-29922, doi: 10.1074/jbc.M113.505495.
 9. Hochbaum, D., Zhao, Y., Farhi, S., Klapoetke, N., Werley, C. A., et al. (2014) All-optical electrophysiology in mammalian neurons using engineered microbial rhodopsins, *Nat. Methods*, **11**, 825-833, doi: 10.1038/nmeth.3000.
 10. Beaudoin, G., Lee, S.-H., Singh, D., Yuan, Y., Ng, Yu-G., et al. (2012) Culturing pyramidal neurons from the early postnatal mouse hippocampus and cortex, *Nat. Protoc.*, **7**, 1741-1754, doi: 10.1038/nprot.2012.099.
 11. Van Rossum, G., and Drake, F. (2009) *Python 3 Reference Manual*, Scotts Valley, CA: CreateSpace.
 12. Nakanishi, K., and Crouch, R. (1995) Application of artificial pigments to structure determination and study of photoinduced transformations of retinal proteins, *Isr. J. Chem.*, **35**, 253-272, doi: 10.1002/ijch.199500030.
 13. Ullrich, S., Gueta, R., and Nagel, G. (2013) Degradation of channelrhodopsin-2 in the absence of retinal and degradation resistance in certain mutants, *Biol. Chem.*, **394**, 271-280, doi: 10.1515/hsz-2012-0256.
 14. Miesenböck, G., De Angelis, D., and Rothman, J. (1998) Visualizing secretion and synaptic transmission with pH-sensitive green fluorescent proteins, *Nature*, **394**, 192-195, doi: 10.1038/28190.

CATIONIC CHANNELRHODOPSIN FROM THE ALGAE *Platymonas subcordiformis* AS A PROMISING OPTOGENETIC TOOL

O. S. Idzhilova^{1,2}, G. R. Smirnova^{1,2}, L. E. Petrovskaya³, D. A. Kolotova^{1,2},
M. A. Ostrovsky², and A. Y. Malyshev^{1*}

¹ Institute of Higher Nervous Activity and Neurophysiology, Russian Academy of Sciences, 117485 Moscow, Russia; E-mail: malyshev@ihna.ru

² Emanuel Institute of Biochemical Physics, Russian Academy of Sciences, 119334 Moscow, Russia

³ Shemyakin and Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry, Russian Academy of Sciences, 117997 Moscow, Russia

The progress of optogenetics largely depends on the development of new molecular tools – light-activated proteins. Using cultured hippocampal neurons, we compared properties of two light-activated cation channels: the classical channelrhodopsin-2 from *Chlamydomonas reinhardtii* (*CrChR2*) and the recently described channelrhodopsin isolated from the algae *Platymonas subcordiformis* (*PsChR2*). We have shown that *PsChR2* is capable to induce generation of action potentials during pulsed light stimulation of neurons up to frequencies of 40-50 Hz, while the upper limit for *CrChR2* is 20-30 Hz. An important advantage of *PsChR2* compared to classical *CrChR2* is the blue shift of its excitation spectrum. This opens up the possibility for its effective use in experiments based on the “all-optical electrophysiology” principle, for which it is necessary to separate the maxima of the spectra of channelrhodopsins used to stimulate a neuron and the excitation spectra of various red fluorescent probes. We compared the responses of neurons (generation of action potentials) expressing *CrChR2* and *PsChR2* to light stimuli with a wavelength of 530 and 550 nm, the most commonly used for excitation of red fluorescent probes. It was shown that light with a wavelength of 530 nm for neurons expressing *PsChR2* is much (3.7 times) less effective than for those expressing classical *CrChR2*. Light with a wavelength of 550 nm, even at its maximum used intensity, does not stimulate neurons expressing any of the studied opsins at all. This means that the *PsChR2* channelrhodopsin isolated from the algae *P. subcordiformis*, both in terms of its frequency characteristics and the possibility of its use for stimulating a neuron with short-wavelength (blue, 470 nm) light and simultaneous recording of various physiological processes using fluorescent probes, can be considered as a very promising optogenetic tool.

Keywords: optogenetics, neuron, bacterial opsin, channelrhodopsin, light-induced current, patch clamp, intracellular recording, *Platymonas subcordiformis*

О ВОЗМОЖНОСТИ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ МЕТОДА УЛЬТРАКОРОТКОГО ПОЛНОПРОТЕОМНОГО АНАЛИЗА DirectMS1 В ЗАДАЧАХ ХИМИЧЕСКОЙ ПРОТЕОМИКИ ПО ПОИСКУ МИШЕНЕЙ ЛЕКАРСТВЕННОГО ВОЗДЕЙСТВИЯ

© 2022 Е.М. Соловьева¹, Ю.А. Бубис¹, И.А. Тарасова¹, А.А. Лобас¹, М.В. Иванов¹,
А.А. Назаров², И.А. Шутков², М.В. Горшков^{1*}

¹ Федеральный исследовательский центр химической физики им. Н.Н. Семенова РАН,
Институт энергетических проблем химической физики им. В.Л. Тальрозе,
119334 Москва, Россия; электронная почта: mike.gorshkov@gmail.com

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

Поступила в редакцию 16.06.2022

После доработки 20.09.2022

Принята к публикации 03.10.2022

Анализ количественного содержания белков в клетках тканей или физиологических жидкостях, основанный на хроматомасс-спектрометрии, является одним из ключевых источников информации о механизмах жизнедеятельности клеток в условиях химиотерапевтического воздействия. Выявление значимых изменений экспрессии белков решается методами химической протеомики и требует анализа протеомов клеток, подверженных обработке лекарствами, а также разработки экспериментальных и биоинформатических методов и подходов к поиску лекарственных мишеней. При этом производительность полнопротеомного анализа, основанного на жидкостной хроматографии и тандемной масс-спектрометрии, является одним из основных факторов, ограничивающих масштаб таких исследований. Метод прямой масс-спектрометрической идентификации белков DirectMS1 является одним из разработанных в последние годы подходов, позволяющих осуществлять ультракороткий полнопротеомный анализ в режиме минутных градиентов разделения смесей протеолитических пептидов. Целями данной работы являлось выяснение возможностей и ограничений метода для идентификации мишеней лекарственного воздействия на уровне всего клеточного протеома, а также выявления активируемых воздействием клеточных процессов. В частности, в работе был проведен анализ литературных данных химической протеомики для большого набора онкопрепаратов, полученных ранее методом мультиплексного количественного протеомного профилирования, основанного на тандемной масс-спектрометрии в сочетании с высокоэффективной жидкостной хроматографией. Полученные результаты были сопоставлены с данными полнопротеомного анализа, полученными методом DirectMS1 с использованием ультракоротких режимов разделения протеолитических смесей для клеточных линий человека, с целью выяснения возможностей метода идентифицировать известные лекарственные мишени онкопрепаратов. Также, на примере клеточной линии A2780, было проведено полнопротеомное сравнение двух методик клеточного лизиса, включая используемый в химической протеомике лизис, основанный на заморозке-разморозке и стандартную в протеомных исследованиях методику на основе ультразвукового разрушения клеток. Кроме того, были получены результаты экспрессионной протеомики на основе ультракороткого полнопротеомного анализа методом DirectMS1 для клеточной линии A2780, обработанной онкопрепаратом лонидамин, с последующим анализом геномных онтологий, с целью выяснения возможностей метода для выявления регуляции белков в клеточных процессах, ассоциированных с лекарственным воздействием.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: протеомика, масс-спектрометрия, белки, лонидамин, лизис, сигнальные каскады лонидамина.

DOI: 10.31857/S0320972522110094, **EDN:** LWGFCF

Принятые сокращения: A2780 – клеточная линия карциномы яичника человека; DirectMS1 – метод прямой хроматомасс-спектрометрической идентификации белков протеомов; HeLa – клеточная линия рака шейки матки, используемая в протеомике в качестве стандарта клеточной линии человека; GO – анализ геномных онтологий; FC – кратные изменения концентраций белков; FDR – в протеомике означает уровень (в %) присутствия ложно-положительных идентификаций среди всех репортируемых идентификаций белков или пептидов; FT – лизис клеток на основе заморозки-разморозки; MS1 – масс-спектры первого уровня; TMT – тандемные изотопные метки (tandem mass-tag); US – лизис клеток на основе ультразвукового разрушения.

* Адресат для корреспонденции.

ВВЕДЕНИЕ

Выяснение механизмов жизнедеятельности клеток живых организмов и их развития, включая изменения в результате лекарственного воздействия, влияния внешних факторов или физиологического состояния самого организма, является одной из основных задач современных постгеномных исследований и разработок в области «омиксных» технологий, а также их дальнейшего использования в биологии и клинической практике [1], что, в свою очередь, расширит существующие возможности для качественных изменений в подходах к решению фундаментальных и практических проблем медицины, например, ранней диагностики различных форм тяжёлых заболеваний или предсказания эффективности терапевтического воздействия [2, 3]. Одним из основных подходов к выявлению изменений в экспрессии белков, связанных с влиянием перечисленных выше факторов и играющих ключевую роль в патологическом развитии или отклике на воздействие, является качественный и количественный анализ протеомов методами высокоэффективной жидкостной хроматографии в сочетании с тандемной масс-спектрометрией (ВЭЖХ-МС/МС) [4, 5]. Следует отметить, что поиск и анализ регулируемых воздействием белков на уровне всего протеома стали возможными с развитием масс-анализаторов высокого разрешения [6, 7] и, если говорить о химической протеомике, с появлением таких новых методов, как температурное полнопротеомное профилирование (thermal proteome profiling, TPP) [8, 9]. Однако значительные затраты инструментального времени для осуществления полнопротеомного профилирования остаётся серьёзной и актуальной проблемой дальнейшего методического развития химической протеомики и её использования в биомедицинских исследованиях. Действительно, типичное время, затрачиваемое на полнопротеомный анализ клеточных лизатов современными методами ВЭЖХ-МС/МС, составляет от несколько часов до десятков часов на один образец, проанализированный в нескольких технических репликах и биоповторах. В первую очередь такие затраты инструментального времени связаны с длительным разделением анализируемых протеолитических смесей, необходимым для реализации тандемной масс-спектрометрии (МС/МС) и идентификации как можно большего количества компонент смесей [10, 11]. Соответственно, только для одной системы «лекарство–протеом», для которой, например, реализация метода TPP связана с проведением порядка 100 полно-

протеомных хроматомасс-спектрометрических анализов, потребуются существенные затраты инструментального времени, ограничивающие его широкое практическое применение. В этой связи роль быстрого анализа становится принципиальной для выявления регулируемых воздействием белков на больших выборках образцов и систем «лекарство–протеом». Проблема частично решается использованием мультиплексинга на основе изобарных меток (tandem mass tags, TMT) [12], что тем не менее не снимает актуальности задачи сокращения времени полнопротеомного анализа из-за цены такого решения.

Первые работы по разработке методов быстрого полнопротеомного хроматомасс-спектрометрического анализа для широкомасштабных скрининговых исследований в области сравнительной протеомики с целью поиска биомаркеров появились буквально в последние несколько лет, включая исследования, посвящённые проблеме повышения скорости такого анализа [13–16]. Метод прямой хроматомасс-спектрометрической идентификации DirectMS1 [17, 18] является одним из таких подходов к реализации быстрого количественного полнопротеомного анализа за счёт использования ультракоротких градиентов разделения протеолитических смесей. Так, метод позволяет идентифицировать более 2000 белков за время анализа в несколько минут при использовании масс-спектрометров высокого разрешения на основе орбитальной ионной ловушки Орбитрэп [19]. Понятие «прямая» масс-спектрометрическая идентификация подразумевает исключение из анализа стадии последовательного получения масс-спектров фрагментации протеолитических пептидов смеси, являющейся одной из основных причин увеличения времени анализа в стандартных протеомных методах. Идентификация белков осуществляется за счёт использования всей совокупности экспериментальных данных о пептидах, комплементарных к масс-спектрометрическим, в частности, хроматографическим временам, ионной подвижности и др. Важным преимуществом метода DirectMS1 является возможность идентификации белков с существенно большим покрытием последовательности детектируемыми протеолитическими пептидами, что даёт более точную количественную информацию [19]. Однако возможности использования метода DirectMS1 в задачах химической протеомики, в частности, идентификации белков-мишеней лекарственного воздействия и выявления регулируемых воздействием процессов, до недавнего времени не исследовались.

В работе нами был проведён цикл исследований возможности использования метода прямой масс-спектрометрической идентификации белков DirectMS1 с использованием ультракоротких градиентов разделения в химической протеомике. Конкретными задачами исследования были следующие: (1) проверка возможностей метода для мониторинга мишеней лекарственных воздействий; (2) сравнение наборов белков, идентифицируемых в рамках полнопротеомного анализа, для различных методик клеточного лизиса, включая наиболее широко используемый в химической протеомике лизис на основе заморозки-разморозки (FT, freeze-thaw lysis) [20] и стандартный лизис на основе ультразвукового разрушения клеток (US, ultrasound-induced lysis); (3) выявление белков, регулируемых лекарственным воздействием. Для реализации первой задачи использовались экспериментальные данные, полученные ранее в Каролинском институте Стокгольма для большого набора онкопрепаратов методом мультиплексного глубокого количественного протеомного профилирования клеточной линии A549 [21], а также данные полнопротеомного анализа, полученные методом ультракороткого DirectMS1 как ранее для коммерческого гидролизата клеточной линии HeLa [19], так и в данной работе для гидролизата клеточной линии рака яичников A2780. Для реализации второй задачи использовались данные, полученные в работе двумя методами полнопротеомного анализа, включая стандартный ВЭЖХ-МС/МС и DirectMS1 на основе ультракоротких градиентов, для гидролизатов клеточной линии A2780 с использованием двух методик клеточного лизиса. Наконец, третья задача исследования решалась на примере полнопротеомного анализа клеточной линии рака яичников A2780, обработанной препаратом лонидамин (lonidamine), с последующим анализом генных онтологий для выявления обогащённых клеточных компонентов, регулируемых лекарственным воздействием.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Культивирование клеток. Клетки карциномы яичников человека A2780, полученные из Европейской коллекции аутентичных клеточных культур (ECACC, Великобритания), культивировали в стандартной среде RPMI 1640 («Gibco™», Ирландия), содержащей 5%-ную эмбриональную сыворотку телят («Gibco™», Бразилия) и смесь антибиотиков (пенициллин – 100 мкг/мл, стрептомицин –

100 мкг/мл, «ПанЭко», Россия) при 37 °С в атмосфере 5% CO₂. В экспериментах были использованы клетки после 5–7 пассажей. Для получения клеточной массы клетки высевали в культуральные флаконы 25 см² («TPP», Швейцария) (1 × 10⁶ клеток в 5 мл культуральной среды) и инкубировали 24 ч. В день эксперимента среду заменяли на 5 мл среды с содержанием активного соединения лонидамин (полученный в МГУ по опубликованной ранее методике [22]) в концентрации 150 мкМ (IC₅₀). Далее, клетки инкубировали в течение 72 ч, среду удаляли, клетки отделяли от поверхности скребком, суспендировали в свежей культуральной среде, центрифугировали (1500 об./мин, 3 мин), а затем дважды промывали холодным 10 мМ PBS (pH 7,4). В качестве контроля использовали клетки во флаконах, не подвергавшиеся обработке лонидамином. Все эксперименты проводились в пяти повторах.

Клеточный лизис. Белки клеток выделялись двумя сравниваемыми методами: (1) с использованием ультразвука (US) и (2) методом заморозки-разморозки (FT). В первом методе использовался стандартный протокол лизиса, включающий лизирующий буфер – 50 мМ аммоний бикарбонат (ABC), 10% ацетонитрила, 0,1% Protease MAX Surfactant («Promega», США). На 1 млн клеток добавляли 100 мкл лизирующего буфера с последующей инкубацией на термошейкере (500 об./мин) при комнатной температуре в течение 30 мин. Дальнейший лизис проводили с использованием ультразвукового гомогенизатора Qsonica Q125 («Qsonica», США) в течение 3 мин (циклами по 10 с) на льду с амплитудой 25%. Для дальнейшего ферментативного гидролиза пробы были разбавлены в 2 раза 50 мМ ABC.

Для лизиса методом заморозки-разморозки использовали 1 × PBS (pH 7,4); 100 мкл буфера на 1 млн клеток. Пробу помещали в жидкий азот на 1 мин, затем нагревали до 25 °С на термошейкере (600 об./мин) в течение 1 мин. Цикл заморозки-разморозки повторяли 3 раза, после чего пробы центрифугировали (10 000 g) в течение 5 мин. Супернатант переносили в новые пробирки для дальнейшего ферментативного гидролиза.

Подготовка протеомных проб для хромато-масс-спектрометрического анализа. Для восстановления дисульфидных связей к пробам добавлялся дитиотреитол (DTT, финальная концентрация 10 мМ) с последующим нагреванием до 56 °С (25 мин), после чего проводили реакцию алкилирования с использованием йодацетамида (IAA, финальная концентрация 15 мМ) в отсутствии освещения при ком-

натной температуре в течение 30 мин. Для устранения возможного избытка алкилирующего реагента к пробам добавляли DTT в финальной концентрации 5 мМ. Для ферментативного гидролиза был использован трипсин (Sequencing Grade Modified Trypsin, «Promega») в соотношении 1/75, реакцию проводили при температуре 37 °С в течение 15 ч. Для прекращения гидролиза к пробам была добавлена уксусная кислота (3–5%, финальный pH < 3). Через 30 мин проводили центрифугирование проб (12 000 g, 10 мин). Супернатант перенесли в стеклянные пробирки и высушивали с использованием вакуумного центрифужного испарителя. Полученные пробы хранились при температуре –80 °С. Непосредственно перед масс-спектрометрическим анализом пробы растворяли в 0,1%-ном водном растворе муравьиной кислоты до концентрации пептидов 1 мкг/мкл.

Хроматомасс-спектрометрический анализ протеолитических смесей пептидов протеомов.

Полнопротеомный анализ клеточных лизатов осуществлялся в работе двумя методами: (1) стандартный полнопротеомный анализ «снизу-вверх» (bottom-up) [23], основанный на гидролизе белков, разделении получаемых смесей протеолитических пептидов обращённо-фазовой хроматографией и идентификации пептидов на основе MS/MS и (2) метод прямой хроматомасс-спектрометрической идентификации белков DirectMS1, основанный на ультракоротком жидкостно-хроматографическом разделении смесей протеолитических пептидов и измерении масс-спектров первого уровня (MS1) высокого разрешения ионов пептидов без использования фрагментации [18].

Протеомный анализ на основе MS/MS осуществляли в двух технических повторах с использованием хроматографической ВЭЖХ-системы Ultimate 3000 RSLCnano («Thermo Scientific», США), соединённой с масс-спектрометром Q-Exactive HFX («Thermo Scientific»). Пептидную смесь (500 нг) загружали на обогащающую колонку Acclaim μ -Precolumn (0,5 мм × 3 мм, размер частиц – 5 мкм, «Thermo Scientific») при потоке 10 мкл/мин в течение 4 мин в изократическом режиме (2% ацетонитрила, 0,1% муравьиной кислоты в деионизованной воде). Далее пептиды разделяли на ВЭЖХ-колонке C18 (75 мкм × 150 мм, фаза Reprosil-Pur, размер частиц – 3 мкм, размер пор – 100 Å) в градиентном режиме элюирования. Градиент формировали подвижной фазой А (0,1%-ная муравьиная кислота) и подвижной фазой Б (80% ацетонитрила, 0,1% муравьиной кислоты в деионизованной воде)

при скорости потока 400 нл/мин. Колонку уравнивали при 2% подвижной фазы Б в течение 3 мин, после чего линейно увеличивали концентрацию подвижной фазы Б до 35% за 28 мин, затем линейно увеличивали концентрацию фазы Б до 99% за 5 мин, после 5-минутной промывки при 99% фазы Б концентрацию буфера линейно снижали до исходных 2% подвижной фазы Б за 1 мин. Общая продолжительность анализа составляла 45 мин. Масс-спектрометрический анализ проводили на масс-спектрометре Q-Exactive HFX в режиме положительной ионизации с использованием источника NESI («Thermo Scientific»). Для масс-спектрометрического анализа были установлены следующие параметры настроек: напряжение на эмиттере – 2,3 кВ; температура капилляра – 285 °С. Панорамное сканирование проводили в диапазоне масс 350–1500 m/z при разрешении 120,000. При тандемном сканировании, используемом для наработки данных протеомного анализа методом DDA (data dependent acquisition) [24], масс-спектральное разрешение устанавливали 15 000 в диапазоне масс от 100 m/z до верхней границы, которая определяется автоматически, исходя из массы прекурсора, но не более 2000 m/z . Изоляцию прекурсорных ионов проводили в окне ± 1 Да. Максимальное число разрешённых для изоляции ионов в режиме получения спектров фрагментации (масс-спектры второго уровня MS/MS) – не более 20, нормализованная энергия соударения (normalized collision energy NCE) равнялась 29. Для прекурсорных ионов, отправляемых на фрагментацию, учитывали только ионы от $z = 2+$ до $z = 6+$ по зарядовому состоянию. Максимальное время накопления для прекурсорных ионов составляло 50 мс, для фрагментных ионов – 110 мс. Величину общего накапливаемого в ловушке заряда (automatic gain control, AGC) для прекурсоров и фрагментных ионов устанавливали соответственно $1 \cdot 10^6$ и $2 \cdot 10^5$. Все ранее проанализированные ионы-прекурсоры динамически исключались на 30 с из списка кандидатов, отбираемых на изоляцию и фрагментацию. Данные протеомного анализа гидролизатов белков анализируемых клеточных линий, полученные стандартным методом, описанным выше, обрабатывались с целью получения идентификаций белков.

Протеомный анализ пептидов с использованием метода DirectMS1 осуществляли для каждой биологической реплики в трёх технических повторах на хроматографической ВЭЖХ-системе Ultimate 3000 RSLCnano, соединённой с масс-спектрометром Q-Exactive HFX.

Пептидную смесь (200 нг) загружали на обогащающую колонку Acclaim μ -Precolumn (0,5 мм \times 3 мм, размер частиц – 5 мкм) при потоке 10 мкл/мин в течение 4 мин в изократическом режиме (2% ацетонитрила, 0,1% муравьиной кислоты в деионизованной воде). Далее пептиды разделяли на обращённо-фазовой ВЭЖХ-колонке C18 (75 мкм \times 150 мм, фаза Reprosil-Pur, размер частиц – 3 мкм, размер пор – 100 Å) в градиентном режиме элюирования. Градиент формировали подвижной фазой А (0,1% муравьиной кислоты) и подвижной фазой Б (80% ацетонитрила, 0,1% муравьиной кислоты в деионизованной воде) при скорости потока 1,5 мкл/мин. Хроматографический градиент был сформирован следующим образом: сначала колонку эквilibрировали при 8% подвижной фазы Б в течение 0,8 мин, после чего линейно увеличивали концентрацию подвижной фазы Б до 35% за 4,2 мин, затем линейно увеличивали концентрацию фазы Б до 99% за 0,9 мин, после 0,9-минутной промывки при 99% фазы Б, концентрацию буфера линейно снижали до исходных 8% подвижной фазы Б за 0,1 мин. Общая длительность анализа, включая стадии промывки и уравнивания колонки составляла 7,3 мин.

Идентификация белков. Во всех случаях, здесь и далее, при идентификации белков использовалась библиотека канонических последовательностей человека SwissProt от 30.07.2021 с ограничением по видовой принадлежности исследуемого организма *Homo sapiens*, содержащей 20 368 белков. Идентификацию белков в данных, полученных с использованием МС/МС, проводили при помощи поисковой протеомной машины IdentiPy v.0.3.3 [25] и алгоритмом послепоисковой валидации Scavager v.0.2.9 [26] с интегрированным в него по умолчанию алгоритмом NSAF (normalized spectral abundance factor) [27], выбранным ранее как наиболее точный алгоритм безметочного полуколичественного анализа на основе спектров МС/МС [28]. Для поиска протеолитических пептидов задавались следующие входные параметры: фермент – трипсин, ограничения на длину пептидов – 7–30 аминокислотных остатков, точность определения масс моноизотопных пептидов в спектрах МС1 – ± 5 ppm, точность определения масс в спектрах МС/МС – $\pm 0,01$ Да, а также возможность пропуска до двух сайтов гидролиза белка трипсином. Окисление метионина, *N*-концевое ацетилирование белка и модификация цистеина алкилирующим реагентом были учтены как возможные модификации пептидов. Для идентификации сопоставлений (образования пар) спектров и

пептидов (peptide-spectrum matches, PSM), а также пептидов и белковых групп использовали величину ложноположительных идентификаций (false discovery rate, FDR) не более 1,0%. Для сравнения белков, идентифицированных с использованием различных методов лизиса, технические и биологические реплики были объединены и совместно отфильтрованы до такого же уровня FDR (функция union алгоритма Scavager v.0.2.9) [26].

Идентификацию белков в данных, полученных методом DirectMS1, проводили при помощи программы ms1searchpy v.2.0.3 [17], усовершенствованной путём её интеграции с алгоритмами машинного обучения [18, 19]. Ложные последовательности для последующей валидации результатов генерировались путём полного перемешивания исходных белковых последовательностей. Были заданы следующие поисковые параметры: фермент – трипсин; минимум 3 скана на пептидный ионный кластер, формируемый распределением пептидов по изотопам ^{13}C ; количество пиков в кластере не менее 2, включая моноизотопный; начальная точность масс – 8 ppm; рассматривались пептиды без пропусков сайтов гидролиза длиной 7–30 аминокислотных остатков (484 765 пептидов), зарядовые состояния которых варьировались в диапазоне от 1+ до 6+. Список белков фильтровался до уровня ложноположительных идентификаций FDR не более 1,0%. Для сравнения различных методов лизиса были проанализированы все 5 биологических повторов, и использовались белки, идентифицированные как минимум в 4-х из них. Идентифицированные белки репортировались как лидеры белковых групп, в которые включались белки с пересекающимися пептидами. При этом в последующем полуколичественном анализе участвовали все белки группы. В частности, для МС1-данных в методе DirectMS1 количественный анализ выполняется следующим образом [18]: на первой стадии собирается список всех достоверно (с заданным уровнем FDR) идентифицируемых белков (лидеров белковых групп) для технических/биологических повторов и образцов, используемых в последующем количественном анализе; далее, для этих белков составляется список всех идентифицированных пептидов; и, на финальной стадии, для этих пептидов составляется список всех белков из базы данных, от которых эти пептиды могли образоваться. Таким образом, в полуколичественном анализе для статистических тестов участвовали не только лидеры белковых групп, но и все белки, пересекающиеся с ними по пептидам.

Анализ данных химической протеомики Каролинского института. Данные по химической протеомике для большого набора систем «лекарство–протеом», проанализированных ранее мультиплексным методом на основе тандемных изотопных меток (ТМТ-меток) в ЦКП молекулярной биометрии Каролинского института [21], были скачаны в сыром виде (доступны в хранилище данных консорциума ProteomeXchange под идентификатором PXD009775) и проанализированы с использованием поискового алгоритма IdentiPy [25]. Для поиска пептидов точности масс ионов-предшественников и фрагментов были установлены, соответственно, на уровне 10 ppm и 0,01 Да. Данные были получены с использованием мультиплексинга на основе ТМТ-меток (ТМТ 10) соответственно, модификация с массовым сдвигом 229,16 Да была задана, как фиксированная на всех *N*-концах пептидов и остатках лизина, так же, как и карбамидометилирование остатков цистеина. Окисление остатков метионина и фосфорилирование остатков серина, треонина и тирозина были заданы как потенциальные модификации. Результаты поиска для отдельных фракций были объединены и валидированы с использованием программы Scavenger [26]. Для оценки относительного содержания белка была использована сумма его интенсивностей во всех 10 ТМТ-каналах, усреднённая для трёх реплик – такая величина не отражает реальное содержание белка в конкретном образце, но характеризует его среднюю концентрацию, поэтому она была использована для ранжирования известных мишеней препаратов и отбора мишеней топ-15.

Отбор дифференциально регулированных белков. Для полуколичественного анализа идентификаций белков, полученных методом DirectMS1, использовался алгоритм Diffacto [29]. Интенсивности пептидов, на основе которых Diffacto выполняет статистический анализ, извлекались с помощью алгоритма Biosaur v.2.0 [30]. Значения *p*-value для белков рассчитывались с использованием метода PECA (Probe-level Expression Change Averaging), интегрированного в Diffacto, и корректировались на множественные сравнения методом Бенджамини–Хохберга. Отбор дифференциально регулированных белков был выполнен, согласно следующим критериям: $FDR_{BH} < 0,001$; $FC_{up} > 1,2$; $FC_{down} < 1/1,2$. При оценке ответа клеток A2780 на лонидамин методом DirectMS1 анализ генов онтологий (GO) выполнялся отдельно для белков с повышенной ($FC_{up} > 1,2$) и пониженной

($FC_{down} < 1/1,2$) регуляцией с помощью программы GOrilla [31]. Обогащения GO вычислялись против всех идентифицированных белков, попавших в результаты полуколичественного анализа (background).

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

Для анализа возможности метода прямой масс-спектрометрической идентификации белков DirectMS1 на основе ультракоротких градиентов разделения использовались данные по химической протеомике для большого набора систем «лекарство–протеом», проанализированных ранее мультиплексным методом на основе ТМТ-меток в ЦКП молекулярной биометрии Каролинского института [21]. Данные были получены для нескольких десятков как широко используемых в клинической практике, так и перспективных, проходящих начальные стадии доклинических испытаний, противоопухолевых химиотерапевтических препаратов, которыми обрабатывались клетки линии A549 аденокарциномы лёгких человека коллекции ATCC. В табл. 1 представлен список использовавшихся лекарств и их мишени (коллонки «Лекарство» и «ID белков-мишеней»). Для сравнения в результатах мультиплексного протеомного ВЭЖХ-МС/МС-анализа были выбраны те из мишеней, которые входят в список 15 мишеней с наибольшими значениями относительных концентраций (топ-15) из всех найденных. В протеомных данных, полученных с использованием метода DirectMS1 и ультракоротких градиентов разделения осуществлялся поиск белков, также относящихся к списку мишеней топ-15. В частности, в табл. 1 представлены результаты DirectMS1-анализа как клеточной линии HeLa, полученные ранее с использованием масс-спектрометра Orbitrap Fusion («Thermo Scientific»), оборудованного системой разделения ионов пептидов по подвижности FAIMS [19], так и клеточной линии A2780, полученные в данной работе с использованием двух разных методик лизиса. Следует отметить, что результаты, полученные для стандартного гидролизата клеточной линии HeLa, являются примером наиболее глубокого протеома, достигаемого на сегодняшний день при использовании метода DirectMS1 и 5-минутных градиентов разделения. Как видно из представленных данных, при глубине анализа порядка 2000 белков, достижимого методом DirectMS1, идентифицируется большинство белков-мишеней из списка топ-15 для лекарств, представленных в табл. 1.

Таблица 1. Анализ данных по химической протеомике для наборов систем «лекарство–протеом», проанализированных методом мультиплексного ВЭЖХ-МС/МС анализа на основе ТМТ-меток [21], возможности метода DirectMS1 с использованием ультракоротких градиентов разделения на примере протеомного анализа стандартного гидролизата клеточной линии HeLa, а также сравнение чувствительности метода ультракороткого полнопротеомного количественного профилирования на примере клеточной линии A2780 при мониторинге белков-мишеней лекарственного воздействия при использовании различных методик клеточного лизиса

Лекарство	ID белков-мишеней	Методы протеомного анализа		Методы клеточного лизиса	
		мультиплексный (ТМТ-метки), 90 мин ВЭЖХ-МС/МС, гидролизат линии A549	5 мин ВЭЖХ-DirectMS1, гидролизат линии HeLa**	FT-лизис, 5 мин ВЭЖХ-DirectMS1, гидролизат линии A2780	US-лизис, 5 мин ВЭЖХ-DirectMS1, гидролизат линии A2780
Lapatinib	P04626, P00533	P00533	P00533		
Afatinib	P04626, Q15303, P00533	P00533	P00533		
Dasatinib	P00519, P12931, P29317, P06239, P07947, P10721, P09619, P51692, P42684, P06241, Q06187, Q92570, P11274, P41240, P54756, P54760, P09769, P42685, P11142, P07948, Q9NYL2, Q16539, Q06203	P11142, Q06203		P11142, Q06203	P07947, P11142, Q9NYL2, Q06203
Gefitinib	P00533	P00533	P00533		
OSI-420	P00533	P00533	P00533		
Fludarabine	P09884, P23921, P27707	P23921	P09884	P27707	P23921, P27707
8-Azaguanine	P00491	P00491	P00491	P00491	P00491
Vincristine	P07437, P68366	P07437, P68366	P07437	P07437	P07437
Paclitaxel	P10415, Q9H4B7, O75469, P27816, P11137, P10636	P27816, Q9H4B7		P27816	P27816
Docetaxel	P10415, Q9H4B7, O75469, P27816, P11137, P10636	P27816, Q9H4B7		P27816	P27816
Genistein	Q92731, P03372, P11388, Q14289, Q15596, Q15788	P11388	P11388		
Epirubicin	O14646, P11388	P11388	O14646, P11388		O14646
Doxorubicin	P11388	P11388	P11388		
Etoposide	P11388, Q02880	P11388, Q02880	P11388		Q02880
Idarubicin	P11388	P11388	P11388		
Teniposide	P11388	P11388	P11388		
Topotecan	Q969P6, P11387	P11387	P11387	P11387	P11387
Irinotecan	Q969P6, P11387	P11387	P11387	P11387	P11387
Camptothecin	P11387	P11387	P11387	P11387	P11387
Bortezomib	P28074, P20618	P20618	P28074	P28074, P20618	P28074, P20618
b-AP15	Q9Y5K5, P54578	P54578	Q9Y5K5	Q9Y5K5, P54578	Q9Y5K5, P54578
TRi-1	Q16881	Q16881	Q16881	Q16881	Q16881
TRi-2	Q16881	Q16881	Q16881	Q16881	Q16881
OSW-1	P22059	P22059	P22059		P22059
Lonidamin*	P19367, P13569	P19367			

Примечание. В таблице представлены известные белки-мишени различных онкопрепаратов (вторая колонка), а также те из них, которые «видны» тем или иным методом протеомного анализа и/или лизиса.

* Препарат лонидамин не анализировался в работе Saei et al. [21].

** Использовались экспериментальные данные для клеточной линии HeLa, полученные ранее методом DirectMS1 [19] (идентификатор данных PXD023977 в депозитарии PRIDE).

Ещё одной задачей исследования было сравнение различных методик клеточного лизиса, включая методику на основе ультразвукового (US) разрушения клеток, а также методику, основанную на криогенной заморозке клеток с последующей разморозкой (FT). Сравнение протоколов лизиса было проведено для необработанного образца клеточной линии A2780 с использованием как стандартного протеомного анализа на основе тандемной масс-спектрометрии ВЭЖХ-МС/МС с 30-минутными градиентами разделения, так и DirectMS1 с 5-минутными градиентами разделения (см. выше). Протокол лизиса FT используется в задачах химической протеомики при

поиске мишеней лекарственного воздействия с целью реализации взаимодействия лекарственных препаратов с белками в их нативной форме [8]. На рис. 1 представлены результаты сравнения двух методик лизиса с использованием протеомного анализа на основе тандемной масс-спектрометрии (рис. 1, а) и метода DirectMS1 (рис. 1, б). Как видно из полученных результатов, использование лизиса FT даёт несколько меньшую глубину анализа (белковые группы, теряемые в МС/МС-анализе при использовании лизиса FT, приведены в табл. S1 в Приложении). Однако следует отметить, что наблюдаемое уменьшение глубины анализа ожидаемо происходит в основном за счёт

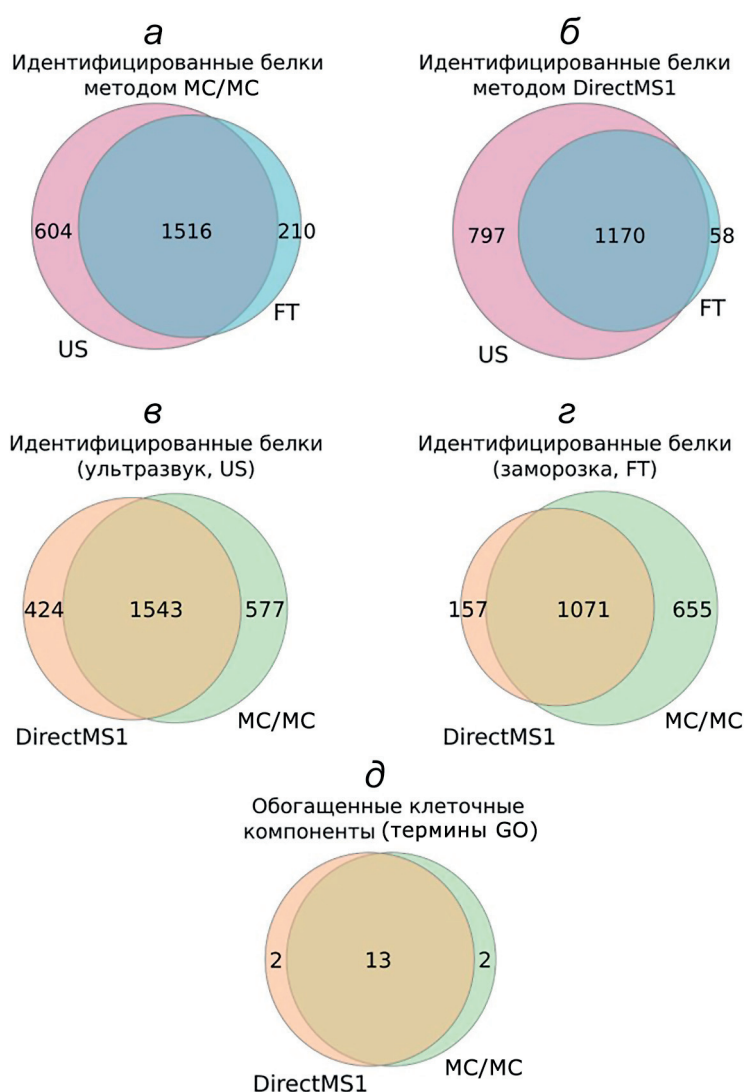


Рис. 1. Результаты сравнения различных методик лизиса, включая стандартный протокол на основе ультразвукового разрушения клеток (US) и протокол, основанный на заморозке клеток в жидком азоте с последующей медленной разморозкой (FT). Сравнение глубины полнопротеомного анализа клеточной линии A2780 при использовании двух протоколов клеточного лизиса с использованием протеомного анализа на основе тандемной масс-спектрометрии МС/МС (а) и метода DirectMS1 (б). Сравнение идентифицированных белков (лидеров белковых групп), полученных методами DirectMS1 и МС/МС с использованием US-лизиса (в) и FT-лизиса (г). д – Пересечение 15 наиболее статистически значимых обогащённых клеточных компонентов для белков, теряемых при использовании протокола лизиса FT относительно контроля (подробнее см. табл. 2). Анализ проведён с использованием утилиты GOrilla

мембранных белков. Действительно, согласно анализу обогащения по функциональной принадлежности с использованием утилиты GOrilla [31], подавляющее большинство белков, идентифицированных исключительно с использованием классического метода лизиса US и «теряемых» при переходе на методику FT, относятся к мембранным клеточным компонентам, таким как клеточная стенка и митохондриальная мембрана (табл. 2). Пересечение идентифицированных белков (в данном случае лидеров белковых групп) между методами на основе MC/MC и DirectMS1 составило порядка 80% (рис. 1, в и г), и вне зависимости от метода анализа наблюдается обогащение мембранных компонент (рис. 1, д). Стоит отметить, что белки, уникальные для метода лизиса FT, имеют в основном цитоплазматическую локализацию и не относятся к определённому клеточному компартменту. Таким образом, их идентификация, вероятно, связана с уменьшением сложности белковой смеси за счёт отсутствия значительного количества мембранных белков. Следует отметить, что анализ генных онтологий (Gene Ontology, GO) [32], результаты которого приведены в табл. 2, осуществлялся для данных, полученных стандартным ВЭЖХ-MC/MC, с использованием только лидеров белковых групп, представляющих собой наиболее вероятные белки, присутствующие в образце. В то же время количественный анализ в алгоритме Diffacto, используемом в методе DirectMS1, осуществляется для всех белков группы [18, 19]. Однако такое различие в

методах не повлияло на результаты сравнения, поскольку подавляющее большинство теряемых при использовании методики FT-лизиса белковых групп состояло, по результатам MC/MC-анализа, из одного белка (80% белковых групп) либо из двух гомологичных белков (10% белковых групп), имеющих одинаковые термины GO.

Исследование возможностей развиваемого метода прямой масс-спектрометрической идентификации белков DirectMS1 на основе ультракоротких градиентов разделения для решения задач выявления каскадов внутриклеточных взаимодействий, регулируемых лекарственным воздействием, осуществлялось на примере полнопротеомного анализа клеточной линии рака яичников A2780, обработанной препаратом лонидамин. Считается, что метаболизм раковых клеток характеризуется повышенным поглощением и потреблением глюкозы – феноменом, известным как эффект Варбурга (Warburg effect). Постоянная активация анаэробного гликолиза в раковых клетках может быть связана с активацией онкогенов или потерей опухолевых супрессоров, тем самым существенно ускоряя прогрессирование рака. В этом отношении ингибирование гликолитической способности в злокачественных клетках может усиливать эффект противоопухолевой комбинированной химиотерапии [33]. Лонидамин является производным индазола, и считается, что механизм его действия основан на ингибировании ассоциированной с митохондриями гексокиназы-II [34, 35]. Также ряд

Таблица 2. Анализ обогащения по функциональной принадлежности (клеточным компонентам) белков, теряемых при использовании протокола лизиса на основе заморозки-разморозки относительно контроля

Термины GO	Описание процесса	<i>q</i> -value, DirectMS1	<i>q</i> -value, MC/MC
GO:0016021	компоненты мембраны	2,93E-42	1,9E-60
GO:0031224	внутренние компоненты мембраны	1,31E-41	9,55E-60
GO:0044425	части мембраны	3,53E-19	6,01E-40
GO:0031090	мембрана (органелла)	7,88E-11	8,92E-17
GO:0031966	митохондриальная мембрана	1,56E-9	7,89E-16
GO:0005789	мембрана эндоплазматического ретикулума	2,65E-8	1,18E-11
GO:0044455	части митохондриальной мембраны	4,76E-6	1,02E-16
GO:0005743	внутренняя митохондриальная мембрана	8,48E-6	5,67E-12
GO:0019866	внутренняя мембрана органелл	1,41E-5	4,04E-10
GO:0098796	мембранный белковый комплекс	1,55E-5	2,63E-10

Примечание. В таблице приведены 10 наиболее значимых компонентов (терминов GO), демонстрирующих обогащение в двух методах анализа (на основе тандемной масс-спектрометрии MC/MC и метода DirectMS1 с использованием ультракоротких градиентов, рис. 1, в). Представленные в таблице *q*-value были рассчитаны утилитой GOrilla и представляют собой *p*-value обогащённых процессов, скорректированных на множественные сравнения.

более ранних исследований показал, что лонидамин ингибирует и гликолиз, что приводит к снижению синтеза внутриклеточного АТФ [36]. Перечисленные возможные механизмы действия лонидамина обозначили его, как один из компонентов комбинированной химиотерапии солидных опухолей, включая рак яичников [37, 38]. В данном контексте в работе был проведён сравнительный анализ протеомов клеточной линии рака яичников, обработанной лонидамином (в концентрации IC₅₀), относительно контроля с использованием развиваемого метода ультракороткого полнопротеомного анализа DirectMS1. Иными словами, интерес представляло увидеть регуляцию белков, характерных для метабо-

лических путей, связанных с гликолизом и синтезом АТФ для относительно хорошо охарактеризованной системы «лекарство–рак яичников» [39]. На рис. 2 представлены результаты анализа протеомов клеточной линии рака яичников A2780, обработанной лонидамином, в сравнении с контрольной, не обработанной лекарством, линией с использованием 5-минутного ВЭЖХ-DirectMS1-метода. На основе полученных диаграмм рассеяния количественных изменений содержания белков, идентифицированных с использованием метода DirectMS1 и геновых онтологий, можно сделать вывод о том, что выявленные регулируемые белки, статистически значимо повысившие концентрацию, как и ожидалось, связаны

Таблица 3. Анализ геновых онтологий с использованием утилиты GOzilla для белков, статистически значимо повысивших концентрацию после обработки лекарством (белки в правом верхнем квадранте диаграммы рассеяния на рис. 2)

Термины GO	Описание процесса	<i>q</i> -value	Степень обогащения
GO:0006735	восстановление кофермента дегидрогеназ (NADP)	0,044	10,04
GO:0006007	катаболический процесс разложения глюкозы	0,041	10,04
GO:0061718	катаболический процесс разложения глюкозы с образованием пирувата	0,039	10,04
GO:0061621	канонический гликолиз	0,037	10,04
GO:0061620	гликолитический процесс через глюкозо-6-фосфата	0,050	9,32
GO:0061615	гликолитический процесс через фруктозо-6-фосфата	0,048	9,32
GO:0006757	получение АТФ из ADP	0,036	8,7
GO:0006096	гликолитический процесс	0,032	8,7
GO:0006094	глюконеогенез	0,035	8,24
GO:0019320	катаболический процесс разложения гексозы	0,033	8,24
GO:0042866	процесс биосинтеза пирувата	0,031	8,24
GO:0006165	фосфорилирование нуклеозиддифосфата	0,015	8,03
GO:0046939	фосфорилирование нуклеотидов	0,013	7,73
GO:0019319	процесс биосинтеза гексозы	0,043	7,46
GO:0009206	процесс биосинтеза пуририбонуклеозидтрифосфата	0,018	7,2
GO:0006754	процесс биосинтеза АТФ	0,050	7,12
GO:0046031	метаболический процесс ADP	0,048	7,12
GO:0046364	процесс биосинтеза моносахаридов	0,030	7,03
GO:0009145	процесс биосинтеза пуририбонуклеозидтрифосфата	0,019	6,96
GO:0016051	процесс биосинтеза углеводов	0,028	6,91
GO:0009201	процесс биосинтеза рибонуклеозидтрифосфата	0,021	6,73
GO:0009132	процесс метаболизма нуклеозиддифосфата	0,033	6,14
GO:0009142	процесс биосинтеза нуклеозидтрифосфата	0,034	5,8
GO:0016310	фосфорилирование	0,030	2,73

Примечание. Приведены процессы с индексом достоверности *q*-value < 0,05 в порядке убывания степени обогащения. Анализ геновых онтологий показал регулирование белков, связанных с метаболическими путями гликолиза и синтеза АТФ, ассоциированных ранее с механизмом действия лонидамина (ячейки, выделенные серым фоном).

Таблица 4. Анализ генных онтологий с использованием утилиты GOzilla для белков, статистически значимо понизивших концентрацию после обработки лекарством (левый верхний квадрант на рис. 2)

Термины GO	Описание процесса	q-value	Степень обогащения
GO:0045814	отрицательная эпигенетическая регуляция экспрессии генов	0,040	8,02
GO:0043484	регуляция сплайсинга РНК	0,001	5,33
GO:0048024	регуляция сплайсинга мРНК через сплайсосому	0,039	4,94
GO:0000377	сплайсинг РНК посредством реакций переэтерификации с аденозином в качестве нуклеофила	0,001	3,56
GO:0000398	сплайсинг мРНК с участием сплайсосомы	0,001	3,56
GO:0000375	сплайсинг РНК посредством реакций переэтерификации	0,001	3,5
GO:0008380	сплайсинг РНК	0,001	3,35
GO:0006397	процессинг мРНК	0,000	3,22
GO:0016071	метаболизм мРНК	0,001	2,55
GO:0006396	процессинг РНК	0,003	2,34
GO:0016070	метаболизм РНК	0,002	2,03
GO:0051252	регуляция метаболизма мРНК	0,006	1,89
GO:0090304	метаболизм нуклеиновых кислот	0,004	1,82
GO:0019219	регуляция метаболизма азотистых соединений	0,008	1,8
GO:0010468	регуляция экспрессии генов	0,010	1,68

Примечание. Приведены процессы с индексом достоверности q -value < 0,05 в порядке убывания степени обогащения. Анализ генных онтологий выявил обогащение биологических процессов, связанных метаболизмом РНК и сплайсингом.

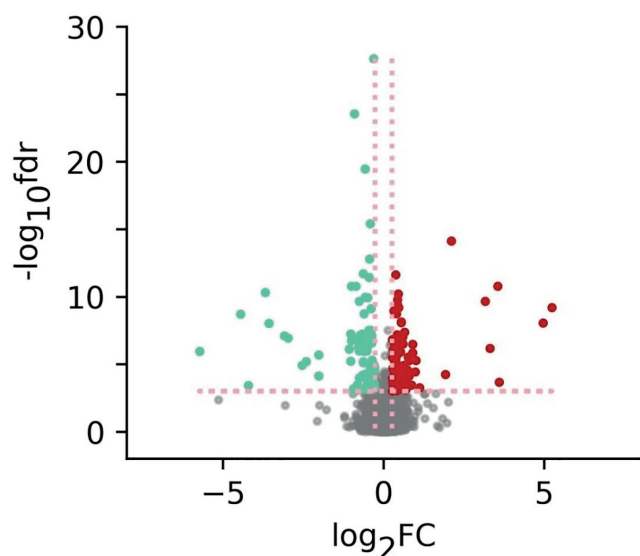


Рис. 2. Диаграмма рассеяния белков, идентифицированных с использованием метода DirectMS1 для клеточной линии A2780, обработанной лонидамином в координатах кратных изменений (FC) измеренных концентраций, относительно контроля и статистической значимости индекса достоверности этих изменений (p -value). Эксперименты проводились на ВЭЖХ-МС-системе Orbitrap Q Exactive HF, адаптированной под метод DirectMS1 на основе ультракоротких (5 мин) ВЭЖХ градиентов

с метаболическими путями гликолиза и синтеза АТФ (выделено серым фоном в табл. 3), ассоциированных ранее с известным механизмом действия лонидамина. Для оптимизации статистического порога функционально значимых изменений концентрации белков протеомов в условиях воздействия лонидамином использовался развитый в проекте подход, основанный на методе Бенджамини–Хохберга, — анализ плотности распределения точек на диаграммах рассеяния и генных онтологий [40]. Анализ генных онтологий для выявленных дифференциально регулируемых белков, статистически значимо понизивших концентрацию после обработки, выявил обогащение биологических процессов, связанных метаболизмом РНК и сплайсингом (табл. 4).

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В целом, исследования показали принципиальную возможность использования ультракороткого полнопротеомного полуквантитативного анализа DirectMS1 в задачах химической протеомики, связанных с поиском

мишеней химиотерапевтического воздействия. В частности, в работе были проанализированы данные химической протеомики, полученные ранее методом глубокой экспрессионной протеомики для большого набора известных химиотерапевтических препаратов, и показано, что DirectMS1 позволяет в рамках 5-минутных полнопротеомных анализов идентифицировать и измерять количественные изменения основных белков-мишеней лекарственного воздействия для большинства из представленных систем «лекарство—протеом». Более того, даже при недостаточной глубине анализа для прямой количественной идентификации мишеней, как в случае с проанализированной в работе клеточной линии рака яичников A2780, обработанной лонидамином, метод позволяет правильно выявлять основные каскады внутриклеточных взаимодействий, активируемых лекарственным воздействием. Полученные результаты позволяют предположить, что новый метод ультракороткого полнопротеомного полуколичественного анализа найдёт широкое применение в задачах, требующих использования больших количеств образцов для получения биологически значимой информации, таких как клиническая и популяционная протеомика, валидация панелей белковых биомаркеров заболеваний и другие.

Вклад авторов. Е.М. Соловьева — проведение экспериментов по методикам лизиса и анализ экспериментальных данных; Ю.А. Бубис,

М.В. Иванов — проведение экспериментов и анализ данных, полученных с использованием метода DirectMS1; И.А. Тарасова — статистический анализ результатов экспрессионной протеомики, полученных для клеточной линии A2780, обработанной лонидамином; А.А. Лобас — анализ данных химической протеомики Каролинского института, полученных для клеточной линии A549, обработанной 56 известными онкопрепаратами; А.А. Назаров, И.А. Шутков — клеточные работы; М.В. Горшков — общее руководство работами и написание статьи.

Благодарности. Авторы благодарят Центр коллективного пользования «Протеом Человека» Института биомедицинской химии им. В.Н. Ореховича и проф. В.Г. Згуду за помощь в реализации метода прямой масс-спектрометрической идентификации белков DirectMS1 для полнопротеомного анализа и наработку экспериментальных данных для данного исследования.

Финансирование. Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда (грант № 20-14-00229).

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

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

Дополнительные материалы. Приложение к статье опубликовано на сайте журнала «Биохимия» (<https://biochemistrymoscow.com>).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Olivier, M., Asmis, R., Hawkins, G. A., Howard, T. D., and Cox, L. A. (2019) The need for multi-omics biomarker signatures in precision medicine, *Int. J. Mol. Sci.*, **20**, 4781, doi: 10.3390/ijms20194781.
2. Ibrahim, R., Pasic, M., and Yousef, G. M. (2016) Omics for personalized medicine: defining the current we swim in, *Expert Rev. Mol. Diagn.*, **16**, 719-722, doi: 10.1586/14737159.2016.1164601.
3. Kamel, H. F. M., and Al-Amodi, H. S. A. B. (2017) Exploitation of gene expression and cancer biomarkers in paving the path to era of personalized medicine, *Genom. Proteom. Bioinform.*, **15**, 220-235, doi: 10.1016/j.gpb.2016.11.005.
4. Aebersold, R., and Mann, M. (2016) Mass-spectrometric exploration of proteome structure and function, *Nature*, **537**, 347-355, doi: 10.1038/nature19949.
5. Beck, M., Schmidt, A., Malmstroem, J., Claassen, M., Ori, A., et al. (2011) The quantitative proteome of a human cell line, *Mol. Syst. Biol.*, **7**, 549, doi: 10.1038/msb.2011.82.
6. Saei, A. A., Sabatier, P., Tokat, Ü. G., Chernobrovkin, A., Pirmoradian, M., et al. (2018) Comparative proteomics of dying and surviving cancer cells improves the identification of drug targets and sheds light on cell life/death decisions, *Mol. Cell Proteomics*, **17**, 1144-1155, doi: 10.1074/mcp.RA118.000610.
7. Gaetani, M., Sabatier, P., Saei, A. A., Beusch, C. M., Yang, Z., et al. (2019) Proteome integral solubility alteration: a high-throughput proteomics assay for target deconvolution, *J. Proteome Res.*, **18**, 4027-4037, doi: 10.1021/acs.jproteome.9b00500.
8. Savitski, M. M., Reinhard, F. B., Franken, H., Werner, T., Savitski, M. F., et al. (2014) Tracking cancer drugs in living cells by thermal profiling of the proteome, *Science*, **346**, 1255784, doi: 10.1126/science.1255784.
9. Mateus, A., Kurzawa, N., Perrin, J., Bergamini, G., and Savitski, M. M. (2022) Drug target identification

- in tissues by thermal proteome profiling, *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.*, **62**, 465-482, doi: 10.1146/annurev-pharmtox-052120-013205.
10. Baker, E. S., Liu, T., Petyuk, V. A., Burnum-Johnson, K. E., Ibrahim, Y. M., et al. (2012) Mass spectrometry for translational proteomics: progress and clinical implications, *Genome Med.*, **4**, 63, doi: 10.1186/gm364.
 11. Gillet, L. C., Leitner, A., and Aebersold, R. (2016) Mass spectrometry applied to bottom-up proteomics: entering the high-throughput era for hypothesis testing, *Annu. Rev. Anal. Chem.*, **9**, 449-472, doi: 10.1146/annurev-anchem-071015-041535.
 12. Zhang, L., and Elias, J. E. (2017) Relative protein quantification using tandem mass tag mass spectrometry, *Methods Mol. Biol.*, **1550**, 185-198, doi: 10.1007/978-1-4939-6747-6_14.
 13. Bekker-Jensen, D. B., Kelstrup, C. D., Batth, T. S., Larsen, S. C., Haldrup, C., et al. (2017) An optimized shotgun strategy for the rapid generation of comprehensive human proteomes, *Cell Syst.*, **4**, 587-599.e4, doi: 10.1016/j.cels.2017.05.009.
 14. Meier, F., Geyer, P. E., Virreira Winter, S., Cox, J., and Mann, M. (2018) BoxCar acquisition method enables single-shot proteomics at a depth of 10,000 proteins in 100 minutes, *Nat. Methods*, **15**, 440-448, doi: 10.1038/s41592-018-0003-5.
 15. Bache, N., Geyer, P. E., Bekker-Jensen, D. B., Hoerning, O., Falkenby, L., et al. (2018) Novel LC system embeds analytes in pre-formed gradients for rapid, ultra-robust proteomics, *Mol. Cell. Proteomics*, **17**, 2284-2296, doi: 10.1074/mcp.TIR118.000853.
 16. Meier, F., Brunner, A. D., Koch, S., Koch, H., Lubeck, M., et al. (2018) Online Parallel Accumulation-Serial Fragmentation (PASEF) with a novel trapped ion mobility mass spectrometer, *Mol. Cell. Proteomics*, **17**, 2534-2545, doi: 10.1074/mcp.TIR118.000900.
 17. Ivanov, M. V., Tarasova, I. A., Levitsky, L. I., Solovyeva, E. M., Pridatchenko, M. L., et al. (2017) MS/MS-free protein identification in complex Mixtures using multiple enzymes with complementary specificity, *J. Proteome Res.*, **16**, 3989-3999, doi: 10.1021/acs.jproteome.7b00365.
 18. Ivanov, M. V., Bubis, J. A., Gorshkov, V., Tarasova, I. A., Levitsky, L. I., et al. (2020) DirectMS1: MS/MS-free identification of 1000 proteins of cellular proteomes in 5 minutes, *Anal. Chem.*, **92**, 4326-4333, doi: 10.1021/acs.analchem.9b05095.
 19. Ivanov, M. V., Bubis, J. A., Gorshkov, V., Abdrakhimov, D. A., Kjeldsen, F., et al. (2021) Boosting MS1-only proteomics with machine learning allows 2000 protein identifications in single-shot human proteome analysis using 5 min HPLC gradient, *J. Proteome Res.*, **20**, 1864-1873, doi: 10.1021/acs.jproteome.0c00863.
 20. Tansey, W. P. (2006) Freeze-thaw lysis for extraction of proteins from Mammalian cells, *CSH Protoc.*, **2006**, pdb.prot4614, doi: 10.1101/pdb.prot4614.
 21. Saei, A. A., Beusch, C. M., Chernobrovkin, A., Sabatier, P., Zhang, B., et al. (2019) ProTargetMiner as a proteome signature library of anticancer molecules for functional discovery, *Nat. Commun.*, **10**, 5715, doi: 10.1038/s41467-019-13582-8.
 22. Duan, J.-X. (2005) Method for synthesis of lonidamine and related indazole derivatives, *Patent WO2005120498A2*, publication date 22.12.2005.
 23. Zhang, Y., Fonslow, B. R., Shan, B., Baek, M. C., and Yates, J. R. 3rd. (2013) Protein analysis by shotgun/bottom-up proteomics, *Chem. Rev.*, **113**, 2343-2394, doi: 10.1021/cr3003533.
 24. Bateman, N. W., Goulding, S. P., Shulman, N. J., Gadok, A. K., Szumlinski, K. K., et al. (2014) Maximizing peptide identification events in proteomic workflows using data-dependent acquisition (DDA), *Mol. Cell. Proteomics*, **13**, 329-338, doi: 10.1074/mcp.M112.026500.
 25. Levitsky, L. I., Ivanov, M. V., Lobas, A. A., Bubis, J. A., Tarasova, I. A., et al. (2018) IdentiPy: an extensible search engine for protein identification in shotgun proteomics, *J. Proteome Res.*, **17**, 2249-2255, doi: 10.1021/acs.jproteome.7b00640.
 26. Ivanov, M. V., Levitsky, L. I., Bubis, J. A., and Gorshkov, M. V. (2019) Scavenger: a versatile postsearch validation algorithm for shotgun proteomics based on gradient boosting, *Proteomics*, **19**, e1800280, doi: 10.1002/pmic.201800280.
 27. Zybailov, B., Mosley, A. L., Sardi, M. E., Coleman, M. K., Florens, L., et al. (2006) Statistical analysis of membrane proteome expression changes in *Saccharomyces cerevisiae*, *J. Proteome Res.*, **5**, 2339-2347, doi: 10.1021/pr060161n.
 28. Bubis, J. A., Levitsky, L. I., Ivanov, M. V., Tarasova, I. A., and Gorshkov, M. V. (2017) Comparative evaluation of label-free quantification methods for shotgun proteomics, *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, **31**, 606-612, doi: 10.1002/rcm.7829.
 29. Zhang, B., Pirmoradian, M., Zubarev, R., and Käll, L. (2017) Covariation of peptide abundances accurately reflects protein concentration differences, *Mol. Cell. Proteomics*, **16**, 936-948, doi: 10.1074/mcp.O117.067728.
 30. Abdrakhimov, D. A., Bubis, J. A., Gorshkov, V., Kjeldsen, F., Gorshkov, M. V., et al. (2021) Biosaur: An open-source Python software for liquid chromatography-mass spectrometry peptide feature detection with ion mobility support, *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, e9045, doi: 10.1002/rcm.9045.
 31. Eden, E., Navon, R., Steinfeld, I., Lipson, D., and Yakhini, Z. (2009) GOrilla: a tool for discovery and visualization of enriched GO terms in ranked gene lists, *BMC Bioinformatics*, **10**, 48, doi: 10.1186/1471-2105-10-48.
 32. Ashburner, M., Ball, C. A., Blake, J. A., Botstein, D., Butler, H., et al. (2000) Gene ontology: tool for the unification of biology. The Gene Ontology Consortium, *Nat. Genet.*, **25**, 25-29, doi: 10.1038/75556.

33. Zhao, Y., Butler, E. B., and Tan, M. (2013) Targeting cellular metabolism to improve cancer therapeutics, *Cell Death Dis.*, **4**, e532, doi: 10.1038/cddis.2013.60.
34. Shang, C., Hou, Y., Meng, T., Shi, M., and Cui, G. (2021) The anticancer activity of indazole compounds: a mini review, *Curr. Top. Med. Chem.*, **21**, 363-376, doi: 10.2174/1568026620999201124154231.
35. Peng, J., Cui, Y., Xu, S., Wu, X., Huang, Y., et al. (2021) Altered glycolysis results in drug-resistant in clinical tumor therapy, *Oncol. Lett.*, **21**, 369, doi: 10.3892/ol.2021.12630.
36. Pelicano, H., Martin, D. S., Xu, R. H., and Huang, P. (2006) Glycolysis inhibition for anticancer treatment, *Oncogene*, **25**, 4633-4646, doi: 10.1038/sj.onc.1209597.
37. De Lena, M., Lorusso, V., Latorre, A., Fanizza, G., Gargano, G., et al. (2001) Paclitaxel, cisplatin and lonidamine in advanced ovarian cancer. A phase II study, *Eur. J. Cancer*, **37**, 364-368, doi: 10.1016/s0959-8049(00)00400-7.
38. Nath, K., Guo, L., Nancolas, B., Nelson, D. S., Shestov, A. A., et al. (2016) Mechanism of anti-neoplastic activity of lonidamine, *Biochim. Biophys. Acta*, **1866**, 151-162, doi: 10.1016/j.bbcan.2016.08.001.
39. Shen, Y. A., Chen, C. C., Chen, B. J., Wu, Y. T., Juan, J. R., et al. (2021) Potential therapies targeting metabolic pathways in cancer stem cells, *Cells*, **10**, 1772, doi: 10.3390/cells10071772.
40. Gabdrakhmanov, I. T., Gorshkov, M. V., and Tarasova, I. A. (2021) Proteomics of cellular response to stress: taking control of false positive results, *Biochemistry (Moscow)*, **86**, 338-349, doi: 10.1134/S0006297921030093.

ON THE FEASIBILITY OF USING AN ULTRA-FAST DirectMS1 METHOD OF PROTEOME-WIDE ANALYSIS FOR SEARCHING DRUG TARGETS IN CHEMICAL PROTEOMICS

E. M. Solovyeva¹, J. A. Bubis¹, I. A. Tarasova¹, A. A. Lobas¹, M. V. Ivanov¹, A. A. Nazarov², I. A. Shutkov², and M. V. Gorshkov^{1*}

¹ V. L. Talrose Institute for Energy Problems of Chemical Physics, N.N. Semenov Federal Research Center for Chemical Physics, Russian Academy of Sciences, 119334 Moscow, Russia; e-mail: mike.gorshkov@gmail.com

² Faculty of Chemistry, Lomonosov Moscow State University, 119991 Moscow, Russia

Protein quantitation in tissue cells or physiological fluids based on liquid chromatography/mass spectrometry is one of the key sources of information on the mechanisms of cell functioning during chemotherapeutic treatment. Information on significant changes in protein expression upon treatment can be obtained by chemical proteomics and requires analysis of the cellular proteomes, as well as development of experimental and bioinformatic methods for identification of the drug targets. Low throughput of whole proteome analysis based on liquid chromatography and tandem mass spectrometry is one of the main factors limiting the scale of these studies. The method of direct mass spectrometric identification of proteins, DirectMS1, is one of the approaches developed in recent years allowing ultrafast proteome-wide analyses employing minute-scale gradients for separation of proteolytic mixtures. Aim of this work was evaluation of both possibilities and limitations of the method for identification of drug targets at the level of whole proteome and for revealing cellular processes activated by the treatment. Particularly, the available literature data on chemical proteomics obtained earlier for a large set of onco-pharmaceuticals using multiplex quantitative proteome profiling were analyzed. The results obtained were further compared with the proteome-wide data acquired by the DirectMS1 method using ultrashort separation gradients to evaluate efficiency of the method in identifying known drug targets. Using ovarian cancer cell line A2780 as an example, a whole-proteome comparison of two cell lysis techniques was performed, including the freeze-thaw lysis commonly employed in chemical proteomics and the one based on ultrasonication for cell disruption, which is the widely accepted as a standard in proteomic studies. Also, the proteome-wide profiling was performed using ultrafast DirectMS1 method for A2780 cell line treated with lonidamine, followed by gene ontology analyses to evaluate capabilities of the method in revealing regulation of proteins in the cellular processes associated with drug treatment.

Keywords: proteomics, mass spectrometry, proteins, lonidamine, lysis, signaling pathways

РАКОВО-СЕТЧАТОЧНЫЕ АНТИГЕНЫ В МОЧЕ БОЛЬНЫХ РАКОМ МОЧЕВОГО ПУЗЫРЯ И ПРЕДСТАТЕЛЬНОЙ ЖЕЛЕЗЫ

© 2022 Ю.М. Шляпников^{1*}, Е.А. Малахова¹, А.З. Винаров², Н.В. Потолдыкова²,
В.И. Владимиров³, Е.Ю. Зерний⁴, А.А. Замятнин мл.^{4,5,6}, Е.А. Шляпкина¹

¹ *Институт теоретической и экспериментальной биофизики РАН,
142290 Пущино, Московская обл., Россия; электронная почта: yuri.shlyapnikov@gmail.com*

² *Первый Московский государственный медицинский университет имени И.М. Сеченова Минздрава России,
Институт урологии и репродуктивного здоровья человека, 119991 Москва, Россия*

³ *Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН,
117437 Москва, Россия*

⁴ *НИИ физико-химической биологии имени А.Н. Белозерского,
Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, 119992 Москва, Россия*

⁵ *Первый Московский государственный медицинский университет имени И.М. Сеченова Минздрава России,
Институт молекулярной медицины, 119991 Москва, Россия*

⁶ *Научно-технологический университет «Сириус»,
354340 Краснодарский край, федеральная территория «Сириус», Россия*

Поступила в редакцию 07.04.2022

После доработки 02.10.2022

Принята к публикации 13.10.2022

Недавно было показано, что комбинация зрительного аррестина с рековерином может служить эффективным мочевым биомаркером рака почки с чувствительностью и специфичностью выше 92%. В настоящей работе изучена возможность детекции указанных антигенов в моче при других урологических онкозаболеваниях – раке мочевого пузыря (РМП) и предстательной железы (РПЖ). С использованием ультрачувствительного иммуноанализа на микрочипах, имеющего предел детектирования 0,1 пг/мл, были проанализированы образцы мочи 40 больных РМП и 40 больных РПЖ. Показано, что при РМП чувствительность определения комбинации аррестина с рековерином составляет 58% (AUC 0,76; 95% доверительный интервал 0,66–0,86), в то время как при РПЖ – 60% (AUC 0,78; 95% доверительный интервал 0,68–0,88). Установлено, что у больных с РМП и РПЖ, имевших положительный результат анализа, после удаления опухоли указанные антигены в моче не обнаруживаются в 90% случаев. Полученные результаты в будущем могут стать основой для создания новых подходов для своевременного выявления рецидивов таких заболеваний и наблюдения за ходом лечения, а также для развития новых диагностических методов.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: раково-сетчаточные антигены, иммуноанализ, урологические онкозаболевания, микрочипы, магнитные частицы.

DOI: 10.31857/S0320972522110100, EDN: LWНОКА

ВВЕДЕНИЕ

Несмотря на значительные успехи в области молекулярной медицины, высокочувствительные и специфичные биомаркеры урологических онкозаболеваний практически отсутствуют. В настоящее время моча рассматривается в качестве уникального источника биомаркеров урологических онкозаболеваний, в первую очередь ввиду её прямого контакта

с опухолью. Немаловажно, что простой неинвазивный способ получения образцов, позволяющий избежать тяжёлых для пациента процедур, не требует дополнительной пробоподготовки. Потенциальные мочевые биомаркеры рака мочевыводящих путей подробно описаны в многочисленных работах [1–6]. Поиск новых белковых мочевых онкомаркеров представляется перспективным по нескольким причинам. Во-первых, наличие большого чис-

Принятые сокращения: ПСА – простатический специфический антиген; РМП – рак мочевого пузыря; РПЖ – рак предстательной железы; AUC – площадь под ROC-кривой; ROC – операционная характеристика приёмника.

* Адресат для корреспонденции.

ла хорошо отработанных методов иммунохимического анализа белков позволяет выбрать оптимальный метод детекции заданного биомаркера. Во-вторых, крайне низкое содержание белков в моче, в том числе по сравнению с кровью, облегчает проведение иммуноанализа. Наконец, антигены выделяются опухолью непосредственно в анализируемую среду, избегая разбавления в кровяном русле. В результате многолетних исследований мочевых белковых биомаркеров почечно-клеточного рака были выявлены наиболее перспективные индивидуальные биомаркеры, а также предложены панели, которые демонстрируют чувствительность, близкую к 100%. К ним относятся аквапорин-1 в комбинации с перилипином-2 (100% чувствительность и 95% специфичность) [7], комбинация белка, ингибирующего Raf-киназу, с его фосфорилированной формой [8] и др. В отношении рака мочевого пузыря было предложено множество диагностических тестов мочи, включая UBC-тест, UroVysion (FISH), тесты на основе определения ядерного матриксного белка (NMP22®), рецептора фактора роста фибробластов 3 (FGFR3) и др. Все они имеют высокую чувствительность и специфичность [6], однако ни одна из предложенных систем не была рекомендована для клинической практики [9, 10]. Проанализировав эффективность как одиночных мочевых биомаркеров, так и панелей, составленных из комбинации белков для диагностики рака мочевого пузыря (РМП), мы предположили, что использование более чувствительных методов детекции может помочь открытию новых перспективных белковых онкомаркеров [6].

Рак предстательной железы (РПЖ) является ведущей причиной смерти мужчин от онкологических заболеваний [11]. Обычно его подозревают на основании пальцевого ректального исследования и/или наличия изменений уровней в сыворотке крови простатического специфического антигена (ПСА). Применение ПСА в качестве сывороточного маркера произвело революцию в диагностике РПЖ, несмотря на его ограниченную чувствительность и специфичность [12]. До сих пор ПСА остаётся единственным диагностическим биомаркером РПЖ, который рекомендован для широкого практического использования. В последние годы были предложены новые биомаркеры рака предстательной железы, определяемые в моче и плазме [13–16]. Из мочевых биомаркеров последнего поколения наибольшее внимание привлекают ПСА3 (Progenza), SelectMDx, MiPS и EchoDx [17]. Ряд тестов, например, ПСА3 и SelectMDx, направлен на выявление в моче

специфических мРНК. Согласно данным мета-анализа, чувствительность теста ПСА3 составляет 46,9–82,3%, специфичность – 56,3–89% [18]. SelectMDx показал обнадеживающие результаты с AUC, равной 0,90 [19]. Тест EchoDx Prostate (IntelliScore) предсказывает рак предстательной железы с AUC = 0,80 [20]. Однако в настоящее время как оценка MiPS, так и анализ EchoDx считаются экспериментальными. Таким образом, в целом можно говорить о том, что в настоящее время не существует методик определения каких-либо биомаркеров в моче, пригодных для достоверной диагностики РПЖ.

Известно, что некоторые фоторецепторные белки, такие как аррестин и рековерин, экспрессируются как раково-сетчаточные антигены опухолями различных типов. Это подтверждено определением как антигенов в самих опухолевых тканях, так и аутоантител к ним в сыворотке крови [21, 22]. Недавно мы показали, что комбинация аррестина с рековерином может служить эффективным мочевым биомаркером рака почки с чувствительностью 96% и специфичностью 92% [23]. В то же время моча может контактировать с опухолью и при других урологических онкозаболеваниях, в том числе при РМП и РПЖ. В настоящей работе мы определили уровни аррестина и рековерина в моче 80 больных раком мочевого пузыря и предстательной железы и сравнили их с результатами анализа 50 пациентов с урологическими незлокачественными заболеваниями. Кроме того, нами были проанализированы образцы мочи больных РМП и РПЖ до и после удаления опухоли. Для решения этих задач в работе был использован мультиплексный иммуноанализ на микрочипах с магнитными метками, имеющий предел обнаружения 0,1 пг/мл [6].

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Материалы. Реагенты и мембрана из регенерированной целлюлозы (толщина 40 мкм) приобретены в «Sigma-Aldrich» США. Карбоксилированные магнитные частицы (Dynabeads MyOne, диаметр 1 мкм) приобретены в «Invitrogen» США. Получение рекомбинантных антигенов и антител описано ранее [6, 23].

Пациенты и образцы. Сбор образцов проводился в Институте урологии и репродуктивного здоровья Сеченовского университета в 2019–2021 гг. Образцы мочи хранили при –80 °С. Диагноз РМП и РПЖ подтверждался гистологическим исследованием образцов ткани, полученных в ходе оперативного лечения. Среди больных РМП было 32 мужчины и 8 женщин;

медианный возраст (диапазон) составил 66 (30–86) и 68 (48–81) лет для больных РМП и РПЖ соответственно. Количество больных РМП с разными стадиями опухоли составили: T1 – 32, T2 – 2, T3 – 1, T4 – 5 (T1 соответствует наиболее лёгкой стадии с наименьшим размером опухоли); в случае РПЖ: T1 – 38, T2 – 1, T3 – 1, T4 – 0. У всех пациентов метастазы в отдалённые органы и лимфоузлы отсутствовали. В контрольной группе 25 пациентов имели диагноз мочекаменная болезнь, 18 – доброкачественная гиперплазия предстательной железы, 3 – стриктура уретры, 3 – гидронефроз и 1 – кисты почки [23]. Содержание ПСА в сыворотке больных РПЖ определяли с помощью стандартных коммерческих наборов.

Проведение иммуноанализа. Процедура изготовления белковых микрочипов описана ранее [20]. Микрочипы помещали в пробирки с мочой (1–1,5 мл) и инкубировали в течение ночи при +4 °С с вращением со скоростью 20 об./мин. Микрочип промывали водой и фиксировали в проточной ячейке, описанной ранее [24], под которую устанавливали магнит (рис. 1, а). Суспензию магнитных частиц, конъюгированных с антителами к аррестину и рековерину, с общей концентрацией 0,001% прокачивали через ячейку в течение 2–3 мин. Изображения микрочипа получали с помощью оптического микроскопа Микмед-6 («ЛОМО», Россия) с темнопольным осветителем и обрабатывали, как описано ранее [25] с некоторыми модификациями [23]. При этом в каждом эксперименте анализировалось большое число (до 1000) связанных на поверхности микрочипа магнитных частиц, что позволило определить

статистическую значимость результата анализа для каждого образца мочи.

Статистическая обработка результатов. Для оценки различий между опытными и контрольными группами использовали χ^2 -тест; для определения различий в содержании аррестина и рековерина до и после операции – критерий знаков; для определения различий в содержании ПСА – критерий Манна–Уитни. Расчёты осуществлялись в OriginPro 2018. Варьируя значение пороговой концентрации (0,1; 0,3; 1; 3; 10 пг/мл), строили ROC-кривые (receiver operator characteristic), представляющие собой зависимость доли истинно положительных от доли ложноположительных результатов. Для оценки предсказательной способности биомаркеров определяли площадь под ROC-кривой (AUC, area under curve). По построению, площадь под кривой, равная 1, соответствует идеальной предсказательной способности, а при AUC, равной 1/2, предсказательная способность полностью отсутствует. Для оценки доверительных интервалов значений AUC использовали биномиальную модель [26].

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

Для мультиплексного иммуноанализа методом электрораспыления были изготовлены микрочипы на низкоадгезивной мембране из регенерированной целлюлозы [24]. Описанная технология позволяет параллельно изготавливать до 100 микрочипов с минимальным расходом антител – около 10 нг на один микрочип. На основе таких микрочипов нами была раз-

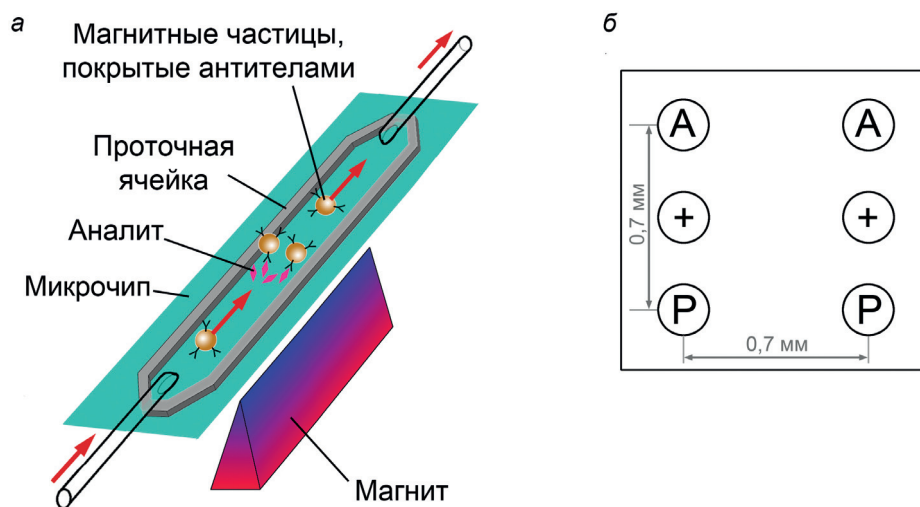


Рис. 1. Иммуноанализ на микрочипах. а – Схема ультразвуковой детекции сигнала на микрочипе с помощью магнитных частиц, покрытых специфическими антителами. Стрелки указывают траекторию движения магнитных частиц. б – Схема микрочипа. Обозначения активных зон: А – моноклональные антитела к аррестину, Р – поликлональные антитела к рековерину, + – положительный контроль (рекомбинантный рековерин). Роль отрицательного контроля выполняет пространство между активными зонами микрочипа

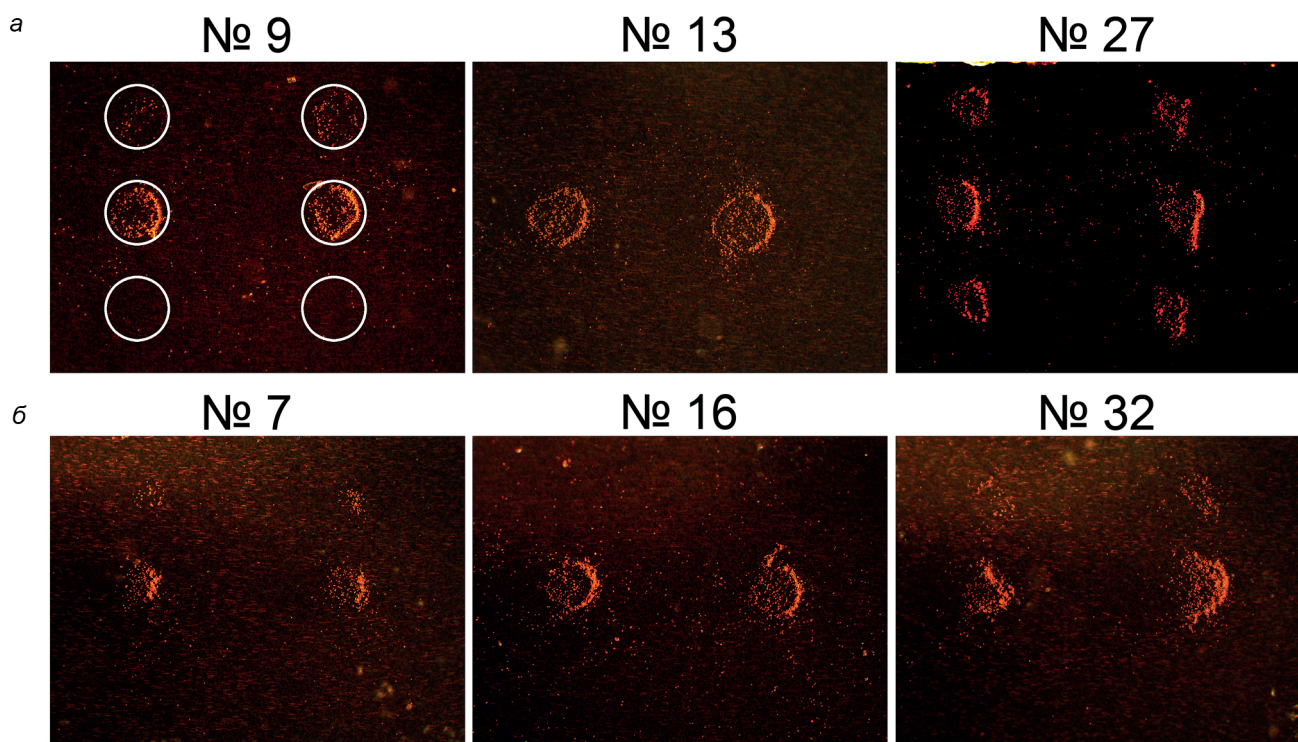


Рис. 2. Репрезентативные примеры результатов анализа образцов мочи, полученных от больных РМП (*а*) и РПЖ (*б*). Номера образцов соответствуют указанным в табл. S1 и S2 в Приложении. На верхней левой фотографии отмечены зоны, в которых анализируется сигнал

работана ультрачувствительная тест-система для определения раково-сетчаточных антигенов [23]. На рис. 1, *а* приведено схематическое изображение ячейки, использованной в иммуноанализе, и схема детекции сигнала на микрочипе. В настоящем исследовании микрочипы включали активные зоны антител к аррестину и рековерину, а также зоны положительного

контроля в двух повторах (рис. 1, *б*). В качестве положительного контроля использовался один из исследуемых антигенов, а именно рекомбинантный рековерин. На первом этапе был определён предел детектирования аррестина и рековерина в контрольном образце мочи, в котором данные антигены изначально отсутствовали. Он составил 0,1 пг/мл для обоих антигенов.

Таблица 1. Характеристики эффективности определения аррестина, рековерина и их комбинации в моче больных РМП и РПЖ

Биомаркер	Характеристика	Рак мочевого пузыря	Рак предстательной железы
Аррестин	чувствительность ¹	30% ($n = 40$)	53% ($n = 40$)
	специфичность ²	94% ($n = 50$)	
	AUC ³	0,63 (0,51–0,75)	0,74 (0,63–0,85)
Рековерин	чувствительность ¹	38% ($n = 40$)	13% ($n = 40$)
	специфичность ²	96% ($n = 50$)	
	AUC ³	0,67 (0,55–0,79)	0,54 (0,42–0,66)
Комбинация аррестина с рековерином	чувствительность ¹	58% ($n = 40$)	60% ($n = 40$)
	специфичность ²	92% ($n = 50$)	
	AUC ³	0,76 (0,66–0,86)	0,78 (0,68–0,88)

Примечание. ¹ Значения чувствительности и специфичности рассчитаны для пороговой концентрации 0,1 пг/мл.

² Специфичность определяли для контрольной группы из 50 урологических больных, не имеющих злокачественных образований [23].

³ В скобках указаны значения 95% доверительного интервала.

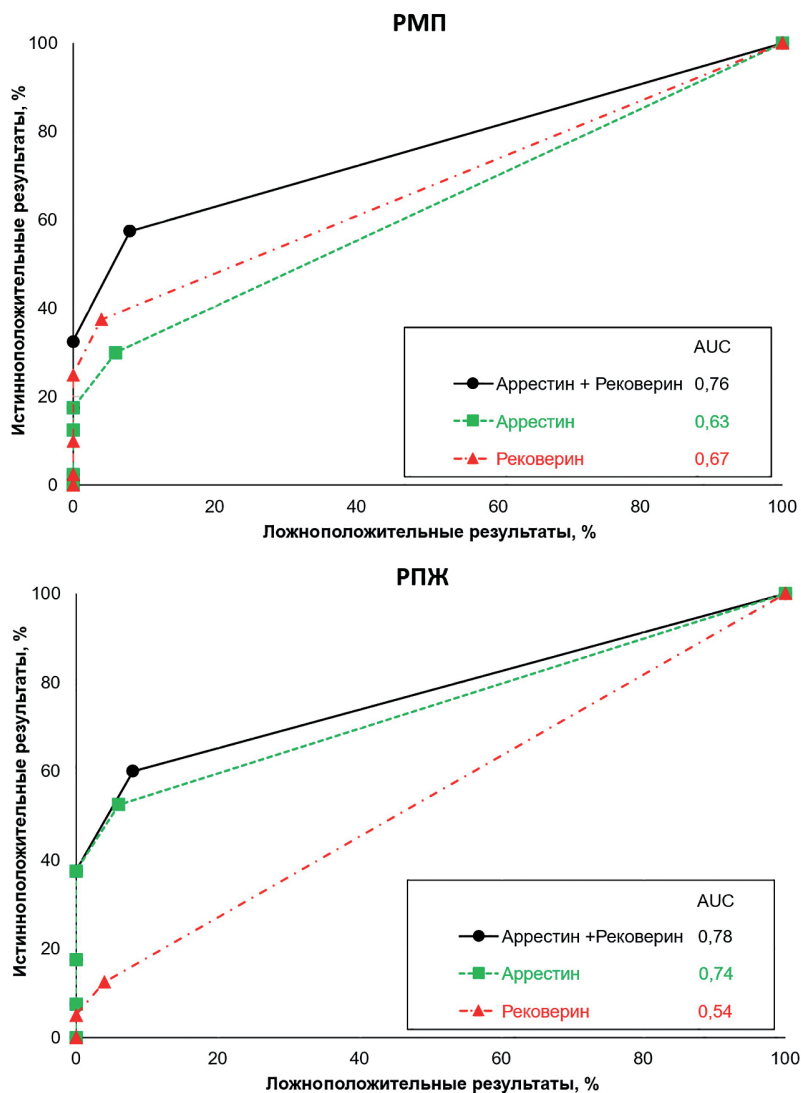


Рис. 3. ROC-кривые для определения раково-сетчаточных антигенов при РМП и РПЖ. Результаты статистической обработки ROC-кривых (доверительные интервалы для значений AUC) содержатся в табл. 1

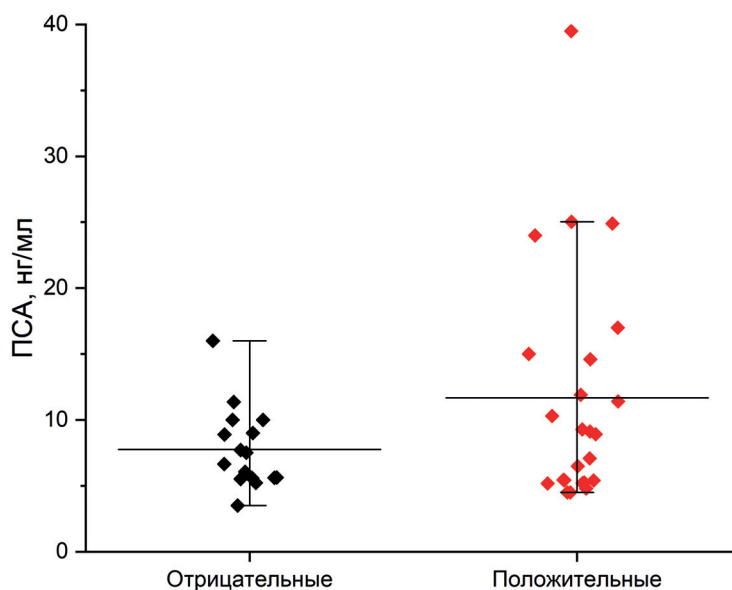


Рис. 4. Сравнение содержания ПСА в образцах сыворотки пациентов с положительным и отрицательным анализом мочи на аррестин и рековерин. Приведены медианы и 5–95% перцентили

Далее, были построены калибровочные кривые, позволяющие проводить полуколичественное измерение концентрации белков с точностью $\frac{1}{2}$ десятичного порядка [23]. Надо отметить, что высокая чувствительность иммуноанализа достигается благодаря детекции сигнала покрытыми специфическими антителами магнитными частицами, которые в ламинарном потоке при приложении магнитного поля сканируют поверхность микрочипа. Такой способ проведения анализа, как мы показали ранее, позволяет выявлять даже единичные межмолекулярные взаимодействия [27].

Всего в работе на присутствие зрительно-го аррестина и рековерина было проанализировано 40 образцов мочи больных РМП и 40 образцов больных РПЖ. Репрезентативные фотографии микрочипов, полученные в результате анализа образцов мочи пациентов с указанными заболеваниями, представлены на рис. 2.

На рис. 3 приведены ROC-кривые и соответствующие значения площади под кривой (AUC) для аррестина и рековерина в отдельности и для их комбинации. Как и в случае рака почки [23], полуколичественный характер

Таблица 2. Результаты анализа образцов мочи, полученных от больных РМП перед операцией и через 7 дней после операции

Пациент #	Аррестин, пг/мл		Рековерин, пг/мл	
	до операции	после операции	до операции	после операции
1	<0,1	<0,1	0,1–0,3	<0,1
2	<0,1	<0,1	0,1–0,3	<0,1
3	<0,1	<0,1	0,1–0,3	<0,1
4	0,1–0,3	<0,1	<0,1	<0,1
5	0,3–1,0	<0,1	<0,1	<0,1
6	<0,1	<0,1	0,3–1,0	<0,1
7	0,1–0,3	<0,1	<0,1	<0,1
8	0,1–0,3	<0,1	<0,1	<0,1
9	0,1–0,3	<0,1	<0,1	<0,1
10	<0,1	0,3–1,0	1–3	<0,1

Примечание. # Номера образцов соответствуют указанным в табл. S1 и S2 в Приложении. Различия в содержании аррестина и рековерина до и после операции являются статистически значимыми ($p < 0,01$).

Таблица 3. Результаты анализа образцов мочи, полученных от больных РПЖ перед операцией и через 7 дней после операции

Пациент #	Аррестин, пг/мл		Рековерин, пг/мл	
	до операции	после операции	до операции	после операции
1	3–10	<0,1	1–3	<0,1
2	1–3	<0,1	<0,1	<0,1
3	0,3–1,0	<0,1	<0,1	<0,1
4	0,1–0,3	<0,1	<0,1	<0,1
5	0,1–0,3	0,1–0,3	<0,1	<0,1
6	<0,1	<0,1	0,1–0,3	<0,1
7	0,1–0,3	<0,1	<0,1	<0,1
8	<0,1	<0,1	0,1–0,3	<0,1
9	1–3	<0,1	<0,1	<0,1
10	0,3–1,0	<0,1	<0,1	<0,1

Примечание. # Номера образцов соответствуют указанным в табл. S1 и S2 в Приложении. Различия в содержании аррестина и рековерина до и после операции являются статистически значимыми ($p < 0,01$).

используемого метода объясняет небольшое количество доступных значений пороговой концентрации – 0,1, 0,3, 1, 3 и 10 пг/мл. Очевидно, что оптимальным является минимальное значение пороговой концентрации 0,1 пг/мл. В табл. 1 указаны доверительные интервалы для значений AUC, а также значения чувствительности и специфичности определения аррестина и рековерина, отвечающие порогу концентрации 0,1 пг/мл. Исходные данные для вычисления указанных значений приведены в табл. S1 и S2 в Приложении.

В данной работе мы проанализировали также по 10 образцов мочи, взятой через 7 дней после удаления опухоли у больных с РМП и РПЖ, у которых тест на раково-сетчаточные антигены до операции был положительным. Результаты анализа приведены в табл. 2 и 3. Как в случае РМП, так и РПЖ в 90% образцов больных после операции аррестин с рековерином не были обнаружены.

Наконец, мы исследовали корреляцию содержания традиционного биомаркера ПСА в сыворотке крови и аррестина и рековерина в моче у больных РПЖ. Для этого мы сравнили содержание ПСА в сыворотке пациентов, имеющих положительный и отрицательный анализ мочи на аррестин и рековерин (рис. 4). Показано, что для больных, в моче которых детектированы данные антигены, характерен более высокий уровень ПСА, хотя различие не является статистически значимым ($p > 0,05$).

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

В настоящей работе мы определили содержание раково-сетчаточных антигенов – аррестина и рековерина – в моче больных РМП и РПЖ и пациентов с доброкачественными урологическими заболеваниями и сравнили их с результатами, полученными ранее для больных раком почки [23]. Из данных, полученных в результате анализа 40 образцов больных РМП и представленных на рис. 3, можно сделать вывод о том, что лучшей предсказательной способностью, как и ожидалось, обладает комбинация биомаркеров: значение AUC повышается с 0,63 – для аррестина и 0,67 – для рековерина до 0,76. Совсем другая картина наблюдалась при исследовании 40 образцов мочи больных РПЖ. Показано, что эффективность рековерина в качестве потенциального биомаркера РПЖ близка к нулю (AUC = 0,54). В результате предсказательная способность комбинации рековерина с арре-

стином для РПЖ оказалась такой же, как для самого аррестина (AUC = 0,78 и 0,74 соответственно). Для объяснения этих результатов требуется детальное понимание механизмов, управляющих aberrантной экспрессией раково-сетчаточных антигенов различными типами раковых клеток, однако пока эти механизмы остаются невыясненными. В работах Golovastova et al. [22] и Vazhin et al. [28] показана роль деметилирования CpG в промоторной области гена рековерина в регуляции его aberrантной экспрессии в клетках рака почки, меланомы и других типов рака. Примечательно, что некоторые образцы опухолей с неизменённым статусом метилирования ДНК промотора рековерина оказались тем не менее способными продуцировать белок [22]. Это не исключает описанного эпигенетического механизма, однако предполагает наличие альтернативных путей, регулирующих экспрессию рековерина в злокачественных опухолях.

Помимо уровня экспрессии биомаркеров в опухолях различных типов, на диагностическую эффективность может влиять способность биомаркеров экстрагироваться из опухолевой ткани в мочу. Полученные нами результаты могут быть частично объяснены с учётом этого обстоятельства. Обобщая данные по содержанию аррестина и рековерина в моче при различных урологических онкозаболеваниях, можно заключить, что предсказательная способность раково-сетчаточных антигенов существенно выше в случае рака почки, чем для РМП и РПЖ. Вместе с тем, согласно литературным данным, одиночные биомаркеры рака простаты в среднем уступают по чувствительности и предиктивной способности биомаркерам рака почки и мочевого пузыря [6, 17–20]. Надо отметить, что единственный широко применяемый в клинической практике белковый биомаркер, ПСА в крови, имеет весьма низкую предсказательную способность (AUC = 0,67) [29], то есть ниже предсказательной способности комбинации аррестина и рековерина в моче. Известно, что при РПЖ опухоль локализуется преимущественно в периферической зоне предстательной железы [30], из которой массоперенос белков в мочу может быть затруднён по анатомическим причинам. В то же время в случае рака почки развитая внутренняя поверхность, эффективно омываемая мочой, способствует более полной экстракции биомаркеров. Ткани мочевого пузыря также хорошо омываются мочой, однако плотный барьерный слой эпителиальных клеток пузыря может затруднять диффузию веществ, особенно срав-

нительно гидрофобных белков, таких как раково-сетчаточные антигены. Этим может объясняться их невысокая диагностическая эффективность в случае РМП по сравнению с раком почки.

Однако, несмотря на указанные проблемы, мочевые биомаркеры белковой природы представляются более перспективными для диагностики урологических онкозаболеваний по сравнению с биомаркерами крови. Как было показано ранее [23], определение аррестина и рековерина в сыворотке крови неэффективно вследствие низкой специфичности анализа. Вероятно, высокое содержание белков в крови мешает получению специфического сигнала при ультрачувствительном иммуноанализе. Если сравнить уровень содержания ПСА в крови и моче, оказывается, что у здоровых мужчин среднее значение в 200 раз выше в моче, чем в крови: 800 нг/мл против 4 нг/мл [31], а у больных РПЖ концентрация ПСА в моче может превышать 900 нг/мл [32]. Очевидно, что в случае урологических онкозаболеваний концентрация выделяемых опухолью белковых биомаркеров в моче существенно выше по сравнению с кровью, что, в сочетании с более низким содержанием общего белка в моче, может способствовать более высокой диагностической эффективности мочевых биомаркеров.

Оценку специфичности аррестина, рековерина и их комбинации проводили на основании результатов анализа образцов 50 пациентов, не имеющих злокачественных или доброкачественных опухолей почки и мочевого пузыря, таких как онкоцитома; однако в группе было 13 больных с доброкачественной гиперплазией предстательной железы, и в 2 образцах таких больных был детектирован аррестин [23]. Доля положительных анализов в случае гиперплазии предстательной железы оказалась существенно ниже ($2/13 = 15\%$), чем в случае РПЖ (60%), но больше, чем для контрольной группы пациентов, у которых доброкачественные урологические опухоли отсутствовали ($2/37 = 5\%$). Хотя малая выборка не позволяет говорить о статистической достоверности результатов, тем не менее они согласуются с литературными данными [21, 22], в которых показана экспрессия аррестина и рековерина в доброкачественных урологических опухолях. Стоит отметить, что концентрация ПСА в крови также может повышаться при доброкачественных заболеваниях предстательной железы [29]. Вместе с тем систематическое изучение возможности дифференциальной диагностики доброкачественных и

злокачественных опухолей по раково-сетчаточным антигенам, а также урологических и неурологических онкозаболеваний является самостоятельной задачей.

Наконец, следует обсудить перспективы использования аррестина и рековерина в качестве предиктивных биомаркеров. После удаления опухоли у больных с РМП и РПЖ аррестин с рековерином в моче не детектируются в 90% случаев. Это наблюдение согласуется с результатами, полученными ранее для больных почечно-клеточным раком [23], и подтверждает опухолевое происхождение обнаруживаемых в моче аррестина и рековерина. Данный факт выгодно отличает раково-сетчаточные антигены от многих других биомаркеров, в частности, ПСА, концентрация которого в моче оставалась довольно высокой (в среднем 21,4 нг/мл) даже после удаления предстательной железы [31], и может иметь большое практическое значение, например, для отслеживания эффективности лечения.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В настоящей работе установлено, что при РМП и РПЖ из опухоли в мочу могут выделяться раково-сетчаточные антигены – аррестин и рековерин – в концентрации менее 1 пг/мл, которые не могут быть детектированы традиционными методами иммуноанализа, такими как ИФА, Вестерн-блоттинг или иммунохроматография. Эффективным методом выявления антигенов в столь низких концентрациях является «активный» иммуноанализ на микрочипах с магнитными метками, не требующий дорогостоящего оборудования и большого расхода антител. Выявление аррестина и рековерина в моче пациента позволяет подозревать как рак почки, так и рак мочевого пузыря и предстательной железы. Это означает, что в случае положительного теста на данные антигены больному требуется пройти дополнительное обследование для дифференциальной диагностики этих урологических онкозаболеваний. Важно отметить, что аррестин с рековерином могут рассматриваться и как потенциальные неинвазивные биомаркеры для оценки состояния послеоперационных больных и эффективности проводимого лечения. В связи с этим мы предполагаем, что описанный в настоящей работе тест по новым мочевым биомаркерам может представлять интерес для специалистов, работающих в области урологической онкологии, и в перспективе может быть использован в клинической практике.

Вклад авторов. Ю.М.Ш., А.З.В., А.А.З. – концепция и руководство работой; Ю.М.Ш., Е.А.М., Е.А.Ш. – проведение экспериментов; Н.В.П. – сбор и обработка образцов; В.И.В. и Е.Ю.З. – получение антител и антигенов; Ю.М.Ш., А.З.В., А.А.З. – обсуждение результатов исследования; Е.А.Ш. и Ю.М.Ш. – написание текста; Ю.М.Ш., Е.Ю.З. – редактирование финального текста статьи.

Финансирование. Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда (грант № 19-75-10025).

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Соблюдение этических норм. Все исследования проводили в соответствии с Хельсинкской декларацией 1975 г., пересмотренной в 2008 г.; они были также одобрены Этическим комитетом Сеченовского университета (№ 10-18; 17/11/2018). От всех пациентов было получено добровольное письменное согласие на участие в исследовании.

Дополнительные материалы. Приложение к статье опубликовано на сайте журнала «Биохимия» (<https://biochemistrymoscow.com>).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Flitcroft, J. G., Verheyen, J., Vemulkar, T., Welbourne, E. N., Rossi, S. H., et al. (2022) Early detection of kidney cancer using urinary proteins: a truly non-invasive strategy, *BJU Int.*, **129**, 290-303, doi: 10.1111/bju.15601.
2. Dakubo, G. D. (2019) *Cancer Biomarkers in Body Fluids (Biomarkers in Proximal Fluids)*, Springer, doi: 10.1007/978-3-030-24725-6.
3. Ng, K., Stenzl, A., Sharma, A., Vasdev, N. (2020) Urinary biomarkers in bladder cancer: a review of the current landscape and future directions, *Urol. Oncol.*, **39**, 1-11, doi: 10.1016/j.urolonc.2020.08.016.
4. Maas, M., Bedke, J., Stenzl, A., and Todenhöfer, T. (2019) Can urinary biomarkers replace cystoscopy? *World J. Urol.*, **37**, 1741-1749, doi: 10.1007/s00345-018-2505-2.
5. Batista, R., Vinagre, N., Meireles, S., Vinagr, E. J., Prazeres, H., Leão, R., et al. (2020) Biomarkers for bladder cancer diagnosis and surveillance: a comprehensive review, *Diagnostics*, **10**, 39, doi: 10.3390/diagnostics10010039.
6. Shlyapnikov, Y. M., Malakhova, E. A., Vinarov, A. Z., Zamyatnin, A. A., and Shlyapnikova, E. A. (2021) Can new immunoassay techniques improve bladder cancer diagnostics with protein biomarkers? *Front. Mol. Biosci.*, **7**, 620687, doi: 10.3389/fmolb.2020.620687.
7. Morrissey, J. J., Mellnick, V. M., Luo, J., Siegel, M. J., Figenschau, R. S., et al. (2015) Evaluation of urine aquaporin-1 and perilipin-2 concentrations as biomarkers to screen for renal cell carcinoma: a prospective cohort study, *JAMA Oncol.*, **1**, 204-212, doi: 10.1001/jamaoncol.2015.0213.
8. Papale, M., Vocino, G., Lucarelli, G., Rutigliano, M., Gigante, M., et al. (2017) Urinary RKIP/p-RKIP is a potential diagnostic and prognostic marker of clear cell renal cell carcinoma, *Oncotarget*, **8**, 40412-40424, doi: 10.18632/oncotarget.16341.
9. URL: <https://uroweb.org/guidelines/> EAU Guidelines 2022.
10. Babjuk, M., Burger, M., Compérat, E., Gontero, P., Mostafid, A. H., Palou, J., et al. (2019) European association of urology guidelines on non-muscle-invasive bladder cancer (TaT1 and CIS), *Eur. Urol.*, **76**, 639-657, doi: 10.1016/j.eururo.2019.08.016.
11. Siegel, R. L., Miller, K. D., Fuchs, H., and Jemal, A. (2021) Cancer Statistics, 2021, *CA Cancer J. Clin.*, **71**, 7-33, doi: 10.3322/caac.21654.
12. Koo, K. M., Mainwaring, P. N., Tomlins, S. A., and Trau, M. (2019) Merging new-age biomarkers and nanodiagnosics for precision prostate cancer management, *Nat. Rev. Urol.*, **16**, 302-317, doi: 10.1038/s41585-019-0178-2.
13. Eskra, J. N., Rabizadeh, D., Pavlovich, C. P., Catalona, W. J., and Luo, J. (2019) Approaches to urinary detection of prostate cancer, *Prostate Cancer Prostatic Dis.*, **22**, 362-381, doi: 10.1038/s41391-019-0127-4.
14. Fujita, K., and Nonomura, N. (2018) Urinary biomarkers of prostate cancer, *Int. J. Urol.*, **25**, 770-779, doi: 10.1111/iju.13734.
15. Hendriks, R. J., van Oort, I. M., and Schalken, J. A. (2017) Blood-based and urinary prostate cancer biomarkers: a review and comparison of novel biomarkers for detection and treatment decisions, *Prostate Cancer Prostatic Dis.*, **20**, 12-19, doi: 10.1038/pcan.2016.59.
16. Cooperberg, M. R., Carroll, P. R., Dall'era, M. A., Davies, B. J., Davis, J. W., et al. (2019) The state of the science on prostate cancer biomarkers: the San Francisco consensus statement, *Eur. Urol.*, **76**, 268-272, doi: 10.1016/j.eururo.2019.05.013.
17. Salciccia, S., Capriotti, A. L., Laganà, A., Fais, S., Logozzi, M., et al. (2021) Biomarkers in prostate cancer diagnosis: from current knowledge to the role of metabolomics and exosomes, *Int. J. Mol. Sci.*, **22**, 4367, doi: 10.3390/ijms22094367.
18. Luo, Y., Gou, X., Huang, P., and Mou, C. (2014) Prostate cancer antigen 3 test for prostate biopsy decision: a systematic review and meta-analysis, *Chin. Med. J. (Engl)*, **127**, 1768-1774.
19. Van Neste, L., Hendriks, R. J., Dijkstra, S., Trooskens, G., Cornel, E. B., et al. (2016) Detection of high-grade

- prostate cancer using a urinary molecular biomarker-based risk score, *Eur. Urol.*, **70**, 740-748, doi: 10.1016/j.eururo.2016.04.012.
20. Donovan, M. J., Noerholm, M., Bentink, S., Belzer, S., Skog, J., et al. (2015) A molecular signature of PCA3 and ERG exosomal RNA from non-DRE urine is predictive of initial prostate biopsy result, *Prostate Cancer Prostatic Dis.*, **18**, 370-375, doi: 10.1038/pcan.2015.40.
 21. Baldin, A. V., Grishina, A. N., Korolev, D. O., Kuznetsova, E. B., Golovastova, M. O., et al. (2019) Autoantibody against arrestin-1 as a potential biomarker of renal cell carcinoma, *Biochimie*, **157**, 26-37, doi: 10.1016/j.biochi.2018.10.019.
 22. Golovastova, M. O., Tsoy, L. V., Bocharnikova, A. V., Korolev, D. O., Gancharova, A. S., et al. (2016) The cancer-retina antigen recoverin as a potential biomarker for renal tumors, *Tumour Biol.*, **37**, 9899-9907, doi: 10.1007/s13277-016-4885-5.
 23. Shlyapnikov, Y. M., Malakhova, E. A., Potoldykova, V. I., Svetocheva, Y. A., Vinarov, A. Z., et al. (2022) Non-invasive kidney cancer diagnostics using ultrasensitive immunodetection of cancer-retina antigens, *Biochemistry (Moscow)*, **87**, 658-666, doi: 10.1134/S0006297922070070.
 24. Morozov, V. N., and Morozova, T. Y. (2006) Active bead-linked immunoassay of protein microarrays, *Anal. Chim. Acta*, **564**, 40-52, doi: 10.1016/j.aca.2005.09.068.
 25. Shlyapnikov, Y. M., Shlyapnikova, E. A., Simonova, M. A., Shepelyakovskaya, A. O., Brovko, F. A., et al. (2012) Rapid simultaneous ultrasensitive immunodetection of five bacterial toxins, *Anal. Chem.*, **84**, 5596-6603, doi: 10.1021/ac300567f.
 26. Hanley, J. A., and McNeil, B. J. (1982) The meaning and use of the area under a receiver operating characteristic (ROC) curve, *Radiology*, **143**, 29-36, doi: 10.1148/radiology.143.1.7063747.
 27. Shlyapnikov, Y. M., Kanev, I. L., and Shlyapnikova, E. A. (2020) Rapid ultrasensitive gel-free immunoblotting with magnetic labels, *Anal. Chem.*, **92**, 4146-4153, doi: 10.1021/acs.analchem.0c00314.
 28. Bazhin, A. V., De Smet, C., Golovastova, M. O., Schmidt, J., and Philippov, P. P. (2010) Aberrant demethylation of the recoverin gene is involved in the aberrant expression of recoverin in cancer cells, *Exp. Dermatol.*, **19**, 1023-1025, doi: 10.1111/j.1600-0625.2010.01126.x.
 29. Hoffman, R. M., Gilliland, F. D., Adams-Cameron, M., Hunt, W. C., and Key, C. R. (2002) Prostate-specific antigen testing accuracy in community practice, *BMC Fam. Pract.*, **3**, 19, doi: 10.1186/1471-2296-3-19.
 30. Sato, S., Kimura, T., Onuma, H., Egawa, S., and Takahashi, H. (2020) Transition zone prostate cancer is associated with better clinical outcomes than peripheral zone cancer, *BJUI Compass.*, **2**, 169-177, doi: 10.1002/bco2.47.
 31. Sato, I., Morihisa, S., Ishiwari, A., Nishijima, H., Ito, E., et al. (2002) Use of the "SMITEST" PSA card to identify the presence of prostate-specific antigen in semen and male urine, *Forensic Sci. Int.*, **127**, 71-74, doi: 10.1016/s0379-0738(02)00111-1.
 32. Iwakiri, J., Granbois, K., Wehner, N., Graves, H. C., and Stamey, T. (1993) An analysis of urinary prostate-specific antigen before and after radical prostatectomy: evidence for secretion of prostate-specific antigen by the periurethral glands, *J. Urol.*, **149**, 783-786, doi: 10.1016/s0022-5347(17)36207-9.

CANCER-RETINA ANTIGENS IN THE URINE OF BLADDER AND PROSTATE CANCER PATIENTS

Yu. M. Shlyapnikov^{1*}, E. A. Malakhova¹, A. Z. Vinarov², N. V. Potoldykova², V. I. Vladimirov³,
E. Yu. Zernii⁴, A. A. Zamyatnin, Jr.^{4,5,6}, and E. A. Shlyapnikova¹

¹ Institute of Theoretical and Experimental Biophysics, Russian Academy of Sciences,
142290 Pushchino, Russi; E-mail: yuri.shlyapnikov@gmail.com

² Institute for Urology and Reproductive Health, Sechenov First Moscow State Medical University,
119991 Moscow, Russia

³ Shemyakin and Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry, Russian Academy of Sciences,
117437 Moscow, Russia

⁴ Belozersky Institute of Physico-Chemical Biology, Lomonosov Moscow State University,
119992 Moscow, Russia

⁵ Institute of Molecular Medicine, Sechenov First Moscow State Medical University,
119991 Moscow, Russia

⁶ Sirius University of Science and Technology, 354340 Krasnodar Region, Federal Territory Sirius, Russia

It has recently been shown that combination of arrestin and recoverin can serve as an effective urinary biomarker for renal cell carcinoma with sensitivity and specificity of over 92%. In this work, we studied the possibility of detecting these antigens in the urine in other urological oncological diseases – bladder

cancer (BC) and prostate cancer (PCa). Urine samples from 40 BC patients and 40 PCa patients were analyzed using an ultrasensitive microarray immunoassay with a detection limit of 0.1 pg/ml. It was shown that in BC the sensitivity of determining the combination of arrestin with recoverin is 58% (AUC 0.76, 95% CI 0.66-0.86), while in PCa it is 60% (AUC 0.7, 95% CI 0.68-0.88). It has been established that in patients with bladder and prostate cancer who had a positive test, these antigens are not detected in 90% of cases after removal of the tumor. In the future, the obtained results could become the basis for developing new approaches for timely detection of relapses of such diseases and treatment control, as well as for the development of new diagnostic methods.

Keywords: cancer-retina antigens, immunoassay, urological cancer, microarrays, magnetic particles

СРАВНИТЕЛЬНАЯ ОКИСЛЯЕМОСТЬ РАЗНЫХ КЛАССОВ ЛИПОПРОТЕИДОВ ПЛАЗМЫ КРОВИ

© 2022 В.З. Ланкин*, А.К. Тихазе, В.Я. Косач

ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр кардиологии им. акад. Е.И. Чазова» Минздрава РФ,
121552 Москва, Россия; электронная почта: lankin0309@mail.ru

Поступила в редакцию 29.08.2022

После доработки 21.09.2022

Принята к публикации 21.09.2022

Исследовали кинетику свободнорадикального окисления разных классов липопротеидов плазмы крови – наночастиц липид-транспортующей системы организма. Установлено, что Cu^{2+} -иницированная окисляемость (susceptibility to free radical peroxidation) «атерогенных» липопротеидов низкой плотности (ЛНП) плазмы крови человека *in vitro* более чем на порядок выше окисляемости «антиатерогенных» липопротеидов высокой плотности (ЛВП). Исходное содержание ацилгидроперокси-производных фосфолипидов в наружном слое частиц ЛНП *in vivo* (при расчёте на одну частицу) также более чем на порядок превышает содержание этих первичных продуктов свободнорадикального окисления в частицах ЛВП. Окисляемость субфракции ЛВП – ЛВП₂ – была достоверно выше, чем окисляемость общих ЛВП и субфракции ЛВП₃. Полученные данные подтверждают важную роль свободнорадикального окисления ЛНП в молекулярных механизмах, приводящих к индукции повреждения стенки сосудов при атеросклерозе.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: липопротеиды низкой плотности (ЛНП), липопротеиды высокой плотности (ЛВП), свободнорадикальное окисление, ацилгидроперокси-производные фосфолипидов.

DOI: 10.31857/S0320972522110112, EDN: LWVDMY

ВВЕДЕНИЕ

Липид-транспортующая система плазмы крови представлена двумя основными классами липид-белковых наноструктур – липопротеидами низкой плотности (ЛНП) и липопротеидами высокой плотности (ЛВП), которые существенно различаются по метаболическим функциям, а также по размеру и химическому составу частиц [1–5]. Частицы ЛВП содержат апопротеины А₁, С₂ и Е, тогда как частицы больших по размеру ЛНП содержат единственный белок – апопротеин В-100 [1–4]. Образующиеся в печени ЛНП транспортируют липиды в периферические ткани, а ЛВП осуществляют обратный транспорт липидов для их утилизации в печени [5–8]. Апопротеин В-100 частиц ЛНП может подвергаться химической модификации с участием низкомолекулярных дикарбониллов, образующихся в качестве вторичных продуктов при свобод-

норадикальном окислении полиеновых липидов (4-гидрокси-2-ноненаль и малоновый диальдегид – МДА) и при окислении глюкозы и других шестиатомных углеводов (глиоксаль и метилглиоксаль) [9]. Изомер МДА метилглиоксаль образуется ферментативно из триозофосфатов, накапливающихся в процессе гликолиза при гипергликемии [10], тогда как гомолог МДА глиоксаль образуется при автоокислении глюкозы [11] и её соокислении с полиеновыми липидами [11, 12]. Нами была продемонстрирована возможность эффективного образования метилглиоксаля при атаке глюкозофосфатов гидропероксидными радикалами липидов [13], что предусматривает возможность накопления метилглиоксаля в процессе неферментативного свободнорадикального соокисления шестиатомных сахаров и ненасыщенных липидов в процессе окислительного стресса. Частицы окислительно модифицированных ЛНП активно захватываются scavenger-рецепторами клеток сосудистой стенки, что сопровождается возникновением предатерогенных липоидозных повреждений сосудов при атеросклерозе и диабете [9, 12]. При этом молекулярный механизм карбонильной модификации

Принятые сокращения: ЛВП – липопротеиды высокой плотности; ЛНП – липопротеиды низкой плотности; ЛП(а) – липопротеин (а); ЛООН – липогидропероксиды.

* Адресат для корреспонденции.

апопротеинов ЛНП при атеросклерозе с преимущественным участием МДА и при диабете с участием глиоксаля и метилглиоксаля сходен [12, 14], хотя эффективность модификации белка различными дикарбонилами может отличаться [15, 16]. Кроме того, показано, что частицы «окисленных» ЛНП могут образовывать комплекс с рецептором LOX-1 на мембране эндотелиоцитов, стимулируя запуск апоптоза, приводящий к дисфункции эндотелия [17]. Полученные нами данные свидетельствуют о том, что не окисленные ферментативно (при катализе животной С-15 липоксигеназой) ЛНП, а преимущественно дикарбонил-модифицированные ЛНП могут эффективно захватываться scavenger-рецепторами клеток сосудистой стенки [18]. Исходя из этого, можно полагать, что в многочисленных работах по атерогенному действию «окисленных» ЛНП наблюдаемые эффекты связаны не с действием собственно окисленных ЛНП (содержащих ацилгидроперокси-производные фосфолипидов в наружном слое частиц), а с карбонильной модификацией апопротеинов, вызванной накоплением низкомолекулярных дикарбониллов [9, 14]. Таким образом, очевидно, что окислительные превращения липопротеидов могут играть ведущую роль в этиологии и патогенезе атеросклероза и сахарного диабета [9, 14]. Тем не менее в литературе не существует общего мнения относительно сравнительной окисляемости частиц ЛНП и ЛВП [19–27], так как при сравнении скорости окисления обычно используют не только различные инициаторы окисления, различные методы анализа, но и различные расчёты для анализа результатов (обычно – на количество белка частиц, что при большой разнице в содержании апопротеинов в частицах ЛНП и ЛВП затрудняет интерпретацию результатов). Исходя из вышесказанного, в настоящей работе исследовали потенциальную способность частиц ЛНП, ЛВП и их субфракций (ЛВП₂, ЛВП₃) к Cu²⁺-инициированному свободнорадикальному перекисному окислению *in vitro* (susceptibility to free radical peroxidation), а также исходный уровень липогидроперокси-производных фосфолипидов *in vivo* в наружном слое частиц этих липопротеидов.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Изолирование разных классов липопротеидов (ЛНП, ЛВП) и субфракций ЛВП (ЛВП₂, ЛВП₃) при помощи препаративного ультрацентрифугирования. Препаративное выделение

ЛНП, общей фракции ЛВП и субфракций ЛВП₂, ЛВП₃ из плазмы крови практически здоровых доноров проводили методом центрифугирования в градиенте плотности NaBr на ультрацентрифуге Beckman Optima XPN-80 («Beckman Coulter», США) [28]. Липопротеиды изолировали из трёх образцов плазмы крови, полученных от трёх разных здоровых доноров. В центрифужную пробирку вносили донорскую плазму, содержащую 1 мМ ЭДТА, осторожно наслаивали раствор NaBr с плотностью 1,006 г/мл и центрифугировали (105 000 g в течение 18 ч) при 4 °С в роторе Ti-60. После удаления верхнего слоя, содержащего липопротеиды очень низкой плотности (ЛОНП), к содержимому пробирки добавляли при перемешивании расчётное количество мелко растёртого порошка NaBr и растворяли соль для создания плотности 1,065 г/мл, после чего пробирку дополняли раствором NaBr этой же плотности. После центрифугирования (105 000 g в течение 18 ч при 4 °С) аккуратно отбирали верхний слой, содержащий флотированные ЛНП. К раствору в центрифужной пробирке вновь добавляли NaBr и доводили плотность до 1,125 г/мл. После центрифугирования (150 000 g в течение 24 ч при 4 °С) отбирали верхний слой, содержащий ЛПВ₂. К раствору в пробирке добавляли и при перемешивании растворяли NaBr, доводя плотность до 1,21 г/мл. Верхнюю фракцию ЛПВ₃ отбирали после центрифугирования в течение 24 ч при 150 000 g и температуре 4 °С. Фракцию общих ЛВП получали путём центрифугирования (150 000 g в течение 24 ч при 4 °С) после отбора ЛНП и создания плотности NaBr, равной 1,21 г/л. Все полученные фракции липопротеидов подвергали диализу в течение 18 ч при температуре 4 °С против 2000 объёмов 0,145 М NaCl в 50 мМ К,Na-фосфатном буфере (рН 7,4).

Исследование кинетики свободнорадикального Cu²⁺-инициированного окисления разных классов липопротеидов (ЛНП, ЛВП) и субфракций (ЛВП₂, ЛВП₃). После диализа содержание белка в образцах липопротеидов определяли по методу Лоури, а затем пробы разбавляли до 50 мкг белка/мл раствором, содержащим 0,154 М NaCl в 50 мМ К,Na-фосфатном буфере (рН 7,4). Окисление частиц ЛНП, ЛВП, ЛВП₂ и ЛВП₃ при 37 °С индуцировали введением в среду инкубации 30 мкМ CuSO₄, после чего через фиксированные интервалы времени измеряли накопление липогидропероксидов (LOOH) при 233 нм на спектрофотометре UV-2600 Shimadzu («Shimadzu», Япония) [12, 29, 30]. Содержание LOOH (конъ-

югированные диены — ΔD_{233}) в частицах ЛНП и ЛВП рассчитывали, используя коэффициент молярной экстинкции $22\,000\text{ M}^{-1} \times \text{см}^{-1}$. Концентрацию LOOH на 1 частицу ЛНП и ЛВП рассчитывали, исходя из содержания апопротеина В-100 в частицах ЛНП и апопротеина А₁ в частицах ЛВП (каждый из этих апопротеинов присутствует в количестве 1 молекулы на частицу ЛНП и ЛВП соответственно). Содержание апопротеина В-100 и апопротеина А₁ измеряли на химическом анализаторе Abbott Architect С8000 («Abbott», США) при использовании соответствующих тест-наборов этой же фирмы. Исследование кинетики медь-зависимого свободнорадикального окисления липопротеидов *in vitro* проводили, используя частицы, изолированные из плазмы крови 3 доноров (липопротеиды, выделенные из плазмы крови каждого донора, использовали в независимых экспериментах).

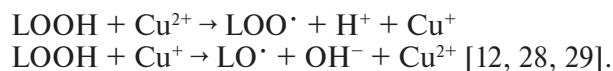
Статистическая обработка результатов. Статистический анализ результатов исследования проводили с помощью пакетов программного обеспечения STATISTICA 10 («Statsoft», США); MedCalc, версия 12.7.0.0 («MedCalc Software», Бельгия) и Microsoft Excel 2010, версия 14.0.7263.5000. Поскольку анализ данных показал, что распределение признаков во всех случаях отличается от нормального, для статистического анализа применяли непараметрические методы статистики. Анализ различий количественных показателей при межгрупповых сравнениях выполняли с помощью непараметрического критерия Манна–Уитни (Mann–Whitney U test). Различия считали статистически значимыми при $p < 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

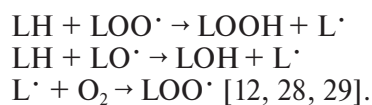
Сравнительное исследование окисляемости разных классов липопротеидов. Механизм инициации свободнорадикального перекисного окисления липопротеидов ионами меди хорошо изучен [29, 30]. Очевидно, что кинетика окисления липопротеидов *in vitro* должна существенно зависеть от строения частиц, качества (ненасыщенность) и количества субстрата окисления — полиеновых фосфолипидов наружного слоя частиц, но прежде всего от наличия первичных продуктов окисления — LOOH, накопленных в частицах в процессе их циркуляции в кровяном русле *in vivo* [12]. Деструкция этих нестойких LOOH может происходить спонтанно:



но медь-зависимая деструкция LOOH с образованием пероксильных (LOO^\bullet) и алкоксильных (LO^\bullet) радикалов происходит более эффективно:



Из приведённых уравнений реакций следует, что скорость иницирования свободнорадикального окисления липопротеидов определяется исходным уровнем LOOH, накопленных в частицах *in vivo*. Дальнейшее окисление полиеновых липидов (LH) частиц липопротеидов происходит по цепному механизму с промежуточным образованием липидных радикалов (L^\bullet):



Результаты наших исследований сравнительной кинетики окисляемости частиц ЛНП и общей фракции ЛВП представлены на рис. 1.

Как видно из рис. 1, при расчёте на 1 частицу скорость свободнорадикального окисления частиц ЛНП в идентичных условиях *in vitro* более чем на два порядка превышает скорость окисления частиц ЛВП. За 90 мин иницированного ионами Cu^{2+} окисления в частицах ЛНП накапливается $66,9 \pm 3,26$ пмоль $\times 10^{-11}$ LOOH на 1 частицу, тогда как за это же время в частицах ЛВП (общая фракция) накапливается лишь $1,85 \pm 0,09$ пмоль $\times 10^{-11}$ LOOH на 1 частицу (рис. 2).

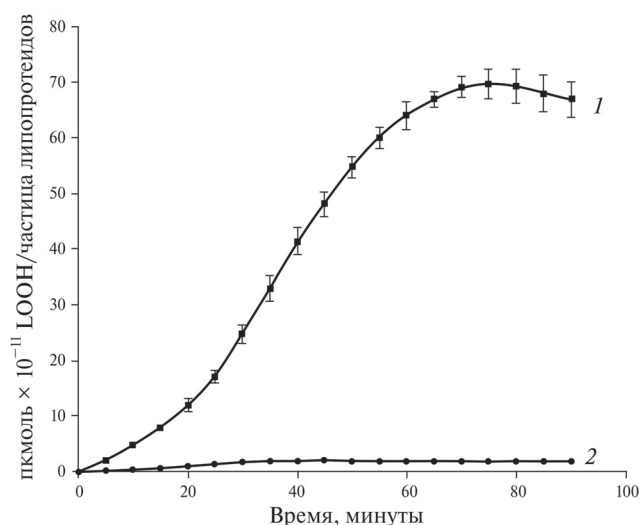


Рис. 1. Кинетика свободнорадикального Cu^{2+} -индуцируемого окисления частиц ЛНП (кривая 1) и ЛВП (кривая 2). Примечания: различия между кривыми 1 и 2 статистически достоверны ($p < 0,05$) во всех точках, начиная с 20 мин исследования

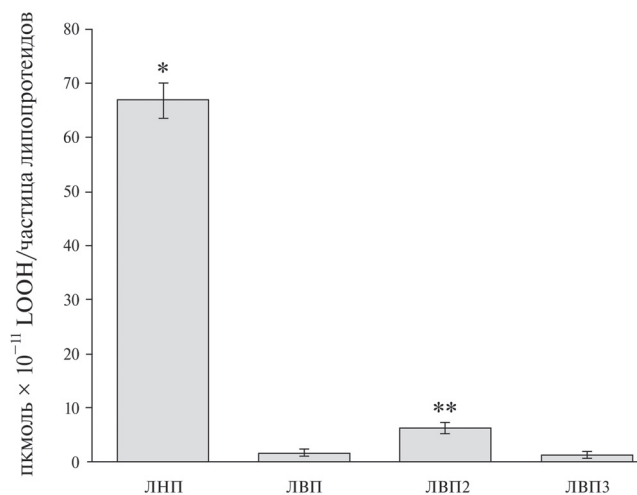


Рис. 2. Уровень LOOH, накопившихся в частицах ЛНП, общей фракции ЛВП, а также в частицах ЛВП₂ и ЛВП₃ за 90 мин свободнорадикального окисления фосфолипидов наружного слоя частиц после инициации окисления ионами Cu²⁺. Примечания: * достоверные различия со всеми фракциями ЛВП ($p < 0,05$); ** достоверные различия ЛВП₂ ($p < 0,05$) от ЛВП и ЛВП₃

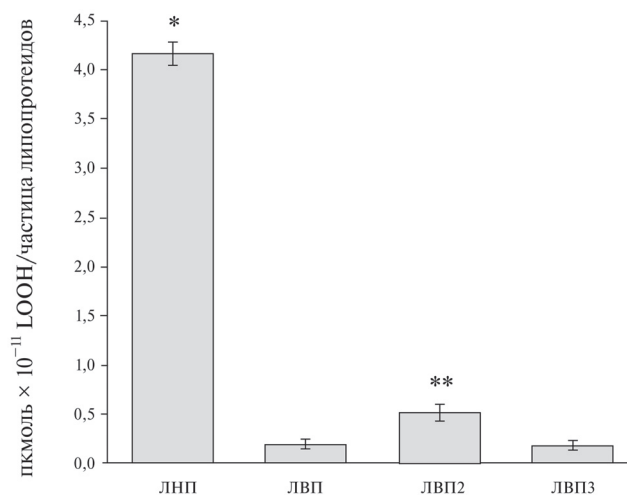


Рис. 3. Стационарная (исходная) концентрация LOOH (содержание LOOH *in vivo*) в частицах ЛНП, в общей фракции ЛВП, а также в частицах ЛВП₂ и ЛВП₃, измеренная непосредственно после изолирования липопротеидов методом ультрацентрифугирования в присутствии ЭДТА. Примечания: * достоверные различия со всеми фракциями ЛВП ($p < 0,05$); ** достоверные различия ЛВП₂ ($p < 0,05$) от ЛВП и ЛВП₃

Из полученных данных однозначно следует, что частицы ЛНП значительно более чувствительны к индукции свободнорадикального окисления в наружном фосфолипидном слое, чем частицы ЛВП. Стационарная (исходная) концентрация LOOH (ацилгидроперокси-производных фосфолипидов) в изолированных ЛНП составляла $4,2 \pm 0,11$ пкмоль $\times 10^{-11}$ LOOH на 1 частицу, тогда как исходное содержание первичных продуктов окисления в ЛВП составляло всего $0,20 \pm 0,04$ пкмоль $\times 10^{-11}$ LOOH на 1 частицу (рис. 3).

Таким образом, исходная окисленность частиц ЛНП *in vivo* также была более чем на порядок выше окисленности частиц ЛВП. Из этого следует, что и *in vivo* скорость свободнорадикального окисления частиц ЛНП должна быть значительно выше, чем скорость окисления частиц ЛВП, поскольку при деструкции LOOH из них образуются активные алкоксильные свободные радикалы LO[•], способные инициировать дальнейшее свободнорадикальное окисление липидного субстрата по цепному механизму. Следовательно, повышенная чувствительность частиц ЛНП к индукции в них свободнорадикального окисления должна весьма сильно зависеть от скорости иницирования [12]. Повышенное содержание липопероксидов в ЛНП *in vivo* [25, 26] может быть объяснено инициацией окисления этих частиц активными формами кислорода (АФК) в процессе развития окислительного стресса [9, 14, 26], в частности, при гиперлипидемии в процессе атерогенеза [9, 12, 26].

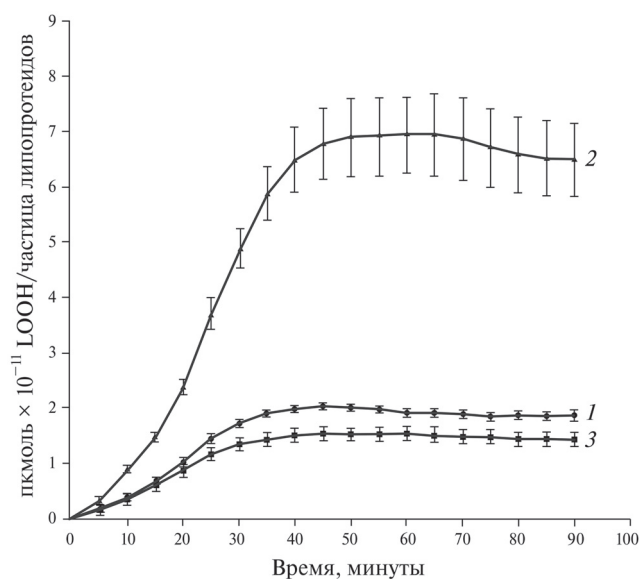


Рис. 4. Сравнительная кинетика свободнорадикального Cu²⁺-индуцируемого окисления частиц общей фракции ЛВП (кривая 1), а также ЛВП₂ (кривая 2) и ЛВП₃ (кривая 3). Примечания: различия между кривыми 2 и 1, а также между кривыми 2 и 3 статистически достоверны ($p < 0,05$) во всех точках, начиная с 20 мин исследования

При исследовании кинетики индуцированного свободнорадикального окисления наиболее антиатерогенных субфракций ЛВП (ЛВП₂ и ЛВП₃) было обнаружено, что скорость окисления частиц ЛВП₂ значительно (в несколько раз) превышает скорость окисления частиц ЛВП₃ и частиц общей фракции ЛВП (рис. 4).

За 90 мин окисления в частицах ЛВП₂ накапливалось в 3,5 раза больше LOOH, чем в

частицах общей фракции ЛВП ($6,49 \pm 0,66$ и $1,85 \pm 0,09$ пмоль $\times 10^{-11}$ LOON на 1 частицу соответственно), тогда как различия в накоплении LOON в частицах ЛВП₃ и частицах общей фракции ЛВП были незначительны (рис. 4). Исходный уровень LOON в частицах ЛВП₂ также был более чем в 2,5 раза выше, чем в частицах общей фракции ЛВП ($0,52 \pm 0,087$ и $0,20 \pm 0,04$ пмоль $\times 10^{-11}$ LOON на 1 частицу соответственно), а различия в исходном уровне LOON в частицах ЛВП₃ и частицах общей фракции ЛВП были недостоверны (рис. 3).

Таким образом, нами получены убедительные доказательства того, что частицы ЛНП имеют значительно большие потенции к свободнорадикальному окислению *in vitro* и спонтанному окислению *in vivo*. Результаты наших исследований, свидетельствующие о том, что частицы ЛНП служат предпочтительным субстратом свободнорадикального окисления не только *in vitro*, но и *in vivo*, хорошо согласуются с представлениями о важной роли окислительно модифицированных ЛНП в молекулярных механизмах повреждения стенки сосудов при атеросклерозе [9, 27] и сахарном диабете [9, 12, 14–16]. Обогащённые гидроперокси-производными фосфолипидов частицы ЛНП легко подвергаются модификации вторичными продуктами деструкции LOON, такими как 4-гидрокси-2-ноненаль и малоновый диальдегид [14–16], причём карбонильная модификация апопротеина В-100 частиц ЛНП, вероятно, играет ключевую роль в пусковых механизмах атерогенеза [9, 14] и сахарного диабета [9, 12, 14, 15]. В литературе имеются отдельные данные, указывающие на большую окисляемость частиц ЛНП по сравнению с ЛВП [24, 26, 27], что согласуется с полученными нами результатами (рис. 1–3). Тем не менее авторы некоторых работ приходят к противоположным выводам [19–23, 25]. Эти противоречия могут быть связаны с рядом факторов, таких как использование различных инициаторов окисления *in vitro*, различных методов определения продуктов окисления, а также различных методов расчётов для интерпретации полученных результатов [19–27]. В частности, следует признать неприемлемым для сравнительной оценки окисляемости ЛНП и ЛВП представление результатов в виде уровня накопленных продуктов окисления на мг общего белка, что обычно и делается. По нашему мнению, такой способ представления результатов является совершенно некорректным вследствие больших различий в содержании апобелков в частицах ЛНП и ЛВП [31]. Мы полагаем, что выполненные нами расчёты, позволяющие представить

уровень LOON на 1 частицу ЛНП или ЛВП, наиболее адекватны для сравнения как уровня преобразованных в ЛНП и ЛВП липопероксидов, так и для сравнения содержания липопероксидов, накопленных в результате инициированного свободнорадикального окисления *in vitro*. По нашему мнению, большая окисляемость ЛВП по сравнению с ЛНП даже теоретически маловероятна вследствие большего процентного содержания апобелков в ЛВП и, в ещё большей степени, вследствие значительно меньшего содержания молекул субстрата окисления – фосфолипидов в частицах ЛВП по сравнению с частицами ЛНП [31]. Действительно, в частицах ЛВП₂ и ЛВП₃ содержится в 5–13 раз меньше молекул фосфолипидов, чем в частицах ЛНП [31]. В то же время процентное содержание белка в ЛВП₂ и ЛВП₃ в 2–2,6 раза выше, чем в ЛНП [31]. Следует отметить, что, как показано нами на примере сравнительной кинетики окисления частиц липопропротеина (а) (ЛП(а)) и ЛНП, при практически равном содержании субстрата окисления значительно меньшая окисляемость ЛП(а) может быть связана с большим содержанием белка в этих липопропротеидах [32]. Можно полагать, что длинный гликопротеиновый «хвост», отличающий молекулу апопротеина (а) от апопротеина В-100, ответственен за меньшую окисляемость частиц ЛП(а), поскольку он способен экранировать полиеновые ацилы фосфолипидов наружного слоя частиц ЛП(а) и тем самым уменьшать их доступность для свободнорадикального окисления (проявление феномена «структурного антиоксиданта») [32]. Доказательством справедливости этого предположения являются результаты наших экспериментов, свидетельствующие о том, что карбонильная модификация ЛП(а), приводящая к снятию или уменьшению экранирования фосфолипидов апопротеином (а), усиливает скорость свободнорадикального окисления частиц ЛП(а) [32].

В настоящее время трудно объяснить обнаруженные нами существенные различия в окисляемости частиц ЛВП₂ и ЛВП₃ (рис. 2–4), однако следует отметить, что свободнорадикальное окисление частиц ЛВП приводит к модификации их апобелков, причём при этом ЛВП могут терять способность к обратному транспорту холестерина [33–35]. Повышенная способность частиц ЛВП₂ к окислительной модификации (рис. 2–4), вероятно, нарушает их трансформацию в ЛВП₃ [36] и способствует усугублению негативного влияния свободнорадикального окисления на обратный транспорт холестерина [33–35]. Данные наших исследований о повышенной подверженности ча-

стиц ЛНП свободнорадикальному окислению *in vitro* и *in vivo* хорошо согласуются также с ранее полученными результатами других авторов, свидетельствующими о том, что повышенная окисляемость частиц ЛНП является предиктором развития коронарного атеросклероза [37].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Впервые с использованием апробированных классических кинетических методов получены данные о содержании первичных продуктов свободнорадикального окисления в частицах ЛНП, ЛВП и субфракциях ЛВП (ЛВП₂ и ЛВП₃). Как следует из полученных данных, использование расчётов содержания LOOH на мг белка в ранее опубликованных работах не позволяет получить однозначные результаты, и только расчёт содержания LOOH на частицу ЛНП и ЛВП является корректным. Результаты работы свидетельствуют о том, что даже у здоровых людей стационарная концентрация LOOH в «атерогенных» ЛНП *in vivo* и скорость индуцированного накопления LOOH в ЛНП *in vitro* значительно превышают значения соответствующих показателей в частицах «анти-атерогенных» ЛВП. Полученные данные убедительно свидетельствуют в пользу того, что именно ЛНП накапливают основное количество продуктов свободнорадикального окисле-

ния в плазме крови при окислительном стрессе, сопровождающем процесс атерогенеза.

Вклад авторов. Ланкин В.З. — концепция и руководство работой, обсуждение результатов исследования, написание текста; Тихазе А.К. — обсуждение результатов исследования, написание текста, редактирование текста статьи; Косач В.Я. — проведение экспериментов, обсуждение результатов исследования, редактирование текста статьи.

Финансирование. Работа выполнена при финансовой поддержке гранта Российского научного фонда № 22-15-00013.

Благодарности. Авторы признательны А.А. Панферовой и к.б.н. Г.Г. Коноваловой за помощь в выделении липопротеидов и проведении отдельных экспериментов, а также д.б.н. К.Б. Шумаеву за участие в обсуждении результатов.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Соблюдение этических норм. Все процедуры, выполненные в исследовании с участием людей, соответствуют этическим стандартам национального комитета по исследовательской этике и Хельсинкской декларации 1964 года и её последующим изменениям или сопоставимым нормам этики. От каждого из включённых в исследование участников было получено информированное добровольное согласие.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Tomkin, G. H. (2010) Atherosclerosis, diabetes and lipoproteins, *Expert Rev. Cardiovasc. Ther.*, **8**, 1015-1029, doi: 10.1586/erc.10.45.
2. Arnao, V., Tuttolomondo, A., Daidone, M., and Pinto, A. (2019) Lipoproteins in atherosclerosis process, *Curr. Med. Chem.*, **26**, 1525-1543, doi: 10.2174/0929867326666190516103953.
3. Carr, S. S., Hooper, A. J., and Sullivan, D. R. (2019) Non-HDL-cholesterol and apolipoprotein B compared with LDL-cholesterol in atherosclerotic cardiovascular disease risk assessment, *Pathology*, **51**, 148-154, doi: 10.1016/j.pathol.2018.11.006.
4. Getz, G. S., and Reardon, C. A. (2020) Atherosclerosis: cell biology and lipoproteins, *Curr. Opin. Lipidol.*, **31**, 286-290, doi: 10.1097/MOL.0000000000000704.
5. Wang, H. H., Garruti, G., Liu, M., Portincasa, P., and Wang, D. H. (2017) Cholesterol and lipoprotein metabolism and atherosclerosis: recent advances in reverse cholesterol transport, *Ann. Hepatol.*, **16** (Suppl. 1), S27-S42, doi: 10.5604/01.3001.0010.5495.
6. Lee, J. M. S., and Choudhury, R. P. (2010) Atherosclerosis regression and high-density lipoproteins, *Expert Rev. Cardiovasc. Ther.*, **8**, 1325-1334, doi: 10.1586/erc.10.108.
7. Bryan, H., and Brewer, Jr. (2011) Clinical review: the evolving role of HDL in the treatment of high-risk patients with cardiovascular disease, *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, **96**, 1246-1257, doi: 10.1210/jc.2010-0163.
8. Hernáez, Á., Soria-Flórido, M., Schröder, H., Ros, E., Pintó, X., et al. (2019) Role of HDL function and LDL atherogenicity on cardiovascular risk: A comprehensive examination, *PLoS One*, **14**, e0218533, doi: 10.1371/journal.pone.0218533.
9. Lankin, V. Z., and Tikhaze, A. K. (2017) Role of oxidative stress in the genesis of atherosclerosis and diabetes mellitus: a personal look back on 50 years of research, *Curr. Aging Sci.*, **10**, 18-25, doi: 10.2174/1874609809666160926142640.
10. Schalkwijk, C. G., and Stehouwer, C. D. A. (2020) Methylglyoxal, a highly reactive dicarbonyl compound, in diabetes, its vascular complications, and other age-related diseases, *Physiol. Rev.*, **100**, 407-461, doi: 10.1152/physrev.00001.2019.

11. Spitteller, G. (2008) Peroxyl radicals are essential reagents in the oxidation steps of the maillard reaction leading to generation of advanced glycation end products, *Ann. NY Acad. Sci.*, **1126**, 128-133, doi: 10.1196/annals.1433.031.
12. Lankin, V. Z., Konovalova, G. G., Tikhaze, A. K., Shumaev, K. B., Kumskova, E. M., et al. (2014) The initiation of the free radical peroxidation of low-density lipoproteins by glucose and its metabolite methylglyoxal: a common molecular mechanism of vascular wall injuries in atherosclerosis and diabetes, *Mol. Cell. Biochem.*, **395**, 241-252, doi: 10.1007/s11010-014-2131-2.
13. Lankin, V. Z., Shadyro, O. I., Shumaev, K. B., Tikhaze, A. K., and Sladkova, A. A. (2019) Non-enzymatic methylglyoxal formation from glucose metabolites and generation of superoxide anion radical during methylglyoxal-dependent cross-links reaction, *J. Antioxidant Activity*, **1**, 33-45, doi: 10.14302/issn.2471-2140.jaa-19-2997.
14. Lankin, V. Z., Tikhaze, A. K., and Melkumyants, A. M. (2022) Dicarbonyl-dependent modification of LDL as a key factor of endothelial dysfunction and atherosclerotic vascular wall damage, *Antioxidants*, **11**, 1565, doi: 10.3390/antiox11081565.
15. Lankin, V. Z., Tikhaze, A. K., Kapel'ko, V.I., Shepel'kova, G. S., Shumaev, K. B., et al. (2007) Mechanisms of oxidative modification of low density lipoproteins under conditions of oxidative and carbonyl stress, *Biochemistry (Moscow)*, **72**, 1081-1090, doi: 10.1134/s0006297907100069.
16. Lankin, V. Z., Tikhaze, A. K., Konovalova, G. G., Kumskova, E. M., and Shumaev, K. B. (2010) Aldehyde-dependent modification of low density lipoproteins, in *Handbook of Lipoprotein Research*, NY., pp. 85-107.
17. Sun, Y., and Chen, X. (2011) Ox-LDL-induced LOX-1 expression in vascular smooth muscle cells: role of reactive oxygen species, *Fundam. Clin. Pharmacol.*, **25**, 572-579, doi: 10.1111/j.1472-8206.2010.00885.x.
18. Lankin, V. Z., Tikhaze, A. K., and Kumskova, E. M. (2012) Macrophages actively accumulate malonyl-dialdehyde-modified but not enzymatically oxidized low density lipoprotein, *Mol. Cell. Biochem.*, **365**, 93-98, doi: 10.1007/s11010-012-1247-5.
19. Bowry, V. W., Stanley, K. K., and Stocker, R. (1992) High density lipoprotein is the major carrier of lipid hydroperoxides in human blood plasma from fasting donors, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **89**, 10316-10320, doi: 10.1073/pnas.89.21.10316.
20. Suzukawa, M., Ishikawa, T., Yoshida, H., and Nakamura, H. J. (1995) Effect of in-vivo supplementation with low-dose vitamin E on susceptibility of low-density lipoprotein and high-density lipoprotein to oxidative modification, *J. Am. Coll. Nutr.*, **14**, 46-52, doi: 10.1080/07315724.1995.10718472.
21. Garner, B., Witting, P. K., Waldeck, A. R., Christison, J. K., Raftery, M., et al. (1998) Oxidation of high density lipoproteins. I. Formation of methionine sulfoxide in apolipoproteins AI and AII is an early event that accompanies lipid peroxidation and can be enhanced by alpha-tocopherol, *J. Biol. Chem.*, **273**, 6080-6087, doi: 10.1074/jbc.273.11.6080.
22. Ohmura, H., Watanabe, Y., Hastumi, C., Sato, H., Daida, H., et al. (1999) Possible role of high susceptibility of high-density lipoprotein to lipid peroxidative modification and oxidized high-density lipoprotein in genesis of coronary artery spasm, *Atherosclerosis*, **142**, 179-184, doi: 10.1016/S0021-9150(98)00235-4.
23. Raveh, O., Pinchuk, I., Fainaru, M., and Lichtenberg, D. (2001) Kinetics of lipid peroxidation in mixtures of HDL and LDL, mutual effects, *Free Radic. Biol. Med.*, **31**, 1486-1497, doi: 10.1016/s0891-5849(01)00730-4.
24. Parthasarathy, S., Barnett, J., and Fong, L. G. (1990) High-density lipoprotein inhibits the oxidative modification of low-density lipoprotein, *Biochim. Biophys. Acta*, **1044**, 275-283, doi: 10.1016/0005-2760(90)90314-n.
25. Raveh, O., Pinchuk, I., Schnitzer, E., Fainaru, M., Schaffer, Z., et al. (2000) Kinetic analysis of copper-induced peroxidation of HDL, autoaccelerated and tocopherol-mediated peroxidation, *Free Radic. Biol. Med.*, **29**, 131-146, doi: 10.1016/s0891-5849(00)00332-4.
26. Nourooz-Zadeh, J., Tajaddini-Sarmad, J., Ling, K. L., and Wolff, S. P. (1996) Low-density lipoprotein is the major carrier of lipid hydroperoxides in plasma. Relevance to determination of total plasma lipid hydroperoxide concentrations, *Biochem. J.*, **313** (Pt 3), 781-786, doi: 10.1042/bj3130781.
27. Lankin, V. Z., and Tikhaze, A. K. (2003) in *Free Radicals, Nitric Oxide, and Inflammation: Molecular, Biochemical, and Clinical Aspects* (Tomasi, A., Ozben, T., Skulachev, V. P., eds) IOS Press, NATO Science Series, Amsterdam, **344**, pp. 218-231.
28. Lindgren, F. T. (1975) in *Analysis of Lipids and Lipoproteins* (Perkins, E. G., ed) Champaign: Amer. Oil. Chemists Soc., pp. 204-224.
29. Mark, J., and Burkitt, A. (2001) Critical overview of the chemistry of copper-dependent low density lipoprotein oxidation: roles of lipid hydroperoxides, alpha-tocopherol, thiols, and ceruloplasmin, *Arch. Biochem. Biophys.*, **394**, 117-135, doi:10.1006/abbi.2001.2509.
30. Patel, R. P., and Darley-Usmar, V. (1999) Molecular mechanisms of the copper dependent oxidation of low-density lipoprotein, *Free Rad. Res.*, **30**, 1-9, doi: 10.1080/10715769900300011.
31. Shen, B.W., Scanu, A. M., and Kezdy, F. J. (1977) Structure of human serum lipoproteins inferred from compositional analysis, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **74**, 837-841. doi: 10.1073/pnas.74.3.837.
32. Lankin, V. Z., Afanasieva, O. I., Konovalova, G. G., Utkina, E. A., Dmitrieva, O. A., et al. (2011)

- Modification of lipoprotein(a) by natural dicarbonyls induced their following free radical peroxidation, *Dokl. Biochem. Biophys.*, **441**, 287-289, doi: 10.1134/S1607672911060159.
33. Nagano, Y., Arai, H., and Kita, T. (1991) High density lipoprotein loses its effect to stimulate efflux of cholesterol from foam cells after oxidative modification, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **88**, 6457-6461, doi: 10.1073/pnas.88.15.6457.
 34. Salmon, S., Maziere, C., Auclair, M., Theron, L., Santus, R., et al. (1992) Malondialdehyde modification and copper-induced autooxidation of high-density lipoprotein decrease cholesterol efflux from human cultured fibroblasts, *Biochim. Biophys. Acta*, **1125**, 230-235, doi: 10.1016/0005-2760(92)90050-6.
 35. Gao, D., and Podrez, E. A. (2018) Characterization of covalent modifications of HDL apoproteins by endogenous oxidized phospholipids, *Free Radic. Biol. Med.*, **115**, 57-67, doi:10.1016/j.freeradbiomed.2017.11.012.
 36. Nestel, P. J. (1987) High-density lipoprotein turnover, *Am. Heart J.*, **113** (Pt. 2), 518-521, doi: 10.1016/0002-8703(87)90624-7.
 37. Aoki, T., Abe, T., Yamada, E., Matsuto, T., and Okada, M. (2012) LDL susceptibility to oxidation accelerates future carotid artery atherosclerosis, *Lipids Health Dis.*, **11**, 4, doi: 10.1186/1476-511X-11-4.

COMPARATIVE OXIDIZABILITY OF DIFFERENT CLASSES OF BLOOD PLASMA LIPOPROTEINS

V. Z. Lankin*, A. K. Tikhaze, and V. Ya. Kosach

*National Medical Research Center of Cardiology, Ministry of Health of the Russian Federation,
121552 Moscow, Russia*

The kinetics of free radical peroxidation of different classes of blood plasma lipoproteins, nanoparticles of the lipid-transporting system of the body, was studied. It was found that Cu²⁺-initiated peroxidation of "atherogenic" low density lipoproteins (LDL) of human blood plasma *in vitro* is more than an order of magnitude higher than oxidation of "anti-atherogenic" high density lipoproteins (HDL). The initial content of acylhydroperoxy derivatives of phospholipids in the outer layer of LDL particles *in vivo* (per particle) also exceeds the content of these primary products of free radical peroxidation in HDL particles by more than an order of magnitude. The oxidizability of the HDL subfraction, HDL₂, was higher than the oxidizability of total HDL and HDL₃. The obtained data confirm the important role of free radical peroxidation of LDL in the molecular mechanisms of vascular wall damage under atherosclerosis.

Keywords: low density lipoproteins (LDL), high density lipoproteins (HDL), free radical peroxidation, acylhydroperoxy derivatives of phospholipids

СРАВНЕНИЕ МЕТОДОВ ВЫДЕЛЕНИЯ микроРНК ИЗ ЭКСТРАКЛЕТОЧНЫХ ВЕЗИКУЛ, ПРИСУТСТВУЮЩИХ В АСЦИТИЧЕСКОЙ ЖИДКОСТИ

© 2022 Г.О. Скрябин¹, С.В. Винокурова¹, Н.В. Елкина¹, Д.А. Денисова¹, А.А. Беляева^{1,2}, К.И. Жордания³, Д.В. Багров², А.Д. Еникеев¹, С.А. Галецкий¹, А.В. Комельков^{1*}, Г.И. Краснощекова³, Е.М. Чевкина¹

¹ НИИ канцерогенеза ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России, 115478 Москва, Россия; электронная почта: komelkov@gmail.com

² Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, биологический факультет, 111234 Москва, Россия

³ НИИ клинической онкологии ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России, 115478 Москва, Россия

Поступила в редакцию 24.08.2022

После доработки 21.09.2022

Принята к публикации 26.09.2022

Секретируемые экстраклеточные везикулы (ЭКВ) содержат активные биомолекулы, включая микроРНК, состав которых отражает эпигенетические изменения, возникающие в клетках при патологических процессах, в частности, злокачественной трансформации. Накопленный пул данных о роли ЭКВ в канцерогенезе обусловил поиск диагностических маркеров в составе ЭКВ. Важнейшим фактором, ограничивающим развитие данного направления, является отсутствие «золотых стандартов» как для методик выделения ЭКВ из биологических жидкостей, так и для анализа их молекулярного содержимого, включая состав микроРНК. В работе впервые проведено сравнение эффективности различных методов выделения малых РНК из ЭКВ, содержащихся в асцитической жидкости, для последующего анализа микроРНК. Сравнение различных коммерческих наборов показало преимущества методов, включающих фенол-хлороформную экстракцию: Total Exosome RNA & Protein Isolation Kit (TERPIK) и miRNeasy Serum/Plasma Kit (miRNeasy). Анализ транскриптома малых РНК в ЭКВ показал присутствие различных классов молекул, среди которых доля микроРНК в среднем составляла 6%, достигая 10% при использовании набора TERPIK. Набор PureLink miRNA Isolation Kit характеризовался наименьшей эффективностью. Набор miRNeasy Serum/Plasma Advanced Kit (miRNeasy_A) показал максимальную концентрацию фракции малых РНК, доля микроРНК в которой, однако, не превышала таковую в случае использования наборов miRNeasy и TERPIK. Более того, данные ОТ-ПЦР анализа индивидуальных микроРНК показали более низкое содержание каждой из четырёх микроРНК – miR-1246, miR-200b-5p, miR-200c-3p и miR-23a-3p – при использовании набора miRNeasy_A. По совокупности исследуемых характеристик, включая концентрацию малых РНК, процент содержания микроРНК по данным биоанализатора (БА) и результатам секвенирования и уровень индивидуальных РНК, детектируемых методом ОТ-ПЦР, оптимальными можно считать наборы TERPIK и miRNeasy.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: экзосомы, микроРНК, методы выделения, экстраклеточные везикулы, miRNeasy Serum/Plasma Kit, Total Exosome RNA & Protein Isolation Kit, PureLink miRNA Isolation Kit, miRNeasy Serum/Plasma Advanced Kit.

DOI: 10.31857/S0320972522110124, **EDN:** LWWLAA

ВВЕДЕНИЕ

В последнее время наблюдается неуклонный рост интереса исследователей к свобод-

но циркулирующим нуклеиновым кислотам, включая микроРНК, в контексте их высокого потенциала в качестве биомаркеров широкого спектра заболеваний. Источниками таких

Принятые сокращения: ТЭМ – трансмиссионная электронная микроскопия; ЭКВ – экстраклеточные везикулы; ISEV – International Society of Extracellular Vesicles, Международное сообщество по изучению экстраклеточных везикул; miRNeasy – miRNeasy Serum/Plasma Kit; miRNeasy_A – miRNeasy Serum/Plasma Advanced Kit; NTA – Nanoparticles Tracking Analysis, анализ траектории движения наночастиц; TERPIK – Total Exosome RNA & Protein Isolation Kit.

* Адресат для корреспонденции.

молекул являются различные биологические жидкости (плазма/сыворотка крови, моча, семенная жидкость, маточные аспираты, слюна и др.), удобство применения которых в клинике обуславливается малоинвазивной процедурой забора этих материалов. Однако происхождение свободно циркулирующих молекул до сих пор не до конца понятно, и их присутствие в биологических жидкостях может во многом быть результатом распада клеток, то есть неспецифического процесса. Кроме того, время жизни свободной РНК в биологических жидкостях крайне мало (порядка 15 сек в крови, по некоторым данным [1]). В то же время оно может достигать часов и даже дней за счёт образования комплексов с различными классами биомолекул (РНК-связывающими белками, липопротеинами высокой и низкой плотности) [2–4], а также инкапсуляции в составе мембранных пузырьков – экстраклеточных везикул (ЭКВ), мембрана которых защищает их содержимое от деградации [5–7]. ЭКВ представляют собой гетерогенный класс частиц, среди которых можно выделить три основных типа: апоптотические тельца – крупные везикулы размером более 1 мкм, образующиеся в процессе программируемой клеточной гибели, микровезикулы (или эктосомы), возникающие с помощью непосредственного отпочкования от плазматической мембраны клетки, и экзосомы, биогенез которых осуществляется в системе внутриклеточного эндосомального транспорта, в процессе которого происходит строго контролируемый отбор содержимого будущих везикул. Экзосомы являются наноразмерными представителями ЭКВ (их средний размер по разным оценкам составляет от 30 до 150 нм), причём если раньше предполагалось, что микровезикулы и экзосомы можно разделить по размеру, то согласно нынешним представлениям, размеры этих ЭКВ могут пересекаться, в связи с чем ведущая международная организация ISEV (International Society for Extracellular Vesicles, Международное сообщество по изучению экстраклеточных везикул) рекомендует использование термина «экзосомы» только в том случае, если доказан экзосомальный тип биогенеза везикул [8]. ЭКВ продуцируются клетками во внеклеточное пространство как в физиологических, так и в патофизиологических условиях (причём показано, что опухолевые клетки производят их более активно) и осуществляют межклеточную коммуникацию за счёт содержащихся в них биоактивных молекул (факторов роста, рецепторов, цитокинов, а также различных классов кодирующих и некодирующих РНК, в том числе микроРНК). Профиль

биомолекул, присутствующих в ЭКВ, зависит от типа клеток-продуцентов. Соответственно, ЭКВ, секретируемые клетками злокачественных опухолей, отражают изменения молекулярного состава трансформированных клеток, что делает их перспективными источниками опухоль-ассоциированных микроРНК. В настоящее время предпринимаются активные попытки использования микроРНК в составе ЭКВ в качестве диагностических, прогностических и предиктивных маркеров злокачественных новообразований различных типов [6, 9]. Однако, несмотря на многочисленные данные, включая наши собственные результаты [10, 11], свидетельствующие об опухоль-ассоциированных изменениях состава микроРНК, маркеры злокачественных опухолей на их основе до сих пор не внедрены в клиническую практику. Основной проблемой, лимитирующей развитие данного направления, является противоречивость результатов, полученных в различных исследованиях, что объясняется как высокой гетерогенностью самих ЭКВ, так и целым рядом причин методологического характера. В связи с этим важнейшей задачей, определённой ISEV, является стандартизация методов выделения и анализа ЭКВ, а также методов анализа их молекулярного состава [8]. Это в большей степени относится к анализу микроРНК, учитывая низкий уровень их представленности в ЭКВ [12, 13], высокий уровень содержания липидов в мембранах ЭКВ, присутствие в препаратах ЭКВ РНК-содержащих частиц невезикулярного происхождения со сходными физическими характеристиками (прежде всего липопротеиновых комплексов) [14] и ряд других методических сложностей, особенно относящихся к анализу ЭКВ, содержащихся в биологических жидкостях организма, а не в кондиционированной среде культивируемых клеток *in vitro*. Различия в методах экстракции сказываются на эффективности выделения малых РНК, содержании микроРНК и даже на их составе [15, 16].

К настоящему времени опубликовано большое количество работ, посвящённых сравнению методов выделения свободно циркулирующих микроРНК из биологических жидкостей организма [17]. В то же время анализу методов выделения микроРНК из ЭКВ посвящены лишь несколько статей [15, 18–23]. Важно отметить, что методы экстракции РНК постоянно совершенствуются, и на рынке появляются новые наборы для выделения микроРНК.

В связи со сказанным выше целью данного исследования было сравнение методов выделения микроРНК из ЭКВ, содержащихся в

биологических жидкостях организма (асцитической жидкости больных раком яичника), с использованием различных коммерческих наборов – как зарекомендовавших себя для подобного рода задач (miRNeasy Serum/Plasma Kit (miRNeasy, «Qiagen», Нидерланды)), так и ранее почти (Total Exosome RNA & Protein Isolation Kit (TERPIK, «ThermoFisher Scientific», США)) или полностью (PureLink miRNA Isolation Kit («ThermoFisher Scientific») и miRNeasy Advanced Serum/Plasma Kit (miRNeasy_A, «Qiagen»)) не включённых в аналогичные исследования.

Для данной задачи в качестве источника ЭКВ были выбраны асциты брюшной полости, полученные от пациентов с диагнозом рак яичника. Этот тип биологической жидкости достаточно широко используется для анализа молекулярного состава ЭКВ с точки зрения поиска прогностических и предиктивных маркеров данного заболевания [24, 25]. В то же время ЭКВ из асцитической жидкости практически не попадали в исследования, посвящённые сравнению методов выделения РНК [17].

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Сбор и первичная обработка клинического материала. Шесть образцов асцитической жидкости были получены от пациентов с диагнозом рак яичника в онкогинекологическом отделении ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России. От каждого пациента было получено добровольное информированное согласие на участие в эксперименте в соответствии с требованиями Этического комитета. Каждый из образцов (исходный объём которых был не менее 300 мл) в течение 1 ч после забора был обработан согласно следующему протоколу последовательного центрифугирования: 300 g (4 °C) в течение 15 мин, 800 g (4 °C) – 20 мин, 2000 g (4 °C) – 30 мин и 10 000 g (4 °C) – 30 мин, чтобы очистить его от клеток, клеточного дебриса и крупных везикул. Полученный супернатант был заморожен на –80 °C.

Выделение ЭКВ. Для выделения малых ЭКВ был использован стандартный протокол дифференциального ультрацентрифугирования, описанный They et al. [26], с небольшими модификациями [27]. Работа состояла из двух этапов, на каждом из которых было обработано по 3 асцита. Размороженные супернатанты были разведены ледяным PBS в 4 раза и подвергнуты первому раунду ультрацентрифугирования при 110 000 g (4 °C) в течение 3 ч. Полученный осадок (состоящий в основном из малых ЭКВ) был ресуспендирован в 5 мл холодного PBS.

На первом этапе работы растворённый осадок был разделён на 5 равных аликвот по 1 мл и повторно центрифугирован при 110 000 g (4 °C) в течение 1 ч. Полученные осадки (4 из 5) растворили в 80 мкл PBS, а оставшийся – в 80 мкл лизирующего буфера (Binding Buffer, BB) из набора PureLink. 20 мкл из растворов, разведённых в PBS, были отобраны для анализа методами NTA (Nanoparticles Tracking Analysis, анализ траектории движения наночастиц), ТЭМ (трансмиссионная электронная микроскопия) и иммуноблоттинга, а оставшиеся 60 мкл использовались для выделения микроРНК. На втором этапе полученный после первого раунда ультрацентрифугирования осадок был растворён в 5 мл холодного PBS и подвергнут второму раунду ультрацентрифугирования при 110 000 g (4 °C) в течение 1 ч. Финальный осадок был растворён в 200 мкл холодного PBS и разделён на 3 аликвоты по 60 мкл (для выделения РНК тремя разными наборами). Оставшиеся 20 мкл использовались для анализа методами NTA, ТЭМ и иммуноблоттинга.

Анализ траектории движения наночастиц. Подсчёт концентрации и размерного распределения частиц в препаратах ЭКВ осуществляли методом NTA на приборе NanoSight LM10 HS, оборудованном ячейкой NanoSight LM14 со встроенным датчиком температуры («Malvern Panalytical Ltd.», Великобритания) и лазерной установкой LM 14C (405 нм, 65 мВт). Съёмку производили высокочувствительной камерой C11440-50B с сенсором CMOS («Hamamatsu Photonics», Япония) в соответствии с рекомендациями ASTM E2834–12(2018) со следующими настройками: Camera Shutter = 1500, Camera Gain = 500, Lower Threshold = 195, Higher Threshold = 1885. Образец разводили до концентрации $1,5 \times 10^8$ част./мл, чтобы попасть в оптимальный рабочий диапазон прибора применительно к анализу везикул (в соответствии с рекомендациями «Standard Guide for Measurement of Particle Size Distribution of Nanomaterials in Suspension by NTA» (ASTM E2834-12 (2018))), после чего производили 12 минутных видеозаписей, которые обрабатывали с помощью программы NTA software 2.3 build 33 («Malvern Panalytical Ltd.») на следующих настройках: Screen Gain = 10, Detection Threshold = 8 (Multi), Min. expected size = 30 nm. Результаты всех измерений были объединены для получения гистограммы распределения размеров частиц и общей концентрации с поправкой на фактор разбавления.

Трансмиссионная электронная микроскопия. Анализ морфологии ЭКВ проводили с

помощью просвечивающего электронного микроскопа JEM-1011 («JEOL, Ltd.», «Akishima», Япония) согласно протоколу, описанному ранее [10]. Для каждого образца анализировалось не менее 10 полей зрения.

Вестерн-блот анализ. Иммуноблоттинг проводили согласно описанной ранее методике [27]. Вкратце, концентрацию белка в образцах ЭКВ и клеточном лизате определяли методом Бредфорда с помощью набора Bradford Assay Kit («Bio-Rad Laboratories, GmbH», Германия). Образец, содержащий 10 мкг белка, подвергали электрофорезу в 15%-ном SDS-ПААГ (m/v), переносили на PVDF-мембрану («Merck Millipore», США), которую после инкубировали в 5%-ном растворе БСА (m/v) («PAA Laboratories GmbH», Австрия) в буфере TBS, содержащем 0,1% Tween 20 (v/v). Затем мембрану инкубировали 12 ч при 4 °С с первичными антителами, проводили стандартную отмывку в буфере TBS/Tween 20 и инкубировали 1 ч при комнатной температуре со вторичными антителами, конъюгированными с пероксидазой хрена. После отмывки белки проявляли с помощью реагента Clarity Western ECL Substrate (#170-5061, «Bio-Rad Laboratories, Inc.», США) на приборе Kodak Gel Logic 2200 Imaging System («Kodak», США) с последующей обработкой с помощью программы Carestream Molecular Imaging Software SE ver.5.0.1.27 («Molecular Bioimaging», США). Список использованных в работе антител: anti-Flotillin-2 (#3436S, 1 : 1000; «Cell Signaling Technology», США), anti-CD9 (#13174, 1 : 2000; «Cell Signaling Technology»), anti-TSG-101 (ab125011, 1 : 5000; «Abcam», Великобритания), anti-PCNA (#sc-7907, 1 : 500; «Santa Cruz Biotechnology», США), anti-Stomatin (#sc-134554, 1 : 500; «Santa Cruz Biotechnology»), anti-mouse goat polyclonal antibodies (#2367, 1 : 5000; «Cell Signaling Technology»), и anti-rabbit goat polyclonal antibodies (#29902, 1 : 80 000; «Cell Signaling Technology»).

Выделение и характеристика РНК. Выделение РНК осуществлялось с использованием четырёх коммерческих наборов в соответствии с рекомендациями производителей: TERPIK (4478545, «ThermoFisher Scientific»); miRNeasy (217184, «Qiagen»); PureLink miRNA Isolation Kit (K157001, «Thermo Fisher Scientific»); miRNeasy_A (217204, «Qiagen»). РНК элюировали в 40 мкл деионизированной воды. Концентрацию малых РНК измеряли с помощью набора Qubit™ microRNA Assay Kit (Q32881; «Invitrogen») в соответствии с протоколом производителя. Размерное распределение в полученных препаратах РНК и содержание микроРНК анализировали на биоанализаторе

ре (БА) Agilent 2100 с использованием набора для малых РНК «Small RNA Kits» («Agilent Technologies», США).

Секвенирование. 2 мкл образца тотальной экзосомальной РНК были конвертированы в библиотеки кДНК с использованием набора NEBNext® Multiplex Small RNA Library Prep Set for Illumina (NEB) («BioLabs Inc., Hitchin», Великобритания) для всех препаратов. Выход и распределение длин фрагментов полученных библиотек измеряли с помощью набора High Sensitivity DNA Kit на биоанализаторе Bioanalyzer 2100 («Agilent Technologies») и проводили селекцию кДНК по размеру микроРНК с помощью AMPure XP Beads («BioLabs Inc.») согласно NEB. Секвенирование проводили на приборе HiSeq1500 («Illumina») одноконцевыми чтениями длиной 50 нуклеотидов с генерацией не менее 5 миллионов чтений, сопоставленных с геномом человека (версия сборки генома человека human genome hg18).

Обратная транскрипция и ПЦР в реальном времени. Для детекции микроРНК нами была использована модификация ОТ-ПЦР «петля-на-стержне» («stem-loop»), описанная в работе Chen et al. [28]. Праймеры для специфических микроРНК были разработаны с помощью miRBase v22.1 и синтезированы компанией «ДНК-синтез» (Россия) (последовательности приведены в табл. S1 Дополнительных материалов). Эффективность амплификации проверяли с использованием серийных разведений кДНК, полученных в результате реакции обратной транскрипции соответствующих синтезированных микроРНК. Параметры ПЦР были установлены для достижения эффективности от 95% до 105% для всех наборов праймеров.

Все исследованные образцы экзосомальной РНК были разведены до растворов с финальной концентрацией 12 нг/мл, из которых 4 мкл были взяты в реакцию обратной транскрипции, которую проводили с использованием набора 5x RTMIX-3000 (#RTM-100, «Диалат», Россия) в присутствии 1 пмоль микроРНК-специфичных stem-loop ОТ-праймеров. Для каждой микроРНК параллельно ставили ОТ(-) контроль. После двукратного разведения 2 мкл продукта ОТ были амплифицированы на приборе Real-time CFX96 Touch («Bio-Rad Laboratories, Inc.») с использованием набора 5x MasCFE MIX-2025 (#MCFE-100, «Диалат») в присутствии 20 пмоль микроРНК-специфичных прямых праймеров, 10 пмоль универсальных обратных праймеров и 5 пмоль TaqMan™ микроРНК-специфичных зондов. Температуры отжига праймеров составляли: 56 °С для miR-1246, 58 °С для miR200b, 60 °С для miR-23a

и 62 °С для miR-200с. Реакции проводили в трипликатах, и принимались результаты со значением стандартного отклонения меньше 0,3. Для анализа данных и расчёта порогового значения цикла (Ct) использовалось программное обеспечение Bio-Rad CFX Manager v.3.1.

Биоинформационный анализ результатов секвенирования. Биоинформационный анализ полученных данных с глубиной прочтения не менее 5 млн качественных прочтений на образец проводился по ранее описанной методике [10]. Вкратце, последовательности адаптеров удалялись из полученного текста с помощью пакета cutadapt (v1.12) (параметры --trim-n -n5 -m14), картирование на геном человека проводилось с использованием референсной сборки генома hg18 (https://www.ncbi.nlm.nih.gov/assembly/GCF_000001405.12/) с помощью пакета программ bowtie (v0.12.9) (параметры -n 0), аннотирование полученных результатов проводили с использованием аннотационных файлов баз данных Ensembl data annotations (<https://www.ensembl.org/info/genome/genebuild/biotypes.html>), miRBase v22.1 (<https://www.mirbase.org/>), piRBase v2 (<http://bigdata.ibp.ac.cn/piRBase/>) с помощью пакета программ featureCounts (v1.5.0) (параметры -g transcript_id -t miRNA -Q 10 -a hsa.mature.gtf (или другой файл аннотации)).

Статистическая обработка данных. Все расчёты статистической значимости результатов были проведены на данных трёх повторов независимых экспериментов. Если не указано другое, данные представлены в виде среднего со стандартным отклонением (SD). Методы статистического анализа включали использование двухвыборочного критерия Стьюдента для зависимых и независимых выборок, критерия Манна–Уитни, анализ дисперсии (ANOVA) для сравнения нескольких групп (с посттестом Даннетта). Для оценки трендов (значимости изменений переменной в ряду) использовался вариант ANOVA с проведением линейного анализа трендов. Различия считались статистически значимыми при $p < 0,05$. Для расчётов и построения графиков использовались программы GraphPad 8.3 («GraphPad Software», США) и MS Excel for MS Windows ver. 16.0 («Microsoft Software», США).

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

Выделение и характеристика ЭКВ из асцитических жидкостей. Образцы асцитической жидкости (N = 6) получали от больных раком яичника, проходивших лечение в отделении онкогинекологии ФГБУ «НМИЦ онкологии

имени Н.Н. Блохина». ЭКВ выделяли методом дифференциального центрифугирования по ранее описанной методике [27], полученные препараты валидировали в соответствии с рекомендациями ISEV [8]. Так, анализ размера и морфологии везикул проводили с помощью метода трансмиссионной электронной микроскопии. На рис. 1, а представлены наноразмерные мембранные структуры с типичной для экзосом формой «сдутых мячиков», характерной для данного типа исследования и пробоподготовки.

Размерное распределение и концентрацию препаратов ЭКВ измеряли методом анализа траектории движения наночастиц (рис. 1, б–в). Средний размер частиц варьировал от 118 до 158 нм при положении максимума (мода) от 72 до 92 нм. Средние значения по всем шести образцам ЭКВ, использованным в работе, для медианы и моды составляли 112 нм и 82 нм соответственно. Концентрация ЭКВ в образцах варьировала от 2,02 до $7,62 \times 10^{12}$ частиц/мл и в среднем составила $4,35 \times 10^{12}$ частиц/мл (рис. 1, б–в). Для подтверждения экзосомальной природы везикул был проанализирован уровень экзосомальных маркеров в препаратах ЭКВ методом вестерн-блоттинга. Для этой задачи согласно рекомендациям ISEV были выбраны несколько белков, принадлежащих к различным функциональным классам и имеющих различную внутриклеточную компартментализацию, включая TSG-101 (коровый компонент комплекса ESCRT-I), тетраспанин CD9 и компонент плоских липидных рафтов флотиллин-2 (Flotillin-2). Помимо указанных белков, мы также проверили присутствие стоматина (Stomatin), белка липидных рафтов, ранее впервые обнаруженного нами в составе ЭКВ и предложенного в качестве нового экзосомального маркера [11, 27]. Белок PCNA был выбран в качестве отрицательного контроля – маркера белков клеточного происхождения, отсутствующего в ЭКВ. Как видно на рис. 1, г, полученные препараты ЭКВ характеризовались высоким содержанием всех экзосомальных маркеров и отсутствием белка PCNA, который детектировался в контроле – лизате клеток линии рака яичника, Ovar8.

Сравнение методов выделения микроРНК из ЭКВ с помощью коммерческих наборов PureLink miRNA Isolation Kit, miRNeasy и TERPIK. На первом этапе мы проводили сравнение трёх коммерческих наборов для выделения микроРНК – PureLink miRNA Isolation Kit («Thermo Fisher Scientific»), miRNeasy («Qiagen») и TERPIK («Thermo Fisher Scientific») из препаратов ЭКВ, выделенных из трёх образцов асцитических

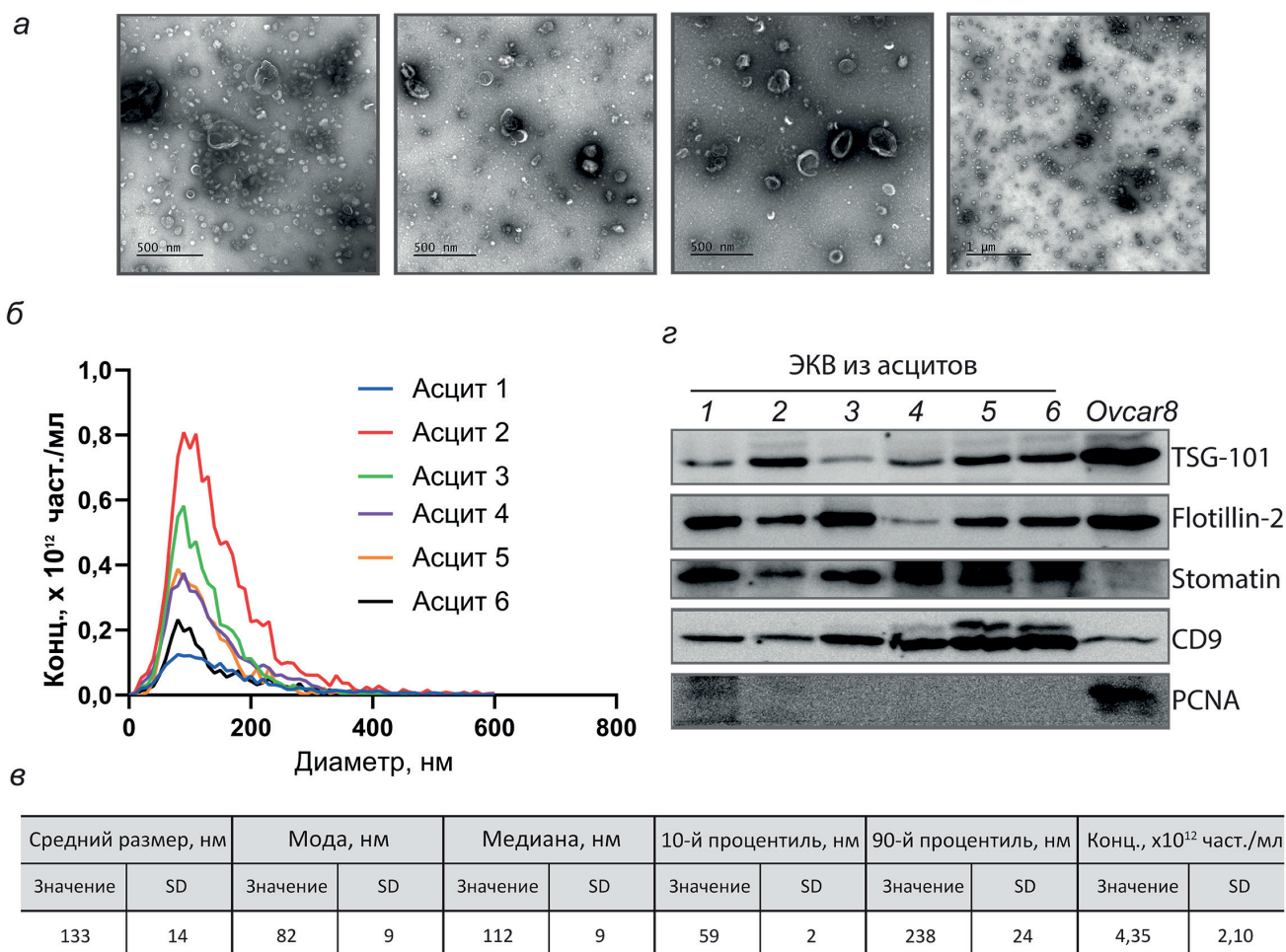


Рис. 1. Характеристики ЭКВ, выделенных из асцитической жидкости больных раком яичника. *а* – Примеры анализа размеров и морфологии везикул, полученных из асцитов 1–4, методом ТЭМ. Приведены масштабные отрезки 500 нм и 1 мкм. *б* – Спектры среднеразмерного распределения и концентрации частиц в образцах ЭКВ, полученных из асцитов 1–6, по данным NTA. *в* – Средние значения размерных характеристик и концентрации везикул в образцах ЭКВ, полученных из асцитов 1–6. *г* – Анализ представленности экзосомальных маркеров CD9, TSG101, Flotillin-2 и Stomatin в образцах ЭКВ, полученных из асцитов 1–6, методом иммуноблоттинга. PCNA – клеточный белок для контроля наличия в препаратах ЭКВ белков невезикулярного происхождения. Ovcar8 – лизат клеток линии рака яичника

жидкостей (асциты 1–3). Поскольку набор PureLink miRNA Isolation Kit изначально предназначен для выделения микроРНК из животных и растительных клеток, а также из бактерий и дрожжей, первым этапом его протокола является лизис клеток и связывание высвобожденных молекул РНК входящим в его состав буфером ВВ, что предполагает наличие сухого клеточного осадка. Однако подавляющее большинство методов выделения ЭКВ предполагает растворение везикул в буфере PBS, в котором везикулы сохраняют свои физико-химические свойства, морфологические характеристики и биологическую активность, что необходимо для последующей верификации ЭКВ и подтверждения их биологической природы (методами электронной микроскопии, NTA или динамического светорассеивания и др.), а также их функционального анализа. В связи с этим набор PureLink miRNA Isolation Kit применялся нами

в двух вариантах первого этапа методики, для чего использовали алиquotы препаратов ЭКВ, выделенных из одних и тех же образцов асцитической жидкости. Для этого осадки ЭКВ в каждом случае параллельно получали из двух равных объёмов каждого из образцов асцитической жидкости, один из которых растворяли в 80 мкл лизирующего буфера ВВ (препараты PL_BB), а второй – в 80 мкл буфера PBS (препараты PL_PBS). В обоих случаях 60 мкл были доведены буфером ВВ до 200 мкл и использованы для выделения РНК. В наборе TERPIK предусмотрена возможность использования дополнительной процедуры (вторая колонка) для обогащения конечного препарата малыми РНК. Мы использовали для сравнения оба протокола: как с использованием 1 колонки (выделение тотальной РНК, препараты TERPIK_1к), так и с использованием 2 колонок (выделение преимущественно малых РНК, препараты TERPIK_2к).

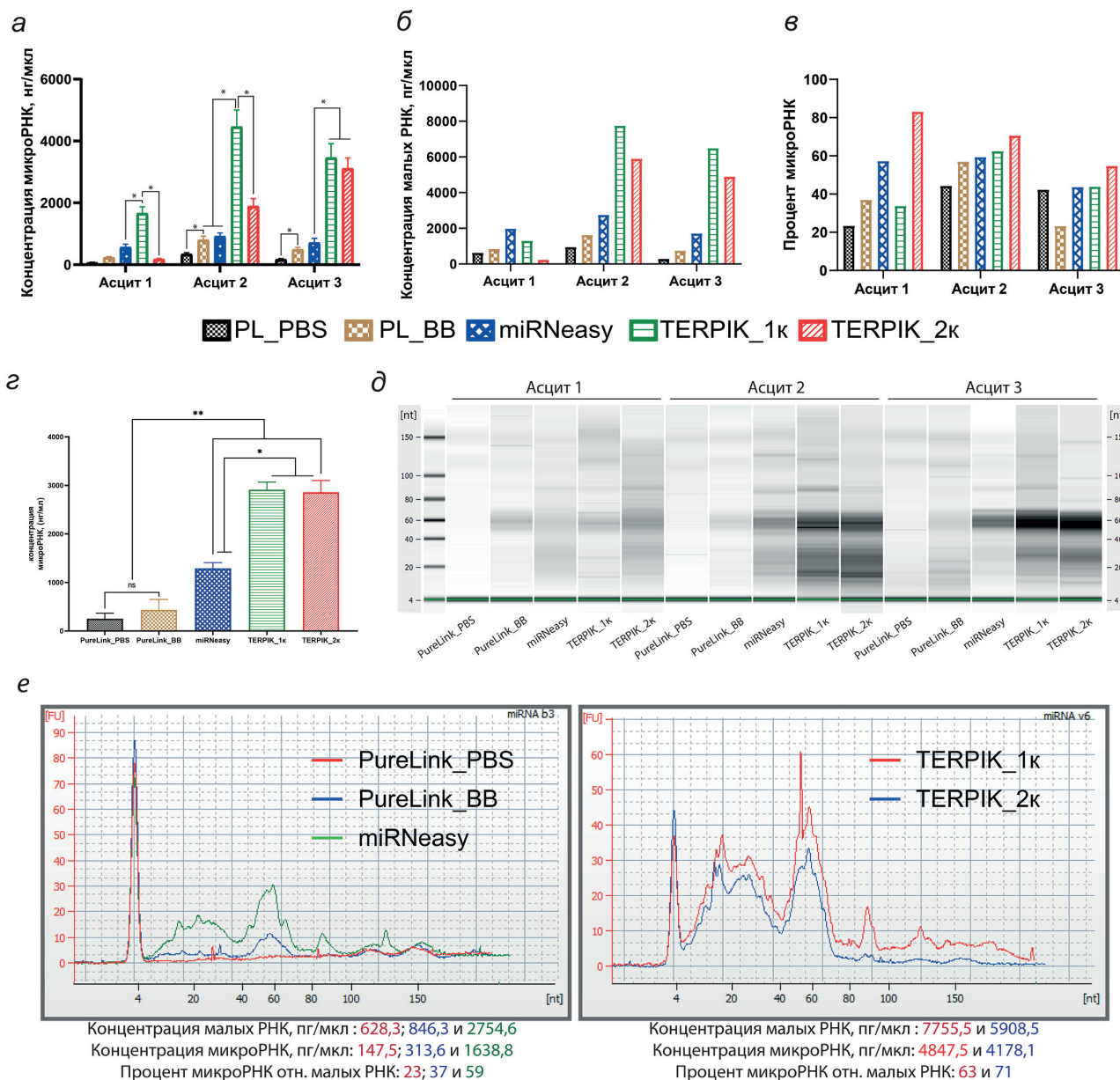


Рис. 2. Анализ концентрации микроРНК, выделенных с помощью наборов PureLink miRNA Isolation Kit, miRNeasy и TERPIK из ЭКВ, содержащихся в асцитической жидкости больных раком яичника (образцы 1–3). *а* – Анализ концентрации микроРНК в препаратах, полученных из ЭКВ асцитов 1–3, с использованием набора Qubit™ microRNA Assay Kit. *б–в* – Анализ концентрации малых РНК и содержания микроРНК по данным биоанализатора Bioanalyzer. *г* – Сравнение усреднённых значений концентрации микроРНК в препаратах, полученных из всех образцов ЭКВ с помощью различных методов выделения, * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$. *д* – Микроэлектрофореграммы, полученные с помощью Bioanalyzer 2100, для всех исследуемых образцов. *е* – Пример результатов анализа – размерного распределения и концентрации малых РНК – в препаратах, полученных с помощью различных методов выделения из образца ЭКВ, выделенных из асцита 2. TERPIK_1к – набор TERPIK, протокол с использованием 1 колонки; TERPIK_2к – набор TERPIK, протокол с использованием 2 колонок; PL_BB – набор PureLink miRNA Isolation Kit, протокол с растворением сухого осадка ЭКВ в буфере производителя; PL_PBS – набор PureLink miRNA Isolation Kit, протокол с использованием ЭКВ в растворе PBS; miRNeasy – набор miRNeasy

Таким образом, из каждого образца асцитической жидкости было выделено 5 идентичных препаратов ЭКВ, из которых были получены с помощью указанных методик пять препаратов микроРНК: PL_PBS, PL_BB, miRNeasy, TERPIK_1к и TERPIK_2к.

Для оценки эффективности выделения микроРНК из образцов ЭКВ нами была из-

мерена концентрация микроРНК с помощью набора Qubit™ microRNA Assay Kit. Согласно полученным данным, наименьшей эффективностью выделения обладает набор PureLink miRNA Isolation Kit, причём из препарата везикул, растворённых в буфере PBS, РНК выделяется хуже, чем из изначально растворённых в буфере BB (рис. 2, а).

Использование двух других наборов, miRNeasy и TERPIK, показало более высокий «выход» малых РНК. Лучший результат по данному критерию показал набор TERPIK, причём в случае использования одной колонки (протокол TERPIK_1к) концентрация микроРНК по данным Qubit™ microRNA Assay Kit оказалась выше (в среднем в 5,25 раз), чем при использовании дополнительного этапа (протокол TERPIK_2к).

Следующим шагом был анализ размерного распределения малых РНК методом капиллярного микроэлектрофореза с помощью чипов Small RNA kit для биоанализатора Bioanalyzer 2100 («Agilent Technologies»). Результаты анализа, включая концентрацию малых РНК, процентную долю микроРНК, микроэлектрофореграммы и примеры спектров размерного распределения, представлены на рис. 2, б–е. Как по данным биоанализатора (рис. 2, б–в), так и по данным, полученным с помощью Qubit™ microRNA Assay Kit (рис. 2, а, г), набор PureLink miRNA Isolation Kit, основанный на сорбционном методе экстракции, уступает наборам, использующим фенол-хлороформный протокол (miRNeasy и TERPIK), не только по совокупному количеству полученной РНК, но и по качеству препаратов, поскольку даже вариант с лизированием сухого осадка ЭКВ в буфере BV (PureLink_BV) демонстрирует маловыраженные пики как в размерной области микроРНК (18–25 нт), так и в области молекул РНК большего размера (рис. 2, д, е). Результаты, полученные с использованием наборов miRNeasy и TERPIK, показали широкий размерный спектр малых РНК, включая пик около 23 нуклеотидов, соответствующий микроРНК, и высокую эффективность выде-

ления. Соотношение эффективности выделения наборами miRNeasy и TERPIK по каждому из используемых критериев оценки несколько варьировало в зависимости от образца, при этом по совокупности критериев однозначных преимуществ между этими наборами не выявлено. Интересно, что дополнительная стадия обогащения препарата малыми РНК в наборе TERPIK (протокол TERPIK_2к) не привела к достоверному увеличению фракции микроРНК в полученных образцах, однако снизила общий выход микроРНК согласно данным биоанализатора в среднем в 1,63 раза, а малых РНК – в 2,72, в связи с чем мы отказались от использования этой модификации в дальнейшем.

Чтобы изучить влияние методов выделения на профиль экзосомальных РНК, было проведено глубокое секвенирование нового поколения (NGS) транскриптома малых РНК (small RNA-seq) в трёх образцах, выделенных из одного асцита (асцит 2) тремя вариантами: PL_PBS, miRNeasy и TERPIK_1к. Далее был проведён биоинформационный анализ полученных данных (не менее 5 млн прочтений на образец), включавший в себя картирование на геном человека (с использованием референсной сборки генома hg18, https://www.ncbi.nlm.nih.gov/assembly/GCF_000001405.12/) с помощью пакета программ bowtie (v0.12.9) и аннотирование полученных результатов с использованием аннотационных файлов баз данных Ensembl data annotations (<https://www.ensembl.org/info/genome/genebuild/biotypes.html>), miRBase v22.1 (<https://www.mirbase.org/>), piRBase v2 (<http://bigdata.ibp.ac.cn/piRBase/>) с помощью пакета программ featureCounts (v1.5.0). Анализ показал присутствие в ЭКВ различных видов РНК, включая регуляторные РНК,

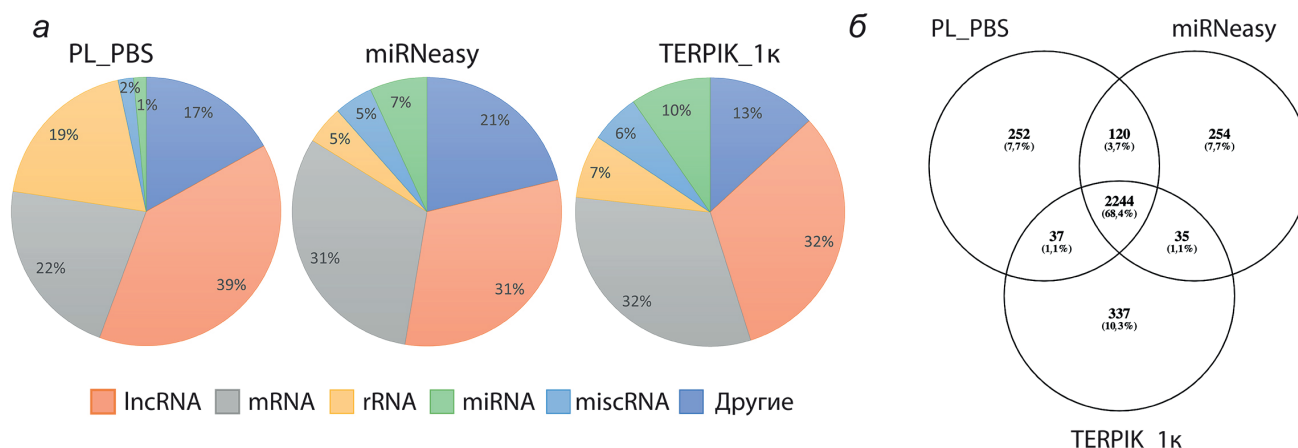


Рис. 3. Состав и процентное содержание различных классов малых РНК по данным глубокого секвенирования (small RNAseq). а – Среднее значение процентного соотношения малых РНК различных классов, включая содержание микроРНК, в препаратах, полученных с помощью различных методов выделения из асцита 2. б – Диаграмма Венна, отражающая пересечение профилей микроРНК при использовании различных методов выделения

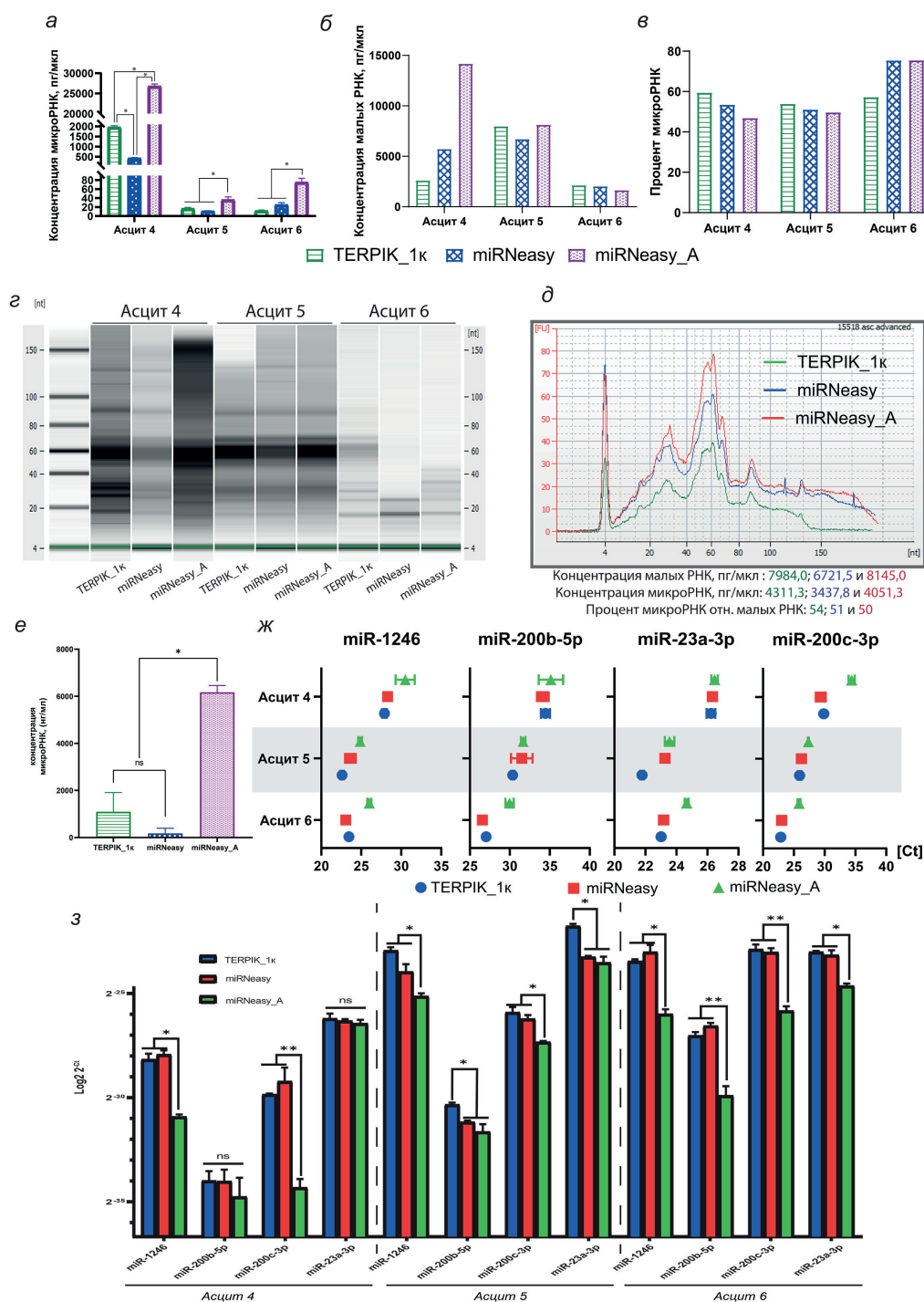


Рис. 4. Анализ концентрации микроРНК, выделенных с помощью наборов miRNeasy, TERPIK и miRNeasy_A из ЭКВ, содержащихся в асцитической жидкости больных раком яичника (образцы 4–6). *а* – Анализ концентрации микроРНК в препаратах, полученных из ЭКВ асцитов 4–6, с использованием «Qubit™ microRNA Assay Kit»; *б–в* – анализ концентрации малых РНК и содержания микроРНК по данным биоанализатора Bioanalyzer 2100; *г* – результаты микроэлектрофореграммы, полученные с помощью Bioanalyzer 2100 для всех исследуемых образцов; *д* – пример результатов анализа (размерного распределения и концентрации малых РНК) в препаратах, полученных с помощью различных методов выделения из образца ЭКВ, выделенных из асцита 5; *е* – сравнение усреднённых значений концентрации микроРНК в препаратах, полученных из всех образцов ЭКВ с помощью различных методов выделения, * $p < 0,05$; жс – средние значения Ct четырёх эндогенных микроРНК в образцах ЭКВ, выделенных из образцов 4–6; *з* – сравнение уровней микроРНК, выделенных тремя вышеперечисленными наборами в образцах ЭКВ асцитов 4–6. По оси ординат представлено сравнение экспрессии (2^{-Ct}) проанализированных микроРНК (на \log_2 шкале). Данные размерного распределения показали широкий спектр малых РНК, присутствующих в ЭКВ, полученных с использованием всех исследуемых наборов, включая пик в районе 23 нуклеотидов, соответствующий микроРНК. Микроэлектрофореграмма для всех образцов приведена на рис. 4, г, пример сравнения гистограмм размерного распределения малых РНК для ЭКВ из асцита 5 – на рис. 4, д. Таким образом, несмотря на больший «выход» малых РНК при использовании набора «miRNeasy_A» (статистически достоверные различия по суммарной выборке образцов представлены на рис. 4, е), этот набор не показал преимуществ по содержанию микроРНК.

такие как длинные некодирующие РНК (Long non-coding RNAs, lncRNA), микроРНК (miRNA), малые ядерные РНК (Small nuclear RNA, snRNA), малые ядрышковые РНК (Small nucleolar RNA, snoRNA), пивиРНК (piwi-interacting RNA, piwiRNA), а также короткие фрагменты кодирующих и структурных РНК, таких как рРНК, мРНК, различные псевдогены и др. (рис. 3, а).

Процент микроРНК в общем пуле малых РНК по данным секвенирования в среднем составлял 6%, максимальное значение – 10% микроРНК – было получено при использовании набора TERPIK. Интересно, что несмотря на низкую эффективность выделения РНК методом PL_PBS, этот образец на 68% перекрывался по составу микроРНК с образцами, выделенными фенол-хлороформными методами (рис. 3, б), хотя в них доля этой фракции заметно выше: 7% и 10% против 1% (рис. 3, а). Также следует отметить, что в препарате, выделенном набором PL_PBS, наблюдается повышенное содержание рРНК по сравнению с наборами miRNeasy и TERPIK.

Таким образом, по итогам сравнения наиболее эффективными в отношении количества выделяемых малых РНК и содержания микроРНК по данным биоанализатора и результатам секвенирования оказались наборы miRNeasy и TERPIK, причём однозначных преимуществ при сравнении двух данных наборов между собой по результатам анализа ЭКВ из трёх образцов асцитической жидкости выявлено не было.

Сравнение методов выделения микроРНК из ЭКВ с помощью коммерческих наборов miRNeasy, miRNeasy_A и TERPIK. На втором этапе работы мы добавили в сравнение набор miRNeasy_A, который, как и PureLink miRNA Isolation Kit, не имеет в своём составе фенола – выделение включает гуанидин-тиоцианатный метод экстракции с последующей адсорбцией нуклеиновых кислот на кремниевой поверхности стекловолоконных колонок, заменив им набор PureLink miRNA Isolation Kit в связи с выявленной низкой эффективностью данного набора. Соответственно, сравнение включало наборы miRNeasy, miRNeasy_A и TERPIK (протокол «TERPIK_1к»). Для сравнения использовали дополнительные образцы ЭКВ, полученные из трёх других асцитов (асциты 4–6). По результатам анализа концентрации набор «miRNeasy_A» продемонстрировал наибольший «выход» для всех исследованных образцов. Так, средняя концентрация микроРНК, измеренная с помощью набора Qubit™ microRNA Assay Kit, в препаратах, полученных с помощью «miRNeasy_A», была в 7,2 раз выше таковой для

набора «TERPIK» и в 11,4 раз – для «miRNeasy» (рис. 4, а). Любопытно, что такая закономерность не сохранялась при определении концентрации микроРНК на биоанализаторе (рис. 4, б–г). Так, несмотря на то что количество малых РНК в целом при использовании «miRNeasy_A» было несколько выше (рис. 4, б, асциты 4 и 5), содержание микроРНК во всех случаях было приблизительно равное или даже меньше (рис. 4, в, асциты 4 и 5), чем при использовании набора «TERPIK». При этом различия в проценте микроРНК по отношению к общему пулу малых РНК при выделении разными наборами среди всей выборки образцов были статистически не значимы ($p > 0,05$).

Далее мы провели сравнение эффективности количественного анализа индивидуальных микроРНК в образцах, полученных с помощью исследуемых коммерческих наборов. Для оценки были выбраны четыре эндогенных микроРНК, присутствующие на высоком уровне, согласно нашим ранее опубликованным данным [10] и данным литературы [29, 30], как в тканях, так и в ЭКВ при раке яичников: hsa-miR-1246, hsa-miR-200b-5p, hsa-miR-200c-3p и hsa-miR-23a-3p. Сравнение концентрации данных молекул проводили с помощью метода ОТ-ПЦР в реальном времени с использованием модификации «петля-на-стержне» (Stem-Loop-RT-qPCR). Результаты анализа показали широкий диапазон представленности этих микроРНК в исследуемых образцах, при этом наибольший уровень детектировался в препаратах, полученных с помощью наборов «TERPIK_1к» и «miRNeasy» (рис. 4, ж, з), в то время как в образцах, выделенных методом «miRNeasy_A», несмотря на самую высокую концентрацию малых РНК в исходных препаратах, все исследуемые микроРНК детектировались на более поздних циклах амплификации.

Таким образом, добавленный в сравнение метод с использованием набора miRNeasy_A по совокупности критериев оценки не показал преимуществ в сравнении с наборами TERPIK и miRNeasy, а по отдельным из них, таким как содержание микроРНК и концентрация индивидуальных микроРНК, даже в среднем уступал этим двум наборам.

Суммируя полученные данные, можно сказать, что наборы, основанные на гуанидин-тиоцианат-фенол-хлороформном методе экстракции, дают лучшие результаты по сравнению с содержащими только хаотропные агенты (гуанидин-тиоцианат). Соответственно, оптимальными методиками можно считать использование наборов TERPIK и miRNeasy.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Несмотря на то что на сегодняшний день существует множество методик выделения РНК и достигнут определённый прогресс в их развитии, согласно данным NIH Extracellular RNA Communication Consortium, ни одна из них не может быть выдвинута в качестве наиболее эффективной для изоляции внеклеточных РНК, и работы по разработке и оптимизации новых подходов к решению этой задачи должны быть продолжены [31].

Для защиты от действия различных рибонуклеаз и фосфодиэстераз, обнаруживаемых в большинстве биологических жидкостей, внеклеточные микроРНК либо образуют комплексы с белками и липопротеинами, либо находятся в составе ЭКВ, в частности экзосом, которые ограждают их от действия ферментов. По данным ряда исследований, экзосомы являются основными транспортёрами внеклеточных нуклеиновых кислот и, в частности, микроРНК, в биологических жидкостях, таких как кровь, моча, слюна [32, 33]. В то же время, по данным других исследований, содержание микроРНК в экзосомах может быть достаточно низким, не превышая одной копии каждой из индивидуальных молекул микроРНК на одну везикулу [13]. Однако учитывая высокое содержание самих экзосом в биологических жидкостях — в среднем 10^8 – 10^{12} на мл крови [12, 32] — очевидно, что общее количество переносимых в составе ЭКВ молекул является очень высоким.

Мембраны ЭКВ обогащены липидами в различных сочетаниях: так, мембраны экзосом обогащены холестерином, фосфотидилсеринном церамидом и сфингомиелином — липидами, обнаруживаемыми в составе мембранных микродоменов, — участков мембран, устойчивых к действию неионогенных детергентов [34–36], а мембраны микровезикул в большей степени обогащены лизофосфотидилхолинами, сфингомиелином и ацилкарнитинами [37, 38]. Высокое содержание липидов и липопротеинов в ЭКВ, а также значительно более высокое по сравнению с клетками соотношение площади поверхности мембраны к содержимому везикулы обуславливают дополнительную сложность в их эффективном лизировании для разрушения мембран, диссоциации комплексов микроРНК с различными биомолекулами и удаления самих липидов и протеинов на финальном этапе получения препарата. В зависимости от успешности этой процедуры профиль полученных препаратов может широко варьировать, поскольку разные по составу микроРНК обладают разным сред-

ством к различным белкам и липопротеинам. Например, было показано, что в зависимости от объёма исходного образца плазмы менялся GC-состав полученных из неё микроРНК [39].

В настоящее время ситуация с методами выделения РНК из ЭКВ ещё менее понятна, чем с выделением свободно циркулирующих молекул из биологических жидкостей, поскольку, как уже говорилось, исследований, в которых проводились подобные сравнения, на порядок меньше. Так, среди многих десятков статей, посвящённых анализу методов выделения микроРНК из тканей и биологических жидкостей, нам удалось найти лишь семь аналогичных работ по методам выделения РНК из ЭКВ. Одна из них была посвящена выбору оптимального метода выделения микроРНК из экзосом, содержащихся в моче [18], в других работах сравнивались методы экстракции РНК из плазмы и сыворотки крови, а также из кондиционированной среды культивируемых клеток [15, 19–23]. ЭКВ из других биологических жидкостей с точки зрения выделения микроРНК ранее не исследовались, хотя происхождение ЭКВ существенно влияет на состав полученных препаратов, поскольку в разной степени контаминирует образцы ЭКВ липопротеиновыми комплексами, крупными протеиновыми агрегатами, рибонуклеопротеинами и другими частицами со сходными с ЭКВ физическими характеристиками. Кроме того, ЭКВ в составе биологических жидкостей являются производными клеток и тканей различного происхождения, и в зависимости от биологического источника характеризуются большой гетерогенностью по размерам, морфологии и молекулярному составу [11, 40, 41], что также влияет на эффективность выделения РНК.

Несмотря на то что авторы всех приведённых выше работ сходятся на том, что оптимизация этапа выделения нуклеиновых кислот является важнейшим аспектом исследования РНК, и в особенности микроРНК, так как в большей степени влияет на последующие результаты анализа, в остальном же данные различных работ в сильной степени варьируют, прежде всего потому, что сильно разнятся наборы, используемые в сравнении. Наиболее часто включаемым в сравнение набором для выделения микроРНК является набор miRNeasy.

Большинство современных методов выделения микроРНК основаны на фенол-хлороформ-гуанидин тиоцианатном методе экстракции, которая позволяет разделить липиды, белки и нуклеиновые кислоты между органической и неорганической фазами. Данный метод может быть усовершенствован добавлением

ем стадии осаждения микроРНК на колонках из стекловолокна, как это сделано в наборах miRNeasy, miRVANA и TERPIK. В случае последнего набора также используется дополнительная стадия лизиса ЭКВ в β -меркаптоэтанол-содержащем буфере, хотя для двух других наборов стадия лизиса протекает непосредственно в фенол-содержащем буфере. К недостаткам данного метода можно отнести временную затратность, высокую токсичность используемых реагентов и частичную потерю РНК с низким содержанием гуанидина и цитозина [42]. При другом, не содержащем фенола, подходе к выделению микроРНК используется ГТЦ в качестве хаотропного агента, а дальнейшая экстракция основана на взаимодействии между функциональными группами нуклеиновых кислот и твёрдыми сорбентами при определённых условиях. Он лежит в основе наборов PureLink miRNA Isolation Kit и miRNeasy_A, где РНК экстрагируется на колонках со стекловолокном, причём производитель набора miRNeasy_A гарантирует лизис содержащихся в плазме ЭКВ и высвобождение из них РНК. Ограничениями для подобного метода могут являться недостаточная диссоциация микроРНК-содержащих комплексов и ко-преципитация с содержащимися в биологических жидкостях биополимерами. Все исследуемые наборы предполагают использование гуанидин тиоцианата на начальной стадии, который обеспечивает разрушение гидрофобных связей и диссоциацию РНК-содержащих комплексов.

В недавнем обзоре был проведён анализ более 20 опубликованных экспериментальных статей, в которых сравнивались различные методики выделения РНК из биологических жидкостей, а также из ЭКВ, имеющих различное происхождение. Авторы обзора пришли к выводу, что наибольшей эффективностью в изоляции РНК обладает метод, основанный на гуанидин-фенол-хлороформной экстракции, хотя разные варианты протокола отличались по производительности по данным различных исследований [17].

В целом это совпадает и с результатами приведённых выше нескольких работ по сравнению отдельных методов выделения микроРНК из ЭКВ – в большинстве случаев оптимальные результаты получали с использованием набора miRNeasy Kit [15, 19, 21].

В нашем исследовании мы провели независимый анализ методов выделения микроРНК из препаратов ЭКВ с использованием четырёх наборов miRNeasy («Qiagen»), TERPIK («Thermo Fisher Scientific»), miRNeasy_A («Qiagen») и PureLink miRNA Isolation Kit

(«Thermo Fisher Scientific») с дополнительными вариантами в случае наборов PureLink miRNA Isolation Kit (варианты пробоподготовки ЭКВ) и TERPIK (варианты с использованием одной или двух колонок).

Набор miRNeasy был выбран в связи с тем, что, как было сказано выше, он довольно часто использовался в подобного рода сравнениях, достаточно хорошо себя зарекомендовал и мог использоваться в качестве «точки отсчета». Набор TERPIK использовался лишь в одной работе [22]. Исследований с использованием наборов miRNeasy_A («Qiagen») и PureLink miRNA Isolation Kit («ThermoFisher Scientific») для сравнения эффективности выделения циркулирующих внеклеточных микроРНК практически не проводилось, а в отношении их эффективности для выделения микроРНК из ЭКВ нами не было обнаружено ни одной статьи.

В данной работе для сравнения методов выделения микроРНК использовались препараты ЭКВ, полученные из образцов асцитической жидкости больных раком яичника. Выделение ЭКВ производили с помощью дифференциального ультрацентрифугирования – метода, рекомендованного ISEV [26]. Препараты были валидированы в соответствии с рекомендациями и критериями ISEV и характеризовались высокой концентрацией частиц (в среднем $4,35 \times 10^{12}$) характерного размера (30–150 нм) и морфологии, а также высоким уровнем экзосомальных маркеров. Образцы микроРНК, полученные с помощью исследуемых наборов, анализировались с использованием следующих критериев: концентрации микроРНК, детектируемой спектрофотометром Qubit с использованием набора для определения микроРНК, Qubit™ microRNA Assay Kit; размерного распределения и концентрации малых РНК, а также содержания молекул, соответствующих по размеру микроРНК, с использованием биоанализатора Bioanalyzer 2100 и чипа Small RNA kit; количества микроРНК по данным глубокого секвенирования транскриптома малых РНК; уровня детекции индивидуальных микроРНК (miR-1246, miR-200b-5p, miR-200c-3p и miR-23a-3p) методом ОТ-ПЦР в реальном времени.

Полученные нами результаты совпадают с данным других исследований в отношении набора miRNeasy, хотя данный набор не демонстрировал преимуществ по сравнению с набором TERPIK. Оба этих набора отличались наилучшим соотношением «выход/качество», причём использование TERPIK со стадией обогащения малыми РНК не приводило к существенному увеличению чистоты препарата, однако сильно сказывалась на его финальной

концентрации. Таким образом, по совокупности характеристик, включая концентрацию малых РНК, содержание микроРНК (по данным капиллярного микроэлектрофореза и результатам глубокого секвенирования) и эффективность амплификации индивидуальных микроРНК, данные наборы можно считать оптимальными для выделения микроРНК.

Набор PureLink miRNA Isolation Kit характеризовался наихудшими результатами по всем исследуемым критериям, что, по-видимому, связано с недостаточной эффективностью первого этапа выделения. Так, критически важной стадией при выделении РНК из ЭКВ представляется лизис их мембран и диссоциация РНК-белковых комплексов. Интересно, что при использовании стандартных препаратов ЭКВ (разведение везикул в фосфатно-солевом буфере) наблюдалось ещё большее падение как концентрации выделенной РНК, так и качества полученных препаратов. Однако даже в случае использования исключительно буфера производителя (BB), для чего необходимо было дополнительно получать отдельную «порцию» ЭКВ в виде сухого осадка специально для выделения РНК с отсутствием возможности оценить размер и морфологию везикул, полученные препараты показали худшие результаты для всех образцов ЭКВ по сравнению с другими наборами.

Интересно, что основанный на сходном принципе (лизирующий буфер, не содержащий фенола, и колонки с твёрдым сорбентом) набор miRNeasy_A продемонстрировал наибольший выход РНК, свидетельствующий о более результативном выделении и стабилизации РНК, но наименьшую эффективность амплификации всех четырёх исследованных микроРНК. Это может быть связано с обогащением молекулами или фрагментами молекул сходного с микроРНК размера, образовавшимися после сверхуспешного лизиса, либо с «предпочтительным» выделением микроРНК того или иного определённого нуклеотидного состава, что могло привести к снижению доли микроРНК «стандартного» состава. Такого рода феномен – влияние метода и условий выделения на состав микроРНК и типы образуемых ими комплексов с различными биомолекулами – ранее были показаны как для микроРНК, выделяемых из тканей, так и для свободно циркулирующих микроРНК [39, 43].

Также важно отметить, что согласно результатам анализа методом ОТ-ПЦР в реальном времени, все 4 микроРНК – miR-1246, miR-200b-5p, miR-200c-3p и miR-23a-3p, которые как по данным литературы [29, 30], так и

по нашим ранее опубликованным данным [10], ассоциированы с патогенезом рака яичника, оказались представлены на высоком уровне в ЭКВ, полученных из асцитической жидкости больных раком яичника.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Несмотря на активное развитие направления, связанного с использованием ЭКВ в качестве источника биомаркеров, в том числе микроРНК-маркеров, для диагностики онкозаболеваний, использование данного подхода в клинической практике на сегодняшний день лимитируется рядом проблем, важнейшие из которых связаны с отсутствием «золотых стандартов» как выделения самих ЭКВ из биологических жидкостей, так и методов анализа их молекулярного содержимого, включая методы выделения и анализа микроРНК. При этом в отличие от методов выделения свободно циркулирующих микроРНК из биологических жидкостей, сравнению методов выделения микроРНК из ЭКВ посвящены лишь единичные исследования. В данной работе мы впервые сравнили эффективность выделения микроРНК из ЭКВ, содержащихся в асцитической жидкости больных раком яичника. В исследование включены коммерческие наборы для выделения микроРНК: miRNeasy («Qiagen»), TERPIK («Thermo Fisher Scientific»), miRNeasy_A («Qiagen») и PureLink miRNA Isolation Kit («Thermo Fisher Scientific»). По совокупности оцениваемых критериев – концентрации малых РНК, концентрации микроРНК и их процентному содержанию в полученных препаратах, а также по эффективности амплификации индивидуальных микроРНК при анализе методом ОТ-ПЦР в реальном времени – оптимальными наборами можно считать TERPIK и miRNeasy.

Вклад авторов. Г.О. Скрыбин – экспериментальные исследования: получение первичных данных, статистический анализ результатов, оформление иллюстраций, написание статьи; С.В. Винокурова – дизайн экспериментов по анализу индивидуальных микроРНК; Н.В. Елкина – экспериментальные исследования: разработка праймеров для анализа микроРНК, отработка условий для метода «StemLoop RT-PCR»; Д.А. Денисова – экспериментальные исследования: анализ экзосомальных маркеров, анализ микроРНК; А.А. Беляева – экспериментальные исследования: анализ траектории движения наночастиц;

К.И. Жордания – забор клинических образцов асцитической жидкости; Д.В. Багров – экспериментальные исследования: трансмиссионная электронная микроскопия; А.Д. Еникев – экспериментальные исследования: анализ размерного распределения и концентрации микроРНК; С.А. Галецкий – экспериментальные исследования: выделение экзосом из асцитической жидкости; А.В. Комельков – биоинформационный анализ данных глубокого секвенирования; Г.И. Краснощекова – клинико-морфологическая характеристика клинических образцов; Е.М. Чевкина – дизайн исследования, анализ литературных данных, анализ полученных результатов, редактирование статьи.

Финансирование. Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда (проект № 22-15-00373).

Благодарности. Измерения методом ТЭМ выполнены на базе Центра коллективного пользования «Электронная микроскопия в науках о жизни» биологического факультета МГУ.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Соблюдение этических норм. Все процедуры, выполненные в исследовании с участием людей, соответствуют этическим стандартам институционального и/или национального комитета по исследовательской этике и Хельсинкской декларации 1964 года и её последующим изменениям или сопоставимым нормам этики. От каждого из включённых в исследование участников было получено информированное добровольное согласие.

Дополнительные материалы. Приложение к статье опубликовано на сайте журнала «Биохимия» (<https://biochemistrymoscow.com>).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Tsui, N. B., Ng, E. K., and Lo, Y. D. (2002) Stability of endogenous and added RNA in blood specimens, serum, and plasma, *Clin. Chem.*, **48**, 1647-1653, doi: 10.1093/clinchem/48.10.1647.
2. Arroyo, J. D., Chevillet, J. R., Kroh, E. M., Ruf, I. K., Pritchard, C. C., et al. (2011) Argonaute2 complexes carry a population of circulating microRNAs independent of vesicles in human plasma, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **108**, 5003-5008, doi: 10.1073/pnas.1019055108.
3. Geekiyanage, H., Rayatpisheh, S., Wohlschlegel, J. A., Brown, R., and Ambros, V. (2020) Extracellular microRNAs in human circulation are associated with miRISC complexes that are accessible to anti-AGO2 antibody and can bind target mimic oligonucleotides, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **117**, 24213-24223, doi: 10.1073/pnas.2008323117.
4. Michell, D. L., and Vickers, K. C. (2016) Lipoprotein carriers of microRNAs, *Biochim. Biophys. Acta*, **1861**, 2069-2074, doi: 10.1016/j.bbali.2016.01.011.
5. O'Brien, K., Breyne, K., Ughetto, S., Laurent, L. C., and Breakefield, X. O. (2020) RNA delivery by extracellular vesicles in mammalian cells and its applications, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, **21**, 585-606, doi: 10.1038/s41580-020-0251-y.
6. Li, C., Zhou, T., Chen, J., Li, R., Chen, H., et al. (2022) The role of exosomal miRNAs in cancer, *J. Translat. Med.*, **20**, 6, doi: 10.1186/s12967-021-03215-4.
7. Florijn, B. W., Duijs, J. M. G. J., Levels, J. H., Dallinga-Thie, G. M., Wang, Y., et al. (2019) Diabetic nephropathy alters the distribution of circulating angiogenic microRNAs among extracellular vesicles, HDL, and Ago-2, *Diabetes*, **68**, 2287-2300, doi: 10.2337/db18-1360.
8. Théry, C., Witwer, K. W., Aikawa, E., Alcaraz, M. J., Anderson, J. D., et al. (2018) Minimal information for studies of extracellular vesicles 2018 (MISEV2018): a position statement of the International Society for Extracellular Vesicles and update of the MISEV2014 guidelines, *J. Extracell. Vesicles*, **7**, 1535750, doi: 10.1080/20013078.2018.1535750.
9. Dilsiz, N. (2020) Role of exosomes and exosomal microRNAs in cancer, *Fut. Sci. OA*, **6**, FSO465, doi: 10.2144/fsoa-2019-0116.
10. Skryabin, G. O., Komelkov, A. V., Zhordania, K. I., Bagrov, D. V., Vinokurova, S. V., et al. (2022) Extracellular vesicles from uterine aspirates represent a promising source for screening markers of gynecologic cancers, *Cells*, **11**, 1064, doi: 10.3390/cells11071064.
11. Skryabin, G. O., Vinokurova, S. V., Galetsky, S. A., Elkin, D. S., Senkovenko, A. M., et al. (2022) Isolation and characterization of extracellular vesicles from gastric juice, *Cancers*, **14**, 3314, doi: 10.3390/cancers14143314.
12. Li, M., Zeringer, E., Barta, T., Schageman, J., Cheng, A., et al. (2014) Analysis of the RNA content of the exosomes derived from blood serum and urine and its potential as biomarkers, *Philos. Transact. R. Soc. B Biol. Sci.*, **369**, 20130502, doi: 10.1098/rstb.2013.0502.
13. Tosar, J. P., and Cayota, A. (2018) Detection and analysis of non-vesicular extracellular RNA, *Methods Mol. Biol.*, **1740**, 125-137, doi: 10.1007/978-1-4939-7652-2_10.
14. Yuana, Y., Levels, J., Grootemaat, A., Sturk, A., and Nieuwland, R. (2014) Co-isolation of extracellular vesicles and high-density lipoproteins using density gradient ultracentrifugation, *J. Extracell. Vesicles*, **3**, 23262, doi: 10.3402/jev.v3.23262.

15. Martínez-González, E., Brochado-Kith, Ó., Gómez-Sanz, A., Martín-Carbonero, L., Jimenez-Sousa, M. Á., et al. (2020) Comparison of methods and characterization of small RNAs from plasma extracellular vesicles of HIV/HCV coinfecting patients, *Sci. Rep.*, **10**, 11140, doi: 10.1038/s41598-020-67935-1.
16. Zhang, N., Hu, G., Myers, T. G., and Williamson, P. R. (2019) Protocols for the analysis of microRNA expression, biogenesis, and function in immune cells, *Curr. Protoc. Immunol.*, **126**, e78, doi: 10.1002/cpim.78.
17. Bryzgunova, O., Konoshenko, M., Zaporozhchenko, I., Yakovlev, A., and Laktionov, P. (2021) Isolation of cell-free miRNA from biological fluids: influencing factors and methods, *Diagnostics*, **11**, 865, doi: 10.3390/diagnostics11050865.
18. Channavajjhala, S. K., Rossato, M., Morandini, F., Castagna, A., Pizzolo, F., et al. (2014) Optimizing the purification and analysis of miRNAs from urinary exosomes, *Clin. Chem. Lab. Med.*, **52**, 345-354, doi: 10.1515/cclm-2013-0562.
19. El-Khoury, V., Pierson, S., Kaoma, T., Bernardin, F., and Berchem, G. (2016) Assessing cellular and circulating miRNA recovery: the impact of the RNA isolation method and the quantity of input material, *Sci. Rep.*, **6**, 19529, doi: 10.1038/srep19529.
20. Moldovan, L., Batte, K., Wang, Y., Wisler, J., and Piper, M. (2013) Analyzing the circulating microRNAs in exosomes/extracellular vesicles from serum or plasma by qRT-PCR, *Methods Mol. Biol.*, **1024**, 129-145, doi: 10.1007/978-1-62703-453-1_10.
21. Meerson, A., and Ploug, T. (2016) Assessment of six commercial plasma small RNA isolation kits using qRT-PCR and electrophoretic separation: higher recovery of microRNA following ultracentrifugation, *Biol. Methods Protocols*, **1**, bpw003, doi: 10.1093/biomethods/bpw003.
22. Tang, Y.-T., Huang, Y.-Y., Zheng, L., Qin, S.-H., Xu, X.-P., et al. (2017) Comparison of isolation methods of exosomes and exosomal RNA from cell culture medium and serum, *Int. J. Mol. Med.*, **40**, 834-844, doi: 10.3892/ijmm.2017.3080.
23. Eldh, M., Lötvall, J., Malmhäll, C., and Ekström, K. (2012) Importance of RNA isolation methods for analysis of exosomal RNA: Evaluation of different methods, *Mol. Immunol.*, **50**, 278-286, doi: 10.1016/j.molimm.2012.02.001.
24. Záveský, L., Jandáková, E., Weinberger, V., Minář, L., Hanzíková, V., et al. (2019) Ascites-derived extracellular microRNAs as potential biomarkers for ovarian cancer, *Reproduct. Sci.*, **26**, 510-522, doi: 10.1177/1933719118776808.
25. Schindler, P., Kupcinskas, J., Juzenas, S., Skieceviciene, J., Salteniene, V., et al. (2018) Expression of microRNAs in the ascites of patients with peritoneal carcinomatosis and peritonitis, *Cancer Cytopathol.*, **126**, 353-363, doi: 10.1002/cncy.21966.
26. Théry, C., Amigorena, S., Raposo, G., and Clayton, A. (2006) Isolation and characterization of exosomes from cell culture supernatants and biological fluids, *Curr. Protoc. Cell Biol.*, **3**, 3.22.1-3.22.29, doi: 10.1002/0471143030.cb0322s30.
27. Skryabin, G. O., Komelkov, A. V., Galetsky, S. A., Bagrov, D. V., Evtushenko, E. G., et al. (2021) Stomatin is highly expressed in exosomes of different origin and is a promising candidate as an exosomal marker, *J. Cell. Biochem.*, **122**, 100-115, doi: 10.1002/jcb.29834.
28. Chen, C., Ridzon, D. A., Broomer, A. J., Zhou, Z., Lee, D. H., Nguyen, J. T., et al. (2005) Real-time quantification of microRNAs by stem-loop RT-PCR, *Nucleic Acids Res.*, **33**, e179, doi: 10.1093/nar/gni178.
29. Xu, Y. F., Hannafon, B. N., Khatri, U., Gin, A., and Ding, W. Q. (2019) The origin of exosomal miR-1246 in human cancer cells, *RNA Biol.*, **16**, 770-784, doi: 10.1080/15476286.2019.1585738.
30. Savolainen, K., Scaravilli, M., Ilvesmäki, A., Staff, S., Tolonen, T., et al. (2020) Expression of the miR-200 family in tumor tissue, plasma and urine of epithelial ovarian cancer patients in comparison to benign counterparts, *BMC Res. Notes*, **13**, 311, doi: 10.1186/s13104-020-05155-6.
31. Laurent, L. C., Abdel-Mageed, A. B., Adelson, P. D., Arango, J., Balaj, L., et al. (2015) Meeting report: discussions and preliminary findings on extracellular RNA measurement methods from laboratories in the NIH extracellular RNA communication consortium, *J. Extracell. Vesicles*, **4**, 26533, doi: 10.3402/jev.v4.26533.
32. Fernando, M. R., Jiang, C., Krzyzanowski, G. D., and Ryan, W. L. (2017) New evidence that a large proportion of human blood plasma cell-free DNA is localized in exosomes, *PLoS One*, **12**, e0183915, doi: 10.1371/journal.pone.0183915.
33. Gallo, A., Tandon, M., Alevizos, I., and Illei, G. G. (2012) The Majority of microRNAs detectable in serum and saliva is concentrated in exosomes, *PLoS One*, **7**, e30679, doi: 10.1371/journal.pone.0030679.
34. Van Niel, G., D'Angelo, G., and Raposo, G. (2018) Shedding light on the cell biology of extracellular vesicles, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, **19**, 213-228, doi: 10.1038/nrm.2017.125.
35. Record, M., Carayon, K., Poirot, M., and Silvente-Poirot, S. (2014) Exosomes as new vesicular lipid transporters involved in cell-cell communication and various pathophysiological, *Biochim. Biophys. Acta*, **1841**, 108-120, doi: 10.1016/j.bbalip.2013.10.004.
36. Skryabin, G. O., Komelkov, A. V., Savelyeva, E. E., and Tchekvina, E. M. (2020) Lipid rafts in exosome biogenesis, *Biochemistry (Moscow)*, **85**, 177-191, doi: 10.1134/S0006297920020054.
37. Frey, B., and Gaipl, U. S. (2011) The immune functions of phosphatidylserine in membranes of dying cells and microvesicles, *Semin. Immunopathol.*, **33**, 497-516, doi: 10.1007/s00281-010-0228-6.
38. Kastelowitz, N., and Yin, H. (2014) Exosomes and microvesicles: identification and targeting by particle

- size and lipid chemical probes, *ChemBioChem*, **15**, 923-928, doi: 10.1002/cbic.201400043.
39. Monleau, M., Bonnel, S., Gostan, T., Blanchard, D., Cournaud, V., et al. (2014) Comparison of different extraction techniques to profile microRNAs from human sera and peripheral blood mononuclear cells, *BMC Genomics*, **15**, 395, doi: 10.1186/1471-2164-15-395.
40. Yuana, Y., Koning, R. I., Kuil, M. E., Rensen, P. C. N., Koster, A. J., et al. (2013) Cryo-electron microscopy of extracellular vesicles in fresh plasma, *J. Extracell. Vesicles*, **2**, 21494, doi: 10.3402/jev.v2i0.21494.
41. Zabeo, D., Cvjetkovic, A., Lässer, C., Schorb, M., Lötvald, J., et al. (2017) Exosomes purified from a single cell type have diverse morphology, *J. Extracell. Vesicles*, **6**, 1329476, doi: 10.1080/20013078.2017.1329476.
42. Kim, Y.-K., Yeo, J., Kim, B., Ha, M., and Kim, V. N. (2012) Short structured RNAs with low GC content are selectively lost during extraction from a small number of cells, *Mol. Cell*, **46**, 893-895, doi: 10.1016/j.molcel.2012.05.036.
43. Brown, R. A. M., Epis, M. R., Horsham, J. L., Kabir, T. D., Richardson, K. L., et al. (2018) Total RNA extraction from tissues for microRNA and target gene expression analysis: not all kits are created equal, *BMC Biotechnol.*, **18**, 16, doi: 10.1186/s12896-018-0421-6.

COMPARISON OF METHODS FOR MICRORNA ISOLATION FROM EXTRACELLULAR VESICLES OBTAINED FROM ASCITIC FLUIDS

G. O. Skryabin¹, S. V. Vinokurova¹, N. V. Elkina¹, D. A. Denisova¹, A. A. Beliaeva^{1,2}, K. I. Zhordania³, D. V. Bagrov², A. D. Enikeev¹, S. A. Galetsky¹, A. V. Komelkov^{1*}, G. I. Krasnoshekhova³, and E. M. Tchevkina¹

¹ Institute of Carcinogenesis, Blokhin National Medical Research Center of Oncology, 115478 Moscow, Russia; e-mail: komelkov@gmail.ru

² Faculty of Biology, Lomonosov Moscow State University, 111234 Moscow, Russia

³ Institute of Clinical Oncology, Blokhin National Medical Research Center of Oncology, 115478 Moscow, Russia

Secreted extracellular vesicles (EVs) contain active biomolecules, including miRNAs, the composition of which represents epigenetic changes occurring in cells during pathological processes, in particular, malignant transformation. The accumulated pool of data on the role of EVs in carcinogenesis has stimulated the study of EV-derived cancer markers. The most important factors limiting the development of this scientific direction are the lack of “gold standards” both for methods of EV isolating from biological fluids and for analyzing their molecular content, including the composition of miRNAs. Here we first examined the efficacy of various methods for small RNA isolation from EVs contained in ascitic fluid for subsequent miRNA analysis. Comparison of different commercial kits showed the advantages of methods based on phenol-chloroform extraction: Total Exosome RNA & Protein Isolation Kit and miRNeasy Serum/Plasma Kit. Analysis of the small RNA transcriptome showed the presence of various classes of molecules in EVs, among which the proportion of miRNAs averaged 6%, reaching 10% with the Total Exosome RNA & Protein Isolation Kit. The PureLink miRNA Isolation Kit demonstrated the lowest efficiency. The miRNeasy Advanced Serum/Plasma Kit showed the highest concentration of the small RNA fraction, miRNA proportion of which, however, did not exceed that of the miRNeasy Serum/Plasma Kit and Total Exosome RNA & Protein Isolation Kit. Moreover, RT-PCR analysis of individual molecules showed lower levels of each of miRNAs investigated — miR-1246, miR-200b-5p, miR-200c-3p, and miR-23a-3p — when using the miRNeasy Advanced Serum/Plasma Kit. In sum, Total Exosome RNA & Protein Isolation Kit and miRNeasy Serum/Plasma Kit can be considered to be the optimal kits in terms of the combination of studied characteristics, including small RNA concentration, percentage of microRNA according to bioanalyzer and sequencing results, and levels of individual miRNAs detected by RT-PCR.

Keywords: exosomes, miRNA, isolation methods, extracellular vesicles, miRNeasy Serum/Plasma Kit, Total Exosome RNA & Protein Isolation Kit, PureLink miRNA Isolation Kit, miRNeasy Advanced Serum/Plasma Kit

УДК 57.016

ГИБРИДНЫЕ ИМПЛАНТАТЫ НА ОСНОВЕ КАЛЬЦИЙ-МАГНИЕВОЙ СИЛИКАТНОЙ КЕРАМИКИ ДИОПСИДА В КАЧЕСТВЕ НОСИТЕЛЯ РЕКОМБИНАНТНОГО ВМР-2 И ДЕМИНЕРАЛИЗОВАННОГО КОСТНОГО МАТРИКСА В КАЧЕСТВЕ КАРКАСА: ДИНАМИКА РЕПАРАТИВНОГО ОСТЕОГЕНЕЗА НА МОДЕЛИ КРАНИОТОМИИ У МЫШЕЙ

© 2022 А.С. Карягина^{1,2,3*}, П.А. Орлова¹, М.С. Попонова¹, И.Н. Бульгина^{1,4}, Р. Чоудхари^{5,6}, А.В. Жулина¹, Т.М. Грунина^{1,3}, К.Е. Никитин¹, Н.В. Струкова¹, М.С. Генералова¹, А.В. Рязанова¹, П.А. Ковалёва⁴, А.И. Зими́на⁴, Е.М. Лукинова⁴, Е.Д. Плахотнюк⁴, М.А. Кирсанова⁷, Е.А. Колесников⁴, Е.В. Захарова⁴, В.Н. Манских², Ф.С. Сенатов^{1,4}, А.В. Громов^{1*}

¹ Национальный исследовательский центр эпидемиологии и микробиологии им. Н.Ф. Гамалеи Минздрава России, 123098 Москва, Россия; электронная почта: akaryagina@gmail.com, alexander.v.gromov@gmail.com

² НИИ физико-химической биологии им. А.Н. Белозерского, Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, 119992 Москва, Россия

³ Всероссийский научно-исследовательский институт сельскохозяйственной биотехнологии, 127550 Москва, Россия

⁴ Национальный исследовательский технологический университет «МИСиС», 119049 Москва, Россия

⁵ Рижский технический университет, LV-1007 Рига, Латвия

⁶ Балтийский центр передового опыта в области биоматериалов, штаб-квартира в Рижском техническом университете, LV-1048 Рига, Латвия

⁷ Сколковский институт науки и технологий, 121205 Москва, Россия

Поступила в редакцию 05.07.2022

После доработки 30.08.2022

Принята к публикации 09.09.2022

Кальций-магниева силикатная керамика диопсид является перспективным материалом для использования в костной пластике, однако до сих пор возможность его применения в качестве носителя рекомбинантного костного морфогенетического белка-2 (ВМР-2) не была исследована, как и особенности репаративного остеогенеза с использованием материалов на основе диопсида с ВМР-2. Порошок кальций-магниево-силикатной керамики был получен твердофазным методом с использованием в качестве исходных компонентов биоотходов – рисовой шелухи и яичной скорлупы. Основная фаза полученной керамики представляла собой диопсид. Частицы имели неправильную форму со средним размером около 2,3 мкм и ~20% объёмной пористостью со средним размером пор около 24 нм, что позволяет классифицировать материал как мезопористый. 1 мг частиц диопсида сорбирует более 150 мкг рекомбинантного ВМР-2, что превышает сорбционную ёмкость гидроксилалюмината, кальций-фосфатной керамики, часто используемой в составе гибридных имплантатов, более чем в 3 раза. Кинетика выхода ВМР-2 *in vitro* характеризуется взрывным выходом в первые 2 суток и постепенным выходом примерно по 0,4–0,5% от нанесённого белка в последующие 7 суток. Эксперименты *in vivo* проводили на мышинной модели краниальных дефектов критического размера с имплантацией суспензии порошка диопсида с/без ВМР-2 в гиалуроновой кислоте, введённой в диски из деминерализованного костного матрикса (ДКМ), обладающего 73–90% объёмной пористостью с размером макропор от 50 до 650 мкм. Гистологически исследована динамика процессов неоостеогенеза и ремоделирования костной ткани на сроках 12, 21, 48 и 63 дня. Частицы диопсида равномерно распределяются в матрице и вызывают минимальную реакцию на введение инородного тела. При наличии ВМР-2 к 63 суткам в порах имплантата образуются значительные фокусы новообразованной костной ткани с очагами костного мозга и вовлечением в ремоделирование областей ДКМ в центре имплантата и материнской кости по краям. Диопсид может рассматриваться как перспективный материал для введения в гибридные имплантаты в качестве эффективного носителя ВМР-2.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: диопсид, кальций-магниева силикатная керамика, имплантат, ВМР-2, деминерализованный костный матрикс, краниальные дефекты, регенерация костной ткани.

DOI: 10.31857/S0320972522110136, EDN: LWWPOZ

* Адресат для корреспонденции.

ВВЕДЕНИЕ

Дефекты костной ткани, зачастую очень обширные, могут образовываться как следствие травм или операций, связанных с удалением злокачественных новообразований или участков кости, поражённых остеомиелитом [1]. Для восстановления функциональности костной ткани требуется заполнение дефектов остеопластическими материалами, выполняющими, с одной стороны, каркасную функцию, а с другой – обладающими остеоиндуктивными свойствами. Золотым стандартом материалов для заполнения дефектов костной ткани до сих пор считается аутогенная костная ткань. Однако объем аутогенной кости ограничен, а забор костного материала связан с дополнительным травмированием пациента [2]. Хорошей альтернативой аутогенной трансплантации может быть ксеногенный деминерализованный костный матрикс (ДКМ), получаемый из костей крупного рогатого скота [3], а также гибридные имплантаты на его основе [4, 5]. Этот материал обладает высокой остеокондуктивностью, может быть наработан в значительных количествах, ему легко придать требуемую форму, он может выполнять каркасную функцию и использоваться для замещения дефектов несущих нагрузку костей; возможно получение низкоиммуногенного ДКМ со сниженным содержанием неколлагеновых белков с целью минимизировать нежелательные эффекты при имплантации [6, 7]. При этом недостатком высокоочищенного ДКМ является его ограниченная остеоиндуктивность, которая может быть преодолена за счёт совместного применения ДКМ с рекомбинантным костным морфогенетическим белком 2 (bone morphogenetic protein-2, BMP-2) [6, 8], который может быть введён как непосредственно в ДКМ, так и с помощью других компонентов гибридных имплантатов.

BMP-2 – основной фактор роста и регенерации костной ткани, введение которого в область дефекта кости способно индуцировать неоостеогенез [9]. Для успешного использования BMP-2 в качестве остеоиндуктора крайне важным является выбор носителя, обеспечивающего постепенное высвобождение белка. В США и Европе для спондилодеза при травмах позвоночника, хирургического лечения травм большеберцовой кости и реконструктивной хирургии верхнечелюстной пазухи одобрено применение препарата INFUSE Bone

Graft Kit («Medtronic», США), продаваемого в Европе под названием InductOS Kit («Wyeth», США), в котором в качестве носителя используется коллагеновая губка [10, 11]. Использование значительных количеств рекомбинантного BMP-2, в тысячи раз превышающих физиологические концентрации (в зависимости от размера дефекта имплантат содержит от 1 до 12 мг белка), в ряде случаев может приводить к тяжёлым последствиям для пациентов, выражающихся в эктопическом остеогенезе, резорбции кости в месте имплантации и др. [12, 13]. Кроме того, следует отметить очень высокую стоимость INFUSE Bone Graft Kit и InductOS Kit, ограничивающую возможность их применения в Российской Федерации. Она, в свою очередь, определяется высокой стоимостью входящего в состав препаратов рекомбинантного BMP-2, нарабатываемого в эукариотических клетках. В настоящее время разработана технология получения рекомбинантного BMP-2 с помощью микробиологического синтеза в клетках *Escherichia coli*, обеспечивающего значительно больший выход белка по сравнению с эукариотическими продуцентами, что приводит к существенному снижению стоимости препаратов белка. При этом активность *in vitro* препаратов BMP-2, получаемых на основе *E. coli*, и эффективность их применения *in vivo* в сочетании с различными носителями для репарации дефектов костной ткани не уступают таковым для препаратов эукариотического BMP-2 [14–29]. В Республике Корея для применения в ортопедии и стоматологии компаниями «Cowellmedi Co.» (Пусан, Корея) и «CGBIO Inc.» (Соннам, Корея) производятся препараты на основе рекомбинантного BMP-2 прокариотического происхождения, в которых в качестве носителя белка используются β-трикальций фосфат/гидроксилапатит (β-ТКФ/ГАП) и гидроксилапатит соответственно [28, 29]. При этом следует отметить, что гидроксилапатит характеризуется наименьшей растворимостью, коррелирующей со скоростью резорбции в организме и кинетикой выхода иммобилизованного BMP-2, среди используемых для регенерации костной ткани кальций-фосфатных керамик [30]. Использование бифазной β-ТКФ/ГАП кальций-фосфатной керамики должно способствовать улучшению характеристик носителя [31]. Однако, несмотря на широкое применение, оба носителя имеют ряд ограничений, в частности, с точки зрения биомиметических свойств и ёмкости в отношении

Принятые сокращения: ГАП – гидроксилапатит; ГК – гиалуроновая кислота; ДКМ – деминерализованный костный матрикс; ДТТ – дитиотрейтол; BMP-2 – bone morphogenetic protein-2 (костный морфогенетический белок-2).

белка [32], и поиск новых эффективных носителей рекомбинантного BMP-2 по-прежнему является одной из ключевых задач современной регенеративной медицины.

Относительно новым материалом, с точки зрения использования в регенеративной медицине, является кальций-магниево-силикатная керамика диопсид ($\text{CaMgSi}_2\text{O}_6$), характеризующаяся хорошей биоактивностью, биосовместимостью и лучшими механическими свойствами, чем ГАП [33]. Исследование биоминерализации показало, что при инкубации диопсида в SBF (simulated body fluid, раствор, имитирующий внеклеточную жидкость организма) и при имплантации биоминерализация протекает достаточно быстро: за несколько часов поверхность диопсида покрывается слоем апатита [34], основного минерального компонента кости, что и является причиной высокой биосовместимости. Кроме того, при введении в организм диопсид может высвобождать ионы Ca^{2+} , Mg^{2+} и SiO_3^{2-} , которые усиливают пролиферацию остеобластов [35–37], таким образом обеспечивая определённый уровень остеоиндуктивности самого носителя. Это делает диопсид потенциально перспективным в качестве замены кальций-фосфатной керамики, такой как ГАП или ТКФ, часто используемой для восстановления костных дефектов. Однако до сих пор способность диопсида выступать в качестве носителя BMP-2 и его остеоиндуктивность в такой комбинации не исследовались.

Целью данной работы была характеристика фазового состава, морфологии и пористости порошка силикатной керамики, синтезированной твердофазным методом из материалов природного происхождения, оценка пористости ксеногенного ДКМ, используемого в качестве материала, обеспечивающего каркасную функцию и одновременно способного участвовать в ремоделировании костной ткани при имплантации, исследование способности частиц диопсида выступать в качестве носителя фактора роста костной ткани BMP-2, изучение кинетики выхода BMP-2 из порошка диопсида, исследование динамики репаративного остеогенеза при имплантации в краниальные дефекты мышей гибридных имплантатов, включающих диопсид в качестве носителя BMP-2 и ДКМ в качестве каркаса.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Твердофазный синтез диопсида. Диопсид ($\text{CaMgSi}_2\text{O}_6$) был синтезирован твердофазным методом при использовании ранее опублико-

ванного протокола [38] с некоторыми модификациями, основная из которых заключалась в использовании шаровой мельницы для смешивания прекурсора. В качестве источников кальция и кремния использовали, соответственно, яичную скорлупу и рисовую шелуху. Кратко, бытовую яичную скорлупу промывали под проточной водой, а затем кипятили при 100°C в течение 3 ч при постоянном перемешивании. Очищенную яичную скорлупу сушили в течение 24 ч в сушильном шкафу при температуре 150°C , а затем измельчали вручную до образования тонкодисперсного порошка. Рисовую шелуху, предоставленную местным поставщиком («BeerMachines», Россия), промывали дистиллированной водой. Органические компоненты удаляли погружением в серную кислоту различных концентраций. Обработанную кислотой рисовую шелуху промывали, сушили при 110°C и нагревали до 730°C , при этой температуре выдерживали 25 мин до образования белого порошка. Измельчённую яичную скорлупу, порошок диоксида кремния, извлечённый из рисовой шелухи, и синтетический оксид магния («Русхим», Россия) брали в соотношении 1 : 2 : 1 и смешивали в планетарной шаровой мельнице Fritsch Pulverisette 5 («Fritsch GmbH», Германия). Полученную смесь выдерживали при температуре 1100°C в течение 6 ч для получения диопсида. Рентгенофазный анализ образцов полученной керамики проводили на дифрактометре Дифрей-401 («Научные приборы», Россия) (CrK α -излучение, $\lambda = 2,29106 \text{ \AA}$). Изображения тёмного поля в режиме сканирующей просвечивающей электронной микроскопии (СПЭМ) получали на просвечивающем электронном микроскопе Titan Themis Z («Thermo Fisher Scientific», США) при ускоряющем напряжении 200 кВ. Оценку размера, морфологии и пористости частиц диопсида проводили с использованием программного обеспечения ImageJ.

Получение ДКМ. ДКМ получали из диафиза бедренной кости крупного рогатого скота, как описано ранее [5], с некоторыми модификациями для удаления неколлагеновых белков [4]. Для оценки объёмной пористости изготавливали образцы ДКМ размером примерно $6 \times 6 \times 6 \text{ мм}$, для оценки эффективности связывания BMP-2 использовали крошку размером 1–2 мм, которую получали фракционированием с помощью грохота Retsch SM-200 («Retsch GmbH», Германия), для имплантации в краниальные дефекты использовали диски толщиной $1,0 \pm 0,1 \text{ мм}$ и диаметром $4,0 \pm 0,1 \text{ мм}$, которые вырезали из костных пластин с помощью пробойника собственного изготовления.

Оценку размера пор образцов ДКМ проводили с помощью анализа изображений, полученных с использованием сканирующего электронного микроскопа (СЭМ) Tescan Vega 3 («TESCAN», Чехия), в программе ImageJ. Оценку объёмной пористости образцов ДКМ проводили тремя различными способами: при оценке по микрофотографиям, полученным методом СЭМ, и двумя способами с помощью гидростатического взвешивания (детальные протоколы приводятся в Приложении).

Оценка эффективности связывания BMP-2 с диопсидом, ГАП и ДКМ. Рекомбинантный BMP-2 нарабатывали в клетках *E. coli* и очищали, как описано ранее [18]. Удельная активность белка составляла 0,1 Ед./мкг. Для иммобилизации BMP-2 10 мг порошка диопсида, наноразмерного ГАП (85-УД, «Полистом», Россия) или крошки ДКМ (0,5–1 мм) инкубировали в 200 мкл раствора, содержащего 10 мМ натрий-фосфатный буфер (рН 5,5) с 50 мМ NaCl, при встряхивании на орбитальном шейкере S-3 («Elmi Ltd.», Латвия) при 10 об./мин и угле платформы 5° в течение 30 мин, далее проводили центрифугирование в течение 10 мин при 9000 g. Затем раствор удаляли, добавляли 100 мкл того же раствора с различными концентрациями BMP-2 и инкубацию в тех же условиях продолжали в течение 2 ч. После центрифугирования надосадочную жидкость, содержащую несвязавшийся белок, отбирали, а оставшийся осадок трижды промывали 1 мл того же буфера в течение 20 мин. К промытому порошку диопсида добавляли 100 мкл того же раствора и осторожно перемешивали. 10 мкл суспензии порошка диопсида и 10 мкл раствора с несвязавшимся белком переносили в пробирки Эппендорф объёмом 1,5 мл и добавляли по 50 мкл буфера для образцов с дитиотрейтолом (ДТТ) для электрофореза по Лэммли. Пробирки инкубировали при 95 °С в течение 15 мин, центрифугировали 5 мин при 9000 g, после чего по 10 мкл супернатанта вносили в лунки геля и проводили электрофорез с последующей окраской бромфеноловым синим.

Исследование кинетики выхода BMP-2 из диопсида, ГАП и ДКМ *in vitro*. В три пробирки Эппендорф объёмом 1,5 мл с крышками помещали по 3 мг порошка диопсида или ГАП с нанесёнными на них 30 мкг BMP-2. В пробирки добавляли по 1 мл фосфатно-солевого буфера (PBS), содержащего 1% (*m/v*) БСА и 0,02% (*m/v*) азида натрия. Пробы инкубировали при комнатной температуре на круговой качалке при 300 об./мин. Через 1, 5, 24, 48, 72, 168 и 220 ч пробирки центрифугировали при 1900 g, надосадочную жидкость отбирали, добавляли 1 мл

свежего буфера того же состава и продолжали инкубирование. Отобранные пробы замораживали и хранили на –80 °С до измерения концентрации белка с помощью ИФА по разработанному ранее протоколу [26]. Аналогичным образом исследовали кинетику выхода BMP-2 из ДКМ, используя в качестве носителя диски диаметром 4,0 ± 0,1 мм, толщиной 1,0 ± 0,1 мм, масса диска 1,5 ± 0,5 мг. На каждый из трёх дисков наносили по 15 мкг BMP-2 по методу, описанному в работе Bartov et al. [4].

Подготовка имплантатов, содержащих и не содержащих BMP-2, для введения в краниальные дефекты мышей. Для приготовления 2%-ного (*m/v*) раствора сухой порошок стерильной гиалуриновой кислоты (ГК, ~100 кДа, «Shanghai Macklin Biochemical Industry Co., Ltd.», Шанхай, Китай) добавляли в стерильный физиологический раствор до конечной концентрации 2%, осторожно перемешивали и оставляли для растворения на ночь в орбитальном шейкере («Elmi Ltd.») при 10 об./мин. Затем 50 мг порошка диопсида (с 10 мкг/мг BMP-2 или без него) в 250 мкл стерильного физиологического раствора добавляли к 750 мкл 2%-ной ГК в физиологическом растворе и тщательно перемешивали до получения однородной массы с помощью стерильного шприца. Диски ДКМ (диаметр 4,0 ± 0,1 мм, толщина 1,0 ± 0,1 мм) выдерживали в 96%-ном спирте 1 ч, отмывали стерильным PBS и высушивали в ламинарном шкафу с ультрафиолетом в течение ночи. Непосредственно перед имплантацией диски погружали в предварительно ещё раз перемешанную 5%-ную (*m/v*) суспензию порошка диопсида в ГК. Один диск (объёмом около 12,5 мм³) впитывал около 7 мкл суспензии и, таким образом, содержал около 0,35 мг диопсида и 3,5 мкг BMP-2.

Имплантация в краниальные дефекты критического размера у мышей дисков из ДКМ с суспензией порошка диопсида, содержащего или не содержащего BMP-2, и дисков из ДКМ с/без BMP-2, нанесённым из раствора. Эксперимент проводили на 60 самцах аутбредных мышей линии ICR (CD-1) возраста 38–47 дней. Животных случайным образом делили на 2 группы по 30 мышей в каждой. В группе 1 в дефект имплантировали диски из ДКМ с суспензией порошка диопсида, не содержащего BMP-2, в группе 2 – диски с суспензией порошка, содержащего BMP-2, около 3,5 мкг на диск. На 12, 21, 42 и 63 сутки животным проводили эвтаназию углекислым газом, по 6 голов из каждой группы. Также провели имплантацию двум контрольным группам мышей, в каждой по 6 животных. Одной группе вводили диски из

ДКМ, другой – диски из ДКМ с нанесённым на них ВМР-2 в количестве 3,5 мкг на диск по методике, описанной выше. Животным этих двух групп проводили эвтаназию на 42 сутки. Образцы тканей, включающие область имплантации и окружающие кости черепа, фиксировали формалином, декальцинировали, проводили через батарею спиртов возрастающей концентрации и заливали в парафин, затем готовили срезы толщиной 3 мкм во фронтальной плоскости и окрашивали гематоксилином и эозином. Срезы толщиной 6 мкм, полученные от животных двух опытных групп, окрашивали пикро-полихромом по Хировичи [39] для выявления степени созревания коллагена в регенерате. Гистоморфометрию проводили с использованием Adobe Photoshop по методу Egan et al. [40] с модификациями с определением доли новообразованной и ремоделированной костной ткани, доли костного мозга, доли соединительной ткани и доли носителя (ДКМ) по отношению к общей площади тканей в образце.

Статистические расчёты проводились с использованием пакета программ Statistica 12.0 («Statsoft», США). Для количественных оценок данные были представлены в виде среднего \pm стандартное отклонение (SD). В случае гистоморфометрии данные представляли в виде среднего, рассчитывалась стандартная ошибка среднего и стандартное отклонение. Проверку на нормальность проводили с помощью теста Колмогорова–Смирнова. Для оценки достоверности отличий проводили дисперсионный анализ с последующей пост-обработкой с применением критерия Ньюмена–Кейлса. Различия считались значимыми при $p < 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

Характеристика порошка диопсида. Наличие фазы диопсида было подтверждено рентгенофазовым анализом (рис. 1). Рентгенограмма демонстрирует наличие характерных пиков диопсида, являющегося основной фазой, в то время как акерманит ($\text{Ca}_2\text{MgSi}_2\text{O}_7$) наблюдался в качестве вторичной фазы. Появление акерманита, обычно наблюдающееся при синтезе диопсида, связано с наличием нестехиометрических участков, богатых кальцием, в образце после кальцинации, что и приводит к образованию вторичной фазы [35]. Рентгенограмма полученного диопсида соответствовала стандартной карточке ICDD № 01-075-1092.

Изображения СПЭМ на рис. 2 дают представление о морфологии частиц полученного порошка, средний размер которых соста-

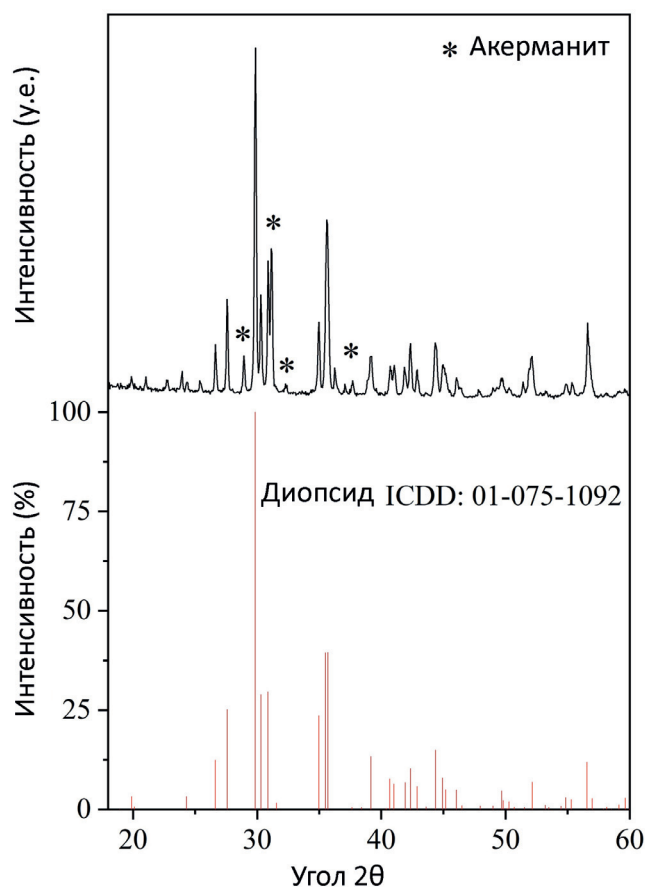


Рис. 1. Рентгенограмма порошка диопсида. Звёздочками обозначены пики, соответствующие вторичной фазе — акерманиту

вил 2,3 мкм с минимальным и максимальным значениями 0,11 мкм и 8,66 мкм соответственно. Объёмная пористость образца составляла примерно 20% со средним размером пор около 24 нм. Соответственно, материал можно классифицировать как мезопористый, то есть имеющий размер пор от 2 до 50 нм [41].

Характеристика образцов ДКМ. Оценка размера пор в образцах проводилась по микрофотографиям, полученным методом СЭМ. Размер пор в образцах ДКМ имеет разброс по среднему от 300 до 450 мкм с максимальным разбросом от 50 до 650 мкм (Таблица S1 в Приложении). Пористость, измеренная по микрофотографиям, имеет разброс от 50 до 70%, а измеренная двумя способами на основе гидростатического взвешивания очень близка по значениям для каждого из образцов и имеет разброс от 73 до 90% (Таблица S1 в Приложении). Поскольку поры ДКМ во много раз превышают размер частиц диопсида, и ДКМ является очень высокопористым материалом, он представляет собой хороший каркас для имплантации суспензии порошка диопсида. Фотография диска ДКМ, аналогичного используемому в экспериментах

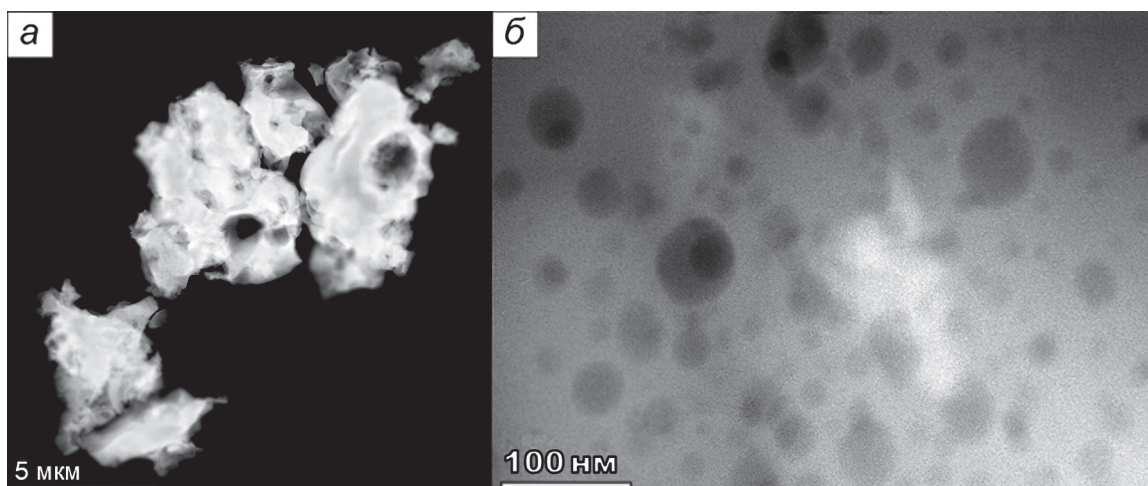


Рис. 2. Темнопольные СПЭМ-изображения порошка диопсида. Слева – обзорное изображение отдельных частиц (а), справа – изображение пор на поверхности частицы (б)

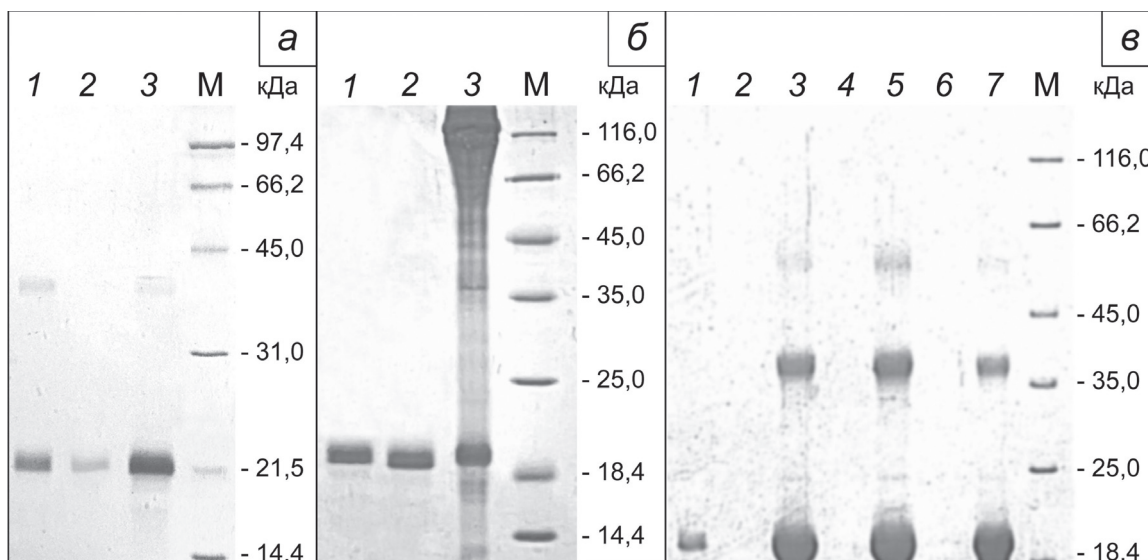


Рис. 3. Электрофореграммы разделения в ПААГ проб, полученных при оценке эффективности связывания ВМР-2 с ГАП (а), ДКМ (б) и диопсидом (в). а – Связывание 500 мкг ВМР-2 с 10 мг ГАП. 1 – ВМР-2, используемый для связывания; 2 – несвязавшийся белок; 3 – связавшийся белок, снятый прогреванием в буфере для электрофореза с ДТТ; М – маркер молекулярной массы 14–97 кДа («Bio-Rad», США). б – Связывание 500 мкг ВМР-2 с 10 мг ДКМ. 1 – ВМР-2, используемый для связывания; 2 – несвязавшийся белок; 3 – связавшийся белок, снятый прогреванием в буфере для электрофореза с ДТТ; М – маркер молекулярной массы 14–116 кДа («Bio-Rad»). в – Связывание 500, 1000 и 1500 мкг ВМР-2 (треки 2–3, 4–5 и 6–7 соответственно) с 10 мг диопсида. 1 – ВМР-2, используемый для связывания; 2, 4, 6 – несвязавшийся белок; 3, 5, 7 – связавшийся белок, снятый прогреванием в буфере для электрофореза с ДТТ; М – маркер молекулярной массы 14–116 кДа («Bio-Rad»)

по кинетике выхода ВМР-2 и в экспериментах *in vivo*, приведена на рис. S1 Приложения.

Эффективность связывания ВМР-2 диопсидом, ГАП и ДКМ. Для оценки эффективности связывания навески порошка диопсида по 10 мг инкубировали с 500, 1000 и 1500 мкг ВМР-2, отмывали и анализировали пробы с несвязавшимся и связавшимся белком электрофорезом по Лэммли. Для сравнения оценили также способность 10 мг наноразмерного ГАП и 10 мг частиц ДКМ размером 1–2 мкм связать 500 мкг ВМР-2 в тех же условиях. Резуль-

таты, представленные на рис. 3, показывают, что ГАП и ДКМ в используемых условиях связывают ВМР-2 в количестве менее 50 мкг/мг, а диопсид – в количестве более 150 мкг/мг носителя, причём минимальной ёмкостью обладает крошка из ДКМ. Связанный с носителями ВМР-2 снимали прогреванием при 95 °С в буфере для нанесения на ПААГ с ДТТ. При этом из частиц ДКМ, помимо ВМР-2, частично выходил коллаген, что приводило к появлению массивной размазанной по треку полосы в области высоких молекулярных масс. Полу-

ченные данные свидетельствуют о высокой сорбционной ёмкости диопсида, синтезированного твердофазным методом, по отношению к BMP-2.

Кинетика выхода BMP-2 из диопсида, ГАП и ДКМ *in vitro*. Кинетику выхода из порошка диопсида оценивали также в сравнении с выходом из ГАП и ДКМ. При исследовании кинетики выхода *in vitro* носители содержали BMP-2 в количестве 10 мкг/мг. Сравнение кривых кумулятивного выхода (рис. 4) показывает, что для всех трёх носителей за первые 9 суток в используемых условиях выходит от 12 (в случае ГАП) до 19 (в случае ДКМ) % от нанесённого белка с первоначальным бурным выходом в течение 1–2 суток. При этом в случае диопсида, начиная со вторых суток, отмечается постоянный выход белка примерно по 0,4–0,5% в сутки. В случае ГАП и ДКМ кривые существенно более пологие, что говорит о меньшем выходе

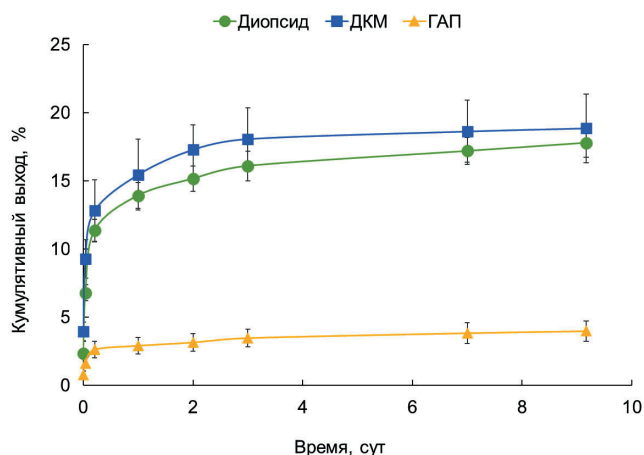


Рис. 4. Кумулятивный выход BMP-2 из ДКМ, ГАП и диопсида. Точки на кривых и верхняя и нижняя планки погрешностей соответствуют среднему значению и стандартному отклонению соответственно. Все измерения проводились в трёх повторностях. Средние значения для ДКМ обозначены квадратами, для ГАП — треугольниками, для диопсида — окружностями

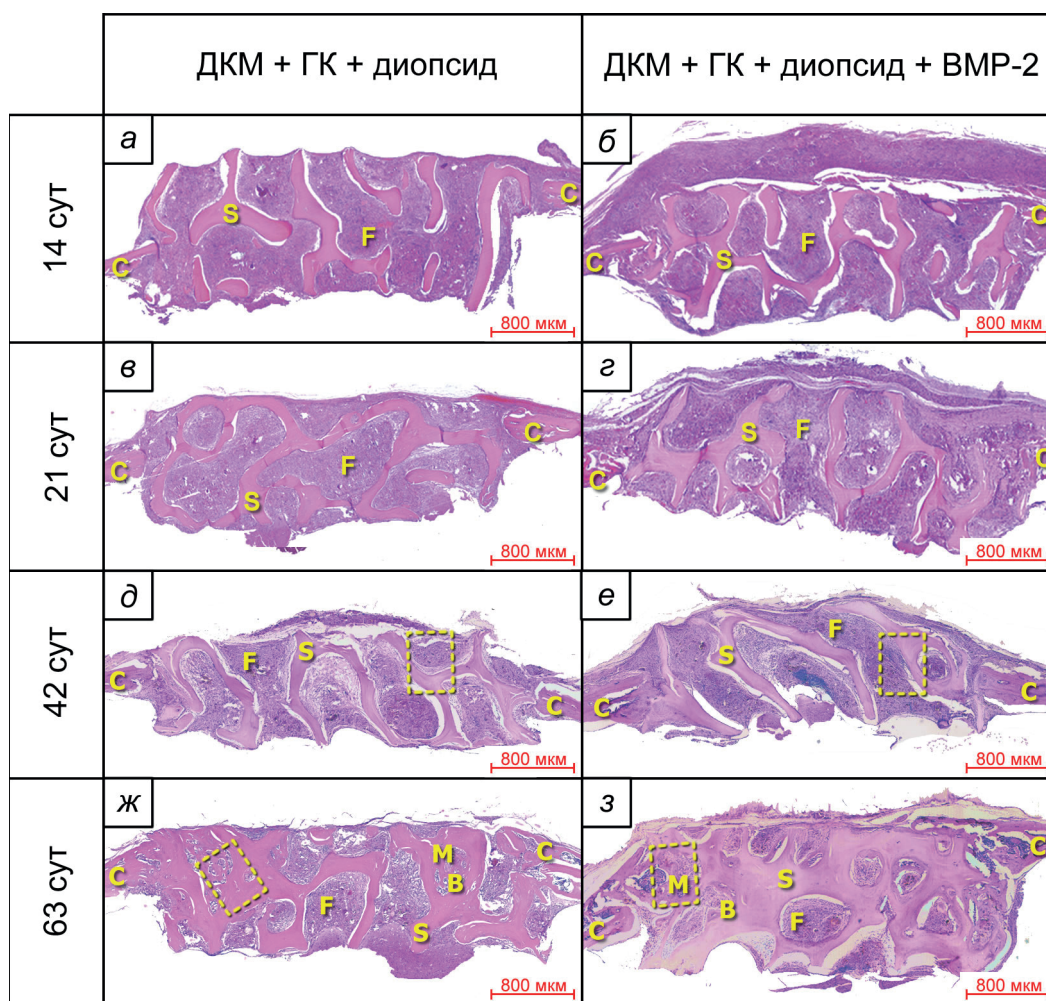


Рис. 5. Результаты гистологического анализа на сроках 12, 21, 42 и 63 суток на модели краниальных дефектов критического размера у мышей после имплантации дисков ДКМ с диопсидом и ГК с/без добавления рекомбинантного BMP-2 (3,5 мкг/имплантат). С — кость черепа, В — новообразованная костная ткань, М — костный мозг, F — фиброзная ткань, S — каркас (скаффолд). Жёлтыми пунктирными линиями выделены области, представленные в увеличенном виде на рис. 8. Подробные гистологические описания приведены в тексте Приложения

белка, начиная со вторых суток, по сравнению с диопсидом. Из ДКМ в течение первых 2 суток выходит такой же процент белка, как из диопсида за 9 суток.

Имплантация в краниальные дефекты критического размера у мышей дисков из ДКМ с суспензией порошка диопсида в ГК, содержащего или не содержащего ВМР-2. Динамику репаративных процессов, наблюдающихся после

имплантации в краниальные дефекты мышей дисков из ДКМ с суспензией порошка диопсида, содержащего или не содержащего ВМР-2, на сроках 14, 21, 42 и 63 суток оценивали гистологически, используя окраску гематоксилином и эозином с последующей гистоморфометрией, а также окраску пикро-полихромом для выявления степени созревания коллагена в регенерате.

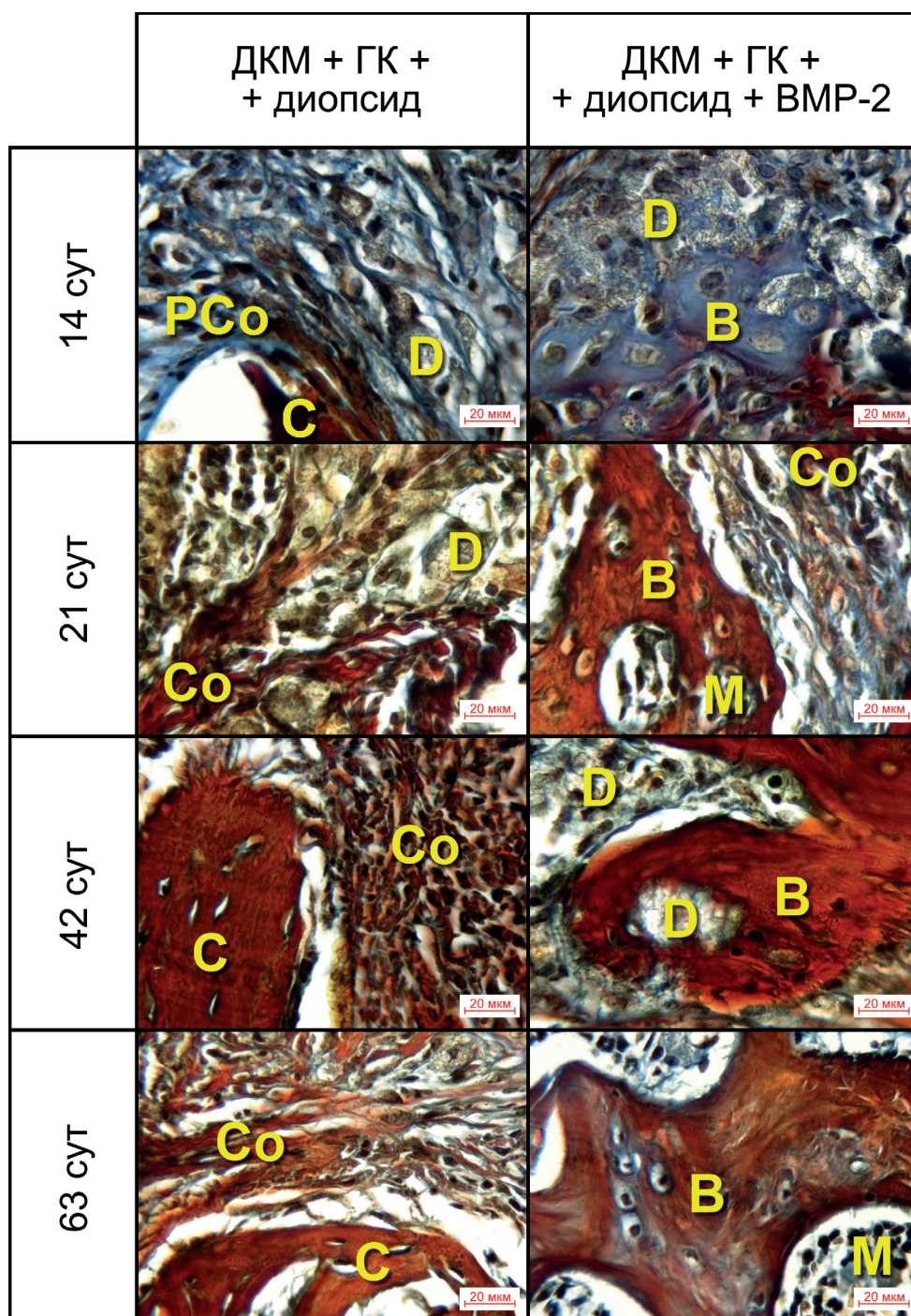


Рис. 6. Результаты гистологического анализа на сроках 12, 21, 42 и 63 суток на модели краниальных дефектов критического размера у мышей после имплантации дисков ДКМ с диопсидом и ГК с/без ВМР-2 (3,5 мкг/имплантат). Увеличение 400×, окраска пикро-полихромом. С – кость черепа, В – новообразованная костная ткань, М – костный мозг, Со – зрелый коллаген, Pco – преколлаген, D – диопсид

Гистологический анализ латеральных срезов области имплантации с использованием окраски гематоксилином и эозином (рис. 5), а также пикро-полихромом по Хировичи (рис. 6), полученных на разных сроках после имплантации, позволяет проанализировать динамику репаративного процесса для двух опытных групп – группы 1, где в дефект имплантировали диски из ДКМ с суспензией порошка диопсида без ВМР-2 в ГК, и группы 2, где имплантат был таким же, но порошок диопсида содержал ВМР-2.

На сроке 12 суток в группе 1 в области дефекта имплантат был окружён молодой волокнистой соединительной тканью, состоящей из тяжёлой молодой коллагена, фибробластоподобных клеток и умеренного количества иммунных клеток (рис. 5). У краёв дефекта следов перестройки костной ткани не наблюдалось. В группе 2 на сроке 12 дней в области имплантации наблюдались признаки остеогенеза с образованием костных трабекул в направлении от краёв дефекта к диску ДКМ. Края костей черепа вблизи дефекта значительно утолщались за счёт перестройки костной ткани.

На 21 сутки в группе 1 диск ДКМ был окружён рыхлой грануляционной клеточно-волокнистой соединительной тканью, местами уплотняющейся, состоящей из пучков коллагена, фибробластоподобных клеток и умеренного количества клеток-эффекторов воспаления – лимфоцитов, нейтрофилов и плазмоцитов, формирующих диффузный инфильтрат. Вокруг свободных частиц диопсида (рис. 6) локализовались эпителиоидные клетки и нейтрофилы, формирующие гранулёмы. Следов резорбции ДКМ и неоостеогенеза не наблюдалось. В группе 2 на 21 сутки наблюдались признаки репаративного остеогенеза с образованием молодой костной ткани на периферии дефекта, где шло объединение диска ДКМ с краями костей черепа, а также образование костных островков с запаянными в них частицами диопсида.

Через 42 суток в группе 1 в зоне дефекта определялся имплантат, окружённый молодой волокнистой соединительной тканью с образованием зрелых коллагеновых волокон у краёв дефекта (рис. 6). Наблюдалась слабовыраженная перестройка материнской костной ткани. В группе 2 на 42 сутки после имплантации в зоне дефекта определялась сеть тонких костных балок, сросшихся с ДКМ. В пространстве между балками наблюдались тяжёлые фиброзной ткани, а также структуры, имеющие строение нормального костного мозга.

На 63 сутки в группе 1 имплантат был окружён и заполнен грубоволокнистой (фи-

брозной) тканью, состоящей из пучков зрелого коллагена, фибробластоподобных клеток и иммунных клеток. Наблюдалась частицы диопсида в окружении эпителиоидных клеток, формирующих узелки, в области краёв дефекта видны следы перестройки костной ткани (рис. 6). В группе 2 на 63 сутки на месте дефекта имелась хорошо выраженная костная ткань, состоящая из сети трабекул (утолщённых костных балок), которая объединяла края дефекта с диском ДКМ. В межтрабекулярном пространстве наблюдались участки, заполненные костным мозгом, и тяжёлой зрелой фиброзной ткани (рис. 5, 6).

Таким образом, в группе без ВМР-2 репарация дефекта происходила с заполнением пор имплантата фиброзной тканью, и только на последнем сроке были заметны начальные этапы ремоделирования/перестройки костной ткани. В группе с ВМР-2 уже с самых ранних сроков микроскопически определялся активный репаративный остеогенез.

Диопсид во всех случаях вызывал умеренное гранулематозное воспаление с агрегацией макрофагов или эпителиоидных клеток и гигантских многоядерных клеток инородных тел, что является нормальной реакцией на имплантируемый материал. На поздних сроках в группе с ВМР-2 большинство частиц диопсида оказывалось полностью окружённым новообразованной костной тканью, что может свидетельствовать о роли диопсида – носителя ВМР-2 – в остеогенезе.

Окрашивание пикро-полихромом [39] позволило оценить динамику созревания коллагена в регенерате. В обеих группах созревание коллагена шло от периферии регенерата к центру. По наличию красной окраски видно, что в группе с ВМР-2 зрелый коллаген присутствовал в зоне у краёв дефекта уже на 12 день, тогда как в группе без ВМР-2 пучки зрелого коллагена определялись у краёв дефекта только на 21 день (и на 63 день внутри пор имплантата) (рис. 6).

Данные гистоморфометрии позволили провести оценку достоверности отличий в группах с и без ВМР-2, а также результатов на трёх последних сроках после имплантации с результатами на первом сроке (14 суток) по четырём измеряемым параметрам – отношению площади новообразованной костной ткани и остеоида, площади костного мозга, площади соединительной ткани и площади ДКМ к общей площади тканей в образце (рис. 7). Доля новообразованной костной ткани и остеоида в образцах группы с ВМР-2 неизменно растёт, достоверно отличаясь на каждом последующем

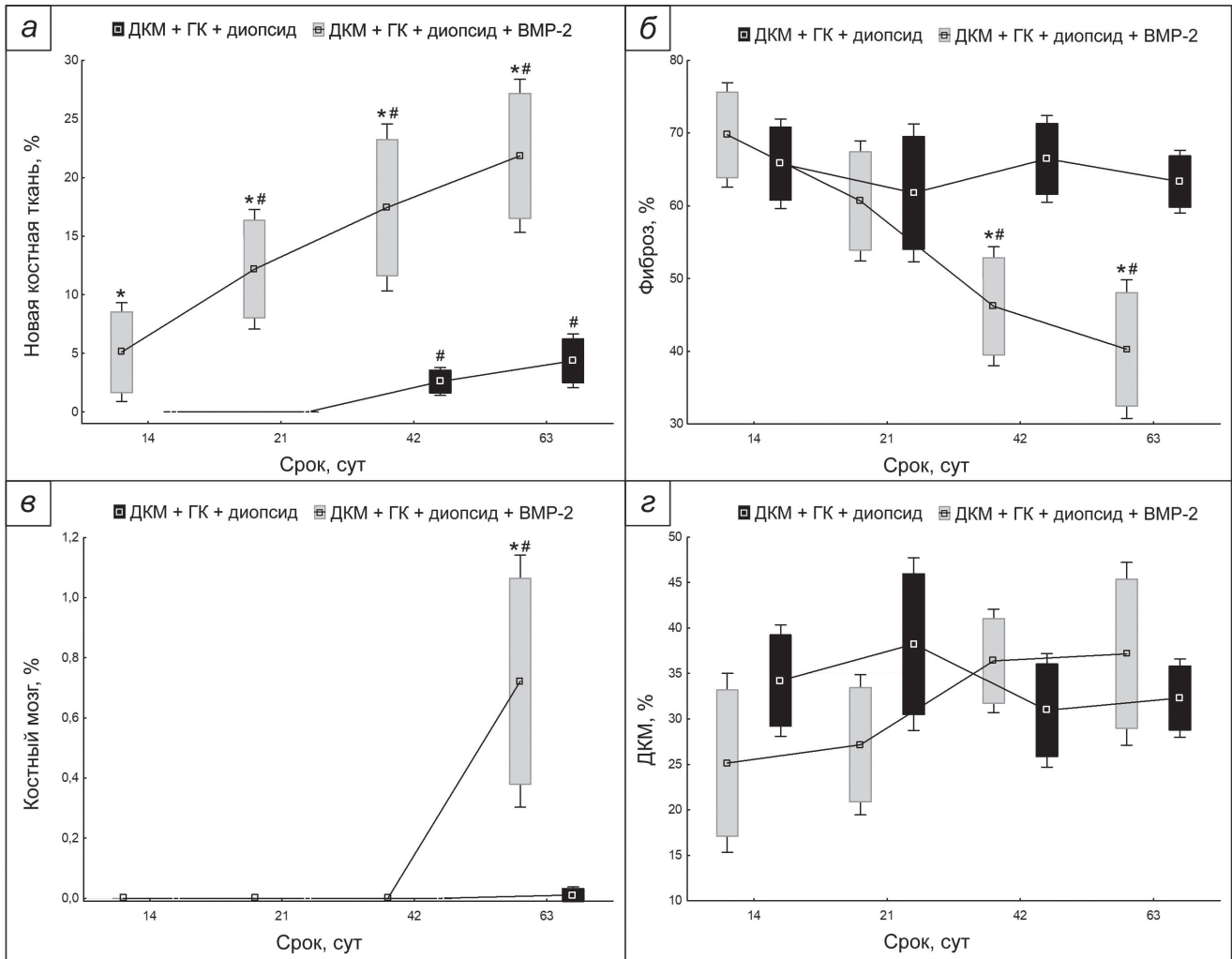


Рис. 7. Результаты гистоморфометрического исследования с оценкой относительной площади новой костной ткани (а), фиброза (б), костного мозга (в) и ДКМ (г) на разных сроках после имплантации дисков из ДКМ, заполненных суспензией порошка диопсида в ГК, насыщенного (серые ящики) и не насыщенного (чёрные ящики) BMP-2. Квадраты – среднее; «ящики» – стандартная ошибка среднего; «усы» – стандартное отклонение. * $p < 0,05$ по сравнению с группой без BMP-2; # $p < 0,05$ по сравнению с группой со сроком 14 суток

сроке от первого срока, а также от соответствующей доли в группе без BMP-2. В группе без BMP-2 доля новообразованной костной ткани начинает достоверно отличаться от первого срока лишь на 42 и 63 сутки после имплантации. Костный мозг появляется в значительных количествах лишь в группе с BMP-2 на 63 сутки. Достоверных отличий по доле ДКМ не наблюдается ни между группами, ни по срокам после имплантации. В группе с BMP-2 достоверно снижается доля, занятая фиброзом (соединительной тканью), замещаясь новообразованной костной тканью. Данные результаты хорошо соответствуют картине выраженного репаративного остеогенеза в группе с диопсидом, насыщенным BMP-2, и свидетельствуют лишь о начальных стадиях перестройки костной ткани в группе с диопсидом без BMP-2.

Имплантация в краниальные дефекты критического размера у мышей дисков из ДКМ, содержащих и не содержащих BMP-2. Для сравнения процессов репаративного остеогенеза в случае внесения BMP-2 в составе порошка диопсида и в составе собственно ДКМ провели эксперимент по имплантации в краниальные дефекты мышей дисков ДКМ без BMP-2, а также дисков, в которые BMP-2 вводили с помощью инкубации дисков ДКМ в растворе BMP-2. Доза BMP-2 – 3,5 мкг на диск – соответствовала расчётной дозе BMP-2, внесённой на порошок диопсида, в опытной группе 2. Длительность этого эксперимента составила 42 дня для того, чтобы была возможность провести сравнение разных способов введения BMP-2 в имплантат на стадии самого активного этапа ремоделирования костной ткани. Гистологический анализ

показал, что в случае обоих экспериментов в присутствии ВМР-2 на сроке 42 дня наблюдается картина активного ремоделирования костной ткани в имплантате (рис. 8, в, ж). На этой стадии новообразованная кость, которую можно отличить от остатков ДКМ по непараллельности тяжей коллагена, более тёмной окраске гематоксилином и присутствию остеоцитов с синими ядрами в лакунах кости, срастается как с материнской костью черепа по краям дефекта, так и с трабекулами ДКМ. При введении

ВМР-2 в составе порошка диопсида наблюдается несколько более активное формирование новообразованной костной ткани в порах имплантата с заключением частиц диопсида внутрь костных структур. В образцах ДКМ с присутствием диопсида и отсутствием ВМР-2 в несколько большем количестве обнаруживаются гигантские клетки инородных тел, при этом сильной воспалительной реакции не выявлено. В присутствии ВМР-2 количество гигантских клеток инородных тел снижено.

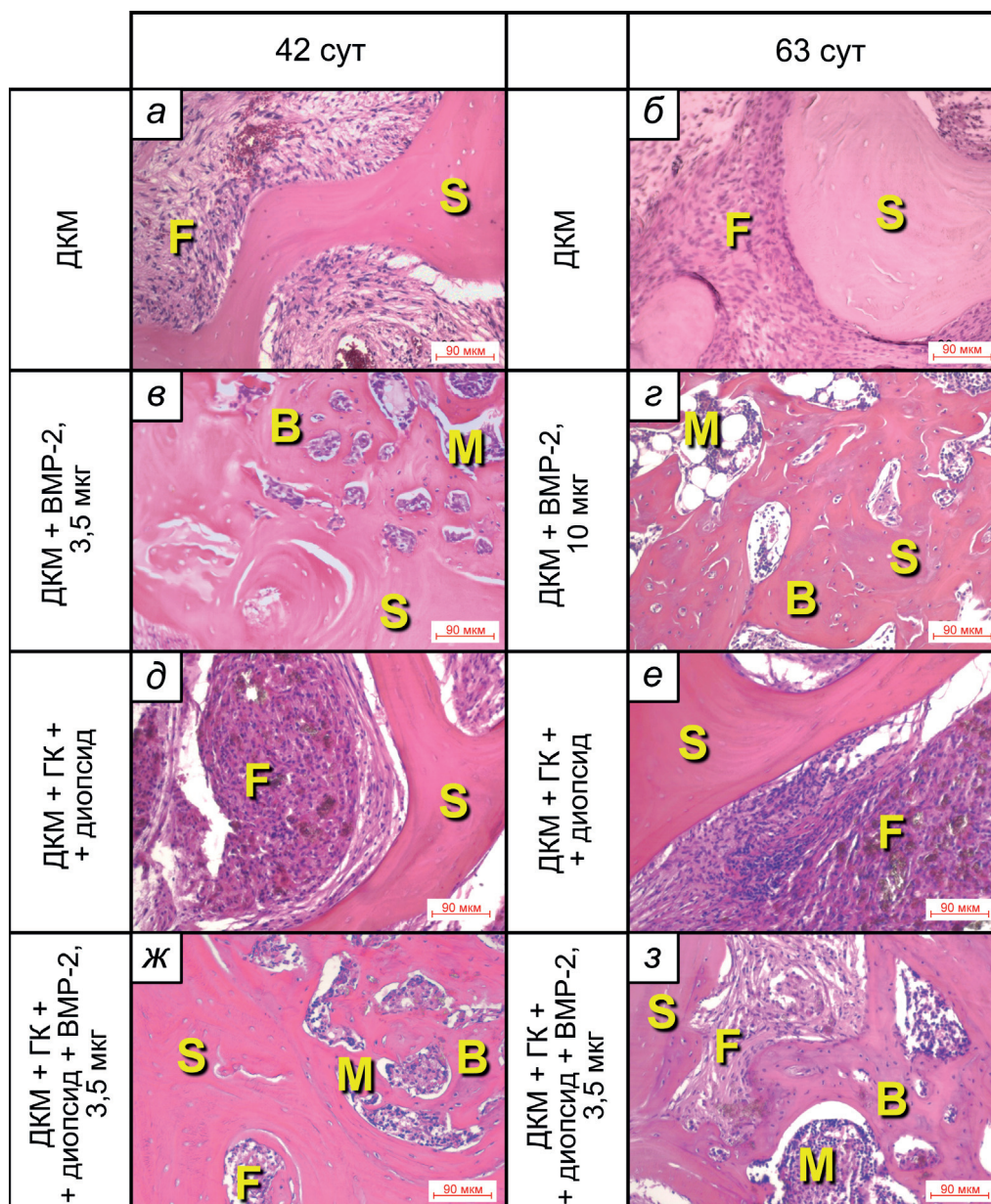


Рис. 8. Результаты гистологического анализа на сроках 42 и 63 суток на модели краниальных дефектов критического размера у мышей после имплантации дисков из ДКМ без/с ВМР-2 на сроке 42 суток (3,5 мкг/имплантат, а, в), дисков из ДКМ без/с ВМР-2 на сроке 63 суток (10 мкг/имплантат, б, г), а также дисков из ДКМ с диопсидом и ГК без/с ВМР-2 (3,5 мкг/имплантат, д, е, ж, з), В – новообразованная костная ткань, М – костный мозг, F – фиброзная ткань, S – каркас (скаффолд). Окраска гематоксилином и эозином. Полноразмерные фотографии образцов а–г представлены на рис. S2 Приложения, образцов д–з – на соответствующих панелях рис. 5. Подробные гистологические описания приведены в тексте Приложения

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Диопсид, используемый в работе (рис. 1, 2), получен твердофазным синтезом из биоотходов, что соответствует современным тенденциям получения веществ, применяемых в биотехнологии, на основе использования пищевых отходов или отходов пищевых производств [38]. Основной модификацией разработанной ранее методики является использование шаровой мельницы, которое в последние годы стало распространено в качестве дополнительной стадии синтеза биокерамики [42, 43]. Механоактивация способствует уменьшению размера частиц прекурсора и увеличению площади поверхности, а также усиливает межфазные взаимодействия между реагентами. Это обеспечивает гомогенность смеси, а также улучшает кинетику реакции в процессе кальцинации [43]. Такой подход облегчает синтез диопсида в качестве основной фазы при низкой температуре (1100 °С).

Для экспериментов *in vivo* по исследованию способности чистого диопсида и диопсида с ВМР-2 индуцировать репаративный остеогенез было решено использовать классическую модель имплантации остеопластических материалов в краниальные дефекты критического размера у мыши. В качестве материала, обеспечивающего каркасную функцию, мы использовали диски из ДКМ, полученные по ранее разработанной технологии [4, 5]. Была проведена оценка размера пор и объёмной пористости полученных образцов ДКМ. Размер пор составлял от 50 до 650 мкм с разбросом по средним значениям от 300 до 450 мкм (таблица S1 в Приложении). Интересно отметить, что объёмная пористость ДКМ, измеренная с помощью двух различных подходов – по микрофотографиям и методом гидростатического взвешивания – существенным образом различалась (в файле с дополнительными материалами приведены подробные описания с формулами расчётов для понимания особенностей методик). По микрофотографиям получился разброс от 50 до 70%, в то время как по измерению двумя способами с помощью гидростатического взвешивания – от 73 до 90%. Мы предполагаем, что эта разница – почти в 20% – соответствует объёму микропор, которые пронизывают костный матрикс. В них проникает смачивающая диск жидкость, и её масса учитывается при взвешивании, однако на микрофотографиях при используемом увеличении микропор не видно, стенки трабекул ДКМ воспринимаются как гладкие, и микропоры не учитываются при расчётах. По данным других авторов [44],

средний размер пор в ДКМ составляет 119 мкм, что попадает в интервал определённых нами величин; средняя пористость, определённая по микрофотографиям, составляет 60%, что полностью соответствует нашим данным по объёмной пористости с учётом только макропористости. В любом случае размер пор ДКМ обеспечивает беспрепятственное проникновение суспензии порошка диопсида размером 2–3 мкм в имплантируемый диск из ДКМ. Нами было показано, что один диск ДКМ объёмом около 12,5 мкл в среднем впитывает около 7 мкл суспензии диопсида в ГК, что составляет 56% от объёма имплантата и хорошо соответствует измеренной объёмной пористости образцов.

Порошок диопсида вводился в пористую матрицу ДКМ (рис. S1 в Приложении) в виде взвеси в высокомолекулярной ГК, которая, обладая достаточно большой вязкостью, должна была препятствовать быстрому оседанию частиц и обеспечивать более равномерное распределение частиц в имплантате. Выбор ГК в качестве связующего агента был обусловлен также тем, что этот природный линейный гликозаминогликан является одним из основных компонентов внеклеточного матрикса в соединительных тканях млекопитающих и обладает высокой гидрофильностью, нетоксичностью, низкой иммуногенностью и хорошей биосовместимостью [45]. ГК обеспечивает благоприятную среду для инженерии костной ткани [46], поскольку может стимулировать клеточную адгезию, пролиферацию и дифференцировку клеток [47] для ускорения заживления дефектов костей черепа [48].

Высокопористые образцы керамики обладают большой площадью поверхности, что может способствовать связыванию большого количества молекул белка. Показано, что мезопористый диоксид кремния со средним размером пор 15,4 нм адсорбировал в 2,5 раза больше БСА и лизоцима, чем образец с размером пор 13,2 нм [49], то есть размер пор может определять адсорбцию биомолекул на поверхности биоматериала. Действительно, полученный вариант диопсида с пористостью около 20% и средним размером пор около 24 нм обладает очень высокой сорбционной ёмкостью по отношению к используемому в нашей работе рекомбинантному ВМР-2, полученному микробиологическим синтезом [18]: 1 мг диопсида связывает более 150 мкг ВМР-2, что более чем в 3 раза превышает ёмкость наноразмерного ГАП, который мы использовали для сравнения. Кроме того, это значительно превышает ёмкость частиц ДКМ размером 1–2 мм, которую мы

также использовали в экспериментах по оценке эффективности связывания ВМР-2 (рис. 3). ДКМ достаточно широко используется в качестве носителя ВМР-2 в различных экспериментальных исследованиях [6, 8, 14, 50, 51], однако продемонстрированная в наших экспериментах относительно невысокая ёмкость в качестве носителя ВМР-2 (по приблизительным оценкам – около 20 мкг ВМР-2 на 1 мг ДКМ) может приводить к ограничениям для применения комбинации ДКМ с ВМР-2 в качестве остеоиндуктивного материала, особенно при его использовании для репарации костных дефектов у крупных животных или человека, где требуется введение более высоких доз белка, а также при использовании частиц ДКМ с ВМР-2 в качестве остеоиндуктивного компонента в композитах и гибридных имплантатах. Тем не менее высокоочищенный ДКМ обладает хорошими остеокондуктивными свойствами и биосовместимостью, а также природной пористостью, соответствующей пористости костной ткани, что позволило остановить выбор на данном материале в качестве имплантируемого каркаса для исследования особенностей репаративного остеогенеза, вызываемого порошком диопсида, насыщенным и не насыщенным ВМР-2.

При исследовании кинетики выхода ВМР-2 *in vitro* из диопсида, ГАП и ДКМ во всех случаях в первые 2 дня наблюдался бурный выход белка, при этом только в случае диопсида, начиная с 3 дня, наблюдался длительный постоянный выход ВМР-2 приблизительно по 0,5% от нанесённого белка в сутки (рис. 4). В случае ГАП и ДКМ постоянный выход был значительно меньше. Возможно, это связано с разницей в растворимости материалов. Аналогичный результат с длительным очень низким постоянным выходом ВМР-2 из ГАП был также показан другими авторами с помощью ИФА [52]. Следует отметить, что кинетика выхода ВМР-2 *in vivo* может существенно отличаться за счёт отличающихся условий, в которых находится имплантат. Например, для кальций-магниево-силикатной керамики в присутствии биологических жидкостей в организме показано быстрое образование слоя апатита на поверхности частиц, который может создавать барьер для диффузии ВМР-2, тем самым снижая скорость его высвобождения [34]. Поэтому единственным критерием эффективности материала в качестве носителя ВМР-2 является успешность эксперимента *in vivo*.

Для оценки принципиальной возможности использования порошка диопсида в качестве носителя ВМР-2 имплантация в краниальные

дефекты критического размера у мышей дисков из ДКМ с порами, заполненными суспензией порошка диопсида в ГК, проводилась в двух вариантах – в одном случае использовали порошок без ВМР-2, в другом – с ВМР-2. На выбранных сроках наблюдения – 12, 21, 48 и 63 суток – проводили гистологическую оценку стадий репарации и ремоделирования костной ткани в пределах дефекта (рис. 5, 6). В случае отсутствия ВМР-2 на всех четырёх сроках наблюдения в образцах тканей в области имплантации отмечали небольшую воспалительную реакцию с образованием грубоволокнистой соединительной ткани в порах имплантата, на двух последних сроках наблюдался незначительно выраженный репаративный остеогенез, выражающийся в появлении небольших островков незрелой костной ткани и зрелого коллагена в порах имплантата, и незначительная перестройка материнской кости в области, примыкающей к имплантату. В присутствии ВМР-2 с самого первого срока наблюдались признаки репаративного остеогенеза с появлением через 9 недель выраженных очагов новообразованной костной ткани, между трабекулами которой присутствовали участки зрелого костного мозга.

На сроке 6 недель картина репаративного остеогенеза в образцах с диопсидом проявляется максимально разнообразно: видны участки новообразованной костной ткани с непараллельно расположенными волокнами коллагена вокруг частиц диопсида, в лакунах которой находятся остециты, между трабекулами костной ткани находятся участки костного мозга, что очень похоже на картину, наблюдающуюся при введении такой же дозы ВМР-2 непосредственно в ДКМ (рис. 8). Негативных последствий при использовании диопсида для введения ВМР-2 в имплантат не наблюдается.

Оценка сорбционной ёмкости порошка диопсида по отношению к ВМР-2 свидетельствует о том, что в случае их использования в качестве носителя ВМР-2 возможно многократное увеличение дозы рекомбинантного белка, вводимой в дефект. Увеличение дозы до определённого предела имеет смысл, поскольку это может ускорить репарацию дефекта. Так, в полученных в ранее проведённых экспериментах [8] образцах костей черепа мышей с имплантатами из ДКМ, в которые было введено 10 мкг ВМР-2 на диск, на сроке 9 недель наблюдалось практически завершённое ремоделирование костной ткани в области дефекта (рис. 8, з), при котором наблюдалось почти полное замещение ДКМ новообразованной костной тканью, причём эта ткань была пол-

ностью минерализована [8]. Поскольку ёмкость ДКМ по отношению к ВМР-2 ограничена, введение большего количества ВМР-2 на порошке диоксида, возможно, сможет сократить сроки ремоделирования костной ткани. Важным обстоятельством при этом является подбор максимальной дозы ВМР-2, которая при этом обеспечивала бы отсутствие нежелательных последствий, таких как эктопический остеогенез, лизис материнской кости и др.

Результаты гистологического анализа при введении суспензии порошка диоксида в диски из ДКМ демонстрируют равномерное распределение частиц в порах имплантатов. В описанных экспериментах с имплантацией порошка диоксида с ВМР-2 размер групп сравнительно небольшой – по 4 животных на каждом сроке. Однако хотелось бы отметить то обстоятельство, что в случае введения ВМР-2 на диоксиде новая кость стабильно образовывалась у всех животных, и разброс по данным гистоморфометрии был относительно небольшим (рис. 7), при этом в ранее проведённых нами экспериментах с ДКМ и другими материалами, когда ВМР-2 вводился непосредственно в материалы [6, 8, 19, 22–26], помимо примеров хорошего роста, практически во всех группах обнаруживались животные, у которых рост новой кости был минимален или неравномерен в пределах имплантата. То есть описанный способ введения ВМР-2 обеспечивает большую стабильность при репарации дефекта.

Таким образом, в результате проведённых экспериментов *in vitro* и *in vivo* показана принципиальная возможность использования диоксида в качестве носителя ВМР-2. Суспензия порошка диоксида, насыщенного ВМР-2, в ГК потенциально может быть универсальным средством, повышающим регенеративный потенциал широкого спектра пористых остеопластических материалов при костной пластике.

Дальнейшие направления работы могут быть связаны с исследованием особенностей регенерации, опосредуемой порошком диоксида с ВМР-2 на других экспериментальных моделях, в составе гибридных имплантатов с другими материалами (каркасами, гидрогелями), исследованием влияния на регенерацию различных доз ВМР-2, использованием порошка диоксида в качестве носителя других белков или их сочетания с ВМР-2 и т.п.

Вклад авторов. А.С. Карягина, Ф.С. Сенатов, А.В. Громов – концепция и руководство работой; А.С. Карягина – написание статьи; П.А. Орлова, А.В. Жулина, М.С. Попонова, И.Н. Булыгина, Р. Чоудхари, П.А. Ковалёва, А.И. Зими́на, Т.М. Грунина, К.Е. Никитин, Н.В. Струкова, М.С. Генералова, А.В. Рязанова, Е.М. Лукинова, Е.Д. Плахотнюк, М.А. Кирсанова, Е.А. Колесников, Е.В. Захарова – проведение экспериментов; П.А. Орлова, М.С. Попонова, И.Н. Булыгина, П.А. Ковалёва, А.И. Зими́на, Т.М. Грунина, К.Е. Никитин, А.В. Громов – написание фрагментов статьи, подготовка иллюстраций; А.С. Карягина, Ф.С. Сенатов, А.В. Громов, В.Н. Манских – обсуждение результатов исследования, редактирование текста статьи.

Финансирование. Исследование выполнено при поддержке Российского научного фонда (проект № 22-15-00216).

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Соблюдение этических норм. Все процедуры, выполненные в исследованиях с участием животных, соответствовали этическим стандартам учреждения, в котором проводились исследования, и утвержденным правовым актам РФ и международных организаций.

Дополнительные материалы. Приложение к статье опубликовано на сайте журнала «Биохимия» (<https://biochemistrymoscow.com>).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Ma, J., Both, S. K., Yang, F., Cui, F. Z., Pan, J., et al. (2014) Concise review: cell-based strategies in bone tissue engineering and regenerative medicine, *Stem Cells Translat. Med.*, **3**, 98-107, doi: 10.5966/sctm.2013-0126.
2. Arrington, E. D., Smith, W. J., Chambers, H. G., Bucknell, A. L., and Davino, N. A. (1996) Complications of iliac crest bone graft harvesting, *Clin. Orthopaedics Related Res.*, **329**, 300-309, doi: 10.1097/00003086-199608000-00037.
3. Zhang, H., Yang, L., Yang, X. G., Wang, F., Feng, J. T. et al. (2019) Demineralized bone matrix carriers and their clinical applications: an overview, *Orthopaedic Surg.*, **11**, 725-737, doi: 10.1111/os.12509.
4. Plantz, M. A., Minardi, S., Lyons, J. G., Greene, A. C., Ellenbogen, D. J., et al. (2021) Osteoinductivity and biomechanical assessment of a 3D printed demineralized bone matrix-ceramic composite in a rat spine fusion model, *Acta Biomater.*, **127**, 146-158, doi: 10.1016/j.actbio.2021.03.060.
5. Driscoll, J. A., Lubbe, R., Jakus, A. E., Chang, K., Haleem, M., et al. (2020) 3D-printed ceramic-demineralized bone matrix hyperelastic bone compos-

- ite scaffolds for spinal fusion, *Tissue Engin. A*, **26**, 157-166, doi: 10.1089/ten.TEA.2019.0166.
6. Bartov, M. S., Gromov, A. V., Poponova, M. S., Savina, D. M., Nikitin, K. E., et al. (2016) Modern approaches to research of new osteogenic biomaterials on the model of regeneration of cranial critical-sized defects in rats, *Bull. Exp. Biol. Med.*, **162**, 273-276, doi: 10.1007/s10517-017-3693-2.
 7. Громов А. В., Никитин К. Е., Карпова Т. А., Зайцев В. В., Сидорова Е. И. и др. (2012) Разработка методики получения остеопластического материала на основе деминерализованного костного матрикса с максимальным содержанием нативных факторов роста костной ткани, *Биотехнология*, **5**, 66-75.
 8. Gromov, A. V., Bartov, M. S., Orlova, P. A., Mansikh, V. N., Krivozubov, M. S., et al. (2019) Combined effect of bone morphogenetic protein-2 and erythropoietin on regeneration of cranial bone defects in mice, *Bull. Exp. Biol. Med.*, **167**, 408-412, doi: 10.1007/s10517-019-04538-5.
 9. Gromov, A. V., Poponova, M. S., and Karyagina, A. S. (2020) Recombinant human bone growth factor BMP-2 produced in *Escherichia coli*. Part 1: from protein purification to experimental models for efficacy research, *Mol. Genet. Microbiol. Virol.*, **35**, 22-31, doi: 10.3103/S0891416820010036.
 10. Li, R. H., and Wozney, J. M. (2001) Delivering on the promise of bone morphogenetic proteins, *Trends Biotechnol.*, **19**, 255-265, doi: 10.1016/S0167-7799(01)01665-1.
 11. Kirker-Head, C. A. (2000) Potential applications and delivery strategies for bone morphogenetic proteins, *Adv. Drug Deliv. Rev.*, **43**, 65-92, doi: 10.1016/S0169-409X(00)00078-8.
 12. Halloran, D., Durbano, H. W., and Nohe, A. (2020) Bone morphogenetic protein-2 in development and bone homeostasis, *J. Dev. Biol.*, **8**, 19, doi: 10.3390/jdb8030019.
 13. Robinson, Y., Heyde, C. E., Tschöke, S. K., Mont, M. A., Seyler, T. M., et al. (2008) Evidence supporting the use of bone morphogenetic proteins for spinal fusion surgery, *Exp. Rev. Med. Devices*, **5**, 75-84, doi: 10.1586/17434440.5.1.75.
 14. Jin, Y. Z., Zheng, G. B., and Lee, J. H. (2019) *Escherichia coli* BMP-2 showed comparable osteoinductivity with Chinese hamster ovary derived BMP-2 with demineralized bone matrix as carrier, *Growth Factors*, **4**, 1-10, doi: 10.1080/08977194.2019.1596905.
 15. Vallejo, L. F., Brokelmann, M., Marten, S., Trappe, S., Cabrera-Crespo, J., et al. (2002) Renaturation and purification of bone morphogenetic protein-2 produced as inclusion bodies in high-cell-density cultures of recombinant *Escherichia coli*, *J. Biotechnol.*, **94**, 185-194, doi: 10.1016/S0168-1656(01)00425-4.
 16. Шарапова Н. Е., Котнова А. П., Галушкина З. М., Лаврова Н. В., Полетаева Н. Н. и др. (2010) Получение рекомбинантного костного морфогенетического белка 2 человека в клетках *Escherichia coli* и тестирование его биологической активности *in vitro* и *in vivo*, *Молек. биол.*, **44**, 1036-1044.
 17. Karyagina, A. S., Boksha, I. S., Grunina, T. M., Demidenko, A. V., Poponova, M. S., et al. (2016) Optimization of rhBMP-2 active-form production in a heterologous expression system using microbiological and molecular genetic approaches, *Mol. Genet. Microbiol. Virol.*, **31**, 208-213, doi: 10.3103/S0891416816040030.
 18. Karyagina, A. S., Boksha, I. S., Grunina, T. M., Demidenko, A. V., Poponova, M. S., et al. (2017) Two variants of recombinant human bone morphogenetic protein 2 (rhBMP-2) with additional protein domains: synthesis in an *Escherichia coli* heterologous expression system, *Biochemistry (Moscow)*, **82**, 613-624, doi: 10.1134/S0006297917050091.
 19. Bartov, M. S., Gromov, A. V., Mansikh, V. N., Makarova, E. B., Rubshtein, A. P., et al. (2017) Recombinant human bone morphogenetic protein-2 (rhBMP-2) with additional protein domain synthesized in *E. coli*: *in vivo* osteoinductivity in experimental models on small and large laboratory animals, *Bull. Exp. Biol. Med.*, **164**, 148-151, doi: 10.1007/s10517-017-3945-1.
 20. Гайфуллин Н. М., Карягина А. С., Громов А. В., Терпиловский А. А., Маланин Д. А. и др. (2016) Морфологические особенности остеоинтеграции при использовании титановых имплантатов с биоактивным покрытием и рекомбинантного костного морфогенетического белка rhBMP-2, *Морфология*, **149**, 7-84.
 21. Karpov, T. E., Peltek, O. O., Muslimov, A. R., Tarakanchikova, Y. V., Grunina, T. M., et al. (2020) Development of optimized strategies for growth factor incorporation onto electrospun fibrous scaffolds to promote prolonged release, *ACS Appl. Mater. Interfaces*, **12**, 5578-5592, doi: 10.1021/acsami.9b20697.
 22. Senatov, F., Amanbek, G., Orlova, P., Bartov, M., Grunina, T., et al. (2020) Biomimetic UHMWPE/HA scaffolds with rhBMP-2 and erythropoietin for reconstructive surgery, *Mater. Sci. Engin. C*, **111**, 110750, doi: 10.1016/j.msec.2020.110750.
 23. Chubrik, A., Senatov, F., Kolesnikov, E., Orlova, P., Poponova, M., et al. (2020) Highly porous PEEK and PEEK/HA scaffolds with *Escherichia coli*-derived recombinant BMP-2 and erythropoietin for enhanced osteogenesis and angiogenesis, *Polymer Testing*, **87**, 106518, doi: 10.1016/j.polymertesting.2020.106518.
 24. Zimina, A., Senatov, F., Choudhary, R., Kolesnikov, E., Anisimova, N., et al. (2020) Biocompatibility and physico-chemical properties of highly porous PLA/HA scaffolds for bone reconstruction, *Polymers*, **12**, 2938, doi: 10.3390/polym12122938.
 25. Senatov, F., Maksimkin, A., Chubrik, A., Orlova, P., Krivozubov, M., et al. (2021) Osseointegration eval-

- uation of UHMWPE and PEEK-based scaffolds with BMP-2 using model of critical-size cranial defect in mice and push-out test, *J. Mech. Behav. Biomed. Materials*, **119**, 104477, doi: 10.1016/j.jmbbm.2021.104477.
26. Senatov, F., Zimina, A., Chubrik, A., Kolesnikov, E., Permyakova, E., et al. (2022) Effect of recombinant BMP-2 and erythropoietin on osteogenic properties of biomimetic PLA/PCL/HA and PHB/HA scaffolds in critical-size cranial defects model, *Biomater. Adv.*, **135**, 112680, doi: 10.1016/j.msec.2022.112680.
 27. Gromov, A. V., Poponova, M. S., and Karyagina, A. S. (2020) Recombinant human bone growth factor BMP-2 synthesized in *Escherichia coli* cells. Part 2: from combined use with other protein factors in animal models to application in medicine, *Mol. Genet. Microbiol. Virol.*, **35**, 61-68, doi: 10.3103/S0891416820020056.
 28. Huh, J.-B., Lee, H.-J., Jang, J.-W., Kim, M.-J., Yun, P.-Y., et al. (2011) Randomized clinical trial on the efficacy of *Escherichia coli*-derived rhBMP-2 with β -TCP/HA in extraction socket, *J. Adv. Prosthodont.*, **3**, 161-165, doi: 10.4047/jap.2011.3.3.161.
 29. Kim, H.-S., Park, J.-C., Yun, P.-Y., and Kim, Y.-K. (2017) Evaluation of bone healing using rhBMP-2 soaked hydroxyapatite in ridge augmentation: a prospective observational study, *Maxillofac. Plast. Reconstr. Surg.*, **39**, 40, doi: 10.1186/s40902-017-0138-9.
 30. Klein, C. P., Driessen, A. A., de Groot, K., and van den Hooff, A. (1983) Biodegradation behavior of various calcium phosphate materials in bone tissue, *J. Biomed. Mater. Res.*, **17**, 769-784, doi: 10.1002/jbm.820170505.
 31. Daculsi, G., LeGeros, R. Z., Nery, E., Lynch, K., and Kerebel, B. (1989) Transformation of biphasic calcium phosphate ceramics *in vivo*: ultrastructural and physicochemical characterization, *J. Biomed. Mater. Res.*, **23**, 883-894, doi: 10.1002/jbm.820230806.
 32. Fernandez-Yague, M. A., Abbah, S. A., McNamara, L., Zeugolis, D. I., Pandit, A., et al. (2015) Biomimetic approaches in bone tissue engineering: Integrating biological and physicochemical strategies, *Adv. Drug Deliv. Rev.*, **84**, 1-29, doi: 10.1016/j.addr.2014.09.005.
 33. Fosca, M., Rau, J. V., and Uskoković, V. (2022) Factors influencing the drug release from calcium phosphate cements, *Bioactive Materials*, **7**, 341-363, doi: 10.1016/j.bioactmat.2021.05.032.
 34. Wu, C., and Chang, J. (2013) A review of bioactive silicate ceramics, *Biomed. Mater.*, **8**, 032001, doi: 10.1088/1748-6041/8/3/032001.
 35. Wu, C., and Chang, J. (2007) Degradation, bioactivity, and cytocompatibility of diopside, akermanite, and bredigite ceramics, *J. Biomed. Mater. Res. Part B Appl. Biomater.*, **83**, 153-160, doi: 10.1002/jbm.b.30779.
 36. Wu, C., Ramaswamy, Y., and Zreiqat, H. (2010) Porous diopside ($\text{CaMgSi}_2\text{O}_6$) scaffold: a promising bioactive material for bone tissue engineering, *Acta Biomater.*, **6**, 2237-2245, doi: 10.1016/j.actbio.2009.12.022.
 37. Sun, J., Li, J., Liu, X., Wei, L., Wang, G., et al. (2009) Proliferation and gene expression of osteoblasts cultured in DMEM containing the ionic products of dicalcium silicate coating, *Biomed. Pharmacother.*, **63**, 650-657, doi: 10.1016/j.biopha.2009.01.007.
 38. Choudhary, R., Venkatraman, S. K., Bulygina, I., Senatov, F., Kaloshkin, S., et al. (2021) Biomineralization, dissolution and cellular studies of silicate bioceramics prepared from eggshell and rice husk, *Mater. Sci. Engin. C*, **118**, 111456, doi: 10.1016/j.msec.2020.111456.
 39. Friend, W. G. (1963) A polychrome stain for differentiating precollagen from collagen, *Stain Technol.*, **38**, 204-206.
 40. Egan, K. P., Brennan, T. A., and Pignolo, R. J. (2012) Bone histomorphometry using free and commonly available software, *Histopathology*, **61**, 1168-1173, doi: 10.1111/j.1365-2559.2012.04333.x.
 41. Rouquerol, J., Avnir, D., Fairbridge, C. W., Everett, D. H., Haynes, J. H., et al. (1994) Recommendations for the characterization of porous solids (Technical Report), *Pure Appl. Chem.*, **66**, 1739-1758, doi: 10.1351/pac199466081739.
 42. Myat-Htun, M., Noor, A.-F. M., Kawashita, M., and Baba Ismail, Y. M. (2022) Tailoring mechanical and *in vitro* biological properties of calcium-silicate based bioceramic through iron doping in developing future material, *J. Mech. Behav. Biomed. Mater.*, **128**, 105-122, doi: 10.2139/ssrn.3962042.
 43. Hafezi, M., Nadernezhad, A., Mohammadi, M., Barzegar, H., and Mohammadi, H. (2014) Effect of ball milling time on the synthesis of nanocrystalline merwinite via mechanical activation, *Int. J. Mater. Res.*, **105**, 469-473, doi: 10.3139/146.111048.
 44. Wang, X., Li, Y., Han, R., He, C., Wang, G., et al. (2014) Demineralized bone matrix combined bone marrow mesenchymal stem cells, bone morphogenetic protein-2 and transforming growth factor- β 3 gene promoted pig cartilage defect repair, *PLoS One*, **9**, e116061, doi: 10.1371/journal.pone.0116061.
 45. Petta, D., Fussell, G., Hughes, L., Buechter, D. D., Sprecher, C. M., et al. (2016) Calcium phosphate/thermoresponsive hyaluronan hydrogel composite delivering hydrophilic and hydrophobic drugs, *J. Orthop. Translat.*, **5**, 57-68, doi: 10.1016/j.jot.2015.11.001.
 46. Chircov, C., Grumezescu, A. M., and Bejenaru, L. E. (2018) Hyaluronic acid-based scaffolds for tissue engineering, *Rom. J. Morphol. Embryol.*, **59**, 71-76.
 47. Liu, M., Zeng, X., Ma, C., Yi, H., Ali, Z., et al. (2017) Injectable hydrogels for cartilage and bone tissue engineering, *Bone Res.*, **5**, 17014, doi: 10.1038/boneres.2017.14.
 48. Sasaki, T., and Watanabe, C. (1995) Stimulation of osteoinduction in bone wound healing by high-molecular hyaluronic acid, *Bone*, **16**, 9-15, doi: 10.1016/s8756-3282(94)00001-8.

49. Diao, X., Wang, Y., Zhao, J., and Zhu, S. (2010) Effect of pore-size of mesoporous SBA-15 (mesoporous silica) on adsorption of bovine serum albumin and lysozyme protein, *Chinese J. Chem. Eng.*, **18**, 493-499, doi: 10.1016/S1004-9541(10)60248-0.
50. Huber, E., Pobloth, A. M., Bormann, N., Kolarczik, N., Schmidt-Bleek, K., et al. (2017) Demineralized bone matrix as a carrier for bone morphogenetic protein-2: burst release combined with long-term binding and osteoinductive activity evaluated *in vitro* and *in vivo*, *Tissue Eng. Part A*, **23**, 1321-1330, doi: 10.1089/ten.TEA.2017.0005.
51. Jin, Y. Z., Zheng, G. B., Lee, J. H., and Han, S. H. (2021) Comparison of demineralized bone matrix and hydroxyapatite as carriers of *Escherichia coli* recombinant human BMP-2, *Biomater. Res.*, **25**, 25, doi: 10.1186/s40824-021-00225-7.
52. Kang, W., Lee, D. S., and Jang, J. H. (2015) Evaluation of sustained BMP-2 release profiles using a novel fluorescence-based retention assay, *PLoS One*, **10**, e0123402, doi: 10.1371/journal.pone.0123402.

HYBRID IMPLANTS BASED ON CALCIUM-MAGNESIUM SILICATE CERAMICS DIOPSIDE AS A CARRIER OF RECOMBINANT BMP-2 AND DEMINERALIZED BONE MATRIX AS A SCAFFOLD: DYNAMICS OF REPARATIVE OSTEOGENESIS IN A MOUSE CRANIOTOMY MODEL

A. S. Karyagina^{1,2,3*}, P. A. Orlova¹, M. S. Poponova¹, I. N. Bulygina^{1,4}, R. Choudhary^{5,6},
A. V. Zhulina¹, T. M. Grunina^{1,3}, K. E. Nikitin¹, N. V. Strukova¹, M. S. Generalova¹,
A. V. Ryazanova¹, P. A. Kovalyova⁴, A. I. Zimina⁴, E. M. Lukinova⁴, E. D. Plakhotniuk⁴,
M. A. Kirsanova⁷, E. A. Kolesnikov⁴, E. V. Zakharova⁴, V. N. Manskikh²,
F. S. Senatov^{1,4}, and A. V. Gromov^{1*}

¹ Gamaleya National Research Center of Epidemiology and Microbiology, Ministry of Healthcare of the Russian Federation, 123098 Moscow, Russia; e-mail: akaryagina@gmail.com, alexander.v.gromov@gmail.com

² Belozersky Institute of Physico-Chemical Biology, Lomonosov Moscow State University, 119992 Moscow, Russia

³ All-Russia Research Institute of Agricultural Biotechnology, 127550 Moscow, Russia

⁴ National University of Science and Technology "MISIS", 119049 Moscow, Russia

⁵ Riga Technical University, LV-1007 Riga, Latvia

⁶ Baltic Biomaterials Centre of Excellence, Headquarters at Riga Technical University, LV-1048 Riga, Latvia

⁷ Skolkovo Institute of Science and Technology, 121205 Moscow, Russia

Calcium-magnesium silicate ceramics, diopside, is a promising material for use in bone plastics, but until now the possibility of its use as a carrier of recombinant bone morphogenetic protein-2 (BMP-2) has not been studied, as well as the features of reparative osteogenesis mediated by the materials based on diopside with BMP-2. Powder of calcium-magnesium silicate ceramics was obtained by solid-state synthesis using biowaste – rice husks and egg shells – as source components. Main phase of the obtained ceramics was diopside. The obtained particles were irregularly shaped with an average size of about 2.3 μm and ~20% porosity; average pore size was about 24 nm, which allowed the material to be classified as mesoporous. Diopside powder adsorbs more than 150 μg of recombinant BMP-2 per milligram, which exceeds binding capacity of hydroxyapatite, a calcium-phosphate ceramic often used in hybrid implants, by more than 3 times. *In vitro* release kinetics of BMP-2 was characterized by a burst release in the first 2 days and a sustained release of approximately 0.4 to 0.5% of the loaded protein over the following 7 days. *In vivo* experiments were performed with a mouse model of cranial defects of critical size with implantation of a suspension of diopside powder with/without BMP-2 in hyaluronic acid incorporated into the disks of demineralized bone matrix with 73-90% volume porosity and macropore size from 50 to 650 μm. Dynamics of neoosteogenesis and bone tissue remodeling was investigated histologically at the time points of 12, 21, 48, and 63 days. Diopside particles were evenly spread in the matrix and caused minimal foreign body reaction. In the presence of BMP-2 by the day 63 significant foci of newly formed bone tissue were formed in the implant pores with bone marrow areas, moreover, large areas of demineralized bone matrix in the implant center and maternal bone at the edges were involved in the remodeling. Diopside could be considered as a promising material for introduction into hybrid implants as an effective carrier of BMP-2.

Keywords: diopside, calcium-magnesium silicate ceramics, implant, BMP-2, demineralized bone matrix, cranial defects, bone tissue regeneration

АДИПОНЕКТИН СТИМУЛИРУЕТ ЭКСПРЕССИЮ ГЕНА АПОЛИПОПРОТЕИНА А-1 В КЛЕТКАХ HepG2 ЧЕРЕЗ СИГНАЛЬНЫЕ ПУТИ АМПК, PPAR-АЛЬФА И LXR

© 2022 Д.А. Таянский^{1,2*}, В.С. Шавва¹, Э.Б. Дидже¹, Г.Н. Олейникова¹, А.В. Лизунов^{1,3}, Е.В. Некрасова¹, Д.А. Могиленко¹, Е.Е. Ларионова¹, С.В. Орлов^{1,3}, А.Д. Денисенко^{1,2}

¹ Институт экспериментальной медицины, отдел биохимии, 197376 Санкт-Петербург, Россия; электронная почта: dmitry.athero@gmail.com

² Санкт-Петербургский государственный университет, кафедра фундаментальных проблем медицины и медицинских технологий, 199034 Санкт-Петербург, Россия

³ Санкт-Петербургский государственный университет, кафедра эмбриологии, 199034 Санкт-Петербург, Россия

Поступила в редакцию 19.09.2022

После доработки 19.09.2022

Принята к публикации 06.10.2022

Адипонектин – гормон жировой ткани, регулирующий энергетический обмен и оказывающий влияние на атерогенез. Ранее было установлено, что адипонектин повышает экспрессию гена *APOA1* (аполипопротеин А-1) в гепатоцитах, однако механизмы этого влияния оставались неизученными. Целью работы было выяснить участие рецепторов адипонектина AdipoR1/R2, АМР-активируемой протеинкиназы (АМПК), ядерных рецепторов PPAR α (рецепторы активаторов пролиферации пероксисом-альфа) и LXR (печёночные X-рецепторы) в опосредовании действия адипонектина на экспрессию гена *APOA1* в гепатоцитах. Исследование проводили на клетках гепатомы человека HepG2. Уровень экспрессии гена *APOA1* определяли с помощью ОТ-ПЦР и ИФА. Выяснилось, что нокдаун генов, кодирующих AdipoR1/R2, АМПК, активирующую её киназу LKB-1 (печёночная киназа В1), а также ядерные рецепторы PPAR α и LXR, предотвращал индуцированную адипонектином экспрессию гена *APOA1* в клетках HepG2. В опытах с трансфекцией клеток HepG2 плазмидами было установлено, что активация адипонектином транскрипции гена *APOA1* зависит от взаимодействия PPAR α и LXR с сайтами А и С гепатоцитарного энхансера. Результаты данного исследования свидетельствуют об участии обоих типов рецепторов адипонектина, АМПК, PPAR α и LXR в регуляции адипонектином экспрессии гена *APOA1*.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: адипонектин, аполипопротеин А-1, гепатоциты, АМПК, ядерные рецепторы.

DOI: 10.31857/S0320972522110148, **EDN:** LWZAYX

ВВЕДЕНИЕ

Ожирение и обусловленные им расстройства, такие как инсулинорезистентность, дислипидемия, гипертензия (симптомокомплекс, именуемый метаболическим синдромом (МС)), являются одними из широко распространённых патогенетических факторов риска развития атеросклероза. Считается, что гормоны жировой ткани, или адипокины, участвуют в патогенезе МС и сердечно-сосу-

дистых заболеваний [1]. В отличие от большинства адипокинов, адипонектин обладает противовоспалительными свойствами, повышает инсулинчувствительность, уменьшает дислипидемию [1-4]. Согласно клиническим наблюдениям, содержание адипонектина в плазме положительно коррелирует с уровнем холестерина липопротеидов высокой плотности (ЛПВП) и отрицательно – с концентрацией триглицеридов в плазме [5, 6]. Указанная взаимосвязь между концентрациями в плазме ади-

Принятые сокращения: апоА-1 – аполипопротеин А-1; ЛПВП – липопротеины высокой плотности; миРНК – малые интерферирующие РНК; ОТ-ПЦР – ПЦР в реальном времени с обратной транскрипцией; AdipoR – рецепторы к адипонектину; AICAR – 5-аминоимдазол-4-карбоксамид рибонуклеотид; АМПК – АМР-активируемая протеинкиназа; HE – гепатоцитарный энхансер; HNF4 α – ядерный фактор гепатоцитов 4 α ; LKB-1 – печёночная киназа В1; LXR – печёночные X-рецепторы; PPAR α – рецепторы активаторов пролиферации пероксисом; TNF- α – фактор некроза опухолей.

* Адресат для корреспонденции.

понектина и холестерина ЛПВП, вероятно, обусловлена влиянием адипокина на метаболизм триглицеридов [4], в то время как воздействие адипонектина на выработку гепатоцитами аполипопротеина А-1 (апоА-1), основного белка ЛПВП, является спорным [2, 3] и требует дальнейшего изучения.

Продукция клетками апоА-1 определяется главным образом активностью транскрипции, которая регулируется взаимодействием транскрипционных факторов со специфическими сайтами в 5'-регуляторной области гена *APOA1*. Эта область, названная гепатоцитарным энхансером (HE, позиции -222... -110 п.н. относительно точки инициации транскрипции), состоит из трёх регуляторных участков: А (-214... -192), В (-169... -146) и С (-134... -119). Сайты А и С содержат консенсусные мотивы для связывания факторов транскрипции, принадлежащих к суперсемейству ядерных рецепторов. Рецепторы активаторов пролиферации пероксисом-альфа ($PPAR\alpha$) и ядерный фактор гепатоцитов 4 α (HNF4 α) активируют транскрипцию гена *APOA1*, взаимодействуя с сайтом А [7, 8]. Печёночные X-рецепторы (LXR α и LXR β) и $PPAR\gamma$ подавляют, в то время как HNF4 α повышает экспрессию гена *APOA1*, связываясь с сайтом С [7, 9, 10]. С сайтом В взаимодействуют FOXA2 (forkhead box protein A2), активатор транскрипции гена *APOA1* [11], и FOXO1, репрессор гена *APOA1* [12].

Ранее нами было показано, что фактор некроза опухоли альфа (TNF- α) и инсулин, концентрации которых повышены в плазме крови у пациентов с МС, оказывают влияние на экспрессию гена *APOA1* в гепатоцитах [13, 14]. TNF- α подавляет экспрессию гена *APOA1* в гепатоцитах, повышая связывание LXR β с сайтом С и снижая взаимодействие $PPAR\alpha$ с сайтом А HE [13]. Инсулин подавляет экспрессию гена *APOA1*, увеличивая связывание LXR α с сайтом С и уменьшая взаимодействие FOXA2 с сайтом В указанного регуляторного элемента [14].

Гепатоциты экспрессируют два типа рецепторов адипонектина, AdipoR1 и AdipoR2 [15], взаимодействующих с несколькими молекулярными формами адипонектина [16, 17]. AdipoR1 связывается с тримерным адипонектином, в то время как AdipoR2 взаимодействует с три-, гекса- и мультимерными формами адипокина [17]. Адипонектин, связываясь с AdipoR1, стимулирует АМР-активируемую протеинкиназу (АМРК), а после связывания с AdipoR2 активирует $PPAR\alpha$ -зависимые пути [18]. Не имея гомологии с рецепторами, связанными с G-белками, AdipoR1/2 передают

сигналы, взаимодействуя с адаптерным белком APPL1. Этот адаптер вызывает перемещение печёночной киназы В1 (LKB-1) из ядра в цитозоль, где LKB-1 фосфорилирует АМРК по остатку Thr-172, что приводит к активации фермента [19]. Механизм активации $PPAR\alpha$ адипонектином недостаточно изучен, но, по крайней мере, частично $PPAR\alpha$ может быть активирован посредством АМРК-зависимого фосфорилирования [20]. Активатор АМРК АICAR (5-аминоимидазол-4-карбоксамид рибонуклеотид) подавляет транскрипцию гена *APOA1* в гепатоцитах человека, вероятно, путём ингибирования экспрессии HNF4 α и его активности [21]. Поскольку АМРК, помимо HNF4 α , также регулирует активность $PPAR\alpha$ и LXR α [20, 22], его влияние на транскрипцию *APOA1* может быть сложным. Адипонектин ингибирует активность HNF4 α в гепатоцитах человека, но, в отличие от АICAR, его влияние на экспрессию гена *APOA1* в гепатоцитах не коррелирует с изменением уровня HNF4 α в данных клетках [3, 4].

Роль АМРК, $PPAR\alpha$ и LXR в активации адипонектином экспрессии гена *APOA1* в гепатоцитах на настоящий момент не изучена. Выяснение данного вопроса и является целью настоящего исследования. Некоторые предварительные данные о регуляции адипонектином продукции аполипопротеинов гепатоцитами были представлены нами ранее [23].

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Культура клеток. Клетки линии гепатомы человека HepG2 (ЦКП «Коллекция клеточных культур позвоночных» Института цитологии РАН) культивировали в среде DMEM с добавлением 4 мМ L-глутамин, 0,1 мг/мл гентамицина («Биолот», Россия) и 10%-ной (v/v) фетальной телячьей сыворотки (FCS) («HyClone», США) в 5%-ном CO₂ при 37 °С, как описано ранее [14]. Клетки высевали в 96-луночные планшеты с плотностью 1×10^4 клеток/см² и выращивали в полной среде в течение 2–3 дней до достижения субконфлуентности. Далее среду заменяли на среду без сыворотки с добавлением 10 либо 30 мкг/мл адипонектина (смесь три-, гекса- и мультимеров, рис. 1 Приложения, «Biovendor», Чехия, производитель – клетки линии HEK293), либо 1 мМ АICAR («Calbiochem», США), либо фосфатно-солевого буфера (PBS, «Биолот») и инкубировали 24 ч. После этого клетки снимали для определения экспрессии исследуемых генов и белка апоА-1.

Плазмиды. В экспериментах использовали следующие плазмидные конструкции: pCMV-lacZ, содержит последовательности промотора ранних генов цитомегаловируса человека и бактериального репортёрного гена β -галактозидазы *LacZ* [24]; pA1(-256/+72)-Luc (pA1-Luc), содержит репортёрный ген люциферазы светлячка под контролем HE (позиции от -256 до +72 относительно сайта инициации транскрипции гена *APOA1* человека) [25]; pA1-Luc с мутациями в сайтах A или C HE [10].

Трансфекция клеток и репортёрный анализ. Трансфекции клеток HepG2 плазмидными конструкциями осуществляли с использованием реагента Липофектамин-3000 («Thermo Fisher Scientific», США) в соответствии с инструкциями производителя. Клетки трансфицировали 420 нг нативной либо мутированной ДНК pA1-Luc на лунку 96-луночного планшета. Для контроля эффективности трансфекции клетки котрансфицировали 80 нг ДНК pCMV-lacZ на лунку. На следующий день среду заменяли на среду, не содержащую FCS, с добавлением 10 мкг/мл адипонектина или PBS на 24 ч. После этого клетки лизировали и определяли активность люциферазы [10] и β -галактозидазы [24] в клеточных экстрактах. Относительная активность люциферазы (%) рассчитывалась как отношение интенсивности света в течение 1 мин на 1 мг общего клеточного белка к значению данного показателя в контрольных клетках (100% в контрольных клетках). Концентрацию общего белка в клеточных лизатах определяли бицинхинониновым методом («Thermo Fisher Scientific»).

РНК-интерференция. МиРНК против *ADIPOR1*, *ADIPOR2* [15], *STK11* (LKB-1) [26] и *PRKAA1/2* (α 1- и α 2-субъединицы АМПК) [12] были приобретены у «Синтол» (Россия). МиРНК против *PPARA* (PPAR α) (sc-36307), *NR1H3* (LXR α) (sc-38828), *NR1H2* (LXR β) (sc-45316) и неспецифические контрольные олигонуклеотиды миРНК (sc-37007) были приобретены в «Santa Cruz Biotechnology» (США).

Трансфекции клеток HepG2 миРНК осуществляли с использованием реагента Липофектамин RNAiMAX («Invitrogen», США) в соответствии с рекомендациями производителя в течение 72 ч. В последние 24 ч трансфекции клетки инкубировали с добавлением 10 мкг/мл адипонектина, либо 1 мМ АICAR, либо PBS в условиях без сыворотки.

Выделение РНК и количественная ПЦР с обратной транскрипцией (ОТ-ПЦР). Общую РНК выделяли из клеток HepG2 с помощью реактива «TRI Reagent» («Ambion», США) в соответствии с протоколом производителя.

0,5–1 мкг РНК подвергали обратной транскрипции с использованием набора для обратной транскриптазы М-MLV («Promega», США) с добавлением праймеров dT16 («Синтол»). ОТ-ПЦР проводили, как описано ранее [10]. Праймеры и зонды для *APOA1*, *NR1H3*, *NR1H2*, *PPARA* [13], *ABCA1* [27], *ACTB* (β -актин) [28], *RPLP0*, *PPIA* (циклофилин А) [14], *PRKAA1* и *PRKAA2* [12] были описаны ранее. Праймеры для *G6PC1* (глюкозо-6-фосфатаза): 5'-CTCAACCTCGTCTTTAAGTGGAT-3', 5'-CCTGGTCCAGTCTCACAGGT-3'; *ADIPOR1*: 5'-CCTGGAAAATTTGACATATGGTTC-3', 5'-AGGCTCAGAGAAGGGTGTCA-3'; *ADIPOR2*: 5'-CGGGGAGTAAGAGCAGGAG-3', 5'-GGGCAGCTCCTGTGATGTAG-3'; *STK11*: 5'-TCTGACCTGCTGAAAGGGA-3', 5'-GTGCA GGTCCCTCCAAGTACG-3' были подобраны с использованием программы Primer3 (<https://primer3.ut.ee/>). Относительное содержание мРНК генов-мишеней нормировали на среднее геометрическое содержания мРНК референс-генов *RPLP0*, *PPIA* и *ACTB* и определяли методом $\Delta\Delta C_t$, принимая за 100% уровень экспрессии гена в группе контроля.

ИФА. Содержание апоА-1 в клетках HepG2 определяли методом сэндвич-ИФА, как описано ранее [29].

Статистика. Результаты представлены в виде средних значений \pm SEM (стандартная ошибка среднего) по меньшей мере 3–4 независимых экспериментов. Статистический анализ различий между сравниваемыми группами проводили с использованием непарного *t*-критерия Стьюдента, либо критерия Даннета для множественных сравнений. Различия считались статистически значимыми при $p < 0,05$. Статистические анализы выполняли с использованием программы Statistica 6.0 («StatSoft», США).

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Адипонектин стимулирует экспрессию гена *APOA1* в клетках HepG2 через HE. Ранее было показано, что адипонектин стимулирует экспрессию гена *APOA1* в клетках HepG2 [2, 4], но не в первичных гепатоцитах человека [3]. Согласно результатам нашего исследования, адипонектин вызывал повышение уровней мРНК *APOA1*, а также белка апоА-1 в клетках HepG2 (рис. 1, а, б). АICAR, активатор АМПК, также индуцировал увеличение содержания мРНК *APOA1* в этих клетках, в то время как оба агента снижали уровень мРНК *G6PC1*, их известной мишени [30] (рис. 1, а). При этом ни адипонектин, ни АМПК не оказывали влияния на со-

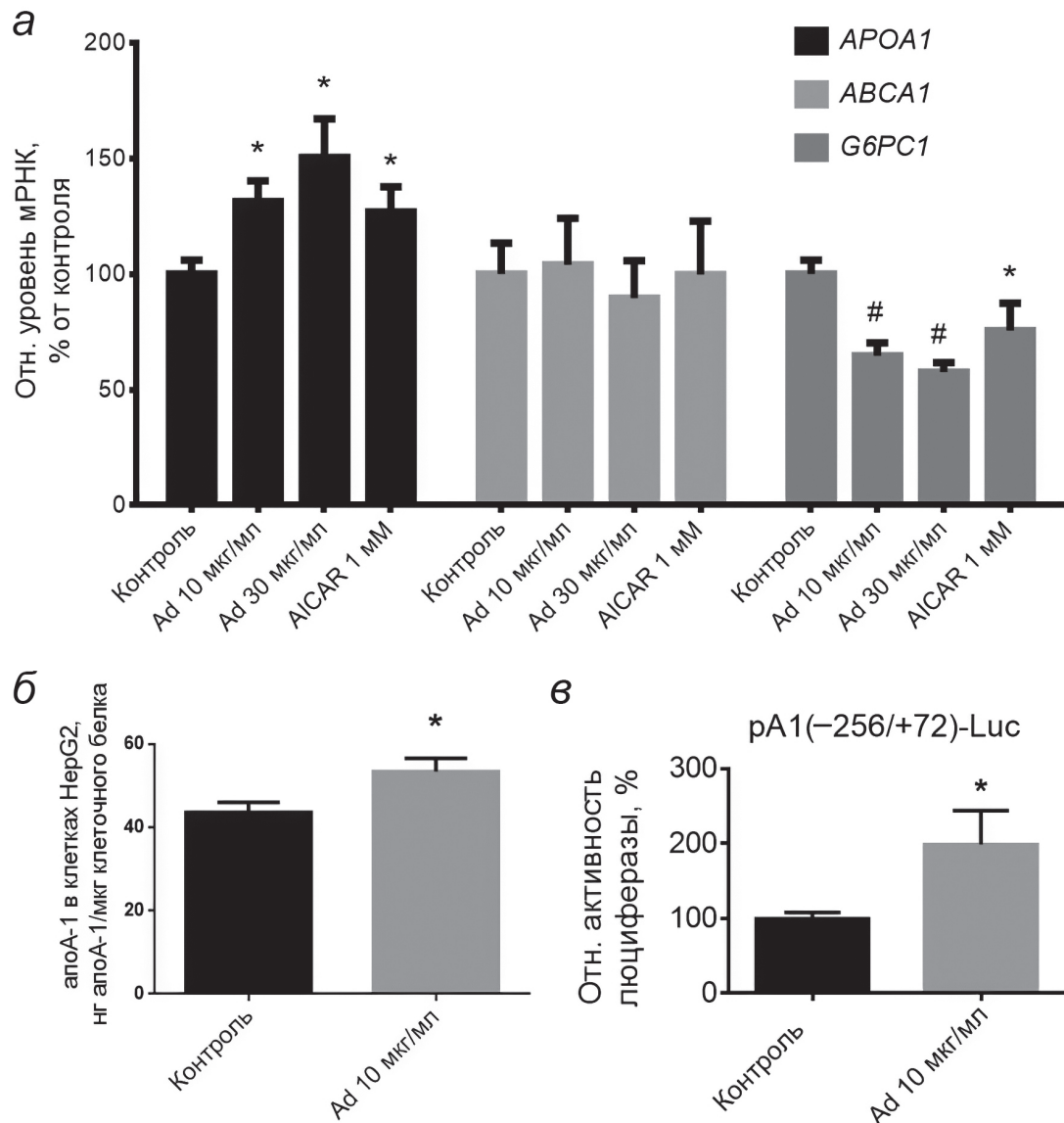


Рис. 1. Влияние адипонектина (Ad) на экспрессию гена *APOA1* в клетках HepG2. Клетки в бессывороточных условиях инкубировали в течение 24 ч с адипонектином либо с AICAR в указанных концентрациях. *а* – ОТ-ПЦР относительного содержания мРНК *APOA1*, *ABCA1* и *G6PC1*. Приведены средние \pm SEM ($n = 16-20$). * $p < 0,05$, # $p < 0,001$ по сравнению с контролем в соответствии с критерием Даннета. *б* – Содержание белка апоА-1 в клетках HepG2. Средние \pm SEM ($n = 7$). * $p < 0,05$ по сравнению с контрольными клетками в соответствии с *t*-критерием Стьюдента. *в* – Относительная активность люциферазы в клетках HepG2 после их трансфекции плазмидами, несущими гены люциферазы под контролем HE (pA1[–256/+72]). Средние \pm SEM ($n = 12$). * $p < 0,05$ по сравнению с контролем в соответствии с *t*-критерием Стьюдента

держание в клетках мРНК *ABCA1* (рис. 1, *а*), другого белка, участвующего в формировании ЛПВП, а также не влияли на активацию регуляторного элемента гена, кодирующего этот белок (рис. 2 Приложения).

Ранее нами было показано, что TNF- α и инсулин влияют на транскрипцию гена *APOA1* через HE, основной регуляторный элемент данного гена [13, 14]. Чтобы определить, действует ли адипонектин на экспрессию *APOA1* через указанный элемент, клетки HepG2 были трансфицированы плазмидами pA1(–256/+72)-Luc, несущими репортёрный

ген люциферазы под контролем HE. Было обнаружено, что адипонектин стимулировал экспрессию данного гена (рис. 1, *в*). В связи с этим мы предполагаем, что адипонектин увеличивает экспрессию гена *APOA1* на транскрипционном уровне, действуя через HE.

Роль рецепторов адипонектина, киназ LKB-1 и AMPK и ядерных рецепторов PPAR α , LXR α и LXR β в регуляции адипонектином экспрессии гена *APOA1*. Для идентификации сигнальных путей, принимающих участие в регуляции адипонектином транскрипции гена *APOA1*, мы использовали технологию РНК-интерференции.

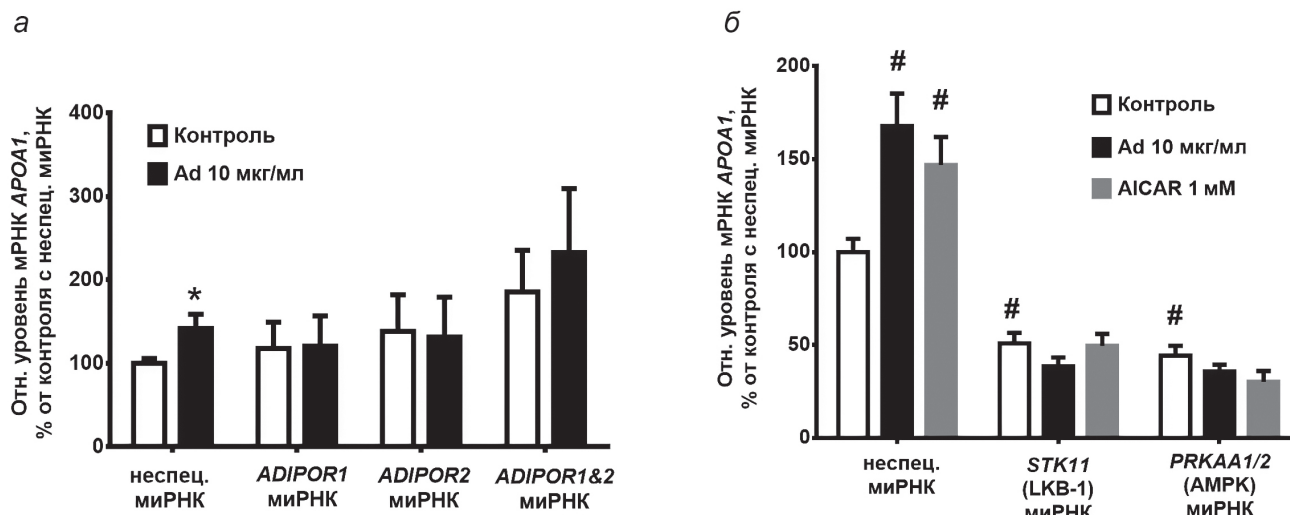


Рис. 2. Участие рецепторов адипонектина AdipoR1/R2 (а) и киназы LKB-1/AMPK (б) в стимуляции адипонектином экспрессии гена *APOA1* в клетках HepG2. Клетки трансфицировали смешанной либо специфической миРНК в течение 72 ч. Последние 24 ч клетки инкубировали с 10 мкг/мл адипонектина (Ad) либо с 1 мМ AICAR. Представлены результаты ОТ-ПЦР относительного содержания мРНК *APOA1*. Приведены средние \pm SEM ($n = 8$). * $p < 0,05$ по сравнению с контролем в соответствии с непарным *t*-критерием Стьюдента, # $p < 0,05$ по сравнению с контролем в соответствии с критерием Даннета

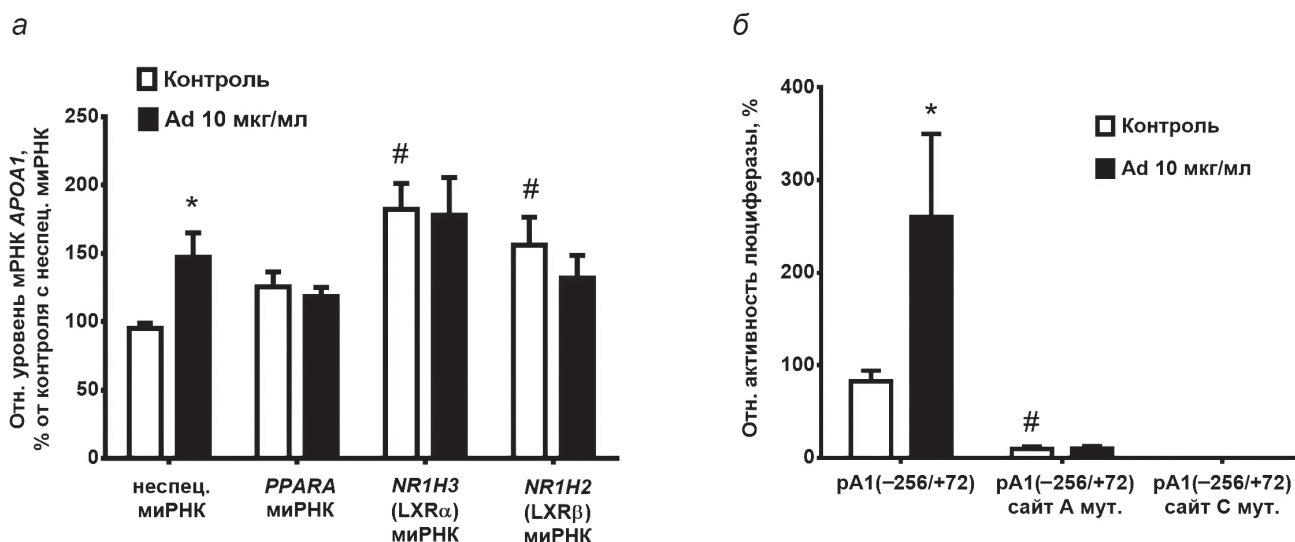


Рис. 3. Участие ядерных рецепторов PPAR α , LXR α и LXR β в стимуляции адипонектином экспрессии гена *APOA1* в клетках HepG2. Клетки трансфицировали миРНК к генам исследуемых рецепторов в течение 72 ч (а), либо плазмидами pA1(-256/+72), либо плазмидами pA1(-256/+72) с мутациями в сайте А, либо С в течение 48 ч (б). Последние 24 ч клетки инкубировали с 10 мкг/мл адипонектина. а – ОТ-ПЦР относительного содержания мРНК *APOA1*, б – относительная активность люциферазы. Приведены средние \pm SEM (а – $n = 8$, б – $n = 5$). Остальные обозначения как в подписи к рис. 2

Клетки HepG2 были трансфицированы либо смешанной неспецифической миРНК, либо миРНК против генов обоих типов рецепторов адипонектина, AdipoR1 и AdipoR2, и нижестоящих сигнальных молекул, таких как киназы LKB-1 и AMPK, а также ядерных рецепторов PPAR α и LXR. Нокдаун генов-мишеней был подтвержден методом ОТ-ПЦР (рис. 3 Приложения). Эффективность нокдауна некоторых генов (*PRKAA1*, *PRKAA2*, *PPARA*, *NR1H3* [12, 31], *NR1H2* [рис. 4 Приложения]) была подтверждена также методом Вестерн-блоттинга.

Нокдаун обоих типов рецепторов адипонектина не влиял на транскрипцию гена *APOA1* в клетках HepG2, но устранял влияние адипонектина на экспрессию данного гена (рис. 2, а). В связи с этим мы предполагаем, что адипонектин стимулирует экспрессию гена *APOA1* посредством взаимодействия адипокина с рецепторами обоого типа.

Нокдаун генов *PRKAA1* и *PRKAA2* (обеих каталитических субъединиц AMPK) и гена её вышестоящей киназы LKB-1 также приводил к отмене влияния адипонектина на экспрес-

сию гена *APOA1* (рис. 2, б). Более того, нокдаун обеих киназ вызывал значительное уменьшение экспрессии гена *APOA1* (рис. 2, б), что свидетельствует о важной роли AMPK в регуляции экспрессии данного гена и согласуется со стимулирующим действием AICAR на уровень мРНК *APOA1* (рис. 1, а и рис. 2, б). Последний эффект отменялся после нокдауна генов *STK11* (LKB-1) либо *PRKAA1/2* (рис. 2, б), что указывает на то, что влияние AICAR на транскрипцию гена *APOA1* являлось AMPK-зависимым.

Далее мы изучили роль ядерных рецепторов в регуляции адипонектином транскрипции гена *APOA1*. Нокдаун *PPARα*, *NR1H3* (LXRα) либо *NR1H2* (LXRβ) вызывал отмену влияния адипонектина на экспрессию *APOA1* (рис. 3, а). Повышение содержания мРНК *APOA1* после нокдауна обоих типов LXR может быть результатом удаления ингибирующего сигнала LXR на транскрипцию данного гена.

Чтобы выявить, опосредовано ли действие адипонектина на транскрипцию гена *APOA1* взаимодействием ядерных рецепторов с HE, мы трансфицировали клетки HepG2 плазмидами pA1 (-256/+72), в которых были произведены мутации сайта А либо сайта С. *PPARα* связывается с сайтом А [8], в то время как LXR связываются с сайтом С [9]. Трансфекция клеток HepG2 плазмидами, мутированными по сайту А, приводила к 10-кратному снижению экспрессии репортёрного гена и к отмене влияния адипонектина на его экспрессию, в то время как плазмиды с мутациями в сайте С были полностью лишены активности (рис. 3, б). Эти данные свидетельствуют о том, что влияние адипонектина на транскрипцию гена *APOA1* зависит от связывания *PPARα* и LXR с HE.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

В более ранних исследованиях было показано, что адипонектин стимулирует выработку апоА-1 и АВСА-1 (АТФ-связывающего кассетного транспортёра А1) в клетках HepG2 [2, 4], но эти результаты не подтверждались в первичных гепатоцитах человека [3]. Наблюдаемые расхождения могут объясняться различиями между типами клеток, концентрациями, источниками и молекулярными формами адипонектина. В нашем исследовании мы инкубировали клетки HepG2 с адипонектином, полученным из клеток HEK293, представляющим собой смесь мультимеров, гексамеров и тримеров (рис. 1 Приложения). По нашим данным, адипонектин как в высоких (30 мкг/мл), так и в умеренных (10 мкг/мл) концентрациях

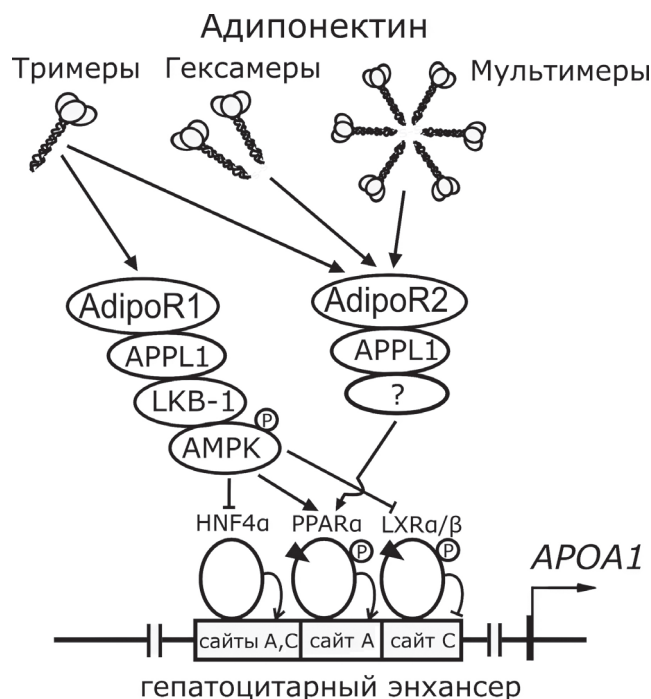


Рис. 4. Возможный механизм индуцированной адипонектином экспрессии гена *APOA1* в клетках HepG2. Взаимодействуя преимущественно с AdipoR1, тримеры адипонектина активируют киназу LKB-1 и далее AMPK. Ингибируя активность HNF4α, повышая активность *PPARα* (оба — активаторы HE) и ингибируя активность LXR (репрессоры гена *APOA1*), AMPK в итоге стимулирует активность HE. Связавшись с AdipoR2, все молекулярные формы адипонектина активируют *PPARα* по AMPK-независимому механизму. APPL1 — белковый адаптер, привлекающий сигнальные молекулы к AdipoRs. Стрелки обозначают сигналы активации, а линии с тупым концом — сигналы ингибирования. Заклочённый в окружность знак P обозначает фосфорилирование

повышал экспрессию гена *APOA1*, что сопровождалось увеличением содержания в клетках белка апоА-1. Эксперименты с РНК-интерференцией показали, что оба типа рецепторов, AdipoR1 и AdipoR2, опосредуют влияние адипонектина на экспрессию гена *APOA1*. Поскольку AdipoR1 преимущественно связывается с тримерными формами адипонектина, в то время как AdipoR2 взаимодействует с три-, гекса- и мультимерами [17], мы предполагаем, что все типы форм данного адипокина регулируют экспрессию гена *APOA1* (рис. 4).

AdipoR1 опосредует эффекты адипонектина, стимулируя AMPK через APPL-1-зависимое связывание и активацию киназы LKB-1 [18, 19]. Наши эксперименты с активацией (добавление AICAR) и ингибированием AMPK (РНК-интерференция) показывают, что влияние адипонектина на экспрессию гена *APOA1* в клетках HepG2 опосредуется участием данной киназы. Однако, вопреки

нашим наблюдениям, ранее было показано, что AICAR подавляет экспрессию гена *APOA1* в клетках HepG2 [21], но не в первичных гепатоцитах человека [32]. Возможно, итоговое влияние АМПК на транскрипцию гена *APOA1* является сложным и определяется действием киназы на активность различных активаторов (HNF4 α [21, 32], PPAR α [20]) и репрессоров (LXR α [22]) транскрипции этого гена. В целом наши результаты свидетельствуют о том, что адипонектин стимулирует экспрессию гена *APOA1* в клетках HepG2 через активацию АМПК.

Другим способом передачи сигналов адипонектина является активация PPAR α – путь, зависимый в основном от AdipoR2 [18]. Ранее мы показали, что TNF- α подавляет экспрессию гена *APOA1* в клетках HepG2 посредством активации LXR и ингибирования PPAR α [13]. В настоящем исследовании, используя трансфекции клеток HepG2 миРНК и плазмидными конструкциями, мы показали, что оба типа ядерных рецепторов участвуют в стимуляции адипонектином транскрипции гена *APOA1*. Активность PPAR α может быть увеличена путём АМПК-зависимого фосфорилирования, в то время как активность LXR α ингибируется при фосфорилировании этим ферментом [20, 22] (рис. 4). В свою очередь, активация АМПК адипонектином осуществляется через AdipoR1 [18]. Помимо указанного пути, в активации PPAR α также участвуют AdipoR2 [18]; механизм передачи данного сигнала остаётся неизвестным (рис. 4).

Таким образом, в настоящем исследовании впервые выяснен механизм, с помощью которого адипонектин повышает экспрессию гена *APOA1* в клетках HepG2. Показано, что влияние адипонектина на экспрессию гена *APOA1* опосредуется участием обоих типов адипонектиновых рецепторов, AdipoR1 и AdipoR2, активацией киназ LKB-1 и АМПК и взаимодействием PPAR α и LXR с сайтами А и С HE.

Вклад авторов. Д.А. Таянский, С.В. Орлов, А.Д. Денисенко – концепция и руководство работой; Д.А. Таянский, В.С. Шавва, Э.Б. Диде, Г.Н. Олейникова, А.В. Лизунов, Е.В. Некрасова, Д.А. Могиленко, Е.Е. Ларионова, С.В. Орлов – проведение экспериментов; Д.А. Таянский, В.С. Шавва, Д.А. Могиленко, С.В. Орлов, А.Д. Денисенко – обсуждение результатов исследования; Д.А. Таянский – написание текста; Д.А. Таянский, С.В. Орлов, А.Д. Денисенко – редактирование текста статьи.

Финансирование. Работа была частично поддержана Российским научным фондом (эксперименты с трансфекцией клеток миРНК и плазмидами, грант № 17-15-01326).

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

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

Дополнительные материалы. Приложение к статье опубликовано на сайте журнала «Биохимия» (<https://biochemistry.moscow.com>).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Berg, A. H., and Scherer, P. E. (2005) Adipose tissue, inflammation, and cardiovascular disease, *Circ. Res.*, **96**, 939-949, doi: 10.1161/01.RES.0000163635.62927.34.
2. Matsuura, F., Oku, H., Koseki, M., Sandoval, J.C., Yuasa-Kawase, M., et al. (2007) Adiponectin accelerates reverse cholesterol transport by increasing high density lipoprotein assembly in the liver, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **358**, 1091-1095, doi: 10.1016/j.bbrc.2007.05.040.
3. Neumeier, M., Siguener, A., Eggenhofer, E., Weigert, J., Weiss, T. S., et al. (2007) High molecular weight adiponectin reduces apolipoprotein B and E release in human hepatocytes, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **352**, 543-548, doi: 10.1016/j.bbrc.2006.11.058.
4. Qiao, L., Zou, C., van der Westhuyzen, D. R., and Shao, J. (2008) Adiponectin reduces plasma triglyceride by increasing VLDL triglyceride catabolism, *Diabetes*, **57**, 1824-1833, doi: 10.2337/db07-0435.
5. Tanyanskiy, D. A., Martynikhin, I. A., Rotar, O. P., Konradi, A. O., Sokolian, N. A., et al. (2015) Association of adipokines with metabolic disorders in patients with schizophrenia: results of comparative study with mental healthy cohort, *Diabetes Metab. Syndr.*, **9**, 163-167, doi: 10.1016/j.dsx.2015.04.009.
6. Tschritter, O., Fritsche, A., Thamer, C., Haap, M., Shirkavand, F., et al. (2003) Plasma adiponectin concentrations predict insulin sensitivity of both glucose and lipid metabolism, *Diabetes*, **52**, 239-243, doi: 10.2337/diabetes.52.2.239.
7. Malik, S., and Karathanasis, S. K. (1996) TFIIB-directed transcriptional activation by the orphan nuclear receptor hepatocyte nuclear factor 4, *Mol. Cell. Biol.*, **16**, 1824-1831, doi: 10.1128/mcb.16.4.1824.
8. Martin, G., Duez, H., Blanquart, C., Berezowski, V., Poulain, P., et al. (2001) Statin-induced inhibition of the Rho-signaling pathway activates PPARalpha and

- induces HDL apoA-I, *J. Clin. Invest.*, **107**, 1423-1432, doi: 10.1172/JCI10852.
9. Huuskonen, J., Vishnu, M., Chau, P., Fielding, P. E., and Fielding, C. J. (2006) Liver X receptor inhibits the synthesis and secretion of apolipoprotein A1 by human liver-derived cells, *Biochemistry*, **45**, 15068-15074, doi: 10.1021/bi061378y.
 10. Shavva, V. S., Mogilenko, D. A., Bogomolova, A. M., Nikitin, A. A., Dizhe, E. B., et al. (2016) PPAR γ represses apolipoprotein A-I gene but impedes TNF α -mediated ApoA-I downregulation in HepG2 Cells, *J. Cell. Biochem.*, **117**, 2010-2022, doi: 10.1002/jcb.25498.
 11. Harnish, D. C., Malik, S., Kilbourne, E., Costa, R., and Karathanasis, S. K. (1996) Control of apolipoprotein AI gene expression through synergistic interactions between hepatocyte nuclear factors 3 and 4, *J. Biol. Chem.*, **271**, 13621-13628, doi: 10.1074/jbc.271.23.13621.
 12. Shavva, V. S., Bogomolova, A. M., Nikitin, A. A., Dizhe, E. B., Oleinikova, G. N., et al. (2017) FOXO1 and LXR α downregulate the apolipoprotein A-I gene expression during hydrogen peroxide-induced oxidative stress in HepG2 cells, *Cell Stress Chaperones*, **22**, 123-134, doi: 10.1007/s12192-016-0749-6.
 13. Mogilenko, D. A., Dizhe, E. B., Shavva, V. S., Lapikov, I. A., Orlov, S. V., et al. (2009) Role of the nuclear receptors HNF4 alpha, PPAR alpha, and LXRs in the TNF alpha-mediated inhibition of human apolipoprotein A-I gene expression in HepG2 cells, *Biochemistry*, **48**, 11950-11960, doi: 10.1021/bi9015742.
 14. Shavva, V. S., Bogomolova, A. M., Nikitin, A. A., Dizhe, E. B., Tanyanskiy, D. A., et al. (2017) Insulin-mediated downregulation of apolipoprotein A-I gene in Human hepatoma cell line HepG2: the role of interaction between FOXO1 and LXR β transcription factors, *J. Cell. Biochem.*, **118**, 382-396, doi: 10.1002/jcb.25651.
 15. Wanninger, J., Neumeier, M., Weigert, J., Bauer, S., Weiss, T. S., et al. (2009) Adiponectin-stimulated CXCL8 release in primary human hepatocytes is regulated by ERK1/ERK2, p38 MAPK, NF-kappaB, and STAT3 signaling pathways, *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.*, **297**, G611-G618, doi: 10.1152/ajpgi.90644.2008.
 16. Waki, H., Yamauchi, T., Kamon, J., Ito, Y., Uchida, S., et al. (2003) Impaired multimerization of human adiponectin mutants associated with diabetes. Molecular structure and multimer formation of adiponectin, *J. Biol. Chem.*, **278**, 40352-40363, doi: 10.1074/jbc.M300365200.
 17. Yamauchi, T., Kamon, J., Ito, Y., Tsuchida, A., Yokomizo, T., et al. (2003) Cloning of adiponectin receptors that mediate antidiabetic metabolic effects, *Nature*, **423**, 762-769, doi: 10.1038/nature01705.
 18. Yamauchi, T., Nio, Y., Maki, T., Kobayashi, M., Takazawa, T., et al. (2007) Targeted disruption of AdipoR1 and AdipoR2 causes abrogation of adiponectin binding and metabolic actions, *Nat. Med.*, **13**, 332-339, doi: 10.1038/nm1557.
 19. Deepa, S. S., Zhou, L., Ryu, J., Wang, C., Mao, X., et al. (2011) APPL1 mediates adiponectin-induced LKB1 cytosolic localization through the PP2A-PKCzeta signaling pathway, *Mol. Endocrinol.*, **25**, 1773-1785, doi: 10.1210/me.2011-0082.
 20. Lee, J., Hong, S. W., Park, S. E., Rhee, E. J., Park, C. Y., et al. (2015) AMP-activated protein kinase suppresses the expression of LXR/SREBP-1 signaling-induced ANGPTL8 in HepG2 cells, *Mol. Cell. Endocrinol.*, **414**, 148-155, doi: 10.1016/j.mce.2015.07.031.
 21. Prieur, X., Schaap, F. G., Coste, H., and Rodríguez, J. C. (2005) Hepatocyte nuclear factor-4alpha regulates the human apolipoprotein AV gene: identification of a novel response element and involvement in the control by peroxisome proliferator-activated receptor-gamma coactivator-1alpha, AMP-activated protein kinase, and mitogen-activated protein kinase pathway, *Mol. Endocrinol.*, **19**, 3107-3125, doi: 10.1210/me.2005-0048.
 22. Hwang, S. H., Ki, S. H., Bae, E. J., Kim, H. E., and Kim, S. G. (2009) Role of adenosine monophosphate-activated protein kinase-p70 ribosomal S6 kinase-1 pathway in repression of liver X receptor-alpha-dependent lipogenic gene induction and hepatic steatosis by a novel class of dithiolethiones, *Hepatology*, **49**, 1913-1925, doi: 10.1002/hep.22887.
 23. Tanyanskiy, D. A., Dizhe, E. B., Oleinikova, G. N., Shavva, V. S., and Denisenko, A. D. (2021) Mechanisms of the influence of adiponectin on apolipoproteins A-1 and B production by human hepatocytes, *Med. Acad. J.*, **21**, 39-45, doi: 10.17816/MAJ62892.
 24. Dizhe, E. B., Ignatovich, I. A., Burov, S. V., Pohvosheva, A. V., Akifiev, B. N., et al. (2006) Complexes of DNA with cationic peptides: conditions of formation and factors effecting internalization by mammalian cells, *Biochemistry (Moscow)*, **71**, 1350-1356, doi: 10.1134/s0006297906120108.
 25. Lapikov, I. A., Mogilenko, D. A., Dizhe, E. B., Ignatovich, I. A., Orlov, S. V., et al. (2008) Ap1-like cis-elements in 5'-regulatory region of human apolipoprotein A-I gene, *Mol. Biol. (Mosk)*, **42**, 295-305, doi: 10.1134/S002689330802012X.
 26. Stahmann, N., Woods, A., Carling, D., and Heller, R. (2006) Thrombin activates AMP-activated protein kinase in endothelial cells via a pathway involving Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase kinase beta, *Mol. Cell. Biol.*, **26**, 5933-5945, doi: 10.1128/MCB.00383-06.
 27. Mogilenko, D. A., Shavva, V. S., Dizhe, E. B., Orlov, S. V., and Perevozchikov, A. P. (2010) PPAR γ activates ABCA1 gene transcription but reduces the level of ABCA1 protein in HepG2 cells, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **402**, 477-482, doi: 10.1016/j.bbrc.2010.10.053.

28. Mogilenko, D. A., Kudriavtsev, I. V., Trulioff, A. S., Shavva, V. S., Dizhe, E. B., et al. (2012) Modified low density lipoprotein stimulates complement C3 expression and secretion via liver X receptor and Toll-like receptor 4 activation in human macrophages, *J. Biol. Chem.*, **287**, 5954-5968, doi: 10.1074/jbc.M111.289322.
29. Tanyanskiy, D. A., Trulioff, A. S., Ageeva, E. V., Nikitin, A. A., Shavva, V. S., et al. (2021) The Influence of adiponectin on production of apolipoproteins A-1 and E by human macrophages, *Mol. Biol.*, **55**, 637-643, doi: 10.1134/S0026893321030122.
30. Miller, R. A., Chu, Q., Le Lay, J., Scherer, P. E., Ahima, R. S., et al. (2011) Adiponectin suppresses gluconeogenic gene expression in mouse hepatocytes independent of LKB1-AMPK signaling, *J. Clin. Invest.*, **121**, 2518-2528, doi: 10.1172/JCI45942.
31. Shavva, V. S., Bogomolova, A. M., Efremov, A. M., Trofimov, A. N., Nikitin, A. A., et al. (2018) Insulin downregulates C3 gene expression in human HepG2 cells through activation of PPAR γ , *Eur. J. Cell Biol.*, **97**, 204-215, doi: 10.1016/j.ejcb.2018.03.001.
32. Leclerc, I., Lenzner, C., Gourdon, L., Vaulont, S., Kahn, A., et al. (2001) Hepatocyte nuclear factor-4alpha involved in type 1 maturity-onset diabetes of the young is a novel target of AMP-activated protein kinase, *Diabetes.*, **50**, 1515-1521, doi: 10.2337/diabetes.50.7.1515.

ADIPONECTIN STIMULATES APOLIPOPROTEIN A-1 GENE EXPRESSION IN HepG2 CELLS VIA AMPK, PPAR-ALPHA, AND LXR SIGNALLING MECHANISMS

D. A. Tanyanskiy^{1,2*}, V. S. Shavva¹, E. B. Dizhe¹, G. N. Oleinikova¹, A. V. Lizunov^{1,3},
E. V. Nekrasova¹, D. A. Mogilenko¹, E. E. Larionova¹, S. V. Orlov^{1,3}, and A. D. Denisenko^{1,2}

¹ Department of Biochemistry, Institute of Experimental Medicine,
197376 St. Petersburg, Russia; e-mail: dmitry.athero@gmail.com

² Department of Fundamental Problems of Medicine and Medical Technologies, St. Petersburg State University,
199034 St. Petersburg, Russia

³ Department of Embryology, St. Petersburg State University, 199034 St. Petersburg, Russia

Adiponectin is an adipose tissue hormone, participating in energy metabolism and involving in atherogenesis. Previously, it was found that adiponectin increases the expression of the *APOA1* gene (apolipoprotein A-1) in hepatocytes, but the mechanisms of this effect remained unexplored. Our aim was to investigate the involvement of adiponectin receptors AdipoR1/R2, AMP-activated protein kinase (AMPK), and nuclear receptors peroxisome proliferator-activated receptor alpha (PPAR α) and liver X receptors (LXRs) in mediating of adiponectin action on hepatic *APOA1* gene expression. The human hepatoma HepG2 cells were used for this purpose. The expression level of *APOA1* was determined by using RT-PCR and ELISA. We showed that siRNA knockdown of genes coding AdipoR1 and AdipoR2, AMPK, PPAR α , and LXRs α and β prevented adiponectin-induced *APOA1* gene expression in HepG2 cells. Plasmids transfection studies revealed that interaction of PPAR α and LXRs with the *APOA1* gene hepatic enhancer is important for adiponectin-dependent *APOA1* gene transcription. The results of this study point out to the involvement of both types of adiponectin receptors, AMPK, PPAR α and LXRs in the adiponectin-dependent up-regulation of *APOA1* gene expression.

Keywords: adiponectin, apolipoprotein A-1, hepatocytes, AMPK, nuclear receptors

Spata2L ПОДАВЛЯЕТ TLR4-ОПОСРЕДОВАННЫЙ СИГНАЛЬНЫЙ ПУТЬ, СПОСОБСТВУЯ ДЕУБИКВИТИНИРОВАНИЮ TRAF6 И TAK1 ПРИ УЧАСТИИ CYLD

© 2022 Z. Zhang^{1,2#}, S. Zhang^{1,2#}, X. Jiang^{1,2#}, D. Wu^{1,2}, Y. Du³, X.-D. Yang^{1,2,4,5*}

¹ Shanghai Institute of Immunology, Shanghai Jiao Tong University School of Medicine, 200025 Shanghai, China; e-mail: xdyang@shsmu.edu.cn

² Department of Immunology and Microbiology, Shanghai Jiao Tong University School of Medicine, 200025 Shanghai, China

³ Department of Biochemistry and Molecular Cell Biology, Shanghai Jiao Tong University School of Medicine, 200025 Shanghai, China

⁴ The Research Center for Traditional Chinese Medicine, Shanghai Institute of Infectious Diseases and Biosecurity, Shanghai University of Traditional Chinese Medicine, 201203 Shanghai, China

⁵ Center for Traditional Chinese Medicine and Immunology Research, School of Basic Medical Sciences, Shanghai University of Traditional Chinese Medicine, 201203 Shanghai, China

Поступила в редакцию 02.02.2022

После доработки 13.07.2022

Принята к публикации 15.08.2022

Toll-подобный рецептор 4 (TLR4, Toll-like receptor) представляет собой ключевой рецептор распознавания паттерна (key pattern recognition), который может быть активирован бактериальным липополисахаридом (LPS) и вызвать воспалительный ответ. Для защиты организма от микробных инфекций необходима активация TLR4. Однако в связи с тем, что гиперактивация TLR4 также приводит к отрицательным последствиям и воспалительным процессам, процесс его активации должен контролироваться механизмами отрицательной регуляции, среди которых наиболее важным может быть деубиквитинирование ключевых сигнальных молекул, происходящее при участии деубиквитинирующих ферментов (DUB, deubiquitinating enzymes). Белок CYLD является членом семейства убиквитин-специфичных процессирующих протеаз (USP, ubiquitin-specific-processing protease) этих деубиквитинирующих ферментов и действует как ключевой негативный регулятор TLR4-зависимых воспалительных ответов, вызывая отщепление полиубиквитиновых цепей от сигнальных молекул, таких как белки TRAF6 и TAK1. Нарушение регуляции активности CYLD вносит существенный вклад в возникновение состояний, ассоциированных с воспалительными процессами. Однако остаются открытыми вопросы, касающиеся регуляции активности CYLD в процессе воспалительного ответа. Недавно нами и другими авторами было показано, что белок Spata2 функционирует как важный партнёр CYLD в регуляции его ферментативной активности и связывания субстратов. В настоящей работе нами было показано, что Spata2-подобный белок Spata2L может также образовывать комплекс с белком CYLD и ингибировать TLR4-зависимый воспалительный ответ. Нами было показано, что белок Spata2L конститутивно взаимодействует с CYLD, и что дефицит белка Spata2L усиливает индуцированную LPS активацию NF-κB и экспрессию генов провоспалительных цитокинов. Конкретно, белок Spata2L усиливал CYLD-опосредованное деубиквитинирование белков TRAF6 и TAK1, вероятно, путём повышения ферментативной активности CYLD. Полученные нами результаты свидетельствуют о том, что белок Spata2L является впервые выявленным регулятором активности CYLD, дают новые представления о регуляторных механизмах, лежащих в основе роли CYLD в TLR4-зависимой передаче сигнала, и предполагают возможные мишени для модуляции воспалительных процессов, индуцируемых TLR-4.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: воспаление, TLR4, деубиквитинирование, CYLD, Spata2L, Spata2.

DOI: 10.31857/S032097252211015X, **EDN:** LXAZUK

Принятые сокращения: BMDM – bone-marrow-derived macrophages, макрофаги из костного мозга; KO – нокаут; LPS – липополисахарид; TLR4 – Toll-like receptor 4, Toll-подобный рецептор 4; USP – ubiquitin-specific-processing protease, убиквитин-специфичная процессирующая протеаза; WT – wild type, дикий тип.

Авторы внесли равный вклад в работу.

* Адресат для корреспонденции.

ВВЕДЕНИЕ

Воспалительные реакции, опосредованные Toll-подобными рецепторами (TLR, Toll-like receptors), необходимы для борьбы с различными инфекциями и поддержания гомеостаза тканей. Их нарушение может вызывать тяжёлые и даже летальные последствия, такие как септический шок, воспаление кишечника, аутоиммунные заболевания и рак [1–5]. Патогены или продукты их жизнедеятельности, такие как липополисахарид (LPS, lipopolysaccharide), вызывают ряд воспалительных ответов путём активации различных TLR [1, 5]. Активация TLR4 приводит к запуску процесса образования сигнального комплекса и последующего рекрутирования E3-убиквитин-лигазы TRAF6, которая катализирует полиубиквитинирование соответствующих субстратных белков и самого белка TRAF6 [6–8]. В свою очередь, это полиубиквитинирование служит в качестве платформы для рекрутирования белка TAK1 и его активации через белки TAB2 (TAK1-связывающий белок 2, TAK1-binding protein 2) и TAB3, каждый из которых связывает цепи убиквитина [6, 9]. Кроме того, прямая конъюгация цепей убиквитина с белком TAK1 вносит вклад в активацию его каталитической активности [10–14], приводя к активации нижележащих IκB-киназ (IKK, IκB kinases) и митоген-активируемых белковых киназ (MAPK, mitogen-activated protein kinases), таких как p38 и JNK [15–17]. Активированные белки IKK фосфорилируют IκBα и вызывают его деградацию в протеасомах, тем самым высвобождая фактор транскрипции NF-κB в ядро, где он индуцирует экспрессию генов провоспалительных цитокинов, таких как *IL-1β*, *IL-6* и *TNFα* [18, 19]. Активированные белки MAPK индуцируют фактор транскрипции AP-1, который принимает участие в транскрипции провоспалительных цитокинов [13, 20, 21].

Процессу активации TLR4 путём полиубиквитинирования противодействует процесс деубиквитинирования, опосредованный деубиквитинирующими белками (DUB, deubiquitinating enzymes), что необходимо для поддержания баланса силы и продолжительности воспалительного ответа. Ключевым представителем белков DUB является CYLD. Он высвобождает активирующие цепи полиубиквитина из ключевых сигнальных молекул, таких как TRAF6 и TAK1 [22, 23], тем самым ослабляя TLR4-зависимую передачу сигнала. Хорошо известно, что нарушение регуляции CYLD имеет место при различных

воспалительных процессах, включая колит, экспериментальный аутоиммунный энцефаломиелит (EAE, experimental autoimmune encephalomyelitis) и полиартрит [15, 24, 25]. До сих пор остаётся открытым вопрос о том, как регулируется ферментативная активность CYLD, и как CYLD определяет различные белковые мишени в TLR4-зависимом сигнальном пути.

Недавно, чтобы выяснить механизм регуляции активности CYLD, нами был использован метод BioID (идентификация биотина, зависимость от близости, proximity-dependent biotin identification) для проведения скрининга CYLD-связывающих белков. В результате был идентифицирован белок Spata2 как партнёр CYLD, контролирующий внутриклеточную локализацию CYLD и его взаимодействие с субстратами в процессе активации инфламмосомы NLRP3 [26]. В ряде работ других авторов было показано, что белок Spata2 взаимодействует с CYLD, стимулируя его ферментативную активность и рекрутируя CYLD на сигнальный комплекс TNF-RSC рецептора TNFα (TNFR, TNFα receptor) после стимуляции TNFα. В этом плане комплекс Spata2 и CYLD служит в качестве важного регулятора гибели клеток, индуцированной TNFα [27–31]. Однако остаётся не выясненным, как регуляторная функция белка CYLD модулируется в TLR4-зависимом сигнальном пути.

Кроме белка Spata2, нами также был идентифицирован Spata2-подобный белок, Spata2L, который сильно взаимодействовал с CYLD при проведении скрининга белков с помощью метода BioID [26]. В настоящей работе нами было показано, что белок Spata2L, так же как и Spata2, взаимодействует с белком CYLD. Однако, в отличие от белка Spata2, Spata2L играет ключевую роль в регуляции TLR4-опосредованной передачи сигнала путём CYLD-опосредованного деубиквитинирования белков TAK1 и TRAF6. В целом наши данные указывают на белок Spata2L как на ранее не охарактеризованный регулятор воспалительного ответа с участием CYLD и TLR4 и дают новые представления о механизмах регуляции активности CYLD.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Мыши. Мыши с нокаутированным (KO) геном *Spata2L* были получены в Шанхайском центре модельных организмов (Shanghai Model Organisms Center, Inc.) с использованием метода CRISPR-Cas9. Вкратце, мРНК Cas9 и

направляющие РНК (gRNA), нацеленные на экзон 2 гена *Spata2L*, были интродуцированы с использованием метода электропорации в оплодотворённые яйцеклетки мышей C57BL/6J. Полученные эмбрионы были имплантированы самкам мышей с ложной беременностью. Полученные химеры были подвергнуты обратному скрещиванию с мышами линии C57BL/6J, и гетерозиготное потомство было генотипировано с помощью геномной ПЦР с использованием пары праймеров, окружающих целевой участок в направляющей РНК (прямой: GCTAAGCTGCCAAGGTCCCTAT, обратный: GTGAGACTACTTTGAGGACAGCCAT) с последующим секвенированием полученных в результате проведения ПЦР фрагментов. Мыши содержались в стерильных условиях на медицинском факультете университета имени Джяо Тона в Шанхае (Shanghai Jiao Tong University School of Medicine), и гетерозиготы были использованы для получения однопомётников дикого типа (WT, wild-type) и мышей *Spata2L* KO. Все протоколы экспериментов на мышах были одобрены комитетом по содержанию и использованию лабораторных животных медицинского факультета университета имени Джяо Тона в Шанхае.

Плазмиды и трансфекция. Плазмиды, кодирующие белки Spata2 и CYLD человека, были описаны ранее [26]. Плаزمида, кодирующая белок Spata2L человека с прикреплённым V5, поступила от «GE Dharmacon» (США). Конструкция, экспрессирующая белок Spata2L человека с прикреплённым тэгом Flag, была получена в результате клонирования с использованием метода ПЦР. Плазмиды, кодирующие белки NOIP (#50015), NOIL-1 (#50016) и Shapin (#50014) человека с тэгом Flag, были получены от «Addgene» (США). Плазмиды, содержащие белки TRAF6 и TAK1 человека, были любезно предоставлены доктором Шао-Конг Сунь (Shao-Cong Sun) из онкологического центра Андерсона, штат Мериленд (MD Anderson Cancer Center, США). При проведении трансфекции плазмид клетки НЕК293 рассевали в 6-ячеечные микропланшеты при плотности 8×10^5 клеток/ячейка. Трансфекцию проводили с использованием реагента для трансфекции Neofect transfection reagent («Neofect Biotech», Китай) в соответствии с инструкциями производителя, и через 36–48 ч после трансфекции клетки собирали для проведения последующих анализов.

Выделение макрофагов из костного мозга (BMDM, bone-marrow-derived macrophages) и их стимуляция. Клетки костного мозга были получены от мышей одного пола и возраста и далее

подвергнуты дифференцировке, как описано ранее [26]. Хорошо дифференцированные клетки BMDM были размещены в 12-ячеечной микропланшете в плотности 5×10^5 клеток на ячейку для последующей стимуляции LPS. При проведении экспериментов по экспрессии генов клетки в течение 4 ч были стимулированы добавлением 20 нг/мл LPS (L4391, «Sigma-Aldrich», США) и затем немедленно отобраны для получения препарата РНК. Для экспериментов по определению активации сигнальных путей с помощью иммуоблоттинга клетки подвергались стимулированию в течение различных периодов времени путём добавления 50 нг/мл LPS и немедленно после отбора были лизированы во льду для получения препаратов клеточного лизата.

Выделение РНК и количественная ПЦР в реальном времени (RT-qPCR). Препарат общей РНК получали с использованием набора RNeasy Mini Kit («Qiagen», США). Препарат кДНК из РНК получали с использованием набора PrimeScript RT Reagent Kit (RR037A, «TaKaRa», Япония). RT-qPCR выполнялась трижды с использованием набора SYBR Green Master Mix (A25918, «Applied Biosystems», США). Относительные показатели экспрессии каждого гена были нормализованы относительно экспрессии гена глицеральдегидфосфатдегидрогеназы (ГАФД) и представлены в виде кратной индукции. Праймеры, использованные для проведения RT-qPCR, были описаны в нашей предыдущей работе [26].

Иммуоблоттинг и иммуопреципитация. Были приготовлены лизаты клеток, которые далее были фракционированы с помощью метода электрофореза в ПААГ в присутствии SDS (SDS-PAGE) и иммуоблоттинга, как было описано ранее [26], с использованием следующих антител: CYLD (sc-74435, «Santa Cruz Biotechnology», США), тубулин (изготовлены в лаборатории), V5 (MA5-15253-HRP, «Thermo Fisher Scientific», США), HA (12013819001, «Roche», Швейцария), FLAG (F1804 или F7425, «Sigma-Aldrich»), IκBα (sc-371, «Santa Cruz Biotechnology»), фосфо-IκBα (2859S, «Cell Signaling», США), p38 (9212S, «Cell Signaling»), фосфо-p38 (9215S, «Cell Signaling»), JNK (sc-474, «Santa Cruz Biotechnology») и фосфо-JNK (9251, «Cell Signaling»). Для проведения иммуопреципитации лизаты трансфицированных клеток инкубировали с агарозными шариками с прикреплённым Flag (M2, A2220, «Sigma-Aldrich») при 4 °C в течение 2 ч. Шарики промывали 3 раза буфером для лизиса клеток и кипятили в двукратном буфере для образцов, содержащем SDS и используемом для прове-

дения SDS-PAGE и иммуноблоттинга. Иммунопреципитацию белков для определения степени их убиквитинирования проводили как было описано ранее [26]. Показаны результаты всех экспериментов (по крайней мере двух независимых повторов) с использованием иммунопреципитации и иммуноблоттинга. Количественную обработку полученных изображений результатов иммуноблоттинга проводили с использованием программы ImageJ 1.8.0.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

Spata2L обладает аминокислотной последовательностью, сходной со Spata2. Ранее, в результате проведения скрининга белков, взаимодействующих с CYLD, с помощью метода BioID нами был идентифицирован белок Spata2 как новый регулятор активности CYLD. Мы также обнаружили, что Spata2L является одним из высокодостоверных совпадений в этом скрининге [26]. Белок Spata2 состоит из *N*-концевого домена PUB и *C*-концевого домена В-box, разделённых участком (а.о. 212–356), взаимодействующим с белком HOIP [29]. Бе-

лок Spata2L имеет большое сходство с белком Spata2 в *N*-концевом домене PUB и немного меньшее сходство в *C*-концевом домене В-box (рис. S1 Приложения). В то же время, в средней части белок Spata2L отличается от белка Spata2, поскольку у него отсутствует ранее идентифицированный мотив PIM следующего состава: Asp-Leu-Tyr-Thr [29] (рис. S1 Приложения), который ответственен за взаимодействие с доменом PUB белка HOIP.

Spata2L конститутивно взаимодействует с белками CYLD и HOIP (аналогично белку Spata2). С использованием совместной иммунопреципитации нами было подтверждено взаимодействие белков Spata2L и CYLD. Наблюдалось сильное взаимодействие Spata2L с CYLD, как и в случае Spata2 (рис. 1, *a*), что согласуется со сходством их *N*-концевых PUB-доменов. Интересно, что, хотя средняя часть Spata2L отличается от мотива PIM, обнаруженного в Spata2, тем не менее Spata2L также может связываться с белком HOIP (рис. 1, *b*). Было убедительно продемонстрировано, что HOIP взаимодействует с HOIL-1 и Sharpin с образованием активной E3-лигазы, обозначаемой как LUBAC [32–34]. Однако белок

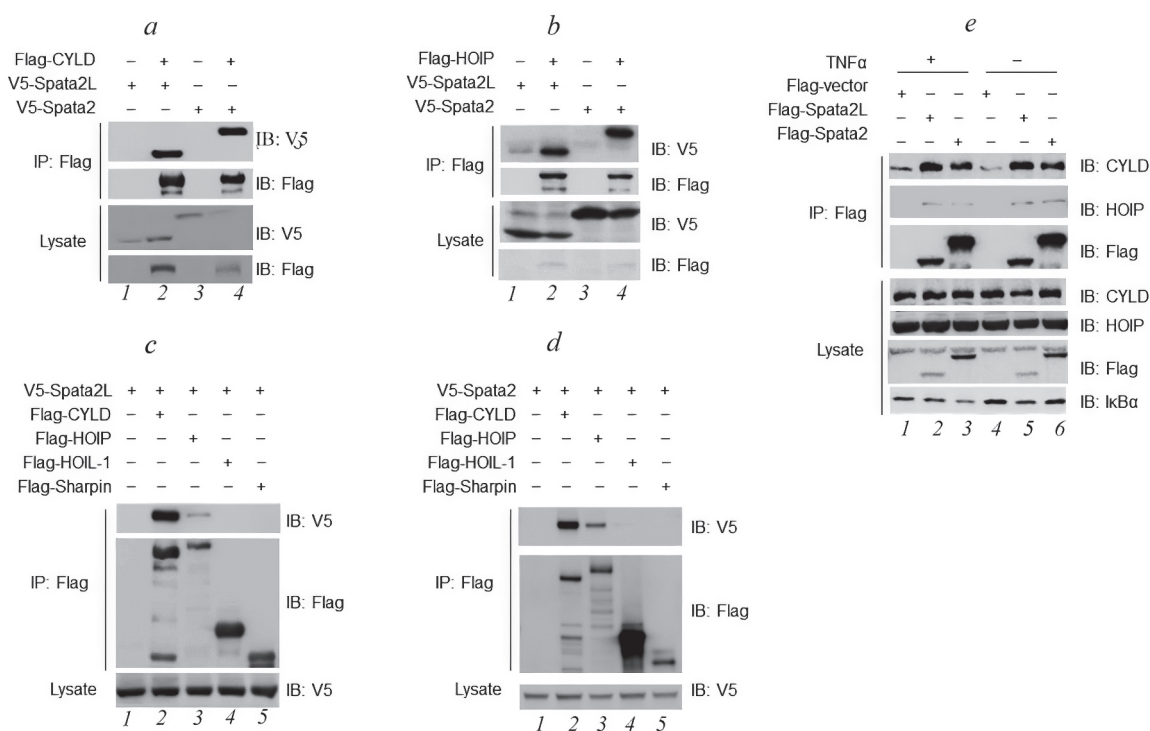


Рис. 1. Идентификация Spata2L как нового белка, взаимодействующего с CYLD. *a* и *b*) Клетки HEK293 были трансфицированы вышеупомянутыми плазмидами, и было проведено осаждение шариками с антителами против Flag (IP – иммунопреципитация). Также был проведён с использованием метода иммуноблоттинга (IB) анализ взаимодействий белка CYLD (*a*) или HOIP (*b*) с белками Spata2L и Spata2. *c*, *d*) IP-Анализ взаимодействий Spata2L (*c*) или Spata2 (*d*) с CYLD и субъединицами белка LUBAC, HOIP, HOIL-1 и Sharpin в трансфицированных клетках HEK293. *e*) IP-Анализ взаимодействий трансфицированных белков Spata2L или Spata2 с эндогенными белками CYLD или HOIP в клетках HEK293, стимулированных TNF α или не подвергшихся стимуляции. Представлены результаты экспериментов, проведённых независимо друг от друга, по крайней мере дважды. Представлены репрезентативные результаты

Spata2L не связывается с HOIP-1 или Sharpin (рис. 1, с), что указывает на высокую специфичность связывания с субъединицей HOIP из комплекса LUBAC, хотя и намного более слабого, чем с белком CYLD (рис. 1, с). Величины сродства связывания Spata2L с этими субъединицами LUBAC и белком CYLD были сходными с параметрами связывания белка Spata2 (рис. 1, d).

При проведении оценки взаимодействий белка Spata2L с эндогенными белками CYLD и HOIP при их стимуляции белком TNF α или в отсутствие такой стимуляции нами было установлено, что Spata2L взаимодействует сходным образом с эндогенными белками CYLD и HOIP как в нестимулированных клетках, так и в клетках, стимулированных белком TNF α (рис. 1, e, дорожки 2 и 5). Были выявлены конститутивные взаимодействия в парах Spata2L–CYLD и Spata2L–HOIP, напоминающие взаимодействия Spata2 с CYLD и HOIP (рис. 1, e, дорожки 3 и 6) [26, 29]. В целом данные по связыванию белков предполагают, что Spata2L и Spata2 могут иметь сходные и, вероятно, избыточные функции в регуляции процесса убиквитинирования белков с участием белков CYLD и LUBAC.

Дефицит белка Spata2L усиливал индуцированную LPS экспрессию генов провоспалительных цитокинов в первичных макрофагах. Чтобы изучить функции Spata2L *in vivo*, с помощью

системы редактирования генома CRISPR/Cas9 была получена линия мышей *Spata2L* KO, у которой делеция размером в 71 нуклеотид в экзоне 2 приводила к образованию преждевременного стоп-кодона, вызывающего терминацию трансляции на самом *N*-конце белка Spata2L (рис. 2, a–c). Мыши с дефицитом белка Spata2L рождались в ожидаемом менделевском соотношении, и их развитие до взрослого состояния протекало нормально. Это указывает на то, что белок Spata2L может быть необязательным для развития и роста в нормальных условиях.

Так как CYLD- и LUBAC-опосредованное убиквитинирование играет важную роль в регуляции TLR-зависимого воспалительного ответа, мы в первую очередь провели оценку LPS-индуцированной транскрипции провоспалительных цитокинов в первичных клетках BMDM, выделенных из мышей линии *Spata2L* KO и контрольных мышей WT из одного помёта. После стимуляции LPS в клетках WT происходило значительное повышение уровня мРНК провоспалительных цитокинов, включая IL-1 β , IL-6, IL-12 и TNF α . Интересно, что дефицит Spata2L в значительной степени усиливал индукцию этих цитокиновых генов (рис. 2, d).

Дефицит белка Spata2L усиливал LPS-индуцированную активацию NF- κ B в первичных макрофагах. Чтобы оценить влияние дефицита

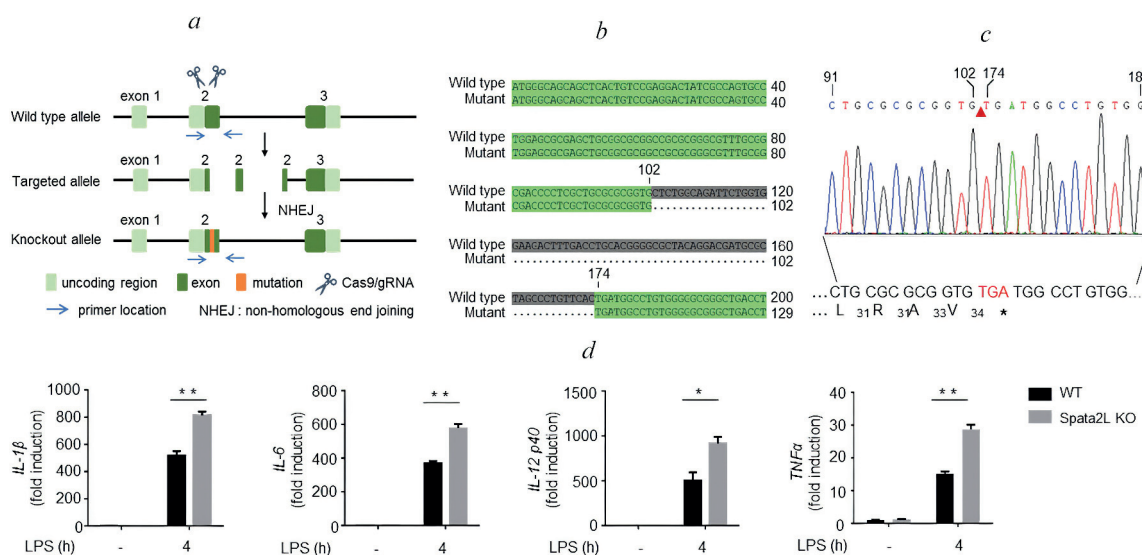


Рис. 2. Дефицит белка Spata2L усиливал экспрессию генов провоспалительных цитокинов, индуцированную LPS. a – Схематичное представление стратегии получения линии мышей *Spata2L* KO с использованием метода CRISPR/Cas9. b, c – Анализ мутантных мышей *Spata2L* KO. Выравнивание последовательностей продуктов ПЦР, амплифицированных из геномной ДНК, выделенной из мышей WT и гомозиготных мутантных мышей, показывает делецию 71 нуклеотида в мутантном аллеле (b). c – Результаты секвенирования и предсказанной трансляции мутантного аллеля; красный треугольник указывает положение делеции. d – BMDM-клетки WT и *Spata2L* KO либо не обрабатывались LPS, либо были стимулированы LPS в течение 4 ч, и транскрипция провоспалительных цитокинов была проанализирована с помощью метода RT-qPCR. Результаты представлены в виде среднего значения \pm стандартное отклонение; * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ при непарном двухвыборочном *t*-критерии Стьюдента

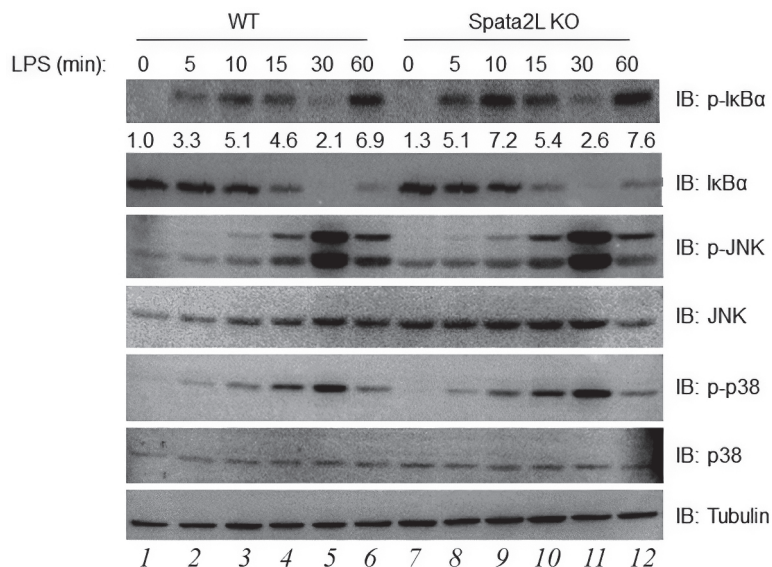


Рис. 3. Белок Spata2L имеет решающее значение для LPS-индуцированной активации NF-κB. Клетки BMDM, выделенные из мышей WT и линии *Spata2L* KO, были стимулированы LPS или не были им обработаны. Далее, эти клетки были использованы для приготовления клеточных лизатов для проведения анализа с помощью иммуноблоттинга фосфорилированной (p – phosphorylated) формы и общего белка в случае IκBα, JNK и p38. Представлены репрезентативные результаты двух независимых повторных экспериментов. Внизу показаны относительные уровни сигнала p-IκBα

Spata2L на TLR4-зависимую передачу сигнала, проводили стимуляцию клеток BMDM и изучали передачу сигнала, следующую после TLR4. Утрата белка Spata2L оказывала небольшой эффект или совсем не влияла на активацию фосфорилирования белков p38 и JNK, а фосфорилирование IκBα (ингибитор NF-κB), которое является этапом индукции в процессе активации NF-κB, немного повышалось в клетках *Spata2L* KO в сравнении с клетками WT (рис. 3). Эти результаты свидетельствуют о том, что белок Spata2L подавляет активацию NF-κB в TLR4-зависимом воспалительном ответе. В то же время ранее нами было показано, что дефицит белка Spata2 оказывает небольшое влияние или вообще не влияет на TLR4-зависимую передачу сигнала и экспрессию провоспалительных цитокинов [26]. В целом можно предположить, что белки Spata2L и Spata2, несмотря на их сходство в структуре и сродстве связывания с ферментами, участвующими в убиквитинировании белков, играют разные роли в регуляции TLR4-зависимого сигнального пути (рис. S1 Приложения и рис. 1).

Spata2L способствовал CYLD-опосредованному деубиквитинированию белков TRAF6 и TAK1. Хорошо известно, что белок CYLD необходим для удаления полиубиквитиновых цепей из молекул TRAF6 и TAK, чтобы предотвратить гиперактивацию сигнальных путей, опосредованных этими белками [22, 23]. Чтобы выяснить молекулярный механизм,

с помощью которого Spata2L осуществляет негативную регуляцию TLR4-зависимого воспалительного ответа, нами была проанализирована роль Spata2L в процессе CYLD-опосредованного деубиквитинирования TRAF6 и TAK1. Прикреплённый к эпителиальному участку (epitope-tagged) убиквитин и белки TRAF6 или TAK1 были совместно экспрессированы в клетках HEK293. Далее, белки TRAF6 или TAK1 были иммунопреципитированы для проведения анализа убиквитинирования. Эктопическая экспрессия убиквитина приводила к сильному полиубиквитинированию молекул TRAF6 и TAK1 (рис. 4, дорожки 1 и 5). Как и ожидалось, при совместной экспрессии белок CYLD взаимодействовал с белками TRAF6 и TAK1 и понижал уровни их полиубиквитинирования (рис. 4, дорожки 3 и 7). Вызывает особый интерес то, что дальнейшая совместная экспрессия Spata2L не влияла на взаимодействия CYLD с TRAF6 и TAK1, но отчётливо усиливала CYLD-опосредованное деубиквитинирование этих белков (рис. 4, дорожки 4 и 8). Эти результаты позволяют предположить важную роль белка Spata2L в модуляции деубиквитинирующей активности белка CYLD в отношении полиубиквитинированных белков TRAF6 и TAK1. Неудивительно, что экспрессия Spata2L в отсутствие CYLD также вызывала снижение уровня полиубиквитинирования TRAF6 и TAK1 (рис. 4, дорожки 2 и 6), вероятно, стимулируя деубиквитиназную активность эндогенного белка CYLD.

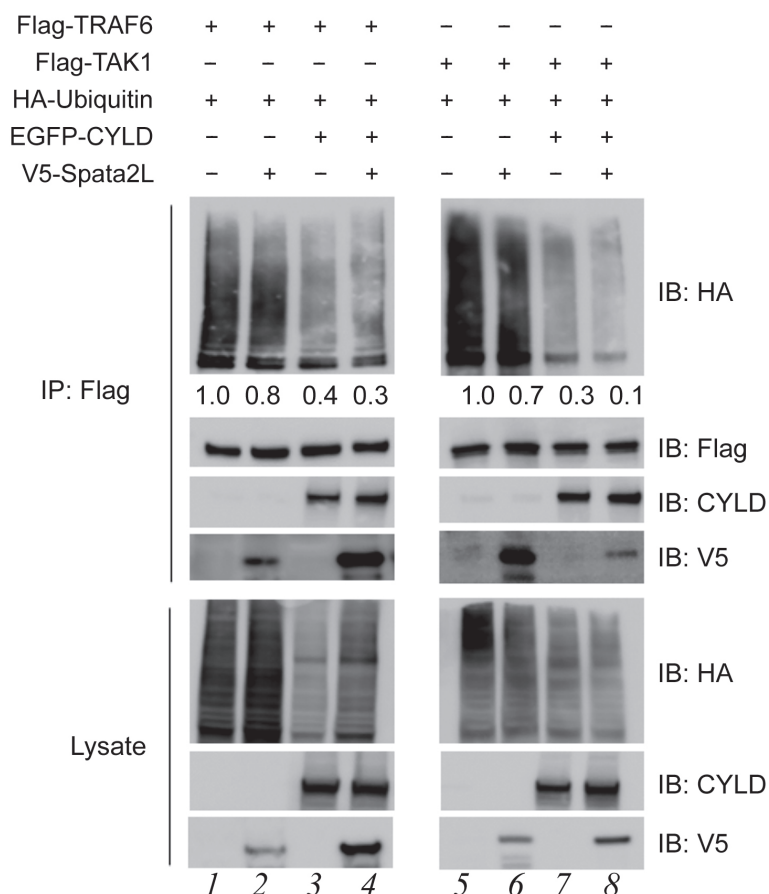


Рис. 4. Spata2L способствовал CYLD-опосредованному деубиквитинированию белков TRAF6 и TAK1. Клетки HEK293 трансфицировали вышеупомянутыми плазмидами с белками TRAF6 и TAK1 с прикреплённым Flag и затем осаждали с помощью шариков с антителами против Flag для проведения анализа степени убиквитинирования с помощью иммуноблоттинга (IB: HA) и определения их взаимодействий с белками CYLD (IB: CYLD) или Spata2L (IB: V5). Представлены результаты трёх экспериментов, выполненных независимо друг от друга. Внизу представлены относительные величины уровня сигнала убиквитинирования

Важно, что Spata2L-опосредованное повышение активности CYLD оказалось специфичным, поскольку Spata2L оказывал незначительное воздействие на процесс стабилизации репрессора транскрипции Snail белком USP37, одной из деубиквитиназ, которые мы ранее идентифицировали в качестве стабилизаторов белка Snail (рис. S2 Приложения) [35].

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Белки CYLD с деубиквитиназной активностью широко признаны в качестве основных регуляторов иммунных и воспалительных ответов и возможных мишеней для действия лекарств при лечении расстройств иммунной системы и рака [36, 37]. Понимание механизма функционирования и регуляции активности белка CYLD было бы полезно для разработки лекарств для лечения заболеваний человека. В ряде работ, включая наши, Spata2L был

идентифицирован как белок, взаимодействующий с CYLD [26, 29, 38]. Однако функции белка Spata2L до сих пор оставались невыясненными. В настоящей работе нами впервые были получены свидетельства о взаимодействии этого белка с CYLD и субъединицами LUBAC и изучена его ключевая роль в модуляции TLR4-зависимого сигнального пути и воспалительных ответов через регуляцию CYLD-опосредованного деубиквитинирования белков TRAF6 и TAK1.

Как основной негативный регулятор воспалительных ответов, белок CYLD сам должен регулироваться соответствующим образом. Было показано, что активность CYLD регулируется путем посттрансляционных модификаций, таких как фосфорилирование и убиквитинирование [22]. Появляется все больше свидетельств о том, что белок CYLD распознает некоторые из своих субстратов не напрямую, а через адапторные белки, из которых лучше всех изучен белок Spata2 [26–30]. Spata2

взаимодействует с белками CYLD и HOIP, рекрутирует CYLD на комплекс TNF–RSC и NOD2–SC в HOIP-зависимой манере и нацелен на полиубиквитинированные белки, присутствующие в этих комплексах (например, RIPK1 и RIPK2) [27–30]. Кроме того, Spata2 может выступать в качестве аллостерического активатора деубиквитирующей активности белка CYLD [29, 30].

В настоящей работе нами было показано, что подобно Spata2, белок Spata2L связывается и с CYLD, и с HOIP. Это позволяет предположить, что Spata2L также может рекрутировать CYLD на белковые комплексы TNF–RSC и NOD2–SC путём взаимодействия с белком HOIP, и, следовательно, он может быть вовлечён в TNFR- и NOD2-опосредованные пути передачи сигнала. Иными словами, белки Spata2 и Spata2L могут быть избыточными в регуляции этих сигнальных путей. Однако было обнаружено, что утрата только белка Spata2 полностью предотвращала рекрутирование белка CYLD на комплекс TNF–RSC в клетках U2OS, что указывает на то, что Spata2L может быть необязательным для этого процесса [29]. Кроме того, в нашей недавней работе было показано, что, в отличие от недостатка Spata2L, дефицит белка Spata2 не влияет на процесс активации NF-κB и экспрессию провоспалительных цитокинов в первичных BMDM. В целом эти результаты свидетельствуют против идеи о функциональной избыточности белков Spata2 и Spata2L и благоприятствуют возможности того, что эти белки выполняют различные функции в зависимости от типа клеток или соответствующего контекста. Для проверки этих предположений нужны дополнительные исследования.

В структурных исследованиях было показано, что Spata2 и OTULIN связываются с доменом PUB белка HOIP через консервативный мотив PIM, а замена в этом мотиве консервативных аминокислотных остатков приводит к значительному снижению степени связывания Spata2 с HOIP, но не сказывается на его взаимодействии с CYLD [29], что предполагает высокий уровень консервативности аминокислотной последовательности мотива PIM. Фрагмент белка в Spata2L отличается от соответствующего мотива PIM в Spata2, и в нём отсутствуют предположительно имеющие большее значение аминокислотные остатки. Тем не менее белок Spata2L связывается с HOIP так же сильно, как и Spata2. Это очевидное несоответствие указывает на то, что может потребоваться пересмотр роли консервативной последовательности PIM в различных белках.

Кроме того, сильное взаимодействие Spata2L с белком HOIP приводит к предположению о том, что Spata2L может играть роль в регуляции активности HOIP в контексте вовлечения этой E3-лигазы. Требуются дополнительные исследования физиологической и патологической значимости взаимодействия этих двух белков.

Дефицит белка Spata2L способствовал TLR4-зависимой передаче сигнала *in vitro*. Представляет интерес изучение *in vivo* функции белка Spata2L в TLR4-индуцированном воспалении с использованием мышиных моделей. Также, поскольку CYLD играет важную роль в регуляции гибели клеток, активации T- и B-клеток и противовирусном врождённом иммунитете, остаётся прояснить, вовлечён ли и Spata2L в регуляцию этих процессов [22, 24].

В заключение, наша работа открывает дверь к пониманию роли белка Spata2L в воспалительном ответе и может привлечь внимание к этой области исследований. Полученные нами результаты показывают, что белок Spata2L является ранее не охарактеризованным регулятором TLR4-зависимой передачи сигнала, предлагают новое механистическое понимание регуляции активности и функций белка CYLD и могут предложить новые потенциальные терапевтические мишени для лечения воспалительных заболеваний.

Вклад авторов. X.-D. Yang – разработка проекта; Z. Zhang и S. Zhang – проведение экспериментов; X. Jiang, D. Wu и Y. Du – участие в проведении экспериментов; Z. Zhang, X. Jiang и X.-D. Yang – анализ полученных результатов и подготовка текста статьи; X.-D. Yang – руководство проектом.

Финансирование. Эта работа была выполнена при грантовой поддержке Национальной программы ключевых исследований и разработок Китая (2021YFA1301400), Основного проекта поддержки науки и технологий муниципалитета г. Шанхай (ZD2021CY001), Национального фонда естественных наук Китая (31770818) и Шанхайской комиссии по науке и технологиям (21ZR1456300).

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов в финансовой или какой-либо иной сфере.

Соблюдение этических норм. Были соблюдены все международные, национальные и институциональные рекомендации по уходу и использованию животных.

Дополнительные материалы. Приложение к статье опубликовано на английском языке на сайте издательства Springer (<https://link.springer.com/article/10.1134/S0006297922090085>).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Hennessy, E. J., Parker, A. E., and O'Neill, L. A. (2010) Targeting Toll-like receptors: emerging therapeutics, *Nat. Rev. Drug Discov.*, **9**, 293-307, doi: 10.1038/nrd3203.
2. Netea, M. G., Wijmenga, C., and O'Neill, L. A. (2012) Genetic variation in Toll-like receptors and disease susceptibility, *Nat. Immunol.*, **13**, 535-542, doi: 10.1038/ni.2284.
3. Murray, P. J., and Smale, S. T. (2012) Restraint of inflammatory signaling by interdependent strata of negative regulatory pathways, *Nat. Immunol.*, **13**, 916-924, doi: 10.1038/ni.2391.
4. Caballero, S., and Pamer, E. G. (2015) Microbiota-mediated inflammation and antimicrobial defense in the intestine, *Annu. Rev. Immunol.*, **33**, 227-256, doi: 10.1146/annurev-immunol-032713-120238.
5. Fitzgerald, K. A., and Kagan, J. C. (2020) Toll-like receptors and the control of immunity, *Cell*, **180**, 1044-1066, doi: 10.1016/j.cell.2020.02.041.
6. Chen, Z. J. (2012) Ubiquitination in signaling to and activation of IKK, *Immunol. Rev.*, **246**, 95-106, doi: 10.1111/j.1600-065X.2012.01108.x.
7. Adhikari, A., Xu, M., and Chen, Z. J. (2007) Ubiquitin-mediated activation of TAK1 and IKK, *Oncogene*, **26**, 3214-3226, doi: 10.1038/sj.onc.1210413.
8. Carpenter, S., and O'Neill, L. A. (2009) Recent insights into the structure of Toll-like receptors and post-translational modifications of their associated signalling proteins, *Biochem. J.*, **422**, 1-10, doi: 10.1042/bj20090616.
9. Xia, Z. P., Sun, L., Chen, X., Pineda, G., Jiang, X., et al. (2009) Direct activation of protein kinases by unanchored polyubiquitin chains, *Nature*, **461**, 114-119, doi: 10.1038/nature08247.
10. Reiley, W. W., Jin, W., Lee, A. J., Wright, A., Wu, X., et al. (2007) Deubiquitinating enzyme CYLD negatively regulates the ubiquitin-dependent kinase Tak1 and prevents abnormal T cell responses, *J. Exp. Med.*, **204**, 1475-1485, doi: 10.1084/jem.20062694.
11. Thiefes, A., Wolf, A., Doerrie, A., Grassl, G. A., Matsumoto, K., et al. (2006) The *Yersinia enterocolitica* effector YopP inhibits host cell signalling by inactivating the protein kinase TAK1 in the IL-1 signalling pathway, *EMBO Rep.*, **7**, 838-44, doi: 10.1038/sj.embor.7400754.
12. Lamb, A., Yang, X. D., Tsang, Y. H., Li, J. D., Higashi, H., et al. (2009) Helicobacter pylori CagA activates NF-kappaB by targeting TAK1 for TRAF6-mediated Lys 63 ubiquitination, *EMBO Rep.*, **10**, 1242-1249, doi: 10.1038/embor.2009.210.
13. Fan, Y., Yu, Y., Shi, Y., Sun, W., Xie, M., et al. (2010) Lysine 63-linked polyubiquitination of TAK1 at lysine 158 is required for tumor necrosis factor alpha- and interleukin-1beta-induced IKK/NF-kappaB and JNK/AP-1 activation, *J. Biol. Chem.*, **285**, 5347-5360, doi: 10.1074/jbc.M109.076976.
14. Li, Q., Yan, J., Mao, A. P., Li, C., Ran, Y., et al. (2011) Tripartite motif 8 (TRIM8) modulates TNFalpha- and IL-1beta-triggered NF-kappaB activation by targeting TAK1 for K63-linked polyubiquitination, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **108**, 19341-19346, doi: 10.1073/pnas.1110946108.
15. Zandi, E., Rothwarf, D. M., Delhase, M., Hayakawa, M., and Karin, M. (1997) The IkappaB kinase complex (IKK) contains two kinase subunits, IKKalpha and IKKbeta, necessary for IkappaB phosphorylation and NF-kappaB activation, *Cell*, **91**, 243-252, doi: 10.1016/s0092-8674(00)80406-7.
16. Wang, C., Deng, L., Hong, M., Akkaraju, G. R., Inoue, J., et al. (2001) TAK1 is a ubiquitin-dependent kinase of MKK and IKK, *Nature*, **412**, 346-351, doi: 10.1038/35085597.
17. Israëli, A. (2010) The IKK complex, a central regulator of NF-kappaB activation, *Cold Spring Harb Perspect. Biol.*, **2**, a000158, doi: 10.1101/cshperspect.a000158.
18. Silverman, N., and Maniatis, T. (2001) NF-kappaB signaling pathways in mammalian and insect innate immunity, *Genes Dev.*, **15**, 2321-42, doi: 10.1101/gad.909001.
19. Kawai, T., and Akira, S. (2007) Signaling to NF-kappaB by Toll-like receptors, *Trends Mol. Med.*, **13**, 460-469, doi: 10.1016/j.molmed.2007.09.002.
20. Yu, Y., Ge, N., Xie, M., Sun, W., Burlingame, S., et al. (2008) Phosphorylation of Thr-178 and Thr-184 in the TAK1 T-loop is required for interleukin (IL)-1-mediated optimal NFkappaB and AP-1 activation as well as IL-6 gene expression, *J. Biol. Chem.*, **283**, 24497-24505, doi: 10.1074/jbc.M802825200.
21. Mao, R., Fan, Y., Mou, Y., Zhang, H., Fu, S., et al. (2011) TAK1 lysine 158 is required for TGF-beta-induced TRAF6-mediated Smad-independent IKK/NF-kappaB and JNK/AP-1 activation, *Cell. Signal.*, **23**, 222-227, doi: 10.1016/j.cellsig.2010.09.006.
22. Sun, S. C. (2010) CYLD: a tumor suppressor deubiquitinase regulating NF-kappaB activation and diverse biological processes, *Cell Death Differ.*, **17**, 25-34, doi: 10.1038/cdd.2009.43.
23. Rothschild, D. E., McDaniel, D. K., Ringel-Scaia, V. M., and Allen, I. C. (2018) Modulating inflammation through the negative regulation of NF-kappaB signaling, *J. Leukoc. Biol.*, doi: 10.1002/jlb.3mir0817-346rrr.
24. Lork, M., Verhelst, K., and Beyaert, R. (2017) CYLD, A20 and OTULIN deubiquitinases in NF-kappaB signaling and cell death: so similar, yet so different, *Cell Death Differ.*, **24**, 1172-1183, doi: 10.1038/cdd.2017.46.
25. Mathis, B. J., Lai, Y., Qu, C., Janicki, J. S., and Cui, T. (2015) CYLD-mediated signaling and diseases, *Curr. Drug Target*, **16**, 284-294, doi: 10.2174/1389450115666141024152421.
26. Yang, X. D., Li, W., Zhang, S., Wu, D., Jiang, X., et al. (2020) PLK4 deubiquitination by Spata2-CYLD suppresses NEK7-mediated NLRP3 inflammasome

- activation at the centrosome, *EMBO J.*, **39**, e102201, doi: 10.15252/embj.2019102201.
27. Kupka, S., De Miguel, D., Draber, P., Martino, L., Surinova, S., et al. (2016) SPATA2-mediated binding of CYLD to HOIP enables CYLD recruitment to signaling complexes, *Cell Rep.*, **16**, 2271-80, doi: 10.1016/j.celrep.
 28. Wagner, S. A., Satpathy, S., Beli, P., and Choudhary, C. (2016) SPATA2 links CYLD to the TNF- α receptor signaling complex and modulates the receptor signaling outcomes, *EMBO J.*, **35**, 1868-1884, doi: 10.15252/embj.201694300.
 29. Elliott, P. R., Leske, D., Hrdinka, M., Bagola, K., Fiil, B. K., et al. (2016) SPATA2 links CYLD to LUBAC, activates CYLD, and controls LUBAC signaling, *Mol. Cell*, **63**, 990-1005, doi: 10.1016/j.molcel.2016.08.001.
 30. Schlicher, L., Wissler, M., Preiss, F., Brauns-Schubert, P., Jakob, C., et al. (2016) SPATA2 promotes CYLD activity and regulates TNF-induced NF- κ B signaling and cell death, *EMBO Rep.*, **17**, 1485-1497, doi: 10.15252/embr.201642592.
 31. Wei, R., Xu, L. W., Liu, J., Li, Y., Zhang, P., et al. (2017) SPATA2 regulates the activation of RIPK1 by modulating linear ubiquitination, *Genes Dev.*, **31**, 1162-1176, doi: 10.1101/gad.299776.117.
 32. Tokunaga, F., Sakata, S., Saeki, Y., Satomi, Y., Kirisako, T., et al. (2009) Involvement of linear polyubiquitylation of NEMO in NF-kappaB activation, *Nat. Cell Biol.*, **11**, 123-132, doi: 10.1038/ncb1821.
 33. Tokunaga, F., Nakagawa, T., Nakahara, M., Saeki, Y., Taniguchi, M., et al. (2011) SHARPIN is a component of the NF- κ B-activating linear ubiquitin chain assembly complex, *Nature*, **471**, 633-636, doi: 10.1038/nature09815.
 34. Emmerich, C. H., Schmukle, A. C., and Walczak, H. (2011) The emerging role of linear ubiquitination in cell signaling, *Sci. Signal.*, **4**, re5, doi: 10.1126/scisignal.2002187.
 35. Qian, W., Li, Q., Wu, X., Li, W., Li, Q., et al. (2020) Deubiquitinase USP29 promotes gastric cancer cell migration by cooperating with phosphatase SCP1 to stabilize Snail protein, *Oncogene*, **39**, 6802-6815, doi: 10.1038/s41388-020-01471-0.
 36. Lopez-Castejon, G., and Edelmann, M. J. (2016) Deubiquitinases: novel therapeutic targets in immune surveillance, *Mediators Inflamm.*, **2016**, 3481371, doi: 10.1155/2016/3481371.
 37. Harrigan, J. A., Jacq, X., Martin, N. M., and Jackson, S. P. (2018) Deubiquitylating enzymes and drug discovery: emerging opportunities, *Nat. Rev. Drug Discov.*, **17**, 57-78, doi: 10.1038/nrd.2017.152.
 38. Sowa, M. E., Bennett, E. J., Gygi, S. P., and Harper, J. W. (2009) Defining the human deubiquitinating enzyme interaction landscape, *Cell*, **138**, 389-403, doi: 10.1016/j.cell.2009.04.042.

Spata2L SUPPRESSES TLR4 SIGNALING BY PROMOTING CYLD-MEDIATED DEUBIQUITINATION OF TRAF6 AND TAK1

Z. Zhang^{1,2#}, S. Zhang^{1,2#}, X. Jiang^{1,2#}, D. Wu^{1,2}, Y. Du³, and X.-D. Yang^{1,2,4,5*}

¹Shanghai Institute of Immunology, Shanghai Jiao Tong University School of Medicine, 200025 Shanghai, China; e-mail: xdyang@shsmu.edu.cn

²Department of Immunology and Microbiology, Shanghai Jiao Tong University School of Medicine, 200025 Shanghai, China

³Department of Biochemistry and Molecular Cell Biology, Shanghai Jiao Tong University School of Medicine, 200025 Shanghai, China

⁴The Research Center for Traditional Chinese Medicine, Shanghai Institute of Infectious Diseases and Biosecurity, Shanghai University of Traditional Chinese Medicine, 201203 Shanghai, China

⁵Center for Traditional Chinese Medicine and Immunology Research, School of Basic Medical Sciences, Shanghai University of Traditional Chinese Medicine, 201203 Shanghai, China

Toll-like receptor 4 (TLR4) is a key pattern recognition receptor that can be activated by bacterial lipopolysaccharide to elicit inflammatory response. Proper activation of TLR4 is critical for the host defense against microbial infections. Since overactivation of TLR4 causes deleterious effects and inflammatory diseases, its activation needs to be tightly controlled by negative regulatory mechanisms, among which the most pivotal could be deubiquitination of key signaling molecules mediated by deubiquitinating enzymes (DUBs). CYLD is a member of the USP family of DUBs that acts as a critical negative regulator of TLR4-dependent inflammatory responses by deconjugating polyubiquitin chains from signaling molecules, such as TRAF6 and TAK1. Dysregulation of CYLD is implicated in inflammatory diseases. However, how the function of CYLD is regulated during inflammatory response remains largely unclear. Recently, we and other authors have shown that Spata2 functions as an important CYLD partner to regulate enzymatic activity of CYLD and substrate binding by this protein. Here, we show that a Spata2-like protein, Spata2L, can also form a complex with CYLD to inhibit the TLR4-dependent inflammatory response. We found that Spata2L constitutively interacts with

CYLD and that the deficiency of Spata2L enhances the LPS-induced NF- κ B activation and proinflammatory cytokine gene expression. Mechanistically, Spata2L potentiated CYLD-mediated deubiquitination of TRAF6 and TAK1 likely by promoting CYLD enzymatic activity. These findings identify Spata2L as a novel CYLD regulator, provide new insights into regulatory mechanisms underlying CYLD role in TLR4 signaling, and suggest potential targets for modulating TLR4-induced inflammation.

Keywords: inflammation, TLR4, deubiquitination, CYLD, Spata2L, Spata2

СТРУКТУРНЫЕ ОСОБЕННОСТИ, МЕХАНИЗМЫ ДЕЙСТВИЯ И ПЕРСПЕКТИВЫ ПРАКТИЧЕСКОГО ПРИМЕНЕНИЯ БАКТЕРИОЦИНОВ КЛАССА II

Обзор

© 2022 Д.В. Антошина, С.В. Баландин, Т.В. Овчинникова*

Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН,
117997 Москва, Россия; электронная почта: ovch@ibch.ru

Поступила в редакцию 25.09.2022

После доработки 28.10.2022

Принята к публикации 28.10.2022

Бактериоцины – антимикробные пептиды, рибосомально синтезируемые как грамотрицательными, так и грамположительными бактериями, а также археями. Бактериоцины обычно активны в отношении филогенетически родственных бактерий, что обеспечивает конкурентное преимущество их продуцентам в естественном бактериальном окружении. Однако известны бактериоцины, обладающие более широким спектром антибактериального действия, включая активность в отношении мультирезистентных бактериальных штаммов. Множество изученных к настоящему времени бактериоцинов характеризуются большим разнообразием химических структур и механизмов действия. Существующие системы классификации бактериоцинов учитывают их структурные особенности, пути биосинтеза, филогенетическую принадлежность организмов-продуцентов. Термостабильные бактериоцины с молекулярной массой менее 10 кДа из грамположительных и грамотрицательных продуцентов разделяют на посттрансляционно модифицируемые (класс I) и лишённые посттрансляционных модификаций пептиды (класс II). В последние годы усилился интерес к бактериоцинам класса II как к потенциальным терапевтическим средствам, способным помочь в борьбе с антибиотикорезистентными инфекциями. Преимуществом немодифицируемых пептидов является относительная простота их биотехнологического получения в гетерологичных системах, а также химического синтеза. Возможность совместного использования бактериоцинов с другими антимикробными средствами для повышения их эффективности, низкая вероятность развития перекрёстной резистентности, а также способность продукции бактериоцинов штаммами пробиотиков *in situ* делает их перспективными кандидатными соединениями для создания новых лекарственных препаратов. Обзор сфокусирован на рассмотрении структурного разнообразия бактериоцинов класса II и их практической значимости.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: антибиотики, антимикробные пептиды, бактериоцины, антибиотикорезистентность.

DOI: 10.31857/S0320972522110161, **EDN:** LXCKTK

ВВЕДЕНИЕ

Проблема борьбы с антибиотикорезистентными инфекциями приобрела глобальный масштаб. К 2050 г. прогнозируется возрастание летальных исходов при заболеваниях, вызванных антибиотикорезистентными инфекциями, до 10 млн случаев в год [1]. Значительную опасность представляют инфекции, вызванные штаммами бактерий с

множественной лекарственной устойчивостью (МЛУ), что требует особого подхода при их лечении и разработке новых лекарственных средств [1]. На фоне снижения лекарственной эффективности традиционных антибиотиков в настоящее время ведётся поиск новых типов терапевтических соединений и разрабатываются стратегии их использования. Среди молекулярных факторов, контролирующих численность микробных популяций в природе,

Принятые сокращения: АМП – антимикробные пептиды; МКБ – молочнокислые бактерии; МЛУ – множественная лекарственная устойчивость; АВС-транспортёр – АТФ-связывающий транспортный белок; Man-PTS – маннозофосфотрансфераза; УррР – ундекапренилпирофосфат-фосфатаза.

* Адресат для корреспонденции.

важнейшую роль играют бактериоцины – рибосомально синтезируемые антимикробные пептиды (АМП) бактериального происхождения, которые сейчас рассматриваются в качестве новых антимикробных средств [2]. Многие бактериоцины обладают выраженной антимикробной активностью в концентрациях, не превышающих 1 нмоль/литр. Большинство таких пептидов обладает узким спектром антимикробного действия, направленного на близкородственные продуценту виды бактерий, однако встречаются бактериоцины и с широким диапазоном активности [2–4]. Бактериоцины, обладающие высокой активностью и избирательностью действия в отношении штаммов социально значимых инфекций, включая бактериальные штаммы с МЛУ, имеют перспективы применения в медицине. Помимо антибактериальных свойств, бактериоцины могут обладать и другими видами биологической активности, включая антибиоплёночную, противовирусную, противогрибковую, противоопухолевую, противовоспалительную, иммуномодулирующую, что также расширяет потенциал их медицинского применения [2–8].

Среди бактериоцинов особый интерес представляют бактериоцины класса II – термостабильные АМП с молекулярной массой менее 10 кДа, которые не претерпевают посттрансляционных модификаций в ходе их биосинтеза [2]. Интерес к данным АМП вызван

не только высокой биологической активностью, но и относительной простотой их биотехнологического получения в гетерологичных продуцентах или с помощью химического синтеза, поскольку они не содержат посттрансляционных модификаций. Эта особенность бактериоцинов класса II также позволяет в дальнейшем проводить искусственную модификацию этих АМП с целью улучшения их химических и биологических свойств. Большинство бактериоцинов класса II, которые продуцируются молочнокислыми бактериями (МКБ), не токсичны для человека, что в совокупности с высокой термостабильностью и активностью в отношении пищевых патогенов может позволить широко применять их в качестве консервантов в пищевой промышленности [3, 5]. Кроме того, возможность продукции бактериоцинов класса II штаммами пробиотиков *in situ* расширяет потенциал их применения в медицине и ветеринарии и придаёт значимость проведению исследований данного класса АМП и разработок лекарственных препаратов на их основе.

КЛАССИФИКАЦИЯ БАКТЕРИОЦИНОВ

К настоящему времени выявлено множество групп бактериоцинов, отличающихся структурными свойствами и механизмами действия. Было обнаружено, что существуют

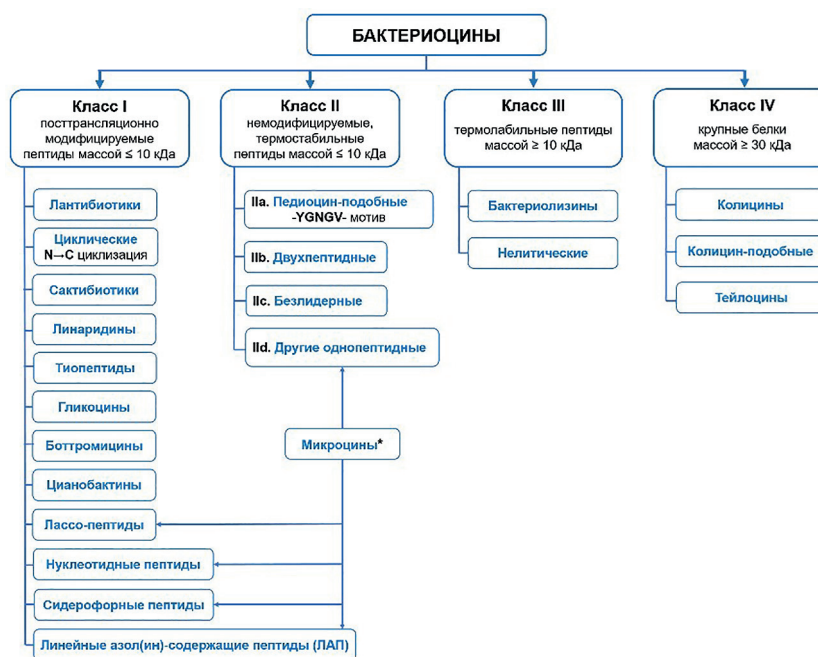


Рис. 1. Классификация бактериоцинов, продуцируемых грамположительными и грамотрицательными бактериями.
* Микроцины, продуцируемые грамотрицательными бактериями, включают как посттрансляционно модифицируемые, так и немодифицируемые пептиды, поэтому могут быть отнесены сразу к двум классам бактериоцинов (I и II)

штаммы-мультипродуценты, которые способны выделять в окружающую среду сразу несколько видов бактериоцинов [8]. В природе продуценты бактериоцинов широко распространены и могут быть найдены в почве и на поверхности растений, в симбиотической микробиоте животных и человека, в различных пищевых продуктах, в особенности ферментированных, а также среди бактериальных возбудителей инфекционных заболеваний [2, 4]. На сегодняшний день охарактеризовано более 500 различных бактериоцинов, и с каждым годом исследователи обнаруживают всё больше этих соединений и их продуцентов, в связи с чем их классификация претерпевает постоянные изменения [9]. Предложены различные варианты классификации, основанные на общности химических структур, механизмов действия, спектра антимикробной активности, механизмов обеспечения иммунитета продуцентов, филогенетическом родстве штаммов-продуцентов и т.д. [2, 3, 5–9]. Построить систему простой и универсальной классификации бактериоцинов практически невозможно из-за перекрывания структурных, функциональных и генетических характеристик у разных групп этих пептидов. Ранее было принято отдельно рассматривать бактериоцины грамотрицательных (колицины) и грамположительных бактерий, однако впоследствии наметилась тенденция к их объединению [8, 9]. Один из вариантов классификации бактериоцинов представлен на рис. 1. Бактериоцины, относящиеся к классам I–III, преимущественно продуцируются грамположительными бактериями, тогда как бактериоцины класса IV и микроцины продуцируются грамотрицательными бактериями.

К классу I бактериоцинов принадлежат небольшие пептиды с молекулярной массой ≤ 10 кДа, содержащие разнообразные посттрансляционные модификации, введение которых в пептид осуществляют специфичные ферменты, гены которых также входят в состав кластеров генов биосинтеза этих пептидов [2, 4, 7]. Бактериоцины класса I подразделяют на подклассы в зависимости от типа посттрансляционных модификаций, обнаруженных в пептиде. Наиболее изученным и многочисленным на сегодняшний день подклассом являются лантибиотики, преимущественно продуцируемые МКБ [10]. Среди лантибиотиков наиболее детально исследован низин, широко применяемый в качестве пищевого консерванта E234 [10]. Среди бактериоцинов класса I также выделяют семейства сактибиотиков, гликоцинов (гликозилированных бактериоцинов),

нуклеотид- и сидерофор-содержащих пептидов, лассо-пептидов, линейных азол(ин)-содержащих пептидов, линаридинов, тиопептидов, боттромицинов, цианобактинов и *N*-*C*-циклических пептидов [9]. Последние до недавнего времени относили к подклассу IIc немодифицируемых бактериоцинов. Изменение в классификации связано с тем, что образование пептидной связи между *N*- и *C*-концевыми остатками данных пептидов требует наличия специфического фермента. К бактериоцинам класса I относятся также посттрансляционно модифицируемые микроцины, которые продуцируются энтеробактериями – семейством грамотрицательных бактерий [11].

Бактериоцины класса II представляют собой немодифицируемые пептиды с молекулярной массой ≤ 10 кДа, при этом структуры некоторых пептидов могут быть стабилизированы одной или несколькими дисульфидными связями [2–7, 12–17]. Бактериоцины класса II подразделяют на четыре подкласса (IIa–IId) на основе структурного сходства и механизмов действия пептидов [12–17]. Подкласс IIa включает педиоцин-подобные пептиды, содержащие консервативную *N*-концевую последовательность YGNG(V/L)XC [14, 15]. В подкласс IIb объединены немодифицируемые двухкомпонентные бактериоцины, проявляющие максимальную активность при скоординированном взаимодействии двух пептидов (α и β) [16]. К подклассу IIc, который ранее включал *N*-*C*-циклические пептиды, сейчас относят бактериоцины, синтезируемые без *N*-концевой лидерной (сигнальной) части («leaderless bacteriocins», далее безлидерные пептиды) [17]. В подкласс IId входят все прочие однокомпонентные немодифицируемые бактериоцины [2, 6–9, 12, 13], в том числе немодифицируемые микроцины грамотрицательных бактерий [11]. Большинство известных бактериоцинов класса II было выделено из бактерий spp. (*Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Pediococcus*, *Streptococcus*, *Propionibacterium*, *Enterococcus* и *Carnobacterium*). Продуценты встречаются также среди штаммов *Corynebacterium*, *Brevibacillus*, *Leuconostoc*, *Weissella*, *Staphylococcus*, *Bacillus*, *Listeria*, *Clostridium*, *Brochothrix*, *Mycrococcus* [2, 7–9, 12–18]. Характерные представители различных подклассов бактериоцинов класса II приведены на рис. 2.

Класс III бактериоцинов включает более крупные термолабильные белки массой ≥ 10 кДа, которые подразделяются на два подкласса: бактериолизины – ферменты, способные разрушать пептидогликан клеточной стенки бактерий, и нелитические бактерио-

Все идентифицированные к настоящему времени двухкомпонентные бактериоцины подкласса IIb содержат сигнальные последовательности диглицинового типа, и их продуценты используют ABC-транспортёр для секреции бактериоцинов [16]. Однако не все бактериоцины класса II транслоцируются с помощью ABC-транспортёра. Предшественники ряда бактериоцинов из подклассов IIa и IId не имеют диглицинового мотива в своих сигнальных участках и секретируются с помощью универсальной Sec-зависимой системы транслокации [13, 19]. Механизм биосинтеза и секреции безлидерных бактериоцинов в настоящее время мало исследован. Предполагают, что секреция и функция обеспечения иммунитета продуцента могут осуществляться одним белковым комплексом, как было показано на примере бактериоцина LsbV и соответствующего ABC-транспортёра LmrV, обуславливающего МЛУ лактококков [20].

Регуляция биосинтеза бактериоцинов класса II может происходить с помощью систем положительной или отрицательной обратной связи. В этом принимают участие специальные двух- или трёхкомпонентные регуляторные системы, для которых необходимо наличие дополнительных генов: гена, кодирующего пептидный фактор индукции, которым может выступать отдельный пептид или сам бактериоцин, а также гена сенсора – гистидиновой протеинкиназы (ГПК) и гена регулятора ответа, являющегося ДНК-связывающим белком, способным активировать экспрессию гена бактериоцина и генов других белков, принимающих участие в его биосинтезе [2, 13]. Индуцирующий пептид первоначально синтезируется в виде препептида с N-концевой сигнальной последовательностью, которая отщепляется при его секреции ABC-транспортёром. Концентрация индуцирующего пептида увеличивается по мере роста плотности культуры, и её избыток приводит к активации трёхкомпонентной системы. При этом запускается аутофосфорилирование ГПК и перенос фосфатной группы на соответствующий белок-регулятор ответа, который действует как активатор транскрипции и запускает экспрессию кластеров генов биосинтеза бактериоцинов [13]. У штаммов-мультипродуцентов гены биосинтеза нескольких разных бактериоцинов могут использовать общую транспортную и регуляторную системы [2, 13]. В качестве примера можно привести совмещённую систему биосинтеза двухкомпонентных бактериоцинов плантарицина EF и плантарицина JK (подкласс IIb), продуцентом которых яв-

ляется штамм *Lactobacillus plantarum* C11 [21]. Индуктором биосинтеза в этом случае служит пептид плантарицин А, относящийся к подклассу IId [22]. При достижении определённой пороговой концентрации плантарицина А включается аутоиндукционный цикл, что приводит к активации продукции плантарицина EF и плантарицина JK. Примечательно, что *L. plantarum* C11 содержит сразу два регулятора ответа – PInC и PInD. Было показано, что PInC активирует, тогда как PInD репрессирует гены, участвующие в синтезе указанных бактериоцинов [22].

Устойчивость бактерий-продуцентов к собственным бактериоцинам обеспечивают специальные белки или пептиды иммунитета [12, 13]. В случае бактериоцинов класса II эти защитные факторы могут включать 30–120 а.о. и значительно отличаться по своей структуре, однако большинство из них содержат трансмембранную часть [13]. Одни белки иммунитета напрямую связывают молекулу бактериоцина после её внедрения в липидный бислой, другие связываются со сформированным комплексом бактериоцин–рецептор, образуя тройной комплекс (это наблюдается у педиоцин-подобных бактериоцинов) [13, 14]. Некоторые иммунные белки имеют гомологию с металлопротеазами и, по-видимому, способны расщеплять узнаваемые ими бактериоцины [13].

КРАТКАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА ОТДЕЛЬНЫХ ПОДКЛАССОВ

Подкласс IIa (педиоцин-подобные бактериоцины). Для большинства бактериоцинов подкласса IIa характерна высокая активность в отношении пищевых патогенов рода *Listeria*, в том числе в отношении *Listeria monocytogenes* [23]. Кроме того, у многих из них обнаружена способность ингибировать рост спорообразующих бактерий, таких как *Bacillus cereus* и *Clostridium perfringens* [14]. Перспективы применения в качестве натуральных пищевых консервантов послужили основанием для детального исследования данного семейства пептидов. Наиболее хорошо изученным членом этого семейства является педиоцин PA-1, продуцируемый грамположительными бактериями *Pediococcus acidilactici* PA-1 [24]. В настоящее время подкласс педиоцин-подобных бактериоцинов включает более 90 представителей. Большинство пребактериоцинов подкласса IIa содержат типичные диглициновые сигнальные последовательности, обеспечивающие секрецию зрелых пептидов с помощью специализированных

ABC-транспортёров, однако отдельные представители, такие как энтероцин P, дуранцин GL, бактериоцин 31 используют универсальную систему Sec-зависимой транслокации [13, 14].

Длина полипептидных цепей зрелых педиоцин-подобных бактериоцинов составляет от 17 (бактериоцин PE-ZYB1) до 58 (ацидоцин A) а.о. [25, 26]. Педиоцин-подобные бактериоцины имеют высокую степень гомологии в N-концевой области за счёт наличия консервативного педиоцинового бокса. Наиболее часто встречающийся вариант педиоцинового бокса – YGNGV, однако у некоторых пептидов остаток Val может быть заменен на Leu или Ile, а первый остаток Gly – на Ala или Asp. Встречаются варианты, содержащие дополнительные остатки в педиоциновом боксе: Thr – у ацидоцина A и бактериоцина OR-7, Gly – у курватицина DN317, Pro – у курватицина L442 [25, 27–29]. Внесение мутаций в педиоциновый бокс обычно приводит к резкому падению антимикробной активности. C-Концевая область педиоцин-подобных бактериоцинов менее консервативна, её аминокислотную последовательность берут за основу для дальнейшего разделения бактериоцинов подкласса IIa на подсемейства: педиоцина PA-1, лейкоцина A, карнобактериоцина B2, сакацина A, диверцина V41, бактериоцина 31, энтероцина HF, ацидоцина A (рис. 2) [13–15]. Некоторые пептиды имеют уникальную структуру и не могут быть отнесены ни к одному из перечисленных подсемейств (например, бактериоцин PE-ZYB1 и др.) [25].

К настоящему времени с помощью ЯМР-спектроскопии определены трёхмерные структуры некоторых педиоцин-подобных бактериоцинов (рис. 3, a): лейкоцина A [30], педиоцина PA-1 M31L [31], курватицина A [32], сакацина P [33], энтероцина HF [34], карнобактериоцина B2 [35], в т.ч. в присутствии имитирующих мембрану мицелл додецилфосфохолина. Как и многие другие антимикробные пептиды, бактериоцины подкласса IIa в водном растворе не имеют упорядоченной трёхмерной структуры, тогда как в гидрофобной среде или на границе фаз они принимают устойчивую конформацию [15]. Несмотря на различия аминокислотных последовательностей, между подгруппами педиоцин-подобных бактериоцинов можно выделить ряд ключевых структурных элементов, общих для всех исследованных пептидов. Катионная гидрофобная N-концевая часть образует тройной антипараллельный β -складчатый лист, стабилизированный одной дисульфидной и несколькими водородными связями, при этом педиоциновый бокс распо-

лагается в первом β -повороте. Варибельная C-концевая область педиоцин-подобных бактериоцинов содержит упорядоченную структуру, которая включает одну или две амфифильные α -спирали и неупорядоченную структуру на C-конце. Между этими двумя частями находится резкий изгиб, придающий всей C-концевой области пептида сходство с β -шпилькой. Между N- и C-концевыми частями располагается шарнирный участок, который обеспечивает их движение относительно друг друга и некоторую функциональную независимость [15].

Подкласс IIb (двухпептидные бактериоцины).

Бактериоцины подкласса IIb, также известные как двухпептидные бактериоцины, состоят из двух разных пептидных компонентов (α и β), которые проявляют высокую антимикробную активность в эквимольном соотношении; при этом индивидуальные компоненты в некоторых случаях также могут проявлять заметную антимикробную активность [2, 6, 16]. Как и пептиды подкласса IIa, они активны в отношении пищевых патогенов и бактерий, вызывающих порчу пищевых продуктов (*L. monocytogenes*, *Bacillus* spp., *Clostridium* spp., *Staphylococcus* spp. и др.) [7, 16]. Первым пептидом, открытым

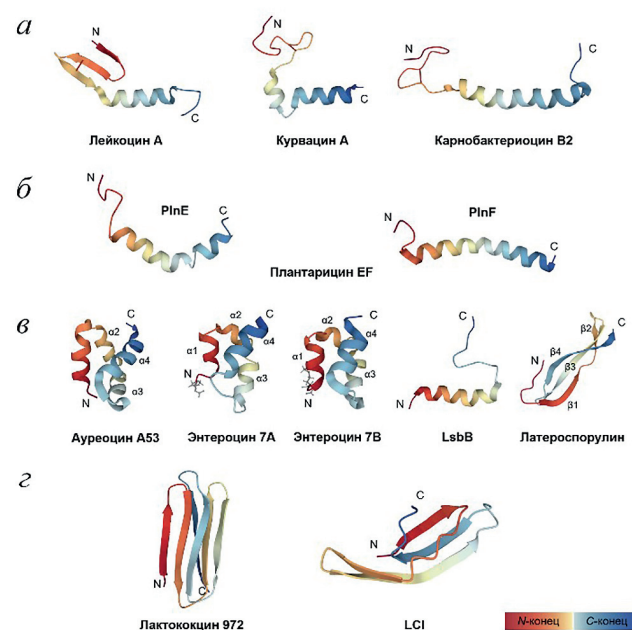


Рис. 3. Трёхмерные структуры некоторых представителей бактериоцинов подклассов IIa–IId. a – Трёхмерные структуры бактериоцинов подкласса IIa – лейкоцина A (PDB: 2LEU), курватицина A (PDB: 2A2B), карнобактериоцина B2 (PDB: 1CW5). б – Трёхмерные структуры компонентов (PlnE и PlnF) бактериоцина подкласса IIb – плантарицина EF (PDB: 2JU1 и 2RLW). в – Трёхмерные структуры бактериоцинов подкласса IIc – ауреоцина A53 (PDB: 2N8O), энтероцина 7A и 7B (PDB: 2M5Z и 2M60), LsbB (PDB: LV), латероспорулина (PDB: 4OZK). г – Трёхмерные структуры бактериоцинов подкласса IId – лактококцина 972 (PDB: 2LGN) и LCI (PDB: 2B9K)

в данном подклассе, стал лактококцин G [36]. В настоящее время подкласс IIb насчитывает 35 представителей. Основываясь на сходстве последовательностей зрелых α - и β -компонентов, среди бактериоцинов подкласса IIb можно выделить несколько подгрупп, хотя уровень гомологии внутри каждой из них часто не превышает 20–40%. Представители этих подгрупп: лактококцин G, термофилин 13, лактацин F и AVR118 (рис. 2) [12, 13, 16]. Остальные пептиды отличаются уникальными последовательностями, например, плантарицин EF, плантарицин JK и др. [16, 37].

Длина полипептидных цепей отдельных компонентов бактериоцинов подкласса IIb варьируется от 23 (ацидоцин J1132 α) до 66 (пневмоцин VlpIJ) а.о. [38, 39]. Как и однокомпонентные бактериоцины, представители подкласса IIb обычно являются катионными, амфипатическими, гидрофобными и проявляют мембранотропные свойства [12, 13]. Отличительная характеристика бактериоцинов подкласса IIb – наличие одного или нескольких мотивов GxxxG, а также GxxxG-подобных мотивов, в которых остатки Gly заменены на Ala или Ser [12]. Мотив GxxxG часто встречается в мембранных белках и способствует спираль-спиральным взаимодействиям: сближенные в пространстве остатки Gly обеспечивают тесный контакт между трансмембранными спиральями за счёт водородных (между C α -H и C=O) и ван-дер-ваальсовых взаимодействий. У бактериоцинов подкласса IIb также наблюдается эффективное спираль-спиральное взаимодействие между двумя комплементарными α - и β -компонентами [12, 16]. Двухпептидные бактериоцины имеют неупорядоченную структуру в водном растворе, но приобретают α -спиральную конформацию в условиях, имитирующих мембрану, что было показано для ряда пептидов с помощью КД-спектроскопии [12]. Методом ЯМР-спектроскопии установлены трёхмерные структуры ряда бактериоцинов подкласса IIb, включая лактококцин G [40], плантарицин EF [41], плантарицин JK [42], плантарицин S [43], карнобактериоцин XY [44]. Трёхмерная структура плантарицина EF представлена на рис. 3, б. У всех вышеперечисленных пептидов оба компонента имеют схожую структуру, представляющую собой одну протяжённую гидрофобную амфипатическую α -спираль (лактококцин G α , плантарицин E, плантарицин J, карнобактериоцин Y) или две α -спирали, разделённые короткой петлёй (лактококцин G β , плантарицин F, плантарицин K, карнобактериоцин X) [12]. Наличие GxxxG-мотива крайне важно для проявления активно-

сти бактериоцинов подкласса IIb. Например, с помощью сайт-направленного мутагенеза было показано, что замена Gly или Ser более крупными остатками в любом из компонентов плантарицина S резко снижает его антимикробную активность [43].

Подкласс IIc (безлидерные бактериоцины). К подклассу IIc относят немодифицируемые бактериоцины, синтезируемые без *N*-концевого сигнального пептида [8, 9, 17]. Известные на сегодняшний день представители структурных подгрупп безлидерных бактериоцинов приведены на рис. 2 [17, 20, 45–50]. Вследствие данной особенности биосинтеза пептиды этого подкласса сохраняют в своей структуре *N*-концевой остаток формилметионина, который в некоторых случаях необходим для проявления полноценной активности [17]. Однако в процессе созревания латероспориоцинов происходит отщепление *N*-концевого формилметионина [46]. Кроме того, показано, что некоторые другие безлидерные бактериоцины могут сохранять нормальный уровень активности при отсутствии *N*-концевого формилирования [17]. На сегодняшний день подкласс безлидерных бактериоцинов насчитывает 39 представителей, среди которых встречаются как однокомпонентные, так и двух-, трёх- и четырёхкомпонентные бактериоцины, демонстрирующие в эквимоллярных концентрациях эффект синергизма. Двухкомпонентный энтероцин L50 был одним из первых обнаруженных представителей этого подкласса бактериоцинов [51]. Длина полипептидных цепей отдельных безлидерных бактериоцинов варьируется от 22 (лактококцин K) до 70 (тойонцин A) а.о. [47, 48]. Исходя из гомологии аминокислотных последовательностей пептидов, среди безлидерных бактериоцинов можно выделить несколько подгрупп, включающих гомологи ауреоцина A53, LsbB, латероспориолина, энтероцина L50 (двухкомпонентные безлидерные пептиды) и ауреоцина A70 (многокомпонентные безлидерные пептиды). Для тойонцина A и лактококцина K гомологов пока не обнаружено. Степень гомологии пептидов внутри подгрупп безлидерных бактериоцинов обычно составляет более 40%, а также имеется некоторое сходство между подгруппой двухкомпонентного энтероцина L50 и подгруппой ауреоцина A53 [17].

С помощью ЯМР-спектроскопии установлены трёхмерные структуры ряда представителей подкласса: ауреоцина A53 [52], лактицина Q [52], эпидермицина NI01 [53], VacSp222 [54], LsbB [55], энтероцина K1 [56], энтероцина 7A и 7B [57], латероспориолина [58] и латероспориолина 10 (PDB: 6LWZ). Трёхмерные

структуры ауреоцина A53, энтероцина 7A и 7B, LsbV и латероспорулина, имеющие разные варианты пространственной укладки, представлены на рис. 3, в. Среди трёхмерных структур безлидерных бактериоцинов можно выделить три основных типа: сапозин-, LsbV- и латероспорулин-подобные структуры. Для безлидерных бактериоцинов подгрупп ауреоцина A53 и энтероцина L50 характерна глобулярная укладка, аналогичная пространственной структуре сапозинов — лизосомальных липид-связывающих белков, содержащих четыре или пять α -спиралей, стабилизированных дисульфидными связями [12]. Сапозин-подобные безлидерные бактериоцины являются катионными, умеренно гидрофобными пептидами и отличаются высоким содержанием ароматических остатков Tyr и Trp в своей структуре, что способствует их встраиванию в липидный бислой мембраны. Структура сапозин-подобных пептидов включает четыре α -спирали с экспонированными на поверхности катионными остатками, окружающими гидрофобное ядро, и стабилизируется за счёт гидрофобных и электростатических взаимодействий (рис. 3, в). Такая укладка ауреоцин A53-подобных бактериоцинов обеспечивает их взаимодействие с липидами и дальнейшее встраивание в мембрану клетки-мишени. В литературе отмечается сходство пространственных структур, значений pI и суммарного катионного заряда молекул сапозин-подобных пептидов с *N*-*C*-циклическими бактериоцинами класса I (гарвицином ML, энтероцином AS-48 и др.), несмотря на отсутствие значимой гомологии аминокислотных последовательностей и очевидное несоответствие размеров представителей двух указанных подклассов бактериоцинов [13, 17].

Безлидерные бактериоцины из подгруппы LsbV также несут суммарный положительный заряд, содержат значительное количество ароматических остатков и состоят из амфипатической *N*-концевой α -спирали и неструктурированного *C*-концевого участка (рис. 3, в). *C*-Концевые участки LsbV-подобных бактериоцинов имеют высокую степень гомологии и содержат консервативный мотив KXXXGXXPWE, который является ключевым для проявления их антимикробной активности и связывания с мишенью [12, 55].

Латероспорулины — единственная подгруппа безлидерных бактериоцинов, представители которой претерпевают посттрансляционные модификации, включая образование дисульфидных связей и отщепление *N*-концевого формилметионина [58]. В настоящее время в эту подгруппу входят только два пептида — лате-

роспорулин и латероспорулин 10, полученные из разных штаммов *Brevibacillus laterosporus* и имеющие 54% идентичности аминокислотных последовательностей [46, 59]. Эти пептиды отличаются высоким содержанием остатков Cys и полярных остатков Tyr, His, Arg, Asp и Glu, что напоминает аминокислотный состав, характерный для некоторых АМП эукариот [12, 58]. Трёхмерная структура латероспорулинов отличается от остальных безлидерных бактериоцинов и представляет собой четыре β -тяжа с тремя дисульфидными мостиками, формирующими скрученный β -лист. Две дисульфидные связи расположены в *N*-концевой части латероспорулина, а третья дисульфидная связь сшивает *C*-конец пептида, что приводит к образованию закрытой протяжённой стержневидной структуры (рис. 3, в) [58]. Расположение дисульфидных связей в молекулах латероспорулинов сходно с таковым у β -дефензинов млекопитающих, тогда как трёхмерная структура в большей степени, чем у других известных бактериоцинов, напоминает структуру α -дефензинов [12].

Подкласс II_d (другие однопептидные бактериоцины). К бактериоцинам подкласса II_d относят все остальные немодифицируемые линейные однопептидные бактериоцины, не включённые в подклассы II_a–II_c. В связи с этим подкласс II_d отличается наибольшей неоднородностью как структуры его представителей, так и спектров их антимикробной активности и, по-видимому, механизмов действия [2, 12, 13]. Пептиды данного подкласса являются наименее изученными. Представители основных структурных подгрупп бактериоцинов подкласса II_d приведены на рис. 2 [6, 12, 13]. Подкласс II_d объединяет порядка 100 представителей, длина полипептидных цепей которых варьируется от 7 (бактериоцин XJS01) до 106 (бактериоцин Ser_APC3775) а.о. [60, 61]. Большинство пептидов подкласса II_d, подобно другим немодифицируемым бактериоцинам, синтезируются в виде неактивного предшественника, содержащего диглициновую сигнальную последовательность, которая отщепляется в ходе секреции с помощью ABC-транспортёра [6, 12]. Некоторые бактериоцины подкласса II_d используют Sec-зависимый путь секреции [12]. Ряд пептидов (например, пропионицин F) являются продуктами специфичного ферментативного отщепления *N*- и *C*-концевых участков крупных белков-предшественников [62].

Разделение на подгруппы внутри подкласса II_d осуществляют по разным критериям: по гомологии аминокислотных последовательностей, по сходству аминокислотного состава, по длине, суммарному заряду молекулы и меха-

низму биосинтеза. Так, на основании сходства аминокислотных последовательностей выделяют подгруппы лактококцина А, лактококцина 972 и пропионина Т1 [63–65]. Исходя из размера пептидов и их аминокислотного состава, выделяют подгруппы глицин-богатых пептидов, пептидов с высоким положительным зарядом в *N*- или *C*-концевой области и коротких пептидов с молекулярной массой менее 2 кДа. Часть представителей подкласса не имеет признаков сходства с другими пептидами (LCI, UviВ и др.) [66, 67].

Подгруппа лактококцина А включает лактококцины А, В и Z, гарвицины А, В, С, Q и AG2, а также VacSJ, уберидин К и бовидин 255 [68]. Несмотря на низкую степень гомологии, все они используют в качестве рецептора маннозофосфотрансферазу (ManPTS) [68, 69]. К подгруппе пропионина Т1 относятся пептиды, продуцируемые пропионовокислыми бактериями [65]. Пропионин PLG-1 обладает весьма широким спектром антимикробной активности, включающим штаммы грамположительных и грамотрицательных патогенов, а также различные грибки, включая плесневые [70]. К подгруппе глицин-богатых бактериоцинов относят пептиды, содержащие большое количество остатков глицина и повторяющиеся глициновые мотивы – GG, GxG, GxxG и т.д. Эти пептиды также обогащены остатками аланина и их повторами, что дополнительно увеличивает их конформационную подвижность. К данной подгруппе относится, например, пептид карнобактериоцин А [71]. Можно отметить некоторое структурное сходство глицин-богатых бактериоцинов подкласса II_d с индивидуальными компонентами двухкомпонентных систем подкласса II_b. Среди бактериоцинов подкласса II_d с заряженной *N*- или *C*-концевой областью [72, 73] стоит упомянуть бактофенсин А, стабилизированный тремя дисульфидными связями и имеющий отдалённое сходство с эукариотическими дефенсинами [74]. Еще одна малоисследованная подгруппа бактериоцинов подкласса II_d – короткие пептиды с молекулярной массой менее 2 кДа (например, бактериоцин LSX01) [75]. Эти пептиды обладают широким спектром антимикробной активности в отношении грамположительных и грамотрицательных бактерий и способны ингибировать рост резистентных штаммов патогенов и их биоплёнок [75].

Пока что с помощью ЯМР-спектроскопии были определены трёхмерные структуры только двух представителей подкласса II_d (рис. 3, з). Лактококцин 972 из *Lactococcus lactis* ssp. *Lactis* IPLA 972 представляет собой β-сэндвич,

состоящий из двух трёхцепочечных антипараллельных β-листов (PDB: 2LGN), а LCI из *Bacillus subtilis* A014 образует антипараллельный β-складчатый лист из четырёх β-тяжей [66].

МЕХАНИЗМЫ ДЕЙСТВИЯ

Предполагаемые механизмы действия и обнаруженные в настоящее время мишени бактериоцинов класса II представлены на рис. 4. Экспериментально показано, что большинство бактериоцинов класса II в сравнительно высоких (микромольных) концентрациях способны проявлять неспецифическое мембранолитическое действие и тем самым вызывать образование пор в мембране бактериальных клеток, что приводит к диссипации трансмембранного потенциала и утечке низкомолекулярных веществ, включая АТФ, неорганические ионы, аминокислоты и другие молекулы [12, 13]. Мембранотропные свойства пептидов, как и во всех подобных случаях, обусловлены гидрофобностью, амфифильностью и наличием положительного заряда. В наиболее общем виде механизм такого действия включает сближение и последующее связывание положительно заряженной области пептидов с отрицательно заряженной поверхностью мембраны бактериальных клеток с последующим погружением гидрофобной части пептида в липидный бислой и формированием поры. В случае педиоцин-подобных бактериоцинов связывание с мембраной обеспечивает *N*-концевой участок пептида, в то время как *C*-концевой участок погружается в липидный бислой [14, 15]. В двухкомпонентных системах подкласса II_b оба пептида принимают участие в образовании трансмембранного спираль-спирального комплекса, а наличие GxxxG-мотивов способствует взаимодействию между α-спиралями компонентов пептидов в бислое (рис. 4, б) [16]. Механизм действия сапозин-подобных безлидерных бактериоцинов тоже основан на быстром связывании пептида с отрицательно заряженной мембраной за счёт электростатических взаимодействий, что затем вызывает флип-флоп-переходы липидов и формирование в мембране крупных тороидальных пор (рис. 4, в) [53, 76]. Способность нарушать целостность мембраны бактериальных клеток показана для латероспорулинов и некоторых других безлидерных бактериоцинов, однако детали этого механизма пока что до конца не изучены [12, 46].

По мере исследования деталей механизмов действия некоторых пептидов становилось

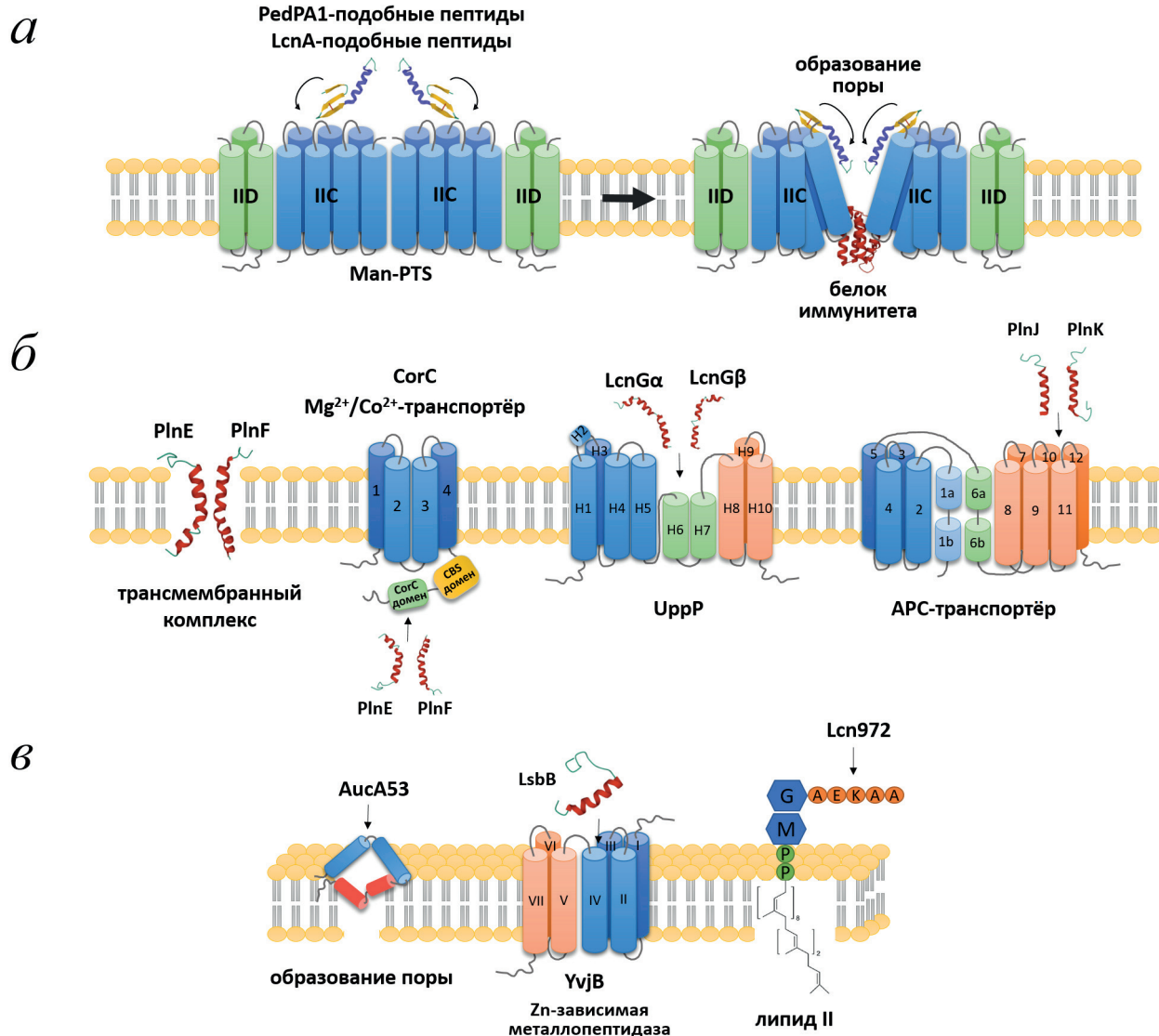


Рис. 4. Предполагаемые механизмы действия и обнаруженные мишени бактериоцинов подклассов IIa–IId. *а* – Механизм действия педиоцин-подобных и лактококцин А-подобных бактериоцинов, связывающих мишень Man-PTS. *б* – Механизмы действия и предполагаемые мишени бактериоцинов подкласса IIb. *в* – Механизмы действия и обнаруженные мишени бактериоцинов подклассов IIc и IId. AucA53 – ауреоцин A53; LcnA, LcnG и Lcn972 – лактококцины A, G и 972; PedPA-1 – педиоцин PA-1; PlnE, PlnF, PlnJ и PlnK – плантарицины E, F, J и K

очевидным, что их активность в низких (нано- и пикомолярных концентрациях) объясняется специфичным связыванием с определёнными мембранными рецепторами. В одних случаях антимикробный эффект обусловлен нарушением функции такого рецептора, который жизненно важен для клетки, в других – рецептор выступает в качестве мембранного «якоря», облегчающего последующее встраивание бактериоцина в мембрану с образованием поры. Нельзя исключать и комбинированного механизма, аналогичного механизму действия низин-подобных антибиотиков [10].

Известно, что мишенью педиоцин-подобных бактериоцинов (подкласс IIa) является Man-PTS [77–79]. Man-PTS – это слож-

ный белковый комплекс, который участвует в транспорте и регуляции обмена углеводов у бактерий и встречается примерно у 60% бактерий, растущих на богатых углеводами средах. Этот комплекс катализирует фосфорилирование углеводных субстратов и, наряду с обеспечением транслокации через клеточную мембрану, координирует поглощение и катаболизм углеводов [77]. Было показано, что педиоцин-подобные бактериоцины связываются с ассоциированным с мембраной комплексом PC/ID фермента Man-PTS (рис. 4, *а*) [78]. С помощью сайт-направленного мутагенеза определено, что в специфичном связывании участвуют два участка субъединицы IC (α - и β -области) и один участок субъединицы ID

(γ -область) [79]. Похожий механизм действия характерен для лактококцин А-подобных бактериоцинов подкласса II_d, которые связываются с другими участками Man-PTS [68, 69]. Структура комплекса педиоцина PA-1 с Man-PTS была недавно детально исследована методом криоэлектронной микроскопии [80].

Молекулярная мишень была выявлена и для некоторых бактериоцинов подкласса II_b (рис. 4, б). Анализ геномов резистентных к лактококцину G штаммов *L. lactis* IL1403 и MG1363 показал, что пептид способен связываться с ундекапренилпирофосфат-фосфатазой (UppP) – мембранным ферментом, участвующим в синтезе пептидогликана клеточной стенки грамположительных бактерий [81]. Лактококцин G обладает избирательной активностью в отношении *Lactococcus* spp., что позволяет предположить существование областей, встречающихся исключительно в структуре UppP лактококков, которые специфично распознаются этим бактериоцином [81]. Для энтероцина 1071 и лактококцина Q, имеющих высокую гомологию с лактококцином G, также предполагают связывание с UppP [81]. Плантарицин JK, также представляющий данный подкласс, предположительно связывается с транспортёром APC (Amino acid-Polyamine-organocation). Устойчивые к пептиду штаммы *Weissella viridescens* и *L. plantarum* содержат мутации в гене этого транспортёра в участках трансмембранных спиралей 10–12 [82, 83]. Этот же подход позволил предположить, что плантарицин EF связывает C-концевой домен мембранного Mg²⁺/Co²⁺-транспортного белка CotC [84].

Ранее считалось, что активность безлидерных бактериоцинов (подкласс II_c) не требует присутствия мембранного рецептора. Однако специфичная мишень была найдена и для представителя этого подкласса, бактериоцина LsbV. Показано, что такой мишенью является Zn-зависимая мембранная металлопептидаза YvjB (рис. 4, в) [85, 86]. Экспрессия гена *yvjB* в резистентных к LsbV штаммах *Lactobacillus casei* и *Enterococcus faecalis* делала их чувствительными к этому пептиду [85]. Дальнейшие исследования показали, что C-концевой консенсусный 8-аминокислотный мотив KXXXGXXPWE LsbV содержит рецептор-связывающий домен, который взаимодействует с высоко консервативными остатками Tyr356 и Ala353 в третьем трансмембранном домене YvjB [85]. Предполагается, что этот механизм действия распространён среди других пептидов из подгруппы LsbV, таких как энтероцины Q, K1 и EJ97.

В отличие от других бактериоцинов класса II, нацеленных на плазматическую мембра-

ну, лактококцин 972 из подкласса II_d ингибирует рост чувствительных грамположительных клеток, препятствуя образованию перегородки в процессе их деления [87]. Лактококцин 972 является единственным известным бактериоцином, который наряду с лантибиотиками способен распознавать и связывать предшественник клеточной стенки липид II (рис. 4, в) [88]. Аналогично мерсацидин-подобным лантибиотикам [10], он ингибирует синтез пептидогликана, не вызывая при этом образования пор, как это имеет место в случае лантибиотиков группы низина. Сайт связывания лактококцина 972 с липидом II до сих пор не установлен. Известно, что он отличается от сайта связывания лантибиотиков, которые взаимодействуют с пирофосфатной группой, так как для лактококцина 972 не было выявлено конкуренции с низином за связывание липида II [88].

ПЕРСПЕКТИВЫ ПРИМЕНЕНИЯ БАКТЕРИОЦИНОВ КЛАССА II

Бактериоцины класса II не содержат посттрансляционных модификаций, кроме образования дисульфидных связей, что значительно упрощает их биотехнологическое получение в гетерологичных продуцентах или с помощью химического синтеза. Большинство бактериоцинов класса II являются термостабильными пептидами, и они способны сохранять более 80% своей антимикробной активности после автоклавирования при 120 °C [12, 13]. Многие бактериоцины класса II стабильны при низких значениях pH [12, 89]. Продуценты бактериоцинов, относящиеся к группе МКБ и применяющиеся в пищевой промышленности, признаны безопасными (Generally Recognized as Safe, GRAS) [9, 89]. Высокая термостабильность, относительная простота получения, низкая токсичность бактериоцинов класса II и наличие у них антимикробной активности в отношении грамположительных и грамотрицательных пищевых патогенов, таких как *Listeria* spp., *Enterococcus* spp., *Staphylococcus aureus*, *E. coli*, *Campylobacter jejuni*, *Salmonella* spp., *Shigella* spp., а также способность подавлять рост спор *Clostridium* spp. и *Bacillus* spp. и способность ингибировать рост различных грибов делает их перспективными кандидатными соединениями для использования в качестве консервантов в пищевой промышленности [12, 13, 89]. Разработка биоконсервантов на основе бактериоцинов представляет большой интерес, поскольку бактериоцины не имеют цвета, запаха и вкуса, и эти вещества можно добавлять в пищевые

продукты без изменения их органолептических свойств [89]. Ряд работ демонстрирует эффективность бактериоцинов в консервации продуктов растительного и животного происхождения [90–92]. Однако стоит отметить, что преимущества добавления некоторых бактериоцинов в пищевые продукты могут быть ограничены слишком узким спектром активности или низкой растворимостью пептида [89]. Чтобы преодолеть эти недостатки, использование бактериоцинов можно сочетать с другими подходами к консервации. Например, активно ведутся разработки упаковочных материалов, содержащих бактериоцины, что становится многообещающим способом замедления порчи пищевых продуктов [91, 92].

Наличие у бактериоцинов класса II антимикробной активности в отношении социально значимых патогенов (*Enterococcus* spp., *S. aureus*, *Pseudomonas* spp., *E. coli*, *Mycobacterium tuberculosis*, *Candida albicans* и др.), включая их резистентные и МЛУ штаммы, делает их перспективными кандидатными соединениями для применения в медицине отдельно или в сочетании с классическими антибиотиками [89]. При этом узкий спектр активности при действии в низких (наномолярных) концентрациях даёт бактериоцинам класса II преимущество перед классическими антибиотиками, так как позволяет избежать негативного эффекта на комменсальную микробиоту [93]. Помимо антибактериальной активности, некоторые бактериоцины класса II могут обладать противогрибковой или противовирусной активностью, что расширяет потенциальный диапазон их медицинского применения. Например, энтероцин В способен подавлять вирусы гриппа, что было показано *in vivo* на модели гриппа у мышей [94]. Для ряда бактериоцинов класса II также показана высокая антибиоплёночная активность, в том числе в отношении антибиотикорезистентных штаммов патогенов [74, 94–96].

Опубликовано сравнительно немного работ, характеризующих цитотоксичность и иммуногенность бактериоцинов класса II. Показано, что некоторые пептиды, в особенности продуцируемые пробиотиками, не токсичны по отношению к эукариотическим клеткам (например, плантарицин 149, энтероцин DD14) [97, 98], другие могут быть токсичными в высоких концентрациях (педиоцин PA-1) [99], третьи проявляют токсичность даже в низких концентрациях (VasSp222) [54]. В ряде случаев наблюдается избирательная цитотоксичность в отношении клеток опухолей [100, 101]. Биологическая активность бактериоцинов класса II не ограничивается прямым антимикробным

или цитотоксическим эффектом. Например, было показано, что двухкомпонентный безлидерный энтероцин DD14 способен препятствовать адгезии клеток метициллин-резистентного штамма *S. aureus* (MRSA) на поверхности эукариотических клеток CaCo-2 [102]. Энтероцин DD14 оказывает противовоспалительный эффект, снижая секрецию провоспалительных интерлейкинов IL-6 и IL-8 клетками этой же линии [102]. Бактериоцин VasSp222, напротив, проявляет провоспалительную активность в отношении клеток моноцитарно-макрофагальной системы и нейтрофилов [103].

Среди множества экспериментальных данных, свидетельствующих о терапевтическом потенциале немодифицируемых бактериоцинов, особую ценность представляют немногочисленные исследования, проведённые *in vivo* и подтверждающие их эффективность в борьбе с инфекцией в условиях внутренней среды живого организма. Так, двухкомпонентный плантарицин EF был эффективен на модели эшерихиоза *E. coli* K1.1 у мышей, при этом рекомбинантный пептид не вызывал токсических эффектов и не приводил к смерти животных даже при увеличении дозы выше 5000 мг/кг массы тела [104]. Однократная местная доза безлидерного бактериоцина эпидермицина NI01 так же эффективно подавляла инфекцию MRSA в носоглотке хлопковых крыс *Sigmodon hispidus*, как и вводимый по два раза в течение трёх дней мупироцин [105].

Несмотря на ряд описанных преимуществ, многим бактериоцинам класса II присущ и ряд серьёзных недостатков: низкая биодоступность, являющаяся следствием больших размеров молекул и плохой растворимости в физиологических условиях, чувствительность к протеолитическим ферментам и высокая стоимость производства. Всё это затрудняет проведение клинических исследований, препятствует коммерциализации разработок и будущему терапевтическому применению препаратов на их основе [89]. Прорывные изменения текущей ситуации могут обеспечить различные биоинженерные подходы, позволяющие улучшить физико-химические и биологические характеристики этих соединений.

Поскольку продуценты бактериоцинов являются компонентами микробиоты человека и животных, они могут принимать участие в регулировании её видового состава и защите организма-хозяина от патогенных микроорганизмов [106, 107]. Опубликован ряд работ, демонстрирующих действие продуцентов бактериоцинов на микробиоту кишечника *in vivo* [108, 109], а также рассматривающих стабильность и

эффекты бактериоцинов класса II при их попадании в желудочно-кишечный тракт человека [110]. Более детальные исследования «экологической» роли бактериоцинов помогли бы более полно раскрыть потенциал применения пробиотиков в медицинских и других целях.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Немодифицируемые бактериоцины на сегодняшний день составляют наибольший по числу представителей класс бактериоцинов. Этот класс стремительно пополняется благодаря *in vitro* скринингу штаммов-продуцентов и биоинформатическому анализу бактериальных геномов. Немодифицируемые бактериоцины подразделяют на ряд подклассов на основании сходства последовательностей и трёхмерных структур, путей биосинтеза и механизмов действия. Подробный структурно-функциональный анализ проведён лишь для малого числа представителей бактериоцинов класса II. Для ряда пептидов описаны трёхмерные структуры и механизмы антимикробного действия, которое может осуществляться как путём неспецифического воздействия на клеточную мембрану бактерий, так и за счёт специфического связывания с белковым рецептором. Благодаря выраженной антимикробной активности в отношении пищевых патогенов, устойчивости к высокой температуре и к низким значениям pH эти антимикробные пептиды, скорее всего, будут во всё более широких масштабах применяться в качестве биоконсервантов в пищевой промышленности. Вопрос о возможности медицинского применения данного класса соединений пока что остаётся открытым. Бактериоцины класса II, обладающие активностью в отно-

шении ряда патогенов, вызывающих тяжёлые инфекционные заболевания (*Enterococcus* spp., *S. aureus*, *Listeria* spp., *Pseudomonas* spp., *E. coli*, *C. albicans* и др.), включая антибиотикорезистентные штаммы, могут стать скаффолд-молекулами или структурным каркасом для создания новых эффективных антимикробных средств, если будут решены проблемы улучшения параметров фармакокинетики и снижения себестоимости производства. Независимо от успехов в этом направлении, безусловную ценность для медицины представляет работа по исследованию роли бактериоцинов нормальной микробиоты человека и бактериоцинов, попадающих в организм человека с пищей, в поддержании гомеостаза организма-хозяина, а также изучение их влияния на состав микробиоты и на иммунитет носителя.

Вклад авторов. Антошина Д.В. и Баландин С.В. собрали и проанализировали литературные данные, а также подготовили начальную версию обзора. Овчинникова Т.В. сформулировала концепцию, обеспечила координацию и финансирование работ, проанализировала собранные литературные данные, осуществила редактирование и подготовила рукопись к публикации. Окончательный вариант обзора был утверждён всеми авторами.

Финансирование. Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда (грант № 22-14-00380).

Конфликт интересов. Авторы подтверждают отсутствие разногласий в финансовой или любой другой сфере.

Соблюдение этических норм. Данный обзор не содержит результатов клинических испытаний на людях и проведённых авторами экспериментальных исследований на животных.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. De Kraker, M. E. A. (2016) Will 10 Million people die a year due to antimicrobial resistance by 2050? *PLoS Med.*, **13**, 1-6, doi: 10.1371/journal.pmed.1002184.
2. Drider, D., and Rebuffat, S. (2011) Prokaryotic Antimicrobial Peptides. From Genes to Applications, *Springer*, pp. 1-451, doi: 10.1007/978-1-4419-7692-5.
3. Klaenhammer, T. R. (1993) Genetics of bacteriocins produced by lactic acid bacteria, *FEMS Microbiol. Rev.*, **12**, 39-85, doi: 10.1111/j.1574-6976.1993.tb00012.x.
4. Cotter, P. D., Ross, R. P., and Hill, C. (2013) Bacteriocins – a viable alternative to antibiotics? *Nat. Rev. Microbiol.*, **11**, 95-105, doi: 10.1038/nrmicro2937.
5. Alvarez-Sieiro, P., Montalbán-López, M., and Kuipers, O. P. (2016) Bacteriocins of lactic acid bacteria: extending the family, *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **100**, 2939-2951, doi: 10.1007/s00253-016-7343-9.
6. Nissen-Meyer, J., Rogne, P., Oppegård, C., Haugen, H. S., and Kristiansen, P. E. (2009) Structure-function relationships of the non-lanthionine-containing peptide (class II) bacteriocins produced by gram-positive bacteria, *Curr. Pharm. Biotechnol.*, **10**, 19-37, doi: 10.2174/138920109787048661.
7. Simons, A., Alhanout, K., and Duval, R. E. (2020) Bacteriocins, antimicrobial peptides from bacterial origin: overview of their biology and their impact against multidrug-resistant bacteria, *Microorganisms*, **8**, 1-31, doi: 10.3390/microorganisms8050639.

8. Zouhir, A., Hammami, R., Fliss, I., and Hamida, J. B. (2010) A new structure-based classification of gram-positive bacteriocins, *Protein J.*, **29**, 432-439, doi: 10.1007/s10930-010-9270-4.
9. Zimina, M., Babich, O., Prosekov, A., Sukhikh, S., Ivanova, S., Shevchenko, M., and Noskova, S. (2020) Overview of global trends in classification, methods of preparation and application of bacteriocins, *Antibiotics (Basel)*, **9**, 553-574, doi: 10.3390/antibiotics9090553.
10. Field, D., Cotter, P. D., Colin, H., and Ross, R. P. (2015) Bioengineering lantibiotics for therapeutic success, *Front. Microbiol.*, **6**, 1-8, doi: 10.3389/fmicb.2015.01363.
11. Rebuffat, S. (2012) Microcins in action: amazing defence strategies of *Enterobacteria*, *Biochem. Soc. Trans.*, **40**, 1456-1462, doi: 10.1042/BST20120183.
12. Yanglei, Y., Ping, L., Zhao, F., and Zhang, T. (2022) Current status and potentiality of class II bacteriocins from lactic acid bacteria: structure, mode of action and applications in the food industry, *Trends Food Sci. Technol.*, **120**, 387-401, doi: 10.1016/j.tifs.2022.01.018.
13. Zhang, T., Zhang, Y., Li, L., and Jiang, X. (2022) Biosynthesis and production of class II bacteriocins of food-associated lactic acid bacteria, *Fermentation*, **8**, 1-32, doi: 10.3390/fermentation8050217.
14. Ríos Colombo, N. S., Chalón, M. C., Navarro, S. A., and Bellomio, A. (2018) Pediocin-like bacteriocins: new perspectives on mechanism of action and immunity, *Curr. Genet.*, **64**, 345-351, doi: 10.1007/s00294-017-0757-9.
15. Balandin, S. V., Sheremeteva, E. V., and Ovchinnikova, T. V. (2019) Pediocin-like antimicrobial peptides of bacteria, *Biochemistry (Moscow)*, **84**, 464-478, doi: 10.1134/S000629791905002X.
16. Oppegård, C., Rogne, P., Emanuelsen, L., Kristiansen, P. E., Fimland, G., and Nissen-Meyer, J. (2007) The two-peptide class II bacteriocins: structure, production, and mode of action, *J. Mol. Microbiol. Biotechnol.*, **13**, 210-219, doi: 10.1159/000104750.
17. Perez, R. D., Zendo, T., and Sonomoto, K. (2018) Circular and leaderless bacteriocins: biosynthesis, mode of action, applications, and prospects, *Front. Microbiol.*, **9**, 1-18, doi: 10.3389/fmicb.2018.02085.
18. Wu, Y., Pang, X., Wu, Y., Liu, X., and Zhang, X. (2022) Enterocins: classification, synthesis, antibacterial mechanisms and food applications, *Molecules*, **27**, 1-14, doi: 10.3390/molecules27072258.
19. Beckwith, J. (2013) The Sec-dependent pathway, *Res. Microbiol.*, **164**, 497-504, doi: 10.1016/j.resmic.2013.03.007.
20. Gajic, O., Buist, G., Kojic, M., Topisirovic, L., Kuipers, O. P., and Kok, J. (2003) Novel mechanism of bacteriocin secretion and immunity carried out by lactococcal multidrug resistance proteins, *J. Biol. Chem.*, **278**, 34291-34298, doi: 10.1074/jbc.M211100200.
21. Diep, D. B., Håvarstein, L. S., and Nes, I. F. (1996) Characterization of the locus responsible for the bacteriocin production in *Lactobacillus plantarum* C11, *J. Bacteriol.*, **178**, 4472-4483, doi: 10.1128/jb.178.15.4472-4483.1996.
22. Hauge, H. H., Mantzilas, D., Moll, G. N., Konings, W. N., Driessen, A. J., Eijssink, V. G., and Nissen-Meyer, J. (1998) Plantaricin A is an amphiphilic alpha-helical bacteriocin-like pheromone which exerts antimicrobial and pheromone activities through different mechanisms, *Biochemistry*, **37**, 16026-16032, doi: 10.1021/bi981532j.
23. Khorshidian, N., Khanniri, E., Mohammadi, M., Mortazavian, A. M., and Yousefi, M. (2021) Anti-bacterial activity of pediocin and pediocin-producing bacteria against *Listeria monocytogenes* in meat products, *Front. Microbiol.*, **12**, 1-16, doi: 10.3389/fmicb.2021.709959.
24. Jin, J., Jie, L., Zhang, H., Xie, Y., Liu, H., Gao, X., and Zhang, H. (2020) Pediocin AcH is transcriptionally regulated by a two-component system in *Lactobacillus plantarum* subsp. *plantarum*, *J. Food Prot.*, **83**, 1693-1700, doi: 10.4315/JFP-19-587.
25. Kanatani, K., Oshimura, M., and Sano, K. (1995) Isolation and characterization of acidocin A and cloning of the bacteriocin gene from *Lactobacillus acidophilus*, *Appl. Environ. Microbiol.*, **61**, 1061-1067, doi: 10.1128/aem.61.3.1061-1067.1995.
26. Zhang, Y., Yang, J., Liu, Y., and Wu, Y. (2020) A novel bacteriocin PE-ZYB1 produced by *Pediococcus pentosaceus* zy-B isolated from intestine of *Mimachlamys nobilis*: Purification, identification and its anti-listerial action, *LWT*, **118**, 1-9, doi: 10.1080/13102818.2020.1830714.
27. Stern, N. J., Svetoch, E. A., Eruslanov, B. V., Perelygin, V. V., Mitsevich, E. V., Mitsevich, I. P., Pokhilenko, V. D., Levchuk, V. P., Svetoch, O. E., and Seal, B. S. (2006) Isolation of a *Lactobacillus salivarius* strain and purification of its bacteriocin, which is inhibitory to *Campylobacter jejuni* in the chicken gastrointestinal system, *Antimicrob. Agents Chemother.*, **50**, 3111-3116, doi: 10.1128/AAC.00259-06.
28. Zommiti, M., Almohammed, H., and Ferchichi, M. (2016) Purification and characterization of a novel anti-campylobacter bacteriocin produced by *Lactobacillus curvatus* DN317, *Probiotics Antimicrob. Proteins*, **8**, 191-201, doi: 10.1007/s12602-016-9237-7.
29. Xiraphi, N., Georgalaki, M., and Driessche, G. V. (2006) Purification and characterization of curvaticin L442, a bacteriocin produced by *Lactobacillus curvatus* L442, *Antonie Van Leeuwenhoek*, **89**, 19-26, doi: 10.1007/s10482-005-9004-3.
30. Gallagher, N. L. F., Sailer, M., Niemczura, W. P., Nakashima, T. T., Stiles, M. E., and Vederas, J. C. (1997) Three-dimensional structure of leucocin A in trifluoroethanol and dodecylphosphocholine micelles: spatial location of residues critical for biological activity in type IIa bacteriocins from lactic acid bacteria, *Biochemistry*, **36**, 15062-15072, doi: 10.1021/bi971263h.

31. Bédard, F., Hammami, R., Zirah, S., Rebuffat, S., Fliss, I., and Biron, E. (2018) Synthesis, antimicrobial activity and conformational analysis of the class IIa bacteriocin pediocin PA-1 and analogs thereof, *Sci. Rep.*, **8**, 1-13, doi: 10.1038/s41598-018-27225-3.
32. Haugen, H. S., Fimland, G., Nissen-Meyer, J., and Kristiansen, P. E. (2005) Three-dimensional structure in lipid micelles of the pediocin-like antimicrobial peptide curvacin A, *Biochemistry*, **44**, 16149-16157, doi: 10.1021/bi051215u.
33. Uteng, M., Hauge, H. H., Markwick, P. R., Fimland, G., Mantzilas, D., Nissen-Meyer, J., and Muhle-Goll, C. (2003) Three-dimensional structure in lipid micelles of the pediocin-like antimicrobial peptide sakacin P and a sakacin P variant that is structurally stabilized by an inserted C-terminal disulfide bridge, *Biochemistry*, **42**, 11417-11426, doi: 10.1021/bi034572i.
34. Arbulu, S., Lohans, C. T., van Belkum, M. J., Cintas, L. M., Herranz, C., Vederas, J. C., and Hernández, P. E. (2015) Solution structure of enterocin HF, an antilisterial bacteriocin produced by *Enterococcus faecium* M3K31, *J. Agric. Food Chem.*, **63**, 10689-10695, doi: 10.1021/acs.jafc.5b03882.
35. Wang, Y., Henz, M. E., Gallagher, N. L., Chai, S., Gibbs, A. C., Yan, L. Z., Stiles, M. E., Wishart, D. S., and Vederas, J. C. (1999) Solution structure of carnobacteriocin B2 and implications for structure-activity relationships among type IIa bacteriocins from lactic acid bacteria, *Biochemistry*, **38**, 15438-15447, doi: 10.1021/bi991351x.
36. Nissen-Meyer, J., Holo, H., Håvarstein, L. S., Sletten, K., and Nes, I. F. (1992) A novel lactococcal bacteriocin whose activity depends on the complementary action of two peptides, *J. Bacteriol.*, **74**, 5686-5692, doi: 10.1128/jb.174.17.5686-5692.1992.
37. Anderssen, E. L., Diep, D. B., Nes, I. F., Eijsink, V. G., and Nissen-Meyer, J. (1998) Antagonistic activity of *Lactobacillus plantarum* C11: two new two-peptide bacteriocins, plantaricins EF and JK, and the induction factor plantaricin A, *Appl. Environ. Microbiol.*, **64**, 2269-2272, doi: 10.1128/AEM.64.6.2269-2272.1998.
38. Tahara, T., Oshimura, M., Umezawa, C., and Kanatani, K. (1996) Isolation, partial characterization, and mode of action of acidocin J1132, a two-component bacteriocin produced by *Lactobacillus acidophilus* JCM 1132, *Appl. Environ. Microbiol.*, **62**, 892-897, doi: 10.1128/aem.62.3.892-897.1996.
39. Fontaine, L., and Pescal, H. (2008) The inhibitory spectrum of thermophilin 9 from *Streptococcus thermophilus* LMD-9 depends on the production of multiple peptides and the activity of BlpG(St), a thiol-disulfide oxidase, *Appl. Environ. Microbiol.*, **74**, 1102-1110, doi: 10.1128/AEM.02030-07.
40. Rogne, P., Fimland, G., Nissen-Meyer, J., and Kristiansen, P. E. (2008) Three-dimensional structure of the two peptides that constitute the two-peptide bacteriocin lactococcin G, *Biochim. Biophys. Acta*, **1784**, 543-554, doi: 10.1016/j.bbapap.2007.12.002.
41. Fimland, N., Rogne, P., Fimland, G., Nissen-Meyer, J., and Kristiansen, P. E. (2008) Three-dimensional structure of the two peptides that constitute the two-peptide bacteriocin plantaricin EF, *Biochim. Biophys. Acta*, **1784**, 1711-1719, doi: 10.1016/j.bbapap.2008.05.003.
42. Rogne, P., Haugen, C., Fimland, G., Nissen-Meyer, J., and Kristiansen, P. E. (2009) Three-dimensional structure of the two-peptide bacteriocin plantaricin JK, *Peptides*, **30**, 1613-1621, doi: 10.1016/j.peptides.2009.06.010.
43. Ekblad, B., and Kristiansen, P. E. (2019) NMR structures and mutational analysis of the two peptides constituting the bacteriocin plantaricin S, *Sci. Rep.*, **9**, 1-10, doi: 10.1038/s41598-019-38518-6.
44. Acedo, J. Z., Towle, K. M., Lohans, C. T., Miskolzie, M., McKay, R. T., Doerksen, T. A., Vederas, J. C., and Martin-Visscher, L. A. (2017) Identification and three-dimensional structure of carnobacteriocin XY, a class IIb bacteriocin produced by *Carnobacteria*, *FEBS Lett.*, **591**, 1349-1359, doi: 10.1002/1873-3468.12648.
45. Netz, D. J., Pohl, R., Beck-Sickingler, A. G., Selmer, T., Pierik, A. J., Bastos, M. D. C. F., and Sahl, H. G. (2002) Biochemical characterization and genetic analysis of aureocin A53, a new, atypical bacteriocin from *Staphylococcus aureus*, *J. Mol. Biol.*, **319**, 745-756, doi: 10.1016/S0022-2836(02)00368-6.
46. Singh, P. K., Chittipurna, Ashish, Sharma, V., Patil, P. B., and Korpole, S. (2012) Identification, purification and characterization of laterosporulin, a novel bacteriocin produced by *Brevibacillus* sp. strain GI-9, *PLoS One*, **7**, 1-8, doi: 10.1371/journal.pone.0031498.
47. Kim, Y. S., Kim, M. J., Kim, P., and Kim, J. H. (2006) Cloning and production of a novel bacteriocin, lactococcin K, from *Lactococcus lactis* subsp. *Lactis* MY23, *Biotechnol. Lett.*, **28**, 357-362, doi: 10.1007/s10529-005-5935-z.
48. Wang, J., Xu, H., Liu, S., Song, B., Liu, H., Li, F., Deng, S., Wang, G., Zeng, H., Zeng, X., Xu, D., Zhang, B., and Xin, B. (2021) Toyoncin, a novel leaderless bacteriocin that is produced by *Bacillus toyonensis* XIN-YC13 and specifically targets *B. cereus* and *Listeria monocytogenes*, *Appl. Environ. Microbiol.*, **87**, 1-14, doi: 10.1128/AEM.00185-21.
49. Liu, X., Vederas, J. C., Whittall, R. M., Zheng, J., Stiles, M. E., Carlson, D., Franz, C. M., McMullen, L. M., and van Belkum, M. J. (2011) Identification of an N-terminal formylated, two-peptide bacteriocin from *Enterococcus faecalis* 710C, *J. Agric. Food Chem.*, **59**, 5602-5608, doi: 10.1021/jf104751v.
50. Ovchinnikov, K. V., Chi, H., Mehmeti, I., Holo, H., Nes, I. F., and Diep, D. B. (2016) Novel group of leaderless multipptide bacteriocins from gram-positive bacteria, *Appl. Environ. Microbiol.*, **82**, 5216-5224, doi: 10.1128/AEM.01094-16.

51. Cintas, L. M., Casaus, P., Holo, H., Hernandez, P. E., Nes, I. F., and Håvarstein, L. S. (1998) Enterocins L50A and L50B, two novel bacteriocins from *Enterococcus faecium* L50, are related to staphylococcal hemolysins, *J. Bacteriol.*, **180**, 1988-1994, doi: 10.1128/JB.180.8.1988-1994.1998.
52. Acedo, J. Z., van Belkum, M. J., Lohans, C. T., Towle, K. M., Miskolzie, M., and Vederas, J. C. (2016) Nuclear magnetic resonance solution structures of lacticin Q and aureocin A53 reveal a structural motif conserved among leaderless bacteriocins with broad-spectrum activity, *Biochemistry*, **55**, 733-742, doi: 10.1021/acs.biochem.5b01306.
53. Hammond, K., Lewis, H., Halliwell, S., Desriac, F., Nardone, B., Ravi, J., Hoogenboom, B. W., Upton, M., Derrick, J. P., and Ryadnov, M. G. (2020) Flowering poration – a synergistic multi-mode antibacterial mechanism by a bacteriocin fold, *iScience*, **23**, 1-30, doi: 10.1016/j.isci.2020.101423.
54. Śmiałek, J., Nowakowski, M., Bzowska, M., Bocheńska, O., Wlizio, A., Kozik, A., Dubin, G., and Mak, P. (2021) Structure, biosynthesis, and biological activity of succinylated forms of bacteriocin BacSp222, *Int. J. Mol. Sci.*, **22**, 1-21, doi: 10.3390/ijms22126256.
55. Ovchinnikov, K. V., Kristiansen, P. E., Uzelac, G., Topisirovic, L., Kojic, M., Nissen-Meyer, J., Nes, I. F., and Diep, D. B. (2014) Defining the structure and receptor binding domain of the leaderless bacteriocin LsbB, *J. Biol. Chem.*, **289**, 23838-23845, doi: 10.1074/jbc.M114.579698.
56. Ovchinnikov, K. V., Kristiansen, P. E., Straume, D., Jensen, M. S., Aleksandrak-Piekarczyk, T., Nes, I. F., and Diep, D. B. (2017) The leaderless bacteriocin enterocin K1 is highly potent against *Enterococcus faecium*: a study on structure, target spectrum and receptor, *Front. Microbiol.*, **8**, 1-12, doi: 10.3389/fmicb.2017.00774.
57. Lohans, C., Towle, K. M., Miskolzie, M., McKay, R. T., van Belkum, M. J., McMullen, L. M., and Vederas, J. C. (2013) Solution structures of the linear leaderless bacteriocins enterocin 7A and 7B resemble carnocyclin A, a circular antimicrobial peptide, *Biochemistry*, **52**, 3987-3994, doi: 10.1021/bi400359z.
58. Singh, P. K., Solanki, V., Sharma, S., Thakur, K. G., Krishnan, B., and Korpole, S. (2015) The intramolecular disulfide-stapled structure of laterosporulin, a class II d bacteriocin, conceals a human defensin-like structural module, *FEBS J.*, **282**, 203-214, doi: 10.1111/febs.13129.
59. Baidara, P., Singh, N., Ranjan, M., Nallabelli, N., Chaudhry, V., Pathania, G. L., Sharma, N., Kumar, A., Patil, P. B., and Korpole, S. (2016) Laterosporulin10: a novel defensin like class II d bacteriocin from *Brevibacillus* sp. strain SKDU10 with inhibitory activity against microbial pathogens, *Microbiology (Reading)*, **162**, 1286-1299, doi: 10.1099/mic.0.000316.
60. Li, H. W., Xiang, Y. Z., Zhang, M., Jiang, Y. H., Zhang, Y., Liu, Y. Y., Lin, L. B., and Zhang, Q. L. (2021) A novel bacteriocin from *Lactobacillus salivarius* against *Staphylococcus aureus*: isolation, purification, identification, antibacterial and antibiofilm activity, *LWT*, **140**, 1-10, doi: 10.1016/j.lwt.2020.110826.
61. Angelopoulou, A., Warda, A. K., O'Connor, P. M., Stockdale, S. R., Shkoporov, A. N., Field, D., Draper, L. A., Stanton, C., Hill, C., and Ross, R. P. (2020) Diverse bacteriocins produced by strains from the human milk microbiota, *Front. Microbiol.*, **11**, 1-19, doi: 10.3389/fmicb.2020.00788.
62. Brede, D. A., Faye, T., Johnsborg, O., Odegård, I., Nes, I. F., and Holo, H. (2004) Molecular and genetic characterization of propionin F, a bacteriocin from *Propionibacterium freudenreichii*, *Appl. Environ. Microbiol.*, **70**, 7303-7310, doi: 10.1128/AEM.70.12.7303-7310.2004.
63. Holo, H., Nilssen, O., and Nes, I. F. (1991) Lactococcin A, a new bacteriocin from *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris*: isolation and characterization of the protein and its gene, *J. Bacteriol.*, **173**, 3879-3887, doi: 10.1128/jb.173.12.3879-3887.1991.
64. Martínez, B., Suárez, J. E., and Rodríguez, A. (1996) Lactococcin 972: a homodimeric lactococcal bacteriocin whose primary target is not the plasma membrane, *Microbiology (Reading)*, **142**, 2393-2398, doi: 10.1099/00221287-142-9-2393.
65. Faye, T., Langsrud, T., Nes, I. F., and Holo, H. (2000) Biochemical and genetic characterization of propionin T1, a new bacteriocin from *Propionibacterium thoenii*, *Appl. Environ. Microbiol.*, **66**, 4230-4236, doi: 10.1128/aem.66.10.4230-4236.2000.
66. Gong, W., Wang, J., Chen, Z., Xia, B., and Lu, G. (2011) Solution structure of LCI, a novel antimicrobial peptide from *Bacillus subtilis*, *Biochemistry*, **50**, 3621-3627, doi: 10.1021/bi200123w.
67. Garnier, T., and Cole, S. T. (1988) Complete nucleotide sequence and genetic organization of the bacteriocinogenic plasmid, pIP404, from *Clostridium perfringens*, *Plasmid*, **19**, 134-150, doi: 10.1016/0147-619x(88)90052-2.
68. Tymoszevska, A., Walczak, P., and Aleksandrak-Piekarczyk, T. (2020) BacSJ – another bacteriocin with distinct spectrum of activity that targets Man-PTS, *Int. J. Mol. Sci.*, **21**, 1-18, doi: 10.3390/ijms21217860.
69. Tymoszevska, A., Diep, D. B., and Aleksandrak-Piekarczyk, T. (2018) The extracellular loop of Man-PTS subunit IID is responsible for the sensitivity of *Lactococcus garvieae* to garvicins A, B and C, *Sci. Rep.*, **8**, 1-15, doi: 10.1038/s41598-018-34087-2.
70. Mohamed, S. E., and Tahoun, M. K. (2015) The expression of propionin PLG-1 gene (plg-1) by lactic starters, *J. Dairy Res.*, **82**, 209-214, doi: 10.1017/S0022029915000011.
71. Worobo, R. W., Henkel, T., Sailer, M., Roy, K. L., Vederas, J. C., and Stiles, M. E. (1994) Characteristics

- and genetic determinant of a hydrophobic peptide bacteriocin, carnobacteriocin A, produced by *Carnobacterium piscicola* LV17A, *Microbiology (Reading)*, **140**, 517-526, doi: 10.1099/00221287-140-3-517.
72. Sawa, N., Koga, S., Okamura, K., Ishibashi, N., Zendo, T., and Sonomoto, K. (2013) Identification and characterization of novel multiple bacteriocins produced by *Lactobacillus sakei* D98, *J. Appl. Microbiol.*, **115**, 61-69, doi: 10.1111/jam.12226.
 73. Ehrmann, M. A., Remiger, A., Eijsink, V. G. H., and Vogel, R. F. (2000) A gene cluster encoding plantaricin 1.25 β and other bacteriocin-like peptides in *Lactobacillus plantarum* TMW1.25, *Biochim. Biophys. Acta*, **1490**, 355-361, doi: 10.1016/S0167-4781(00)00003-8.
 74. O'Shea, E. F., O'Connor, P. M., O'Sullivan, O., Cotter, P. D., Ross, P., and Hill, C. (2013) Bactofencin A, a new type of cationic bacteriocin with unusual immunity, *mBio*, **4**, 1-9, doi: 10.1128/mBio.00498-13.
 75. Jiang, Y. H., Xin, W. G., Yang, L. Y., Yin, J. P., Zhao, Z. S., Lin, L. B., Li, X. Z., and Zhang, Q. L. (2022) A novel bacteriocin against *Staphylococcus aureus* from *Lactobacillus paracasei* isolated from Yunnan traditional fermented yogurt: purification, antibacterial characterization, and antibiofilm activity, *J. Dairy Sci.*, **105**, 2094-2107, doi: 10.3168/jds.2021-21126.
 76. Yoneyama, F., Imura, Y., Ohno, K., Zendo, T., Nakayama, J., Matsuzaki, K., and Sonomoto, K. (2009) Peptide-lipid huge toroidal pore, a new antimicrobial mechanism mediated by a lactococcal bacteriocin, lacticin Q, *Antimicrob. Agents Chemother.*, **53**, 3211-3217, doi: 10.1128/AAC.00209-09.
 77. Jeckelmann, J. M., and Erni, B. (2020) The mannose phosphotransferase system (Man-PTS) – Mannose transporter and receptor for bacteriocins and bacteriophages, *Biochim. Biophys. Acta Biomembr.*, **862**, 1-18, doi: 10.1016/j.bbamem.2020.183412.
 78. Diep, D. B., Skaugen, M., Salehian, Z., Holo, H., and Nes, I. F. (2007) Common mechanisms of target cell recognition and immunity for class II bacteriocins, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **104**, 2384-2389, doi: 10.1073/pnas.0608775104.
 79. Kjos, M., Salehian, Z., Nes, I. F., and Diep, D. B. (2010) An extracellular loop of the mannose phosphotransferase system component IIC is responsible for specific targeting by class IIa bacteriocins, *J. Bacteriol.*, **192**, 5906-5913, doi: 10.1128/JB.00777-10.
 80. Zhu, L., Zheng, J., Wang, C., and Wang, J. (2022) Structural basis of pore formation in the mannose phosphotransferase system by pediocin PA-1, *Appl. Environ. Microbiol.*, **88**, 1-13, doi: 10.1128/AEM.01992-21.
 81. Kjos, M., Oppegård, C., Diep, D. B., Nes, I. F., Veening, J. W., Nissen-Meyer, J., and Kristensen, T. (2014) Sensitivity to the two-peptide bacteriocin lactococcin G is dependent on UppP, an enzyme involved in cell-wall synthesis, *Mol. Microbiol.*, **92**, 1177-1187, doi: 10.1111/mmi.12632.
 82. Oppegård, C., Kjos, M., Veening, J. W., Nissen-Meyer, J., and Kristensen, T. (2016) A putative amino acid transporter determines sensitivity to the two-peptide bacteriocin plantaricin JK, *Microbiologyopen*, **5**, 700-708, doi: 10.1002/mbo3.363.
 83. Ekblad, B., Nissen-Meyer, J., and Kristensen, T. (2017) Whole-genome sequencing of mutants with increased resistance against the two-peptide bacteriocin plantaricin JK reveals a putative receptor and potential docking site, *PLoS One*, **12**, 1-11, doi: 10.1371/journal.pone.0185279.
 84. Heeney, D. D., Yarov-Yarovoy, V., and Marco, M. L. (2019) Sensitivity to the two peptide bacteriocin plantaricin EF is dependent on CorC, a membrane-bound, magnesium/cobalt efflux protein, *Microbiologyopen*, **8**, 1-16, doi: 10.1002/mbo3.827.
 85. Uzelac, G., Kojic, M., Lozo, J., Aleksandrak-Piekarczyk, T., Gabrielsen, C., Kristensen, T., Nes, I. F., Diep, D. B., and Topisirovic, L. (2013) A Zn-dependent metallopeptidase is responsible for sensitivity to LsbB, a class II leaderless bacteriocin of *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* BGMN1-5, *J. Bacteriol.*, **195**, 5614-5621, doi: 10.1128/JB.00859-13.
 86. Miljkovic, M., Uzelac, G., Mirkovic, N., Devescovi, G., Diep, D. B., Venturi, V., and Kojic, M. (2016) LsbB bacteriocin interacts with the third transmembrane domain of the YvjB receptor, *Appl. Environ. Microbiol.*, **82**, 5364-5374, doi: 10.1128/AEM.01293-16.
 87. Martínez, B., Guez, A. R., and Suárez, J. E. (2000) Lactococcin 972, a bacteriocin that inhibits septum formation in lactococci, *Microbiology (Reading)*, **146**, 949-955, doi: 10.1099/00221287-146-4-949.
 88. Martínez, B., Böttiger, T., Schneider, T., Rodríguez, A., Sahl, H. G., and Wiedemann, I. (2008) Specific interaction of the unmodified bacteriocin lactococcin 972 with the cell wall precursor lipid II, *Appl. Environ. Microbiol.*, **74**, 4666-4670, doi: 10.1128/AEM.00092-08.
 89. Soltani, S., Hammami, R., Cotter, P. D., Rebuffat, S., Said, L. B., Gaudreau, H., Bédard, F., Biron, E., Drider, D., and Fliss, I. (2021) Bacteriocins as a new generation of antimicrobials: toxicity aspects and regulations, *FEMS Microbiol. Rev.*, **45**, 1-24, doi: 10.1093/femsre/fuaa039.
 90. Settanni, L., and Corsetti, A. (2008) Application of bacteriocins in vegetable food biopreservation, *Int. J. Food Microbiol.*, **121**, 123-138, doi: 10.1016/j.ijfoodmicro.2007.09.001.
 91. Santos, C. P. J., Sousa, R. C. S., Otoni, C. G., Moraes, A. R. F., Souza, V. G. L., Medeiros, E. A. A., Espitia, P. J. P., Pires, A. C. S., Coimbra, J. S. R., and Soares, N. F. F. (2018) Nisin and other antimicrobial peptides: Production, mechanisms of action, and application in active food packaging, *Innov. Food Sci. Emerg. Technol.*, **48**, 179-194, doi: 10.1016/j.ifset.2018.06.008.

92. Aymerich, T., Jofré, A., and Bover-Cid, S. (2022) Enterocin A-based antimicrobial film exerted strong antilisterial activity in sliced dry-cured ham immediately and after 6 months at 8 °C, *Food Microbiol.*, **105**, 104005, doi: 10.1016/j.fm.2022.104005.
93. Dabour, N., Zihler, A., Kheadr, E., Lacroix, C., and Fliss, I. (2009) *In vivo* study on the effectiveness of pediocin PA-1 and *Pediococcus acidilactici* UL5 at inhibiting *Listeria monocytogenes*, *Int. J. Food Microbiol.*, **133**, 225-233, doi: 10.1016/j.ijfoodmicro.2009.05.005.
94. Ermolenko, E. L., Desheva, Y. A., Kolobov, M. P., Kotyleva, M. P., Sychev, I. A., and Suvorov, A. N. (2019) Anti-influenza activity of enterocin B *in vitro* and protective effect of bacteriocinogenic *Enterococcal* probiotic strain on influenza infection in mouse model, *Probiotics Antimicrob. Proteins*, **11**, 705-712, doi: 10.1007/s12602-018-9457-0.
95. Okuda, K., Zendo, T., Sugimoto, S., Iwase, T., Tajima, A., Yamada, S., Sonomoto, K., and Mizunoe, Y. (2013) Effects of bacteriocins on methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* biofilm, *Antimicrob. Agents Chemother.*, **57**, 5572-5579, doi: 10.1128/AAC.00888-13.
96. Kranjec, C., Ovchinnikov, K. V., Grønseth, T., Ebineshan, K., Srikantham, A., and Diep, D. B. (2020) A bacteriocin-based antimicrobial formulation to effectively disrupt the cell viability of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) biofilms, *NPJ Biofilms Microbiomes*, **6**, 1-13, doi: 10.1038/s41522-020-00166-4.
97. Lin, X., Xu, J., Shi, Z., Xu, Y., Fu, T., Zhang, L., and He, F. (2021) Evaluation of the antibacterial effects and mechanism of plantaricin 149 from *Lactobacillus plantarum* NRIC 149 on the peri-implantitis pathogens, *Sci. Rep.*, **11**, 1-8, doi: 10.1038/s41598-021-00497-y.
98. Caly, D., Chevalier, M., Flahaut, C., Cudennec, B., Al Atya, A. K., Chataigné, G., D’Inca, R., Auclair, E., and Drider, D. (2017) The safe enterocin DD14 is a leaderless two-peptide bacteriocin with anti-*Clostridium perfringens* activity, *Int. J. Antimicrob. Agents*, **49**, 282-289, doi: 10.1016/j.ijantimicag.2016.11.016.
99. Buss, G. P., and Wilson, C. (2021) Exploring the cytotoxic mechanisms of pediocin PA-1 towards HeLa and HT29 cells by comparison to known bacteriocins: microcin E492, enterocin heterodimer and divercin V41, *PLoS One*, **16**, 1-13, doi: 10.1371/journal.pone.0251951.
100. Baidara, P., Gautam, A., Raghava, G. P. S., and Korpole, S. (2017) Anticancer properties of a defensin like class IIb bacteriocin laterosporulin 10, *Sci. Rep.*, **7**, 1-9, doi: 10.1038/srep46541.
101. Ankaiah, D., Palanichamy, E., Antonyraj, C. B., Ayyanna, R., Perumal, V., Ahamed, S. I. B., and Arul, V. (2018) Cloning, overexpression, purification of bacteriocin enterocin-B and structural analysis, interaction determination of enterocin-A, B against pathogenic bacteria and human cancer cells, *Int. J. Biol. Macromol.*, **116**, 502-512, doi: 10.1016/j.ijbiomac.2018.05.002.
102. Teiar, R., Pérez-Ramos, A., Zgheib, H., Cudennec, B., Belguesmia, Y., and Drider, D. (2022) Anti-adhesion and anti-inflammatory potential of the leaderless class IIb bacteriocin enterocin DD14, *Probiotics Antimicrob. Proteins*, **14**, 613-619, doi: 10.1007/s12602-022-09954-0.
103. Śmiałek, J., Bzowska, M., Hinz, A., Mężyk-Kopec, R., Sołtys, K., and Mak, P. (2022) Bacteriocin BacSp222 and its succinylated forms exhibit proinflammatory activities toward innate immune cells, *J. Inflamm. Res.*, **15**, 4601-4621, doi: 10.2147/JIR.S362066.
104. Hanny, E. L. L., Mustopa, A. Z., Budiarti, S., Darusman, H. S., Ningrum, R. A., and Fatimah (2019) Efficacy, toxicity study and antioxidant properties of plantaricin E and F recombinants against enteropathogenic *Escherichia coli* K1.1 (EPEC K1.1), *Mol. Biol. Rep.*, **46**, 6501-6512, doi: 10.1007/s11033-019-05096-9.
105. Halliwell, S., Warn, P., Sattar, A., Derrik, J. P., and Upron, M. (2017) A single dose of epidermicin NI01 is sufficient to eradicate MRSA from the nares of cotton rats, *J. Antimicrob. Chemother.*, **72**, 778-781, doi: 10.1093/jac/dkw457.
106. Wosinska, L., Walsh, C. J., O’Connor, P. M., Lawton, E. M., Cotter, P. D., Guinane, C. M., and O’Sullivan, O. (2022) *In vitro* and *in silico* based approaches to identify potential novel bacteriocins from the athlete gut microbiome of an elite athlete cohort, *Microorganisms*, **10**, 1-17, doi: 10.3390/microorganisms10040701.
107. Coyne, M. J., Béchon, N., Matano, L. M., McEneaney, V. L., Chatzidaki-Livanis, M., and Comstock, L. E. (2019) A family of anti-*Bacteroidales* peptide toxins wide-spread in the human gut microbiota, *Nat. Commun.*, **10**, 1-14, doi: 10.1038/s41467-019-11494-1.
108. Umu, Ö. C., Bäuerl, C., Oostindjer, M., Pope, P. B., Hernández, P. E., Pérez-Martínez, G., and Diep, D. B. (2016) The potential of class II bacteriocins to modify gut microbiota to improve host health, *PLoS One*, **11**, 1-22, doi: 10.1371/journal.pone.0164036.
109. Stropfiová, V., Kubašová, I., and Ščerbová, J. (2019) Oral administration of bacteriocin-producing and non-producing strains of *Enterococcus faecium* in dogs, *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **103**, 4953-4965, doi: 10.1007/s00253-019-09847-3.
110. Soltani, S., Zirah, S., and Rebuffat, S. (2022) Gastrointestinal stability and cytotoxicity of bacteriocins from gram-positive and gram-negative bacteria: a comparative *in vitro* study, *Front. Microbiol.*, **12**, 1-13, doi: 10.3389/fmicb.2021.780355.

STRUCTURAL FEATURES, MECHANISMS OF ACTION AND PROSPECTS FOR THE PRACTICAL APPLICATION OF CLASS II BACTERIOCINS

Review

D. V. Antoshina, S. V. Balandin, and T. V. Ovchinnikova*

*Shemyakin–Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry, Russian Academy of Sciences,
117997 Moscow, Russia; E-mail: ovch@bk.ru*

Bacteriocins are antimicrobial peptides ribosomally synthesized by both gram-negative and gram-positive bacteria, as well as by archaea. Bacteriocins are usually active against phylogenetically related bacteria, providing a competitive advantage to their producers in the natural bacterial environment. However, some bacteriocins are known to have a broader spectrum of antibacterial activity, including activity against multidrug-resistant bacterial strains. The multitude of bacteriocins studied to date are characterized by a wide variety of chemical structures and mechanisms of action. Existing classification systems for bacteriocins take into account their structural features, biosynthetic pathways, and phylogenetic affiliation of producing organisms. Heat-stable bacteriocins with a molecular weight of less than 10 kDa from gram-positive and gram-negative producers are divided into post-translationally modified (the class I) and unmodified peptides (the class II). In recent years there has been an increasing interest in the class II bacteriocins as potential therapeutic agents that can help to combat antibiotic-resistant infections. Advantages of unmodified peptides are a relative simplicity of their biotechnological production in heterologous systems and chemical synthesis. A potential for the combined use of bacteriocins with other antimicrobial agents allowing to enhance their efficacy, a low probability of the cross-resistance development, and the ability of probiotic strains to produce bacteriocins *in situ* make them promising candidate compounds for the creation of new drugs. The review focuses on the structural diversity of class II bacteriocins and their practical relevance.

Keywords: antibiotics, antimicrobial peptides, bacteriocins, antibiotic resistance

ПОЗИТИВНОЕ (РЕГУЛЯТОРНОЕ) И НЕГАТИВНОЕ (ЦИТОТОКСИЧЕСКОЕ) ДЕЙСТВИЕ ДИНИТРОЗИЛЬНЫХ КОМПЛЕКСОВ ЖЕЛЕЗА НА ЖИВЫЕ ОРГАНИЗМЫ

Обзор

© 2022 А.Ф. Ванин

ФИЦ химической физики им. Н.Н. Семёнова РАН,
119991 Москва, Россия; электронная почта: vanin.dnic@gmail.com

Поступила в редакцию 11.05.2022

После доработки 05.07.2022

Принята к публикации 05.07.2022

Предложенный нами механизм образования динитрозильных комплексов железа (ДНКЖ), основополагающей стадией которого является диспропорционирование двух молекул NO, связанных с ионом Fe^{2+} , с последующей реализацией резонансной структуры железо-динитрозильного фрагмента ДНКЖ [$Fe^{2+}(NO)(NO^+)$], позволяет говорить об экспериментально подтверждаемой способности этих комплексов выступать в качестве доноров как нейтральных молекул NO, так и катионов нитрозония (NO^+). Приводимый в обзоре анализ биологической активности ДНКЖ с тиол-содержащими лигандами показывает, что высвобождаемые из этих комплексов молекулы NO и катионы нитрозония преимущественно оказывают на живые организмы соответственно позитивное (регуляторное) или негативное (цитотоксическое) действие. Для усиления селективного высвобождения из ДНКЖ катионов нитрозония с одновременным включением высвобождающихся из этих комплексов молекул NO и ионов железа в биологически неактивные моонитрозильные комплексы железа с производными дитиокарбамата предлагается использовать эти производные для обеспечения распада ДНКЖ непосредственно в живых организмах.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: оксид азота, катионы нитрозония, динитрозильные комплексы железа, тиолы.

DOI: 10.31857/S0320972522110173, **EDN:** LXEUYE

ВВЕДЕНИЕ. ФИЗИКО-ХИМИЯ ДИНИТРОЗИЛЬНЫХ КОМПЛЕКСОВ ЖЕЛЕЗА, ОПРЕДЕЛЯЮЩАЯ ИХ СПОСОБНОСТЬ ВЫСТУПАТЬ В КАЧЕСТВЕ ДОНОРОВ NO И NO^+

В настоящее время есть основание полагать, что динитрозильные комплексы железа (ДНКЖ) с тиол-содержащими лигандами, функционирующие в живых организмах в качестве «рабочей формы» одного из универсальных регуляторов метаболических процессов – оксида азота (NO), могут оказывать на эти организмы как позитивное, регуляторное, так и негативное, цитотоксическое действие [1–5].

В задачу предлагаемого обзора входило показать, что лежит в основе этого столь разнонаправленного действия ДНКЖ на живые организмы.

ДНКЖ с тиол-содержащими лигандами, точнее моноядерная форма этих комплексов (М-ДНКЖ), была открыта в дрожжевых клетках и тканях животных в начале 1960-х гг. по характерному для этой формы анизотропному сигналу ЭПР со значениями g-фактора – $g_{\perp} = 2,04$; $g_{\parallel} = 2,014$; $g_{ср.} = 2,03$ – «сигналу 2,03» (рис. 1) [6–10].

Что касается природы центров, ответственных за этот сигнал, она была идентифицирована после того, как Ваниным [12] было

Принятые сокращения: ДНКЖ – динитрозильные комплексы железа; Б-ДНКЖ и М-ДНКЖ – биядерная и моноядерная формы динитрозильных комплексов железа; ДЭТК – диэтилдитиокарбамат; ДТК – дитиокарбамат; MAP – среднее артериальное давление; МГД – N-метил-D,L-глуксаминдитиокарбамат; МНКЖ – моонитрозильные комплексы железа; МС – меркаптосукцинат; ТС – тиосульфат; GSH – глутатион; GS-NO – S-нитрозоглутатион; NAC – N-ацетил-L-цистеин; NAC-NO – S-нитрозо-N-ацетил-L-цистеин; NO^+ – катион нитрозония.

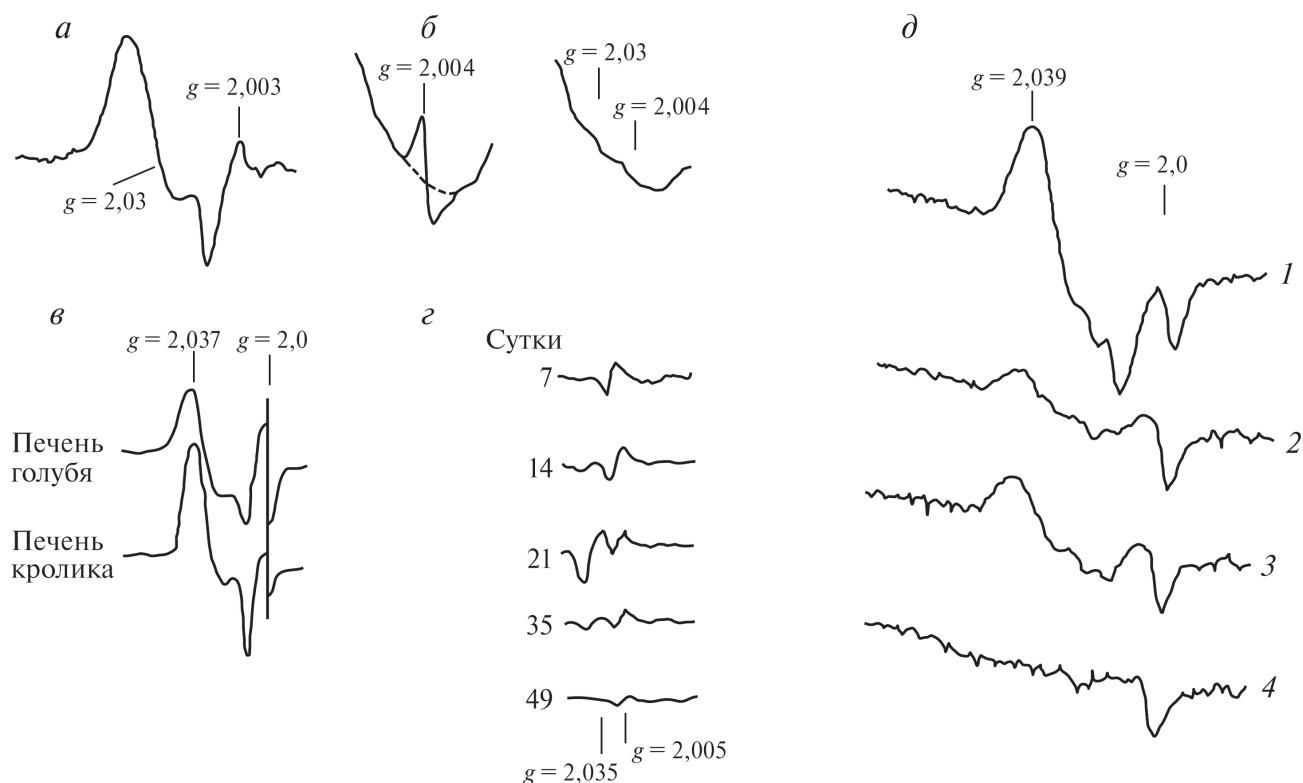


Рис. 1. Сигнал 2,03, впервые зарегистрированный в 1960-е гг.: *a* – в пекарских дрожжах [6, 7]; *б* – в химически индуцированной гепатоме [8]; *в* – в печени голубей и кроликов [9]; *з* – в печени крыс на 7–35 сутки после введения гепатоканцерогена в их диету [10]. *д* – Сигнал 2,03, зарегистрированный в 1990 г. в активированных макрофагах мышей в присутствии субстрата NO-синтазы L-аргинина (спектр 1), L-аргинина и ингибитора NO-синтазы N-метил-L-аргинина (NMLA) (спектр 2), при отсутствии L-аргинина и NMLA (спектр 3) или в присутствии только NMLA (спектр 4) [11]

обнаружено, что растворы М-ДНКЖ с низкомолекулярными тиол-содержащими лигандами, характеризующиеся в процессе регистрации при комнатной температуре узким симметричным сигналом ЭПР [13], при их замораживании дают анизотропный сигнал ЭПР, полностью совпадающий с сигналом 2,03 (рис. 2). Анализ разрешённой сверхтонкой структуры (СТС) сигнала ЭПР этих комплексов, зарегистрированного при комнатной температуре показал, что М-ДНКЖ с тиол-содержащими лигандами включают в себя, наряду с одним атомом железа, по два нитрозильных и по два тиол-содержащих лиганда (формула – $[(RS^-)_2Fe(NO)_2]$), что полностью совпало с последующим рентгеноструктурным анализом этих комплексов в кристаллическом состоянии.

Уже в первой упомянутой выше публикации результатов ЭПР-исследований ДНКЖ с низкомолекулярными тиолами [13] было показано, что при снижении содержания тиолов в растворе при синтезе ДНКЖ с тиол-содержащими лигандами М-ДНКЖ обратимо превращаются в биядерную форму этих комплексов – Б-ДНКЖ (формула – $[(RS^-)_2Fe_2(NO)_4]$). Эта форма, в отличие от М-ДНКЖ, диамагнитна из-за спаривания парамагнитных железо-динитрозильных

фрагментов Б-ДНКЖ при участии мостиковых атомов серы, связывающих эти фрагменты.

Другая деталь – в нашей уже цитированной выше работе [12] и далее в наших последующих публикациях [14–16] было показано, что ДНКЖ могут включать в себя в качестве лигандов не только низкомолекулярные тиолы, но также и тиоловые группы белков с образованием соответствующих белок-связанных ДНКЖ. Из-за низкой подвижности белковой компоненты растворов этих комплексов при комнатной температуре, недостаточной для усреднения анизотропии g-фактора, сигнал ЭПР этих комплексов, регистрируемый при комнатной температуре, характеризуется анизотропной формой, совпадающей с формой сигнала 2,03.

Ясно, что биологическая активность ДНКЖ с тиол-содержащими лигандами, оказывающими на живые организмы как позитивное, так и негативное действие, определяется свойствами электронной оболочки этих комплексов, описываемой различными, в зависимости от окружающей среды, резонансными структурами. Представление об этих структурах можно получить, исходя из механизма образования парамагнитной моноядерной формы этих комплексов – М-ДНКЖ.

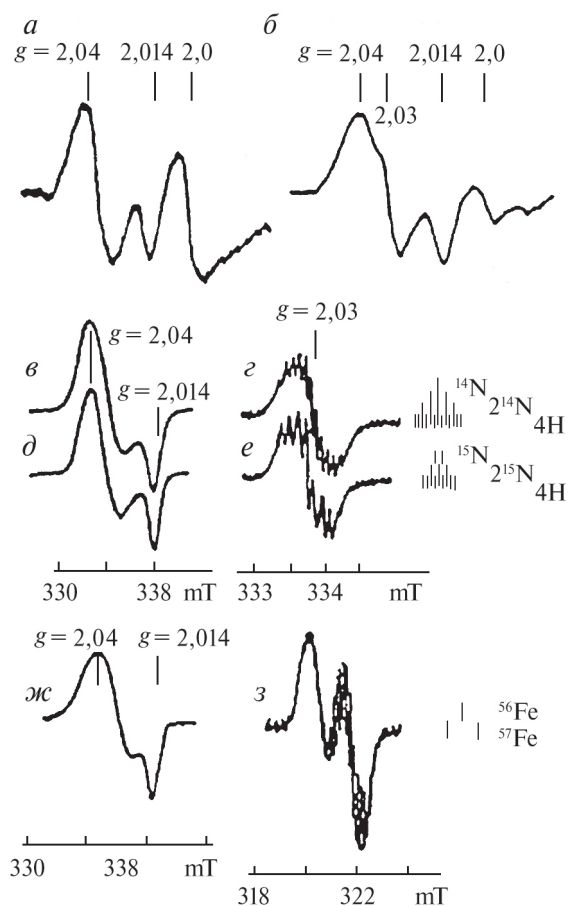


Рис. 2. Сигнал 2,03 ($g = 2,04; 2,014$), зарегистрированный во влажной печени кролика (*a*) и влажных дрожжах (*б*) [14]; ЭПР-спектры растворов ДНКЖ с цистеином, содержащие ^{14}NO (*в* и *з*), ^{15}NO (*д* и *е*) [15] или ^{57}Fe (*ж* и *з*) [16]. Запись произведена при комнатной температуре (*a*, *б*, *г*, *е* и *з*) или 77К (*в*, *д* и *ж*). *и* – Расшифровка СТС для сигнала 2,03 ДНКЖ с цистеином. Сигнал ЭПР при $g = 2,0$ (*a* и *б*) обусловлен эндогенными свободными радикалами

Как следует из упомянутой выше работы [13], ДНКЖ с тиол-содержащими лигандами могут возникать при обработке газообразным NO водных растворов двухвалентного железа и тиолов. Поскольку в ходе этого синтеза молекулы NO попарно связываются с ионом Fe^{2+} , то возникающий железо-динитрозильный фрагмент будет содержать на верхних молекулярных орбиталях (МО)

чётное число (8) электронов (6 d-электронов от Fe^{2+} + 2 электрона от двух свободно-радикальных молекул NO), что в представлении Eneamark–Feltham [17] соответствует формуле железо-динитрозильного фрагмента – $[\text{Fe}(\text{NO})_2]^8$. В этом случае при достаточном энергетическом разнесении верхних МО железо-динитрозильный фрагмент в ДНКЖ должен быть диамагнитным (ЭПР-неактивным), что не соответствует реальному низкоспиновому парамагнитному состоянию М-ДНКЖ с $S = 1/2$. Для устранения этого несоответствия к железо-динитрозильному фрагменту необходимо добавить или отнять один электрон, в результате электронная конфигурация в этом фрагменте должна смениться на парамагнитные конфигурации, описываемые в представлении Eneamark–Feltham соответственно как $[\text{Fe}(\text{NO})_2]^9$ или $[\text{Fe}(\text{NO})_2]^7$.

Наиболее естественным способом смены $[\text{Fe}(\text{NO})_2]^8$ - на $[\text{Fe}(\text{NO})_2]^7$ -конфигурацию при синтезе ДНКЖ представляется включение реакции диспропорционирования – приведённого на схеме 1 одноэлектронного взаимного окисления-восстановления свободнорадикальных молекул NO при участии d-электронной оболочки железа – назовём его «окислительным» механизмом образования ДНКЖ [18–22].

Гидролиз аниона нитроксила, образующегося в результате диспропорционирования молекул NO в этих комплексах, приводит к образованию молекулы нитроксила (HNO), выходящей из лигандного окружения железа с последующим включением в освободившееся место третьей молекулы NO, завершающей синтез низкоспиновых (с $S = 1/2$) моноядерных комплексов (М-ДНКЖ), одна из резонансных структур которых, в соответствии со схемой 1, описывается как $[(\text{RS}^-)_2\text{Fe}^{2+}(\text{NO}^+)(\text{NO})]$.

Согласно Vanin et al. [16], резонансная структура $[\text{Fe}^{2+}(\text{NO})(\text{NO}^+)]$, описывающая состояние железо-динитрозильного фрагмента в М-ДНКЖ, характерна также для тех же фрагментов, включающихся в биядерную форму ДНКЖ (формула – $[(\text{RS}^-)_2\text{Fe}^{2+}_2(\text{NO}^+)_2(\text{NO})_2]$).

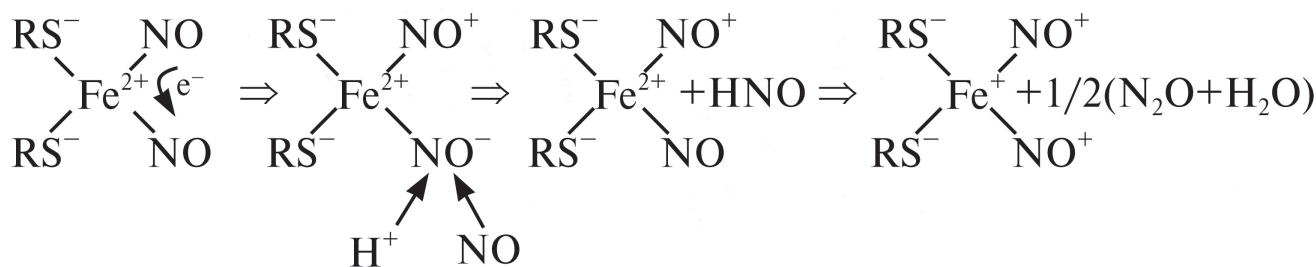


Схема 1. «Окислительный» механизм образования М-ДНКЖ с тиол-содержащими лигандами в реакции Fe^{2+} , NO и тиолов

В принципе, гидролизу (связыванию с анионом гидроксила) может подвергнуться и входящий в железо-динитрозильный фрагмент катион нитрозония (NO^+), превращающийся в ходе этой реакции в анион нитрита (при сохранении нейтральных значений pH). Однако такого превращения в ДНКЖ с тиол-содержащими лигандами не происходит из-за наличия в этих комплексах атомов тиоловой серы. Высокая π -донорная электронная активность этих атомов, передающих часть электронной плотности на катионы нитрозония, обеспечивает снижение положительного заряда на этих лигандах, предотвращая тем самым их связывание с анионами гидроксила, т.е. гидролиз этих катионов. В результате резко повышается стабильность М-ДНКЖ и тем самым время их жизни в клетках и тканях [19]. Кроме того, обеспечивается возможность синтеза экзогенных стабильных ДНКЖ, которые можно использовать в опытах на различных живых организмах.

Возможен ли синтез низкоспиновых ДНКЖ с тиол-содержащими лигандами (с $S = 1/2$) путём одноэлектронного восстановления железо-

динитрозильного фрагмента с исходной $[\text{Fe}(\text{NO})_2]^8$ -конфигурацией, о котором упоминалось выше? О такой возможности, исходя из полученных экспериментальных данных, пишут Truzzi et al. [23]. В соответствии с предложенной ими схемой образования ДНКЖ (схема 2), вначале возникает мононитрозильный комплекс железа, включающий в себя два тиол-содержащих лиганда, с конфигурацией железо-мононитрозильного фрагмента $[\text{Fe}(\text{NO})]^7$, а затем происходит одноэлектронное восстановление этого фрагмента входящим в него тиол-содержащим лигандом с последующим его замещением молекулой NO и включением в комплекс другого тиола – назовём это «восстановительным» механизмом образования ДНКЖ.

В результате этого «восстановительного» механизма возникает М-ДНКЖ с $[\text{Fe}(\text{NO})_2]^9$ -конфигурацией железо-динитрозильных фрагментов, описываемый резонансной структурой $[(\text{RS}^-)_2\text{Fe}^+(\text{NO})_2]$.

Главным аргументом против этой схемы является то, что, исходя из неё, невозмож-

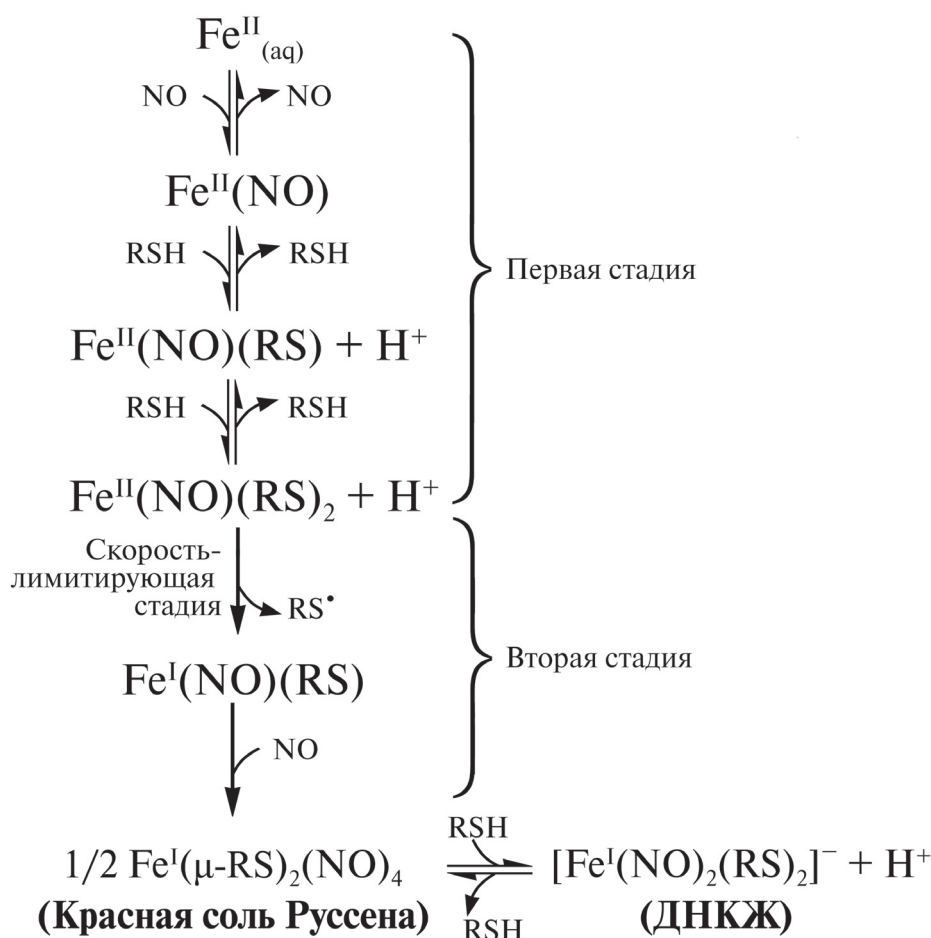


Схема 2. «Восстановительный» механизм образования ДНКЖ в водном растворе, предложенный Truzzi et al. [23]. RSE – тиоэфир красной соли Руссина (Roussine Red Salt thioester)

но объяснить образование М-ДНКЖ с лигандами нетиоловой природы – с фосфатом, цитратом, сукцинатом, наконец, с водой, характеризующихся, как и М-ДНКЖ с тиол-содержащими лигандами, низкоспиновым состоянием с $S = 1/2$ и сигналами ЭПР, хотя и отличающимися по форме от сигнала 2,03, но с тем же средним значением g-фактора и примерно теми же главными значениями этого тензора [12, 13]. Очевидно, вряд ли можно утверждать, что перечисленные нетиоловые лиганды способны, как их тиол-содержащие аналоги, восстанавливать железо-мононитрозильный фрагмент с $[\text{Fe}(\text{NO})]^{7-}$ -конфигурацией до $[\text{Fe}(\text{NO})]^{8-}$ с последующим её превращением в конфигурацию $[\text{Fe}(\text{NO})_2]^{9-}$ с $S = 1/2$. Что касается механизма образования М-ДНКЖ, основой которого является реакция диспропорционирования молекул NO, для этого механизма не имеет значения, способны ли анионные лиганды или нет выступать в качестве восстановителей.

Резонансная структура железо-динитрозильных фрагментов – $[\text{Fe}^{2+}(\text{NO}^+)(\text{NO})]$ в М- и Б-ДНКЖ, которая следует из механизма, учитывающего диспропорционирование молекул NO при образовании этих комплексов, даёт

основание говорить об их способности выступать в качестве доноров как нейтральных молекул NO, так и катионов нитрозония, причём в соответствии со схемой их равновесного распада (схема 3) – в равном соотношении [18–22].

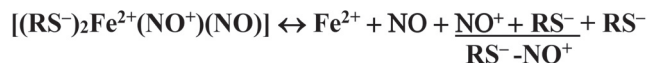


Схема 3. Химическое равновесие между М-ДНКЖ с тиол-содержащими лигандами, синтезированным по «окислительному» механизму, и составляющими М-ДНКЖ компонентами

В присутствии тиолов катионы нитрозония включаются в S-нитрозотиолы (RS-NO), при удалении тиолов катионы нитрозония гидролизуются в анионы нитрита.

Иная ситуация, очевидно, реализуется при равновесном распаде М- и Б-ДНКЖ при $[\text{Fe}(\text{NO})_2]^{9-}$ -конфигурации железо-динитрозильных фрагментов (схема 4).



Схема 4. Химическое равновесие между М-ДНКЖ с тиол-содержащими лигандами, синтезированным по «восстановительному» механизму, и составляющими М-ДНКЖ компонентами

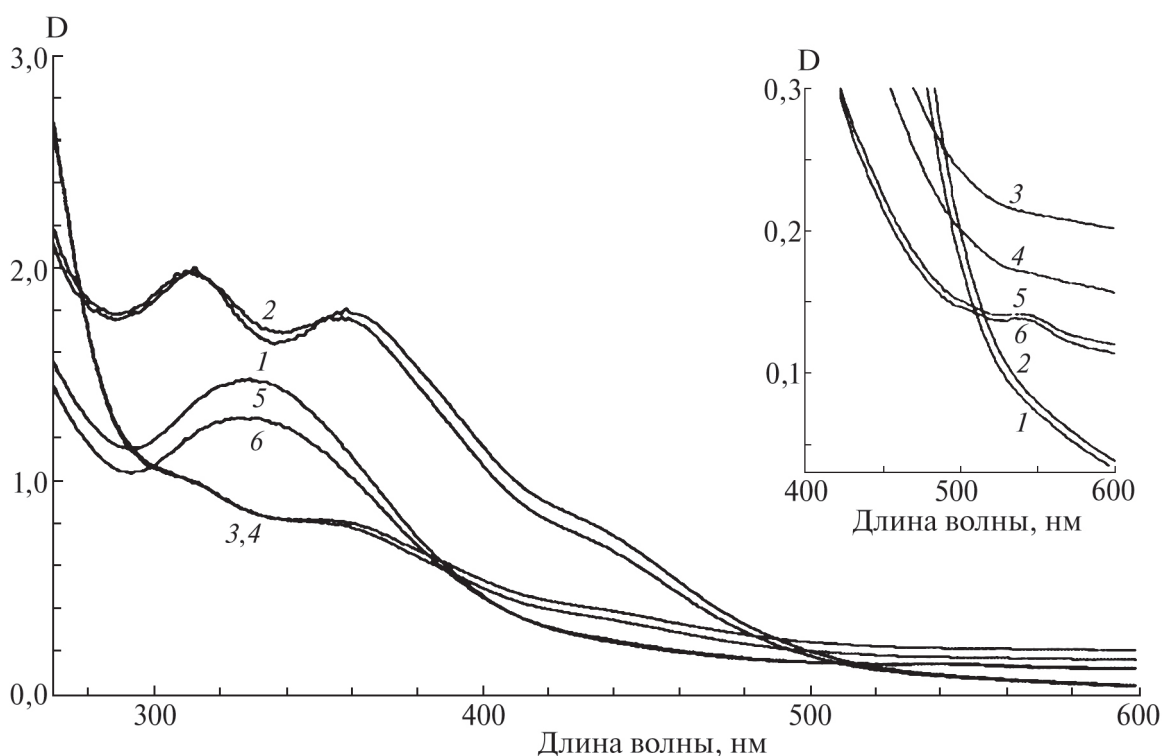


Рис. 3. Спектры поглощения 0,5 мМ растворов Б-ДНКЖ-НАС, содержащих 2,0 и 0,5 мМ НАС, не включённого в комплексы (соответственно кривые 1 и 2). Кривые 3–6 – спектры поглощения 2,0 мМ растворов тех же комплексов, содержащих 8,0 мМ (кривые 3 и 4) или 2,0 мМ НАС (кривые 5 и 6), не включённых в эти комплексы, подвергнутых нагреванию при 80 °С в анаэробных условиях в течение 7–9 мин. Спектры 5 и 6 с полосами на 334 и 543 нм (на вставке) обусловлены образующимися НАС-NO. Коэффициенты экстинкции Б-ДНКЖ и НАС-NO для полос поглощения 360 и 334 нм – соответственно 3700 (в пересчёте на один атом железа в Б-ДНКЖ) и 0,94 $\text{M}^{-1}\cdot\text{см}^{-1}$ [22]

В этом случае нитрозильные лиганды высвобождаются в форме нейтральных молекул NO и анионов нитроксила, но только не в форме катионов нитрозония. Последнему, как это следует из схемы 4, препятствует локализация на железо-динитрозильных фрагментах высокой электронной плотности, определяемой в соответствии с представлением Eneemark–Feltham [17] формулой $[\text{Fe}(\text{NO})_2]^9$. В связи с этим можно было предполагать, что если бы удалось экспериментально показать, что М-ДНКЖ с тиол-содержащими лигандами, так же как и их биядерные аналоги, способны при распаде высвобождать как молекулы NO, так катионы нитрозония, этот факт мог бы однозначно свидетельствовать в пользу $[\text{Fe}(\text{NO})_2]^7$ -конфигурации железо-динитрозильных фрагментов в этих комплексах. Другими словами, можно было бы говорить о реализации при их синтезе механизма диспропорционирования молекул NO, попарно связывающихся с ионами двухвалентного железа с последующими процессами, показанными на схемах 1 и 3.

Такого рода исследования [20–22] полностью подтвердили это предположение. Оказалось, что при прогреве при 80 °С биядерной формы ДНКЖ с глутатионом (GSH) или N-ацетил-L-цистеином (NAC) в сильноокислых растворах (при pH 1–2) вне зависимости от наличия или отсутствия воздуха в системе происходил, судя по исчезновению спектра поглощения этих комплексов, полный их распад с появлением полос поглощения, характерных

для S-нитрозированных форм GSH и NAC (GS-NO и NAC-NO), как это продемонстрировано на рис. 3 для Б-ДНКЖ-NAC [22].

Как следует из рис. 3, при минимальном соотношении концентрации Б-ДНКЖ-NAC и невключённого в комплексы (свободного) NAC (1 : 1) прогрев их раствора в анаэробных условиях приводил к образованию NAC-NO в концентрации, соответствующей включению в NAC-NO в форме NO^+ половины (в соответствии со схемой 3) нитрозильных лигандов Б-ДНКЖ (рис. 3, кривые 5 и 6, полученные в двух независимых опытах). Таким образом, этот результат показал, что при распаде ДНКЖ с тиол-содержащими лигандами из них действительно могут высвобождаться катионы нитрозония, что является, по мнению автора обзора, однозначным доказательством реальности предложенного механизма образования этих комплексов, основой которого предполагается реакция диспропорционирования молекул NO (схема 1).

При более высокой концентрации свободного NAC (при соотношении NAC : Б-ДНКЖ-NAC, равном 4 : 1) образования NAC-NO в этих опытах не обнаруживалось (рис. 3, кривые 3 и 4, полученные в двух независимых опытах). По-видимому, при избытке этого тиола он мог инициировать восстановление NO^+ до NO. Возможный механизм такого восстановления будет рассмотрен в заключительной части обзора.

Как следует из схемы 3, наряду с высвобождением из распадающихся ДНКЖ катионов нитрозония, эти комплексы спо-

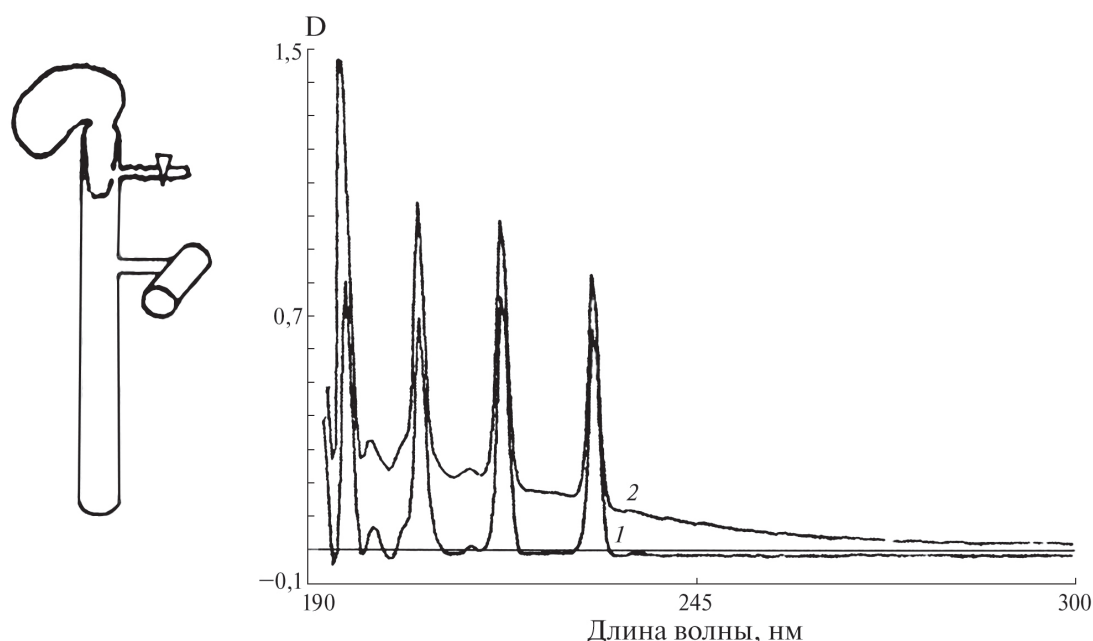


Рис. 4. Слева – схема модифицированного аппарата Тунберга, использованного для измерения оптического поглощения NO и NO₂ в газовой фазе. Справа – спектр оптического поглощения NO (четыре эквидистантных узких полосы, кривая 1) и суммарное оптическое поглощение газовой смеси NO и NO₂ (кривая 2)

собны выступать не менее эффективно и в качестве доноров молекул NO. Высвобождение последних из ДНКЖ было продемонстрировано Borodulin et al. [24] с помощью разработанного метода регистрации газообразного NO по характерному спектру поглощения в УФ-области – четырёх узким эквидистантным полосам поглощения в диапазоне 220–190 нм (рис. 4, справа). Эти полосы регистрировались при пропускании луча света в спектрофотометре вдоль оси цилиндрической кюветы, наполненной газообразными NO или NO₂ (рис. 4, слева).

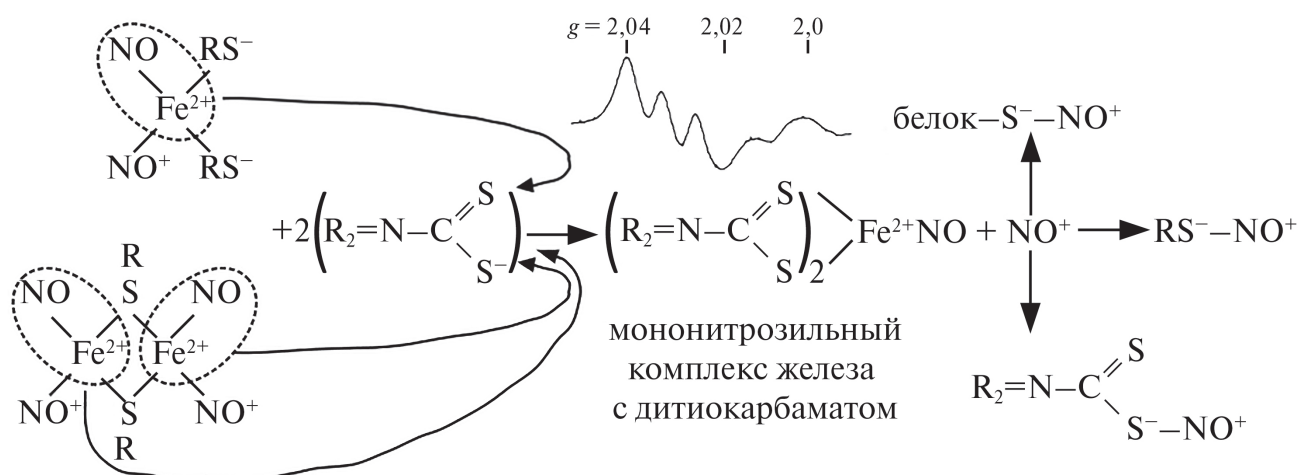
При блокаде тиоловых групп в М- и Б-ДНКЖ с тиол-содержащими лигандами различными тиоловыми реагентами или при окислении этих групп, вызывающих распад ДНКЖ, высвобождающиеся из комплексов катионы нитрозония при нейтральных значениях pH раствора гидролизуются (из-за отсутствия тиолов) в нитрит, тогда как другая половина нитрозильных лигандов высвобождалась в форме газообразного NO, регистрируемого как показано на рис. 4 по четырём эквидистантным полосам оптического поглощения [20, 22].

Способность ДНКЖ с тиол-содержащими лигандами выступать в живых организмах в качестве доноров как катионов нитрозония, так и нейтральных молекул NO, естественно, делает затруднительным выяснение вопроса, какой из этих компонентов ДНКЖ может быть ответственным за какое-либо биологическое действие этих комплексов. Нами предложен экспериментальный подход для решения этой проблемы, позволяющий выявить биологическое действие ДНКЖ, обусловленное только высвобождаю-

щимися из этих комплексов катионами нитрозония. Суть его состоит в использовании в опытах с ДНКЖ производных дитиокарбамата (ДТК) – диэтилдитиокарбамата (ДЭТК) или N-метил-D,L-глюкаминдитиокарбамата (МГД) [25]. Как показано на схеме 5, при контакте с ДНКЖ эти агенты перехватывают на себя из железодинитрозильных [Fe(NO)₂]-фрагментов этих комплексов железо-мононитрозильную группу – [Fe(NO)], образующую с производными дитиокарбамата (R₂=NCS₂) прочные ЭПР-регистрируемые мононитрозильные комплексы железа (МНКЖ), характеризующиеся формулой [(R₂=NCS₂)₂FeNO].

Образующиеся высокостабильные МНКЖ с МГД или ДЭТК биологически неактивны, так что ни включённые в них молекулы NO, ни ионы Fe²⁺, ни дитиокарбаматные лиганды не высвобождаются из них и не способны в связи с этим оказывать на живые организмы какое-либо действие. Что касается катионов NO⁺, высвобождающихся при этом из железодинитрозильных фрагментов ДНКЖ, в живых организмах они преимущественно могут включаться в реакцию S-нитрозирования, показанную на схеме 5, с образованием соответствующих S-нитрозотиолов [25–27]. Кроме того, катионы нитрозония могут воздействовать на различные клеточные компоненты как сильные окислители [26, 27]. Эти воздействия и инициируют, по-видимому, в клетках различные негативные, цитотоксические эффекты.

Эксперименты, проведённые английскими исследователями на культуре фибробластов Swiss 3T3, показали, что в дозовом отношении



М- и Б-ДНКЖ + дитиокарбамат

Схема 5. Механизм превращения Б- и М-ДНКЖ с тиол-содержащими лигандами в МНКЖ с ДЭТК или МГД. Высвобождающиеся при этом катионы NO⁺ могут S-нитрозировать низкомолекулярные и белковые тиолы, а также тиоловую группу в составе ДЭТК или МГД. Наверху приводится зарегистрированный при 77К сигнал ЭПР со значениями g-фактора – 2,04 и 2,02 и триплетной сверхтонкой структурой, характерный для МНКЖ с дитиокарбаматом [25]

катионы нитрозония в 40 раз более цитотоксичны, чем молекулы NO [28]. Доноры NO⁺ – ионы нитропрусида [(CN)⁻₅Fe²⁺NO⁺]²⁻ – вызывали апоптоз у 50% клеток фибробластов уже после 2-часовой инкубации этих клеток с 20 мкМ нитропрусида, тогда как аналогичное действие на фибробласты Swiss 3T3 молекулы NO оказывали только при концентрации 800 мкМ через 24 ч инкубации клеток с газообразным NO или с донорами NO – S-нитрозоглутатионом (GS-NO) или S-нитрозо-N-ацетилпенициламин (SNAP). Аналогичный результат получен для бактерий [29, 30]. Таким образом, есть основание полагать, для катионов нитрозония характерен более выраженный цитотоксический эффект по сравнению с молекулами NO. Поскольку оба этих агента – NO⁺ и NO – могут высвобождаться из ДНКЖ с тиол-содержащими лигандами, оказываемое этими комплексами негативное, цитотоксическое действие на живые организмы, вероятнее всего, может быть обусловлено высвобождающимися из них катионами нитрозония, тогда как позитивное, регуляторное действие – высвобождающимися из ДНКЖ нейтральными молекулами NO.

ПОЗИТИВНОЕ, РЕГУЛЯТОРНОЕ ДЕЙСТВИЕ ДНКЖ КАК ДОНОРОВ NO НА ЖИВЫЕ ОРГАНИЗМЫ

В настоящее время обнаружено разнообразное позитивное, регуляторное действие ДНКЖ с тиол-содержащими лигандами на различные биосистемы. Например, продемонстрирована их способность повышать жизнеспособность культур незлокачественных клеток при вариации концентрации комплексов в диапазоне 20–250 мкМ [31–34] и вместе с тем оказывать на культуры злокачественных клеток токсическое действие примерно в том же диапазоне концентраций [25, 35, 36]. Другой пример: оказалось, что при оральном введении мышам ДНКЖ с меркаптоэтанолом, эти комплексы, переходя на альбумин или муцин, поступали из желудка в мозг этих животных, индуцируя нейрогенез в гиппокампусе и усиливая тем самым когнитивные способности мышей [37]. К сожалению, в этих исследованиях вопрос о том, какими компонентами ДНКЖ – молекулами NO или катионами нитрозония – были обусловлены эти эффекты, в цитированной работе не ставился. Что касается других приводимых ниже примеров позитивного действия ДНКЖ с тиол-содержащими лигандами на живые организмы, можно с достаточно чёткой уверенностью гово-

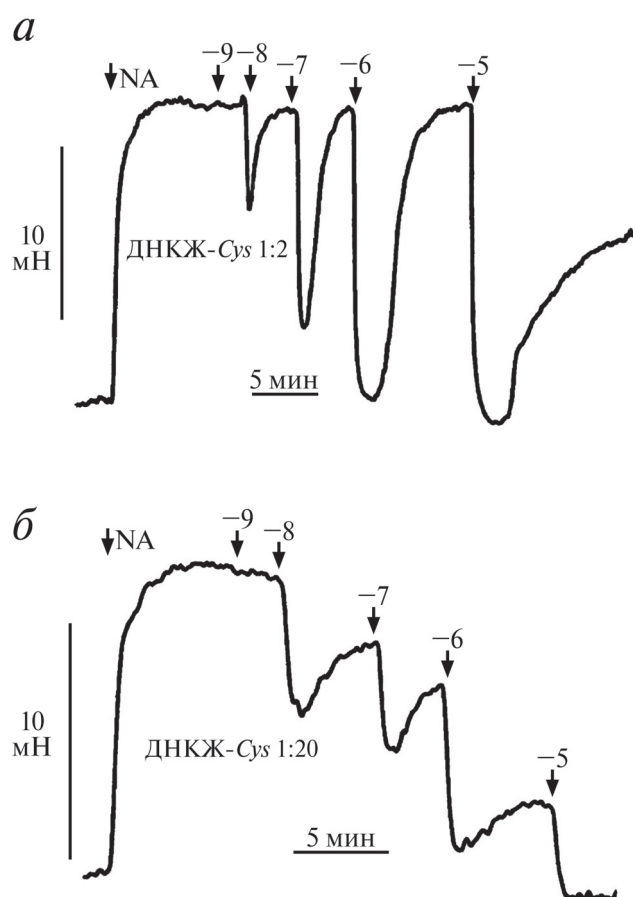


Рис. 5. Вазодилаторное действие ДНКЖ с цистеином при соотношении ДНКЖ и несвязанного с комплексом (свободного) цистеина, равном 1 : 2 (а) или 1 : 20 (б) в зависимости от дозы ДНКЖ (от 1 нМ до 10 мкМ) на кольцевом сегменте абдоминальной аорты крыс с сохранённым эндотелием, предварительно сокращённым норадреналином (NA, 10⁻⁷ М)

рить о том, что эффекты действительно были обусловлены высвобождением из этих комплексов нейтральных молекул NO.

В первую очередь это касается вазодилаторной [38–41] и гипотензивной [42–47] активности этих комплексов, демонстрируемой на рис. 5 и 6.

Как следует из рис. 5, ДНКЖ с цистеином вызывают расслабление сосудов, начиная с концентрации 10 нМ. При этом скорость восстановления тонуса сосуда снижается по мере повышения содержания свободного цистеина в среде, что коррелирует с повышением стабильности ДНКЖ в этой среде. Вазодилаторная активность этих комплексов полностью подавлялась в присутствии ингибиторов гуанилатциклазы – гем-содержащего фермента, активируемого молекулярным NO [39]. Этот факт однозначно свидетельствует о том, что именно молекулы NO, высвобождавшиеся из ДНКЖ, ответственны за вазорелаксирующее действие этих комплексов.

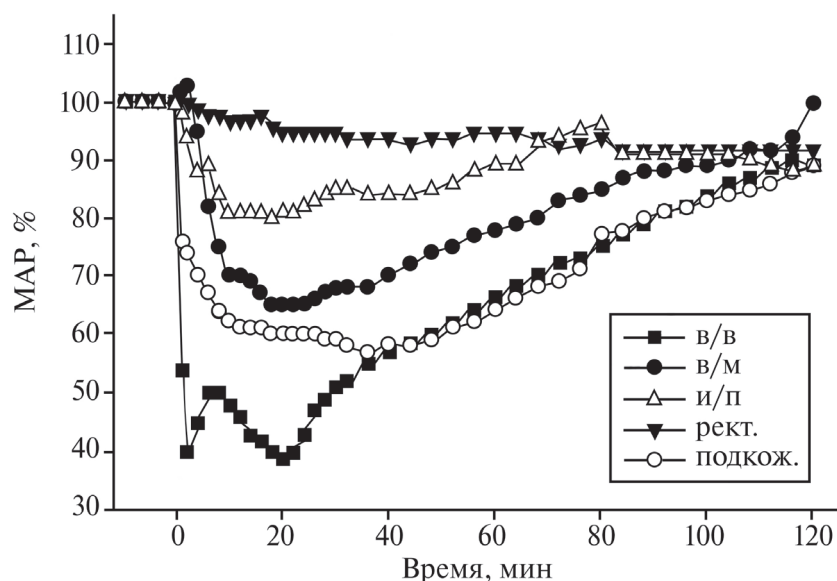


Рис. 6. Изменение среднего артериального давления (МАР, в % к исходному) у крыс при болюсном внутривенном (в/в), внутримышечном (в/м), интраперитонеальном (внутрибрюшинном) (и/п), ректальном (рект.) или подкожном (подкож.) введении крысам Б-ДНКЖ с глутатионом (в дозе 2 мкмольа на кг веса животного)

Впервые вазодилататорное действие ДНКЖ с тиол-содержащими лигандами было обнаружено нами в сотрудничестве с Ю.П. Ведерниковым во Всесоюзном кардиологическом научном центре (ВКНЦ) [38], а затем этот результат воспроизведён [39] нами в Германии в сотрудничестве с Р. Буссе и А. Мюльшем. В это же время независимо группа английских исследователей получила аналогичный результат [40]. Естественно было ожидать, что высокая вазодилататорная активность ДНКЖ должна была обеспечивать гипотензивное действие этих комплексов, что и было обнаружено нами в 80-е гг. сначала на наркотизированных (анестезированных) крысах, а затем и на бодрствующих животных [42–44]. Более детальное изучение этого эффекта было продолжено в сотрудничестве с сотрудниками ВКНЦ в 2000-е гг. [45–47].

В качестве примера одного из результатов этих исследований на рис. 6 показано изменение среднего артериального давления (МАР) у крыс в зависимости от способа введения им Б-ДНКЖ с глутатионом (рис. 6) [47].

В отличие от в/в введения комплекса, при котором обнаруживалась фаза кратковременного (на несколько минут) снижения МАР, обусловленного высвобождением NO из вводимых низкомолекулярных ДНКЖ, при других способах инъекции ДНКЖ с GSH эта фаза не наблюдалась. В таких случаях гипотензия определялась высвобождением NO из белковых ДНКЖ, возникающих в результате переноса железо-динитрозильных $[\text{Fe}(\text{NO})_2]$ -фрагментов с низкомолекулярных ДНКЖ на белковые тиолы с образованием белок-связан-

ных ДНКЖ. Высокая устойчивость последних обеспечивала лишь медленное высвобождение из них молекул NO с медленным снижением МАР и медленным его восстановлением до исходного уровня. Аналогичная кинетика изменения МАР наблюдалась и при в/в введении ДНКЖ с GSH после быстрого превращения последних в белок-связанные ДНКЖ, которые обнаруживались в крови животных по сигналу 2,03, сохранявшему анизотропную форму при повышении температуры его регистрации от 77К до комнатной температуры [45, 46].

На участие молекул NO, высвобождавшихся из ДНКЖ, как детерминантов гипотензивного действия этих комплексов на бодрствующих крыс (рис. 7, а, кривые 1 и 2), свидетельствуют результаты исследования влияния ДЭТК на кинетику гипотензивного эффекта ДНКЖ с тиосульфатом [44]. Как показано на рис. 7, а (кривая 3), в/в введение крысам этого комплекса через 1 мин после такого же введения им раствора ДЭТК приводило практически к полному снятию гипотензивного эффекта. При введении ДЭТК после ДНКЖ в моменты, указанные на рис. 7, а (кривые 4 и 5) стрелками, наблюдалось кратковременное снижение артериального давления, сменявшееся постепенным его восстановлением до исходного уровня.

Как показано на схеме 5, при контакте ДНКЖ с производными дитиокарбамата (ДТК) возникают весьма устойчивые комплексы МНКЖ–ДТК, жёстко удерживающие железо-моонитрозильную группу и тем самым предотвращающие действие на клетки и ткани входящих в эту группу молекулы NO и иона Fe^{2+} .

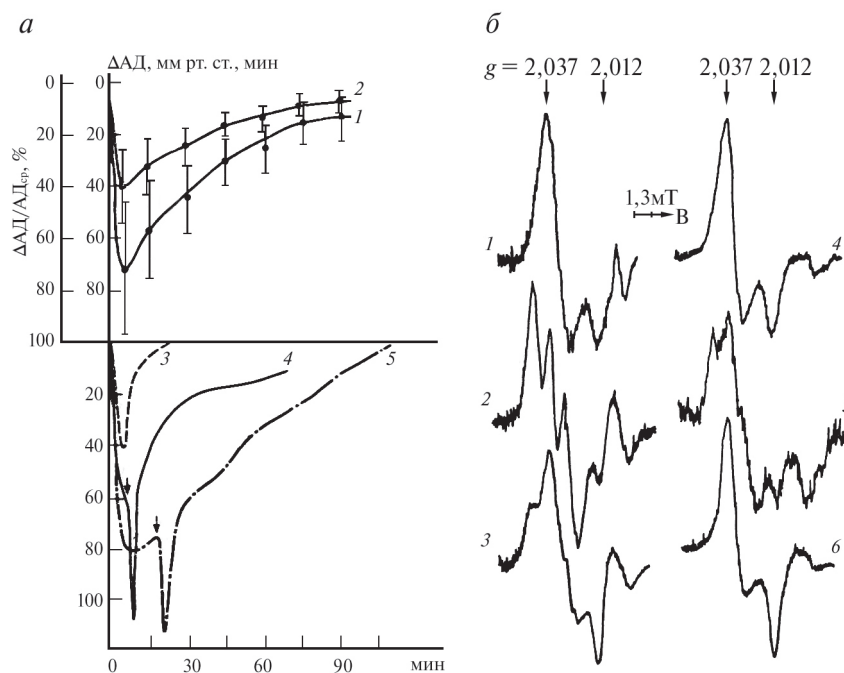


Рис. 7. Изменение артериального давления (АД или Δ АД) у бодрствующих крыс (*a*) после в/в введения им ДНКЖ с тиосульфатом в дозе 10 мкмоль/кг веса животных (кривые 1 и 2); ДНКЖ введён через 1 мин после в/в введения ДЭТК (30 мг/кг) (кривая 3); ДЭТК вводили животным после ДНКЖ в моменты, указанные стрелками (кривые 4 и 5). *б* – Спектры ЭПР крови (1 и 4), печени (2 и 5) и почек (3 и 6), полученных у крыс при последовательном введении ДЭТК + ДНКЖ с интервалом 1 мин (1–3) или последовательном введении ДНКЖ + ДЭТК с интервалом 1 мин (4–6). Спектры зарегистрированы при 77 К

Очевидно, что именно включение NO в МНКЖ с ДЭТК предварительно обработанным крысам приводило к резкому ослаблению гипотензивного действия ДНКЖ, показанному на рис. 7. Об этом свидетельствует также трансформация сигнала 2,03 в тканях этих животных (рис. 7, *б*, спектры 1–3): в печени и почках регистрировался триплетный сигнал ЭПР, характерный для МНКЖ–ДЭТК, тогда как в крови снижалась амплитуда компоненты сигнала 2,03 при $g = 2,012$. Это снижение наблюдалось нами ранее в специальных опытах, в которых изучалось взаимодействие ДЭТК с ДНКЖ, связанными в крови крыс с молекулами альбумина [48]. Что касается дополнительного кратковременного снижения артериального давления при введении крысам ДЭТК после ДНКЖ (рис. 7, *a*, кривые 4 и 5), оно, очевидно, было обусловлено быстрым распадом S-нитрозотиолов (RS-NO), образующихся в соответствии со схемой 5 в реакции ДНКЖ с ДЭТК. Высвобождавшиеся из RS-NO молекулы NO и обеспечивали наблюдавшееся кратковременное снижение артериального давления [44]. Часть ДНКЖ, появляющихся в тканях животных, могла в этих опытах оставаться недоступной для ДЭТК, о чём свидетельствует факт меньшего вклада триплетного сигнала ЭПР от МНКЖ–ДЭТК в суммарные спектры ЭПР, приводимые на рис. 7, *б* (спектры 5 и 6). Эти сохранившиеся ДНКЖ и обе-

спечивали задержку восстановления артериального давления до исходного уровня (рис. 7, *a*, кривые 4 и 5).

Итак, основной результат этих исследований – доказательство того, что гипотензивная активность ДНКЖ в наших опытах определялась высвобождающимися из этих комплексов молекулами NO, связывающимися с гемовым железом в гуанилатциклазе, и тем самым активирующими этот фермент.

Аналогичное заключение можно сделать и в отношении способности ДНКЖ с тиол-содержащими лигандами ускорять заживление, по крайней мере, кожных ран. Этот процесс, вызываемый ДНКЖ, полностью имитировал заживление этих ран, стимулированное газобразным NO, подаваемым на раны, или NO, продуцируемым в них из L-аргинина при участии конститутивных и индуцибельной NO-синтаз [49, 50]. То же самое можно сказать и в отношении способности ДНКЖ с тиол-содержащими лигандами подавлять агрегацию тромбоцитов и, более того, инициировать лизис уже образовавшихся тромбов [51, 52]. Здесь следует отметить и то, что, как было показано в работе Шамовой и соавт. [53], ДНКЖ способны резко повышать эластичность эритроцитов и тем самым облегчать их движение в капиллярах – свойство ДНКЖ, полезное для улучшения микроциркуляции.

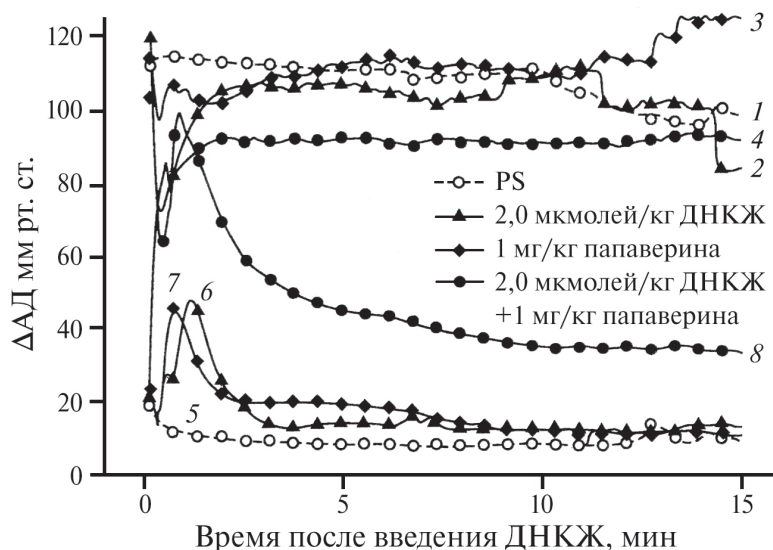


Рис. 8. Изменение во времени системного среднего артериального давления (кривые 1–4) и внутрикавернозного давления крови в кавернозных (пещеристых) телах пениса (кривые 5–8) при внутрикавернозном (в/к) введении крысам-самцам ДНКЖ с цистеином в дозе 2 мкмоль на кг веса животного – кривые 2 и 6; папаверина (1 мг/кг веса животного) – кривые 3 и 7, суммарном введении (ДНКЖ + папаверин) в тех же концентрациях – кривые 4 и 8 и физраствора (PS) – кривые 1 и 5

Во всех этих биосистемах позитивное, регуляторное действие ДНКЖ было обусловлено высвобождением из них молекул NO, активирующих один из важнейших регуляторных ферментов клеток и тканей – гуанилатциклазу, ответственную за появление в биосистемах одного из вторичных мессенджеров – циклического гуанозинмонофосфата (сGMP), запускавшего сложную систему биохимических процессов, приводивших в итоге к физиологическим эффектам, вызванным взаимодействием с гуанилатциклазой молекулярного NO, в частности, высвобождавшегося из ДНКЖ.

Гидролиз сGMP соответствующей фосфодиэстеразой (ФДЭ-5) блокировал реализацию этих эффектов. В свою очередь, подавление активности этого фермента, например, папаверином, усиливало эти эффекты, например, существенно повышало длительность гипотензивного действия ДНКЖ [54]. Эти закономерности четко проявлялись в наших опытах на животных по изучению эректильного действия ДНКЖ с тиол-содержащими лигандами [54], результаты которых продемонстрированы на рис. 8.

Введение в пенис крыс-самцов ДНКЖ с цистеином вместе с папаверином (кстати, аналогом Виагры) приводило к резкому повышению длительности эрекции пениса. Более того, у 10 из 17 принимавших участие в эксперименте животных развивалось явление приапизма (необратимая эрекция из-за отсутствия оттока венозной крови из пениса). Величина давления крови в кавернозных телах достигала уровня, равного

системному среднему артериальному давлению у тех же животных. Характерно, что пенил-эректильная реакция на ДНКЖ с цистеином имела место и у крыс, подвергнутых хирургической денервации кавернозной ткани [54].

НЕГАТИВНОЕ, ЦИТОТОКСИЧЕСКОЕ ДЕЙСТВИЕ ДНКЖ КАК ДОНОРОВ NO⁺ НА КЛЕТКИ И ТКАНИ

Впервые цитотоксическое действие ДНКЖ как доноров катионов нитрозония было продемонстрировано в работе российских и немецких исследователей [35] на культуре опухолевых клеток Jurkat человека с использованием М-ДНКЖ с тиосульфатом (М-ДНКЖ–ТС). Как показано на рис. 9, при одновременном введении в культуру опухолевых клеток 0,1 мМ М-ДНКЖ–ТС и 0,2 мМ МГД количество клеток в состоянии апоптоза повышалось до 60%. Если же учесть, что, в соответствии со схемой 5, при указанном соотношении количества М-ДНКЖ и производного дитиокарбамата (МГД), железо-мононитрозильная группа из М-ДНКЖ–ТС должна была полностью включаться в биологически неактивные МНКЖ–МГД с высвобождением 0,1 мМ катионов нитрозония, можно утверждать, что 60%-ный уровень апоптоза был обусловлен только высвобождающимся из М-ДНКЖ–ТС 0,1 мМ NO⁺.

Таким образом, МГД, фактически обеспечивавший распад М-ДНКЖ–ТС (как это

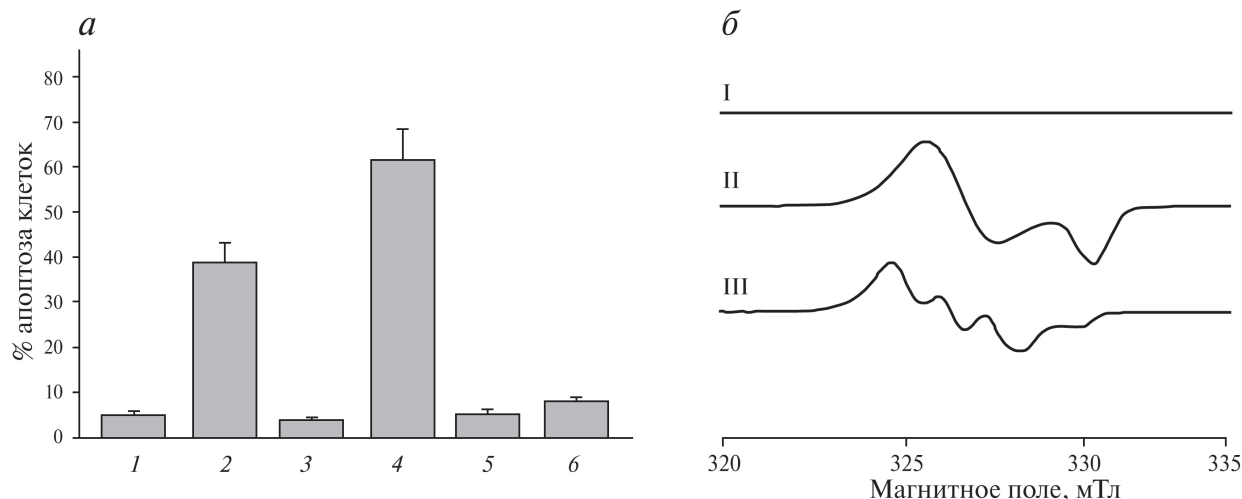


Рис. 9. Иницирование апоптоза в культуре клеток Jurkat при введении М-ДНКЖ–ТС и МГД. *а* – Доля (в %) клеток Jurkat в состоянии апоптоза в контроле (столбик 1), после добавления в клеточную культуру 0,1 мМ М-ДНКЖ–ТС (ДНКЖ, столбик 2), М-ДНКЖ–ТС + 2 мМ GSH (ДНКЖ + GSH, столбик 3), М-ДНКЖ–ТС + 0,2 мМ МГД (ДНКЖ + МГД, столбик 4), 0,2 мМ МГД (столбик 5) и 0,1 мМ (Fe + тиол) (столбик 6). *б* – Трансформация сигнала 2,03 (I), зарегистрированного в клеточной культуре после добавления к ней М-ДНКЖ–ТС, в сигнал ЭПР МНКЖ–МГД (II) при последующем введении в культуру 0,2 мМ МГД. III – контроль

следует из приводимых на рис. 9, ЭПР-спектров I–III) за счёт появляющихся катионов нитрозония, резко повышал цитотоксическое действие М-ДНКЖ. Характерно, что при замещении в М-ДНКЖ–ТС тиосульфата на глутатион, что приводило к образованию более устойчивого Б-ДНКЖ–GSH, цитотоксическая активность препарата существенно ослаблялась (рис. 9, *а*, столбик 3).

Проведённые нами аналогичные эксперименты на культуре опухолевых клеток человека MCF-7 с использованием Б-ДНКЖ с меркаптосукцинатом (Б-ДНКЖ–МС) или

Б-ДНКЖ–GSH также показали, что добавление к ним МГД резко ослабляло выживаемость клеток при действии на них обоих комплексов (выживаемость оценивалась по МТТ-тесту, т. е. по ослаблению активности митохондрий [25] (рис. 10).

Как следует из рис. 10, в соответствии с вышеприведённым рассмотрением, 0,5 мМ катионов нитрозония, высвобождавшихся под действием МГД из Б-ДНКЖ–МС на 30% ослабляли выживаемость клеток. В опытах с Б-ДНКЖ–GSH эта величина достигалась при соотношении комплекса и МГД, равном 1 : 3.

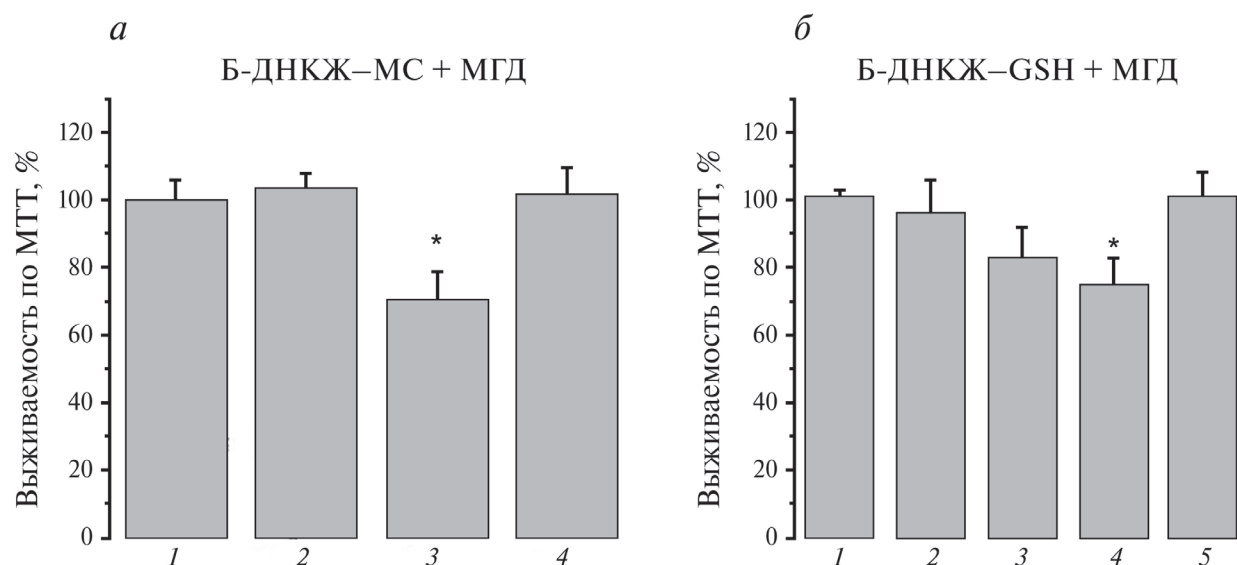


Рис. 10. Ослабление выживаемости клеток MCF-7 под действием Б-ДНКЖ–МС (*а*) или Б-ДНКЖ–GSH (*б*) при добавлении к ним МГД, определявшееся МТТ-методом. Соотношение концентрации обоих Б-ДНКЖ/МГД в мМ следующее: *а* – 0/0 (1); 0,5/0 (2); 0,5/1 (3); *б* – 0/0 (1); 1/0 (2); 1/2 (3); 1/3 (4). Столбики 4 на панели *а* и 5 – на панели *б* характеризуют влияние МНКЖ/МГД при концентрации этих комплексов 0,5 (4) и 1,0 мМ (5)

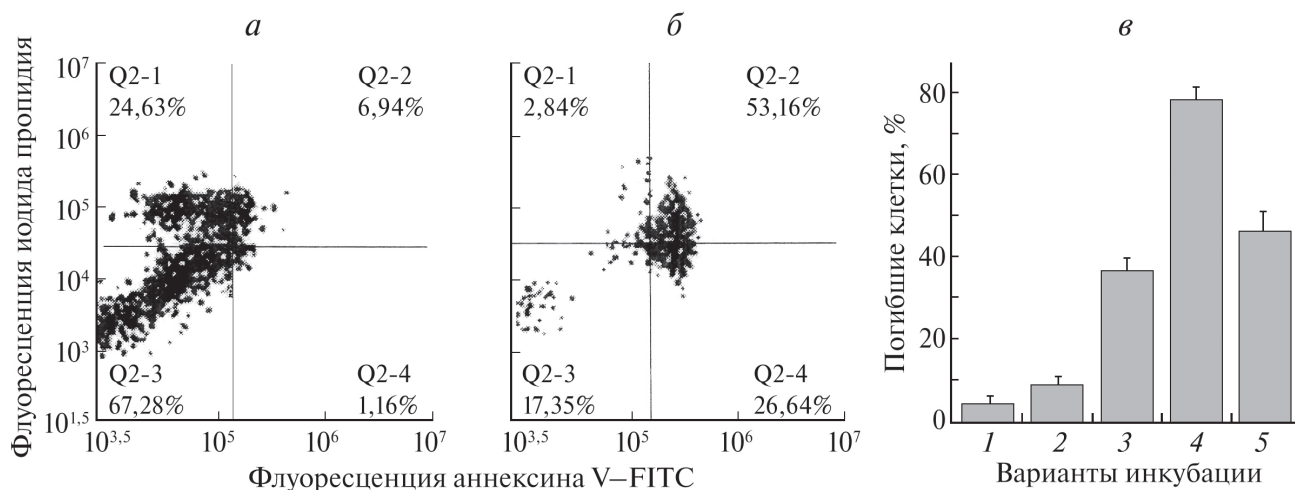


Рис. 11. 2D-диаграммы, полученные методом проточной цитофлуориметрии клеточной культуры. Гибель клеток MCF-7 при их обработке М-ДНКЖ–МС (0,5 мМ) и МГД (1,0 мМ) (по окрашиванию смеси «аннексин + пропидий иодид»). Клетки инкубировали или только с Б-ДНКЖ–МС (а) или смесью Б-ДНКЖ–МС + МГД (б). в – Гибель клеток в %-ном отношении: столбик 1 – контроль; столбик 2 – инкубация с Б-ДНКЖ–МС; столбик 3 – инкубация с МГД; столбик 4 – инкубация со смесью Б-ДНКЖ–МС + МГД; столбик 5 – сумма эффектов Б-ДНКЖ–МС и МГД (столбики 2 + 3) при отсутствии взаимодействия между ними

Не исключено, что низкая эффективность действия катионов нитрозония в этих опытах была обусловлена слабым проникновением МГД в клетки, недостаточным для эффективного токсического действия, появляющегося в клетках нитрозония на митохондрии.

Более эффективное подавление выживаемости клеток (их гибель) в этой культуре определялось по двумерной диаграмме, полученной методом проточной цитофлуориметрии [25], характеризующей степень апоптоза (по флуоресценции аннексина V-FITC) и степень некроза (по флуоресценции пропидия иодида) (рис. 11).

Как следует из рис. 11, б, % клеток, подвергшихся апоптозу, резко повышался при инкубации клеток с М-ДНКЖ–МС + МГД (квадранты Q2-2 и Q2-4), достигая 80%, как это дополнительно показано на рис. 11, в. Поскольку в этих опытах соотношение концентрации комплексов (определённое в пересчёте на одну железо-динитрозильную группу в Б-ДНКЖ–МС) и концентрации МГД составляло 1 : 2, все Б-ДНКЖ–МС превращались в МНКЖ–МГД, так что 80%-ная гибель вызывалась 0,5 мМ катионов нитрозония, высвободившихся из Б-ДНКЖ–МС в ходе этого превращения.

Аналогичные результаты были получены нами при изучении влияния Б-ДНКЖ–GSH и ДЭТК на интактность бактерий *Escherichia coli* TN530 [30] (их интактность оценивалась по колониеобразующей активности) (рис. 12).

Как следует из рис. 12, полная потеря интактности бактериальных клеток вызывалась

0,5 мМ катионов нитрозония, высвобождающихся из Б-ДНКЖ–GSH в ходе превращения практически всех этих комплексов в МНКЖ–ДЭТК [30]. Столь эффективная трансформация Б-ДНКЖ–GSH, очевидно, была обусловлена лёгким проникновением ДЭТК во внутриклеточное пространство, в котором локализовались ДНКЖ. В отличие от МГД, комплексы которого с металлами оставались водорастворимыми.

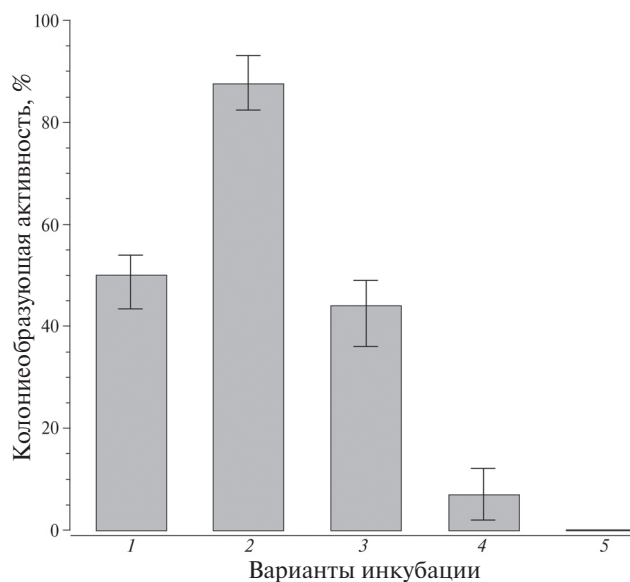


Рис. 12. Влияние на колониеобразующую активность бактерий *E. coli* добавления ДЭТК (2,5 мМ) (столбик 1); Б-ДНКЖ–GSH (0,5 мМ, столбик 2); суммарного действия ДЭТК + Б-ДНКЖ–GSH (1 + 2) при отсутствии взаимодействия между ними (столбик 3); при одновременном введении в среду инкубации Б-ДНКЖ–GSH + ДЭТК (столбик 4); при введении Б-ДНКЖ–GSH, а через 40 мин – ДЭТК (столбик 5)

римыми, аналогичные комплексы ДЭТК приобретали гидрофобные свойства, что и позволяло им легко проходить сквозь клеточные мембраны.

Способность только ДНКЖ с тиол-содержащими лигандами функционировать в этой системе в качестве доноров катионов нитрозония, вызывающих инактивацию бактериальных клеток, демонстрируется следующими опытами. Как следует из результатов опытов, приведённых на рис. 13 [30], при одновременном добавлении к клеткам *E. coli* 0,5 мМ ДЭТК и 0,5 мМ нитрита натрия или S-нитрозоглутатиона (GS-NO) колониеобразующая активность бактерий (рис. 13, столбики 6 и 7 соответственно) практически не отличалась от рассчитанной для суммарного действия ДЭТК + NaNO₂ или ДЭТК + GS-NO при отсутствии взаимодействия между этими агентами (рис. 13, столбики 4 и 5 соответственно). Если же ДЭТК добавляли в клеточную среду через 40 мин после NaNO₂ или GS-NO, наблюдалась полная инактивация бактериальных клеток (рис. 13, столбики 8 и 9 соответственно).

Последнее было обусловлено тем, что 40 мин инкубации клеток с NaNO₂ или GS-NO было достаточно, чтобы эти агенты, как доноры NO, могли обеспечить образование в бактериях ДНКЖ с тиол-содержащими группами белков, обнаруживаемых по сигналу 2,03. Вводимый к этому времени ДЭТК, при контакте с образовавшимися комплексами вызывал образование МНКЖ–ДЭТК и накопление в клетках NO⁺. Последний, возникая непосредственно внутри клеток, провоцировал их полную инактивацию.

Встаёт вопрос, существуют ли эндогенные соединения, которые, как и экзогенные производные дитиокарбамата, могли бы инициировать распад ДНКЖ, приводящий к высвобождению из них только катионов нитрозония, а не одновременно с ними молекул NO? Как показывают наши предварительные исследования, такими соединениями могут оказаться анионы супероксида. Ранее в работе Shumaev et al. [55] было установлено, что эти анионы с достаточно высокой константой скорости реакции ($\sim 10^7 \text{ M}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$) реагируют с молекулами NO в составе железо-динитрозильных фрагментов в белок-связанных ДНКЖ. В результате в этих комплексах в координационной сфере железа появляется пероксинитрит, который может, сохраняя связь с железом, изомеризоваться в нитрат, что должно приводить к распаду ДНКЖ с высвобождением из этих комплексов катионов нитрозония.

Проведённые нами исследования показали (материал готовится к печати), что при контакте Б-ДНКЖ–GSН с избытком KO₂ в качестве донора O₂⁻ действительно происходит распад ДНКЖ с одновременным накоплением в растворе нитрита при нейтральных значениях pH. Появление этого продукта однозначно свидетельствовало о высвобождении из Б-ДНКЖ–GSН катионов нитрозония, быстро гидролизовавшихся в нитрит. Что касается возможности связывания этих катионов с молекулами глутатиона, которое могло бы привести к появлению соответствующего S-нитрозотиола, то этого не происходило. GS-NO не возникал и после подкисления раствора. Ожидалось, что если часть глутатиона, входившего в состав Б-ДНКЖ или

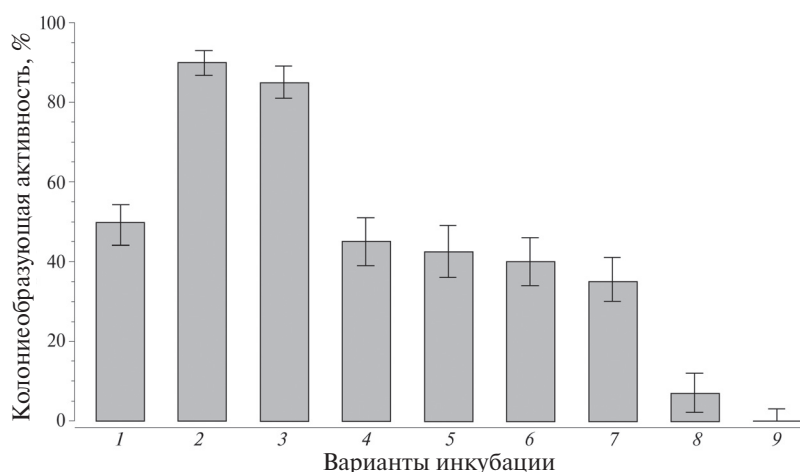


Рис. 13. Влияние на колониеобразующую активность бактерий *E. coli* добавления ДЭТК (2,5 мМ, столбик 1); NaNO₂ (0,5 мМ, столбик 2); GS-NO (0,5 мМ, столбик 3); суммарного действия ДЭТК + NaNO₂ (столбики 1 + 2) при отсутствии взаимодействия между ними (столбик 4); суммарного действия ДЭТК + GS-NO (столбики 1 + 3) при отсутствии взаимодействия между ними (столбик 5); при одновременном введении в среду инкубации ДЭТК + NaNO₂ (столбик 6); при одновременном введении в среду инкубации ДЭТК + GS-NO (столбик 7); NaNO₂ + ДЭТК (ДЭТК добавлен через 40 мин после NaNO₂, столбик 8); GS-NO + ДЭТК (ДЭТК добавлен через 40 мин после GS-NO, столбик 9)

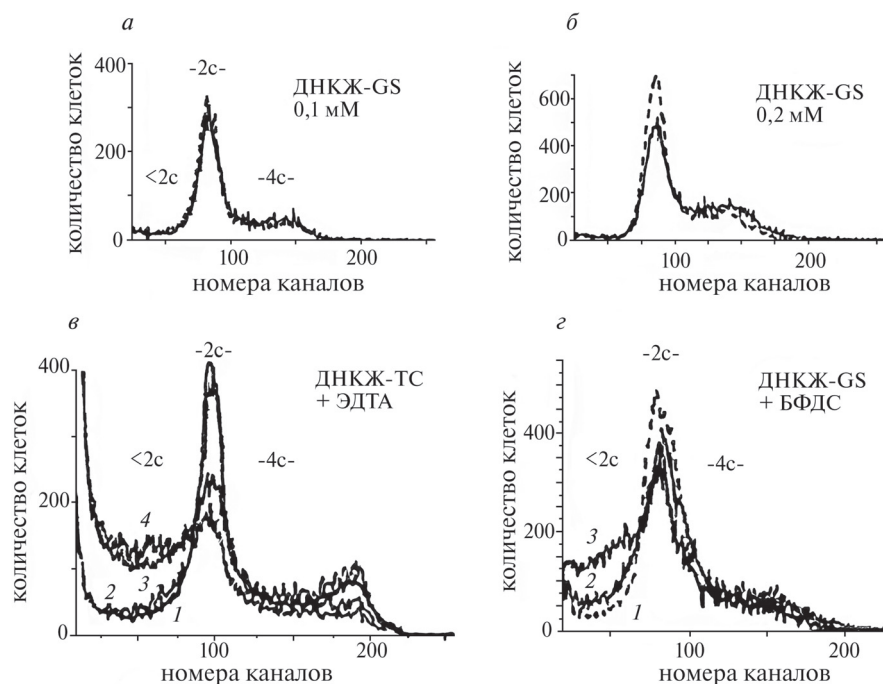


Рис. 14. Гистограммы, иллюстрирующие отсутствие влияния 0,1 мМ Б-ДНКЖ–GSN (*a*) и 0,2 мМ Б-ДНКЖ–GSN (*b*) на состояние ДНК в клетках HeLa при отсутствии хелаторов железа (сохранение в опыте популяции клеток с диплоидными ДНК). Сплошная линия – контроль, штриховая – опыт. -2с и -4с – субпопуляции клеток с диплоидным и тетраплоидным набором ДНК. *в* – Гистограмма, иллюстрирующая проапоптотическое действие 0,1 мМ ДНКЖ–ТС (кривая 3) и 0,2 мМ ДНКЖ–ТС (кривая 4) в присутствии 0,5 мМ ЭДТА. При 0,05 мМ концентрации ДНКЖ–ТС (кривая 2) эффект незначителен. Кривая 1 – контроль. *г* – Гистограмма, иллюстрирующая проапоптотическое действие 0,2 мМ Б-ДНКЖ–GSN в присутствии или отсутствии 0,05 мМ БФДС (кривые 3 и 2 соответственно). Кривая 1 – контроль. Проапоптотический эффект проявляется в повышении количества клеток с гиподиплоидным (<2с) набором ДНК [56]

сохранявшегося в форме свободных молекул в растворе этих комплексов, сохранялась бы, то при подкислении нитрит и молекулы глутатиона образовывали бы GS-NO, обнаруживаемый по полосе поглощения на 334 нм [25]. Отсутствие последнего могло быть обусловлено окислением тиоловой группы в молекулах глутатиона анионами супероксида.

Другой тип эндогенных соединений, которые могли бы разрушать ДНКЖ с высвобождением NO и NO⁺ – это хелаторы железа. Как следует из наших опытов, проведенных совместно с сотрудниками Института ядерной физики в Гатчине [56], в присутствии таких экзогенных хелаторов железа, как батофенантролиндисульфонат (БФДС) или ЭДТА, ДНКЖ–ТС или Б-ДНКЖ–GSN начинали оказывать на культуру клеток HeLa цитотоксическое действие, обнаруживаемое по деградации ДНК – развитию апоптоза в этих клетках [56] (рис. 14). Последнее оценивали по гашению флуоресценции этидиум бромид, интеркалированно в клеточную ДНК. Степень этого гашения определяли по количеству клеток (ось ординат на рис. 14), флуоресцирующих в каналах оптического регистратора, фиксирующих флуоресценцию с меньшей интенсивностью (начиная, как показано на рис. 14, с канала № 75 и ниже).

В отличие от воздействия анионов супероксида на ДНКЖ, которое должно приводить к высвобождению из этих комплексов преимущественно катионов нитрозония, разрушительное действие хелаторов железа на эти комплексы должно обеспечивать высвобождение из ДНКЖ как катионов нитрозония, так и молекул NO, причём, в соответствии со схемой 3, в равном количестве. Конечно, если исходить из того, что катионы нитрозония характеризуются существенно более высокой, чем молекулы NO, цитотоксической активностью, можно полагать, что и хелаторы железа, разрушая ДНКЖ с высвобождением из них катионов нитрозония, должны (как и анионы супероксида) инициировать резкое усиление цитотоксического действия ДНКЖ.

К сожалению, для обоих этих агентов, способных разрушать ДНКЖ, это утверждение не представляется абсолютно верным. Дело в том, что в обоих этих случаях при распаде ДНКЖ сохраняются их тиол-содержащие компоненты, и при высоком их содержании, как уже говорилось при рассмотрении результатов, приведённых на рис. 3, эти тиолы могут инициировать восстановление NO⁺ до NO. Сами по себе, тиолы не могут (из-за нарушения закона сохранения суммарного спина реагентов и продуктов

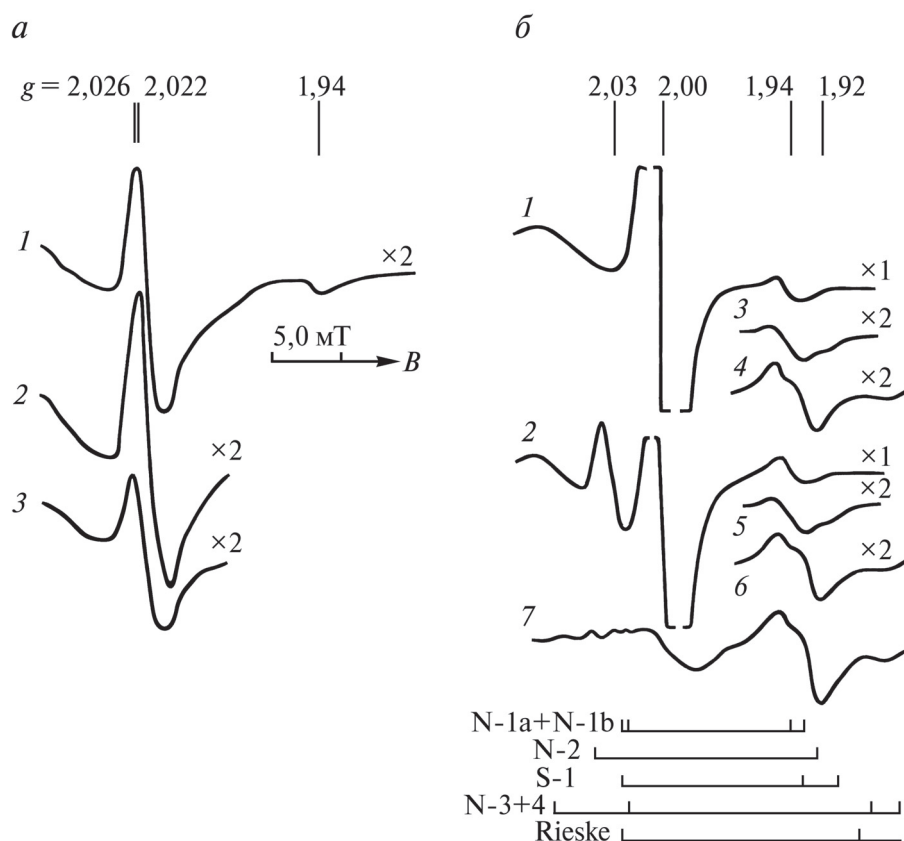


Рис. 15. Спектры ЭПР исходной (необработанной дитионитом как восстановителем) суспензии макрофагов мышей (а). Регистрации при 25К (1), 16К (2) или 30К (3). б – Спектры ЭПР той же суспензии, обработанной дитионитом + метилвиологеном (1) с последующей 5 мин обработкой NO (2). Запись при 40К (1, 2, 3 и 5) или 23К (4, б). в – Спектр ЭПР изолированной печени мышей, зарегистрированный при 23 К (7)

химической реакции) реализовать этот процесс. Этот процесс может, очевидно, реализоваться при участии спиновых катализаторов, способных по механизму спиновой поляризации перевести спин, например, тиолового реагента, из синглетного состояния в триплетное. В результате (в соответствии с законом сохранения спина в химических реакциях) становится возможным превращение NO^+ в NO, сопровождающееся превращением тиола в тиильный радикал (RS). Что касается природы спинового катализатора, в его качестве могут выступать ионы железа, входящие в состав ДНКЖ.

Таким образом, вопрос о появлении катионов нитрозония при распаде ДНКЖ с тиол-содержащими лигандами в химических, а тем более в биологических процессах представляется сейчас весьма сложным. Так что, каким образом можно управлять в живых организмах генерацией этих агентов, способных блокировать протекание различных метаболических процессов – рационально говорить об этом сейчас невозможно. Единственным подходом к решению такой задачи, как следует из вышеизложенного, представляется использование производных дитиокарбамата, способных при

взаимодействии с ДНКЖ обеспечивать (в соответствии со схемой 5) высвобождение из этих комплексов в качестве биологически активных агентов только катионы нитрозония.

ВЗАИМОДЕЙСТВИЕ ДНКЖ С АКТИВНЫМИ ЦЕНТРАМИ ЖЕЛЕЗОСЕРНЫХ БЕЛКОВ

В 80–90-е гг., когда была установлена уникальная роль оксида азота в живых организмах, причём не только позитивная, регуляторная, но и как одного из основных цитотоксических эффекторов системы клеточного иммунитета, было предположено, что это последнее определяется способностью NO разрушать активные центры железосерных белков, широко представленных в дыхательной цепи митохондрий [57–60].

Проверка этого предположения, проведённая нами в конце 80-х – начале 90-х гг. в экспериментах на тканях животных и препаратах макрофагов, не подтвердила его. В качестве контраргумента против этого предположения на рис. 15 приводятся результаты ЭПР исследо-

ваний дыхательной цепи макрофагов мышей, обработанных газообразным NO [61].

На рис. 15, *a* приводятся зарегистрированные при 16–30К спектры ЭПР исходной суспензии макрофагов, представленные сигналами ЭПР окисленной формы S-3 сукцинатдегидрогеназы при $g = 2,022$ и окисленной формы аконитазы при $g = 2,026$. После обработки этой суспензии дитионитом в присутствии редокс медиатора – метилвиологена – в спектре ЭПР доминировали сигналы ЭПР практически всех восстановленных железосерных белков в дыхательной цепи макрофагов, соотношение которых с комплексами Грина (1–3) приведено внизу на правой стороне рисунка. В суспензии макрофагов, обработанной после дитионита газообразным NO, появлялся ДНКЖ-сигнал 2,03.

Анализ этих спектров продемонстрировал практически полное равенство количества железа, включённого в железосерные белки, и железа, входящего в состав ДНКЖ [61]. Отсюда следовало, что появление ДНКЖ в суспензии макрофагов не было обусловлено разрушительным действием NO на активные центры железосерных белков с последующим включением высвобождавшегося из этих центров железа в ДНКЖ. В образовании последнего могла участвовать слабосвязанная, «свободная» форма железа – «негемовое не-FeS железо», обнаруженное в 80-е гг. в митохондриях животных шведскими исследователями [62].

Аналогичные эксперименты, проведённые нами на изолированном электрон-транспортном белке аденодоксине (рис. 16), выделенном из надпочечников быка, привели к такому же заключению [63]. Обработка этого белка газообразным NO после его восстановления дитионитом не приводила к заметному снижению сигнала ЭПР этого белка при $g = 1,94$ и $2,02$ и появлению интенсивного сигнала ДНКЖ при $g = 2,03$, появление которого было бы обусловлено распадом $[2Fe-2S]$ железосерного центра в аденодоксине (рис. 16, спектр *б*). Этот сигнал был наложен на сигнал ЭПР нитрозильных комплексов примесных гемопротейнов с компонентой при $g = 2,07$.

Спектр ЭПР раствора восстановленного аденодоксина резко изменялся, если к нему добавляли избыток соли Fe^{2+} с последующей обработкой газообразным NO. Интенсивность сигнала ЭПР при $g = 1,94$, характерного для интактного железосерного центра в аденодоксине, снижалась практически до нуля с одновременным появлением интенсивного сигнала 2,03 (рис. 16, спектр *в*). Последующая повторная обработка этого раствора дитионитом не приводила к восстановлению сигнала

при $g = 1,94$ до исходного уровня, а приводила лишь к появлению сигнала ЭПР при $g = 2,0$ и $1,98$, обусловленному, как было установлено позже, восстановленной формой связанного с аденодоксином Б-ДНКЖ [63].

Таким образом, в этих опытах происходил распад железосерного центра в аденодоксине, при этом железо, высвободившееся из железосерных центров, количественно включалось в состав возникающих ДНКЖ, связанных с тиоловыми группами апо-аденодоксина. Было основание предполагать, что обнаруженный распад мог быть обусловлен разрушительным действием на железосерный центр низкомолекулярных ДНКЖ, включающих в себя в качестве лигандов добавленного железа, например молекулы буфера (фосфата). Действительно, введение в раствор аденодоксина, предварительно синтезированного ДНКЖ с фосфатом или цистеином, мгновенно приводило и при отсутствии NO к распаду $[2Fe-2S]$ в аденодоксине и появлению белок-связанного ДНКЖ.

Эти результаты позволили нам предположить, что распад активного центра аденодоксина под действием низкомолекулярных ДНКЖ мог осуществляться путём связывания

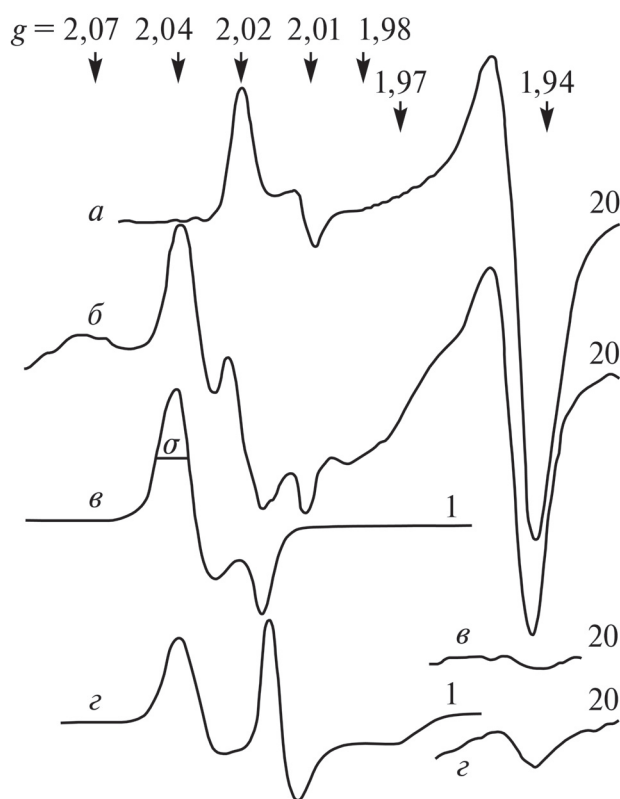


Рис. 16. Спектры ЭПР раствора аденодоксина, восстановленного дитионитом (*a*), с последующей обработкой NO (*б*) или $Fe^{2+} + NO$ (*в*). *з* – Препарат (*в*) повторно обработан дитионитом. δ^{20} и ε^{20} – Усиление радиоспектрметра в отн. ед. Запись при 77К

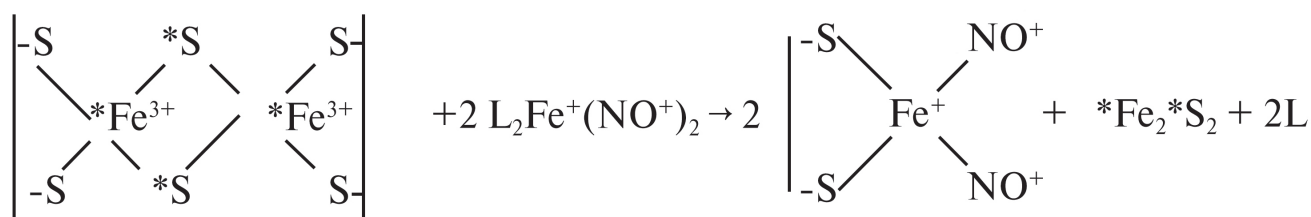


Схема 6. Механизм распада биядерных железосерных центров под действием ДНКЖ

железо-динитрозильного фрагмента этих комплексов с тиоловыми группами аденодоксина, исходно связывающих $[2Fe-2S]$, с белковой глобулой аденодоксина. Что касается железа и неорганической серы (сульфида серы – S^*), они, в соответствии со схемой 6, должны были выходить из железосерного кластера в окружающую среду (схема 6).

В связи с этим естественно было предположить, что в присутствии восстановителей, способных восстанавливать высвобождаемое железо до Fe^{2+} -состояния, это железо, образуя с NO низкомолекулярные ДНКЖ, могло продолжить процесс распада $[2Fe-2S]$ -центров, начатый экзогенными ДНКЖ, в других молекулах аденодоксина. В результате процесс распада железосерных центров мог приобретать лавинообразный, автокаталитический характер.

Соответствующие эксперименты на расторах аденодоксина полностью подтвердили это предположение [63].

Таким образом, результаты этих экспериментов показали, что NO сам по себе не способен был разрушать железосерные центры в аденодоксине: этот процесс мог инициироваться только низкомолекулярными ДНКЖ по механизму, показанному на схеме 6.

Это заключение полностью согласуется с вышеприведёнными результатами наших исследований воздействия газообразного NO на железосерные белки в составе дыхательной цепи в макрофагах. Тем не менее в литературе сейчас накоплено значительное количество данных о способности молекул NO самих по себе разрушать активные центры некоторых железосерных белков с образованием в них ДНКЖ [64–66]. Эти белки относятся к белкам-регуляторам, например, к белкам, выполняющим функции факторов транскрипции в геноме. Предполагается, что для этих белков характерно повышение кислотных аминокислотных остатков в окрестности их железосерных центров. Высвобождение протонов из кислотных остатков ослабляет связь между атомами железа в этих центрах и атомами неорганической серы, что, в свою очередь, усиливает взаимодействие между атомами железа и молекулами NO и тем самым облегчает включение их обоих в ДНКЖ.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Одно из главных утверждений настоящего обзора сводится к тому, что именно ДНКЖ, возникающие в живых организмах, следует рассматривать в качестве основного донора катионов нитрозония. Более того, поскольку эти комплексы могут включать в себя основную часть молекулярного NO , появляющегося в живых организмах, ДНКЖ могут выступать также в качестве основного стабилизатора и переносчика NO к мишеням его биологического действия.

Приведённый выше экспериментальный материал позволяет предположить, что молекулы NO , высвобождающиеся из ДНКЖ, главным образом функционируют в живых организмах в качестве позитивных агентов, регулирующих жизненно важные метаболические процессы. Что касается катионов нитрозония, высвобождающихся из ДНКЖ, они выступают в основном в качестве негативных агентов, ответственных за цитотоксическое действие возникающих в живых организмах М- и Б-ДНКЖ с тиол-содержащими лигандами.

В этом отношении ДНКЖ с тиол-содержащими лигандами, синтезированными химическим путём, можно рассматривать в качестве основы для создания лекарств, которые могли бы обеспечить купирование бактериальных и вирусных инфекций, а также лекарств противоопухолевого действия.

Выше были приведены результаты наших исследований эффективного подавления колониеобразующей активности клеток *E. coli* (т. е. их инфекционной активности) последовательной обработкой суспензии этих клеток сначала ДНКЖ с тиол-содержащими лигандами, а затем – ДЭТК [30]. При такой последовательности из ДНКЖ высвобождались именно катионы нитрозония, а не молекулы NO , так что именно эти катионы оказывали негативное действие на бактерии. Получены предварительные данные, свидетельствующие о том, что в этих условиях происходило также существенное подавление способности ряда патогенных бактерий образовывать биоплёнки, защищающие их от действия различных лекарств, в частности от антибиотиков.

В 2020 г. Ванин [67] предположил, что катионы нитрозония, высвобождающиеся из ДНКЖ, могут оказывать противовирусное действие, в частности проявлять «антиковидную» активность. Предполагается, что такое действие может реализоваться через воздействие катионов нитрозония, как S-нитрозирующих агентов, на жизненно важные для пролиферации вирусов протеазы хозяина и вирусные протеазы. Проведённые в последнее время эксперименты на животных, инфицированных коронавирусами, полностью подтвердили это предположение [68].

Особое значение имеют результаты наших исследований влияния ДНКЖ с тиол-содержащими лигандами на пролиферацию незлокачественных эндометриоидных опухолей у крыс с хирургически индуцированным у них эндометриозом. Эти исследования, проведённые Burgova et al. [68–71], привели к открытию

противоэндометриозного действия ДНКЖ с различными тиол-содержащими лигандами. Несомненно, полученный результат может стать надёжной базой для создания на основе этих комплексов лекарств, которые могут стать полезными при лечении эндометриоза – заболевания женщин репродуктивного периода, захватывающего в последнее время всё большую их популяцию.

Благодарности. Выражаю благодарность моему сотруднику – Николаю Ткачеву за помощь в компьютерном оформлении рисунков.

Конфликт интересов. Автор заявляет об отсутствии конфликта интересов.

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

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Ванин А. Ф. (2015) *Динитрозильные комплексы железа с тиолсодержащими лигандами: физико-химия, биология, медицина*, Институт компьютерных исследований, Ижевск/Москва, Россия.
2. Lu, T.-T., Wang, Y.-M., Hung, C.-H., Chiou, S.-J., and Liaw, W.-F. (2018) Bioinorganic chemistry of the natural [Fe(NO)₂] motif: evolution of a functional model for NO-related biomedical application and revolutionary development of a translational model, *Inorg. Chem.*, **57**, 12425-12443, doi: 10.1021/acs.inorgchem.8b01818.
3. Vanin, A. F. (2019) *Dinitrosyl Iron Complexes as a "Working Form" of Nitric Oxide in Living Organisms*, Cambridge Scholar Publishing, Cambridge, UK.
4. Lehnert, N., Kim, E., Dong, H. T., Harland, J. B., Hunt, A. P., et al. (2021) The biologically relevant coordination chemistry of iron and nitric oxide: electronic structure and reactivity, *Chem. Rev.*, **121**, 14682-14905, doi: 10.1021/acs.chemrev.1c00253.
5. Vanin, A. F. (2021) Physico-chemistry of dinitrosyl iron complexes as a determinant of their biological activity, *Int. J. Mol. Sci.*, **22**, 10356, doi: 10.3390/ijms221910356.
6. Налбандян Р. М., Ванин, А. Ф., Блюменфельд Л. А. (1964) Свободные радикалы нового типа в дрожжевых клетках, Тезисы докладов на конференции «Свободно-радикальные процессы в биологических системах», с. 18.
7. Ванин А. Ф., Налбандян Р. М. (1965) Свободные радикалы нового типа в дрожжевых клетках, *Биофизика*, **10**, 167-168.
8. Mallard, J. R., and Kent, M. (1964) Difference observed between electron spin resonance signals from surviving tumour tissues and from their corresponding normal tissue, *Nature*, **204**, 1192, doi: 10.1038/2041192a0.
9. Ванин А. Ф., Блюменфельд Л. А., Четвериков А. Г. (1967) Исследование методом ЭПР комплексов негеминового железа в клетках и тканях, *Биофизика*, **12**, 829-858.
10. Vithaythil, A. J., Ternberg, J. L., and Commoner, B. (1965) Changes in electron spin resonance signals of rat liver during chemical carcinogenesis, *Nature*, **207**, 1246-1249, doi: 10.1038/2071246a0.
11. Lancaster, J.R., and Hibbs, J. B. (1990) EPR demonstration of iron-nitrosyl complex formation by cytotoxic activated macrophages, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **87**, 1223-1227, doi: 10.1073/pnas.87.3.1223.
12. Ванин А. Ф. (1967) Идентификация комплексов двухвалентного железа с цистеином в биологических системах, *Биохимия*, **32**, 226-232.
13. McDonald, C. C., Philips, W. D., and Mower, H. F. (1965) An electron spin resonance study of some complexes with iron, nitric oxide and anionic ligands, *J. Am. Chem. Soc.*, **87**, 3319-3326, doi: 10.1021/ja01093a007.
14. Четвериков А. Г., Рууге Э. К., Бурбаев Д. Ш., Ванин А. Ф. (1969) Изменение формы сигнала ЭПР с $g_{cp} = 2,03$ в биологических системах в зависимости от условий регистрации, *Биофизика*, **14**, 932-935.
15. Vanin, A. F., Sanina, N. A., Serezhenkov, V. A., Burbaev, D. Sh., Lozinsky, V. I., et al. (2007) Dinitrosyl-iron complexes with thiol-containing ligands: spatial and electronic structures, *Nitric Oxide Biol. Chem.*, **16**, 82-93, doi: 10.1016/j.niox.2006.07.005.
16. Vanin, A. F., Poltorakov, A. P., Mikoyan, V. D., Kubrina, L. N., and Burbaev, D. Sh. (2011) Poly-

- nuclear water-soluble dinitrosyl iron complexes with cysteine or glutathione ligands: electron paramagnetic resonance and optical studies, *Nitric Oxide Biol. Chem.*, **23**, 136-149, doi: 10.1016/j.niox.2010.05.285.
17. Enemark, J. Y., and Feltham, R. D. (1974) Principles of structure, bonding, and reactivity for metal nitrosyl, *Coord. Chem. Rev.*, **13**, 339-406, doi: 10.1016/S0010-8545(00)80259-3.
 18. Vanin, A. F., Malenkova, I. V., and Serezhenkov, V. A. (1997) Iron catalyzes both decomposition and synthesis of S-nitrosothiols: Optical and electron paramagnetic resonance studies, *Nitric Oxide Biol. Chem.*, **1**, 191-203, doi: 10.1006/niox.1997.0122.
 19. Vanin, A. F., and Burbaev, D. Sh. (2011) Electronic and spatial structures of water-soluble dinitrosyl iron complexes with thiol-containing ligands underlying their activity to act as bnitric oxide and nitrosonium ion donors, *Biophys. J.*, **2011**, 878236, doi: 10.1155/2011/878236.
 20. Vanin, A. F. (2019) What is the mechanism of nitric oxide transformation into nitrosonium ions ensuring S-nitrosating processes in living organisms, *Cell Biochem. Biophys.*, **77**, 279-292, doi: 10.1007/s12013-019-00886-1.
 21. Ванин А. Ф. (2020) Свободно-радикальная природа молекул оксида азота как фактор, определяющий их превращения в живых организмах в катионы нитрозония, *Биофизика*, **65**, 421-438, doi: 10.31857/S00063029220030011.
 22. Vanin, A. F. (2020) How is nitric oxide (NO) converted into nitrosonium cations (NO⁺) in living organisms? (Based on the results of optical and EPR analysis of dinitrosyl iron complexes with thiol-containing ligands, *Appl. Magn. Reson.*, **51**, 851-876, doi: 10.1007/s00723-020-01270-6.
 23. Truzzi, D. R., Medeiros, N. M., Augusto, O., and Ford, P. C. (2021) Dinitrosyl iron complexes (DNICs). From spontaneous assembly to biological roles, *Inorg. Chem.*, **60**, 15835-15845, doi: 10.1021/acs.inorgchem.1c00823.
 24. Borodulin, R. R., Kubrina, L. N., Mikoyan, V. D., Poltorakov, A. P., Shvydkiy, O. V., Burbaev, D. Sh., Serezhenkov, V. A., et al. (2013) Dinitrosyl iron complexes with glutathione as NO and NO⁺ donors, *Nitric Oxide Biol. Chem.*, **29**, 4-16, doi: 10.1016/j.niox.2012.11.001.
 25. Vanin, A. F., Tronov, V. A., and Borodulin, R. R. (2021) Nitrosonium cation as a cytotoxic component of dinitrosyl iron complexes with thiol-containing ligands (based on the experimental work on MCF-7 human breast cancer cell culture), *Cell Biochem. Biophys.*, **79**, 93-102, doi: 10.1007/s12013-020-00962-x.
 26. Williams, D. L. H. (2007) *Nitrosation Reactions and the Chemistry of Nitric Oxide*, Elsevier, Amsterdam, the Netherlands.
 27. Бородкин Г. И., Шубин В. Г. (2017) Нитрозоний-катион в химических и биохимических реакциях: достижения и перспективы, *Успехи химии*, **86**, 18-46, doi: 10.1070/RCR4662.
 28. Khan, S., Kayahara, M., Joashi, U., Mazarakis, N. D., Sarraf, C., et al. (1997) Differential induction of apoptosis in Swiss 3T3 cells by nitric oxide and the nitrosonium cation, *J. Cell Sci.*, **110**, 2315-2322, doi: 10.1242/jcs.110.18.2315.
 29. Cui, X., Joannou, C. L., Huges, M. N., and Cammack, R. (1992) The bactericidal effects of transition metal complexes containing NO⁺ group on the food-spoilage bacterium *Clostridium sporogenes*, *FEMS Microbiol. Lett.*, **98**, 67-70, doi: 10.1016/0378-1097(92)90133-9.
 30. Ванин А. Ф., Телегина Д. И., Микоян В. Д., Ткачев Н. А., Васильева С. В. (2022) Цитостатическое действие динитрозильных комплексов железа с глутатионом на клетки *Escherichia coli* определяется катионами нитрозония, высвобождающимися из этих комплексов, *Биофизика*, **67**, 938-946, doi: 10.31857/S0006302922050106.
 31. Polukkody, R., Chupik, R. B., Montalvo, S. K., Khan, S., Bhuvanesh, N., et al. (2017) Toward biocompatible dinitrosyl iron complex: sugar-appended thiolates, *Chem. Commun.*, **53**, 1180-1183, doi: 10.1039/C6CC08659D.
 32. Гизатуллин А. Р., Акентиева Н. П., Санина Н. А., Шматко Н. Ю., Горячев Н. С. и др. (2018) Влияние динитрозильных комплексов железа (доноров NO) на метаболические процессы в фибробластах лёгких человека, *Докл. Росс. Акад. Наук*, **483**, 454-458, doi: 10.31857/S086956520003286-7.
 33. Pestol, D. C., Chupik, R. B., Khan, S., Elsbahy, M., Wooley, K. L., et al. (2019) Towards the optimization of dinitrosyl iron complexes as NO delivery agents to smooth muscle cells, *J. Am. Chem. Soc.*, **16**, 3178-3187, doi: 10.1021/acs.molpharmaceut.9b00389.
 34. Akentieva, N. P., Sanina, N. A., Gizatullin, A. R., Shkondina, N. I., Prikhodenko, T. R., et al. (2019) Cytoprotective effects of dinitrosyl iron complexes on viability of human fibroblasts and cardiomyocytes, *Front. Pharmacol.*, **10**, 1277, doi: 10.3389/fphar.2019.01277.
 35. Kleschyov, A. L., Strand, S., Schmitt, S., Gottfried, D., Skatchkov, M., et al. (2006) Dinitrosyl-iron triggers apoptosis in Jurkat cells despite overexpression of Bcl-2, *Free Radic Biol. Med.*, **40**, 1340-1348, doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2005.12.001.
 36. Wu, S.-C., Lu, C.-Y., Chen, Y.-L., Lo, F.-C., Wang, T.-Y., et al. (2016) Water-soluble dinitrosyl iron complex (DNIC): a nitric oxide vehicle triggering cancer cell death via apoptosis, *Inorg. Chem.*, **55**, 9383-9392, doi: 10.1021/acs.inorgchem.6b01562.
 37. Wu, C.-R., Huang, Y.-D., Hong, Y.-H., Liu, Y.-H., Narwane, M., et al. (2021) Endogenous conjugation of biomimetic dinitrosyl iron complexes with protein vehicles for oral delivery of nitric oxide to brain activation of hippocampal neurogenesis, *JACS Au*, **1**, 998-1013, doi: 10.1021/jacsau.1c00160.
 38. Vedernikov, Yu. P., Mordvintcev, P. I., Malenkova, I. V., and Vanin, A. F. (1992) Similarity between the vaso-

- relaxing activity of dinitrosyl iron complexes and endothelium-derived relaxing factor, *Eur. J. Pharmacol.*, **211**, 313-317, doi: 10.1016/0014-2999(92)90386-i.
39. Mülsch, A., Mordvintcev, P., Vanin, A. F., and Busse, R. (1991) The potent vasodilating and guanylyl cyclase activating dinitrosyl-iron(II) complex is stored in a protein-bound form in vascular tissue and its release by thiols, *FEBS Lett.*, **294**, 252-256, doi: 10.1016/0014-5793(91)81441-a.
40. Flitney, F. W., Megson, L. I., Flitney, D. E., and Butler, A. R. (1992) Iron-sulfur cluster nitrosyls: a novel class of nitric oxide generator: mechanism of vasodilator action on rat isolated tail artery, *Brit. J. Pharmacol.*, **107**, 842-847, doi: 10.1111/j.1476-5381.1992.tb14534.x.
41. Vanin, A. F., Mokh, V. P., Serezhenkov, V. A., and Chazov, E. I. (2007) Vasorelaxing activity of stable powder preparation of dinitrosyl iron complexes with cysteine or glutathione, *Nitric Oxide Biol. Chem.*, **16**, 322-330, doi: 10.1016/j.niox.2006.12.003.
42. Kleschyov, A. L., Mordvintcev, P. I., and Vanin, A. F. (1985) Role of nitric oxide and iron in hypotensive action of nitrosyl iron complexes with various anionic ligands, *Studia Biofizika*, **105**, 930-102.
43. Мордвинцев П. И., Путинцев М. Д., Галаган М. Е., Орановская О. В., Медведев О. С. и др. (1988) Гипотензивная активность у наркотизированных животных динитрозильных комплексов железа с белками, *Бюлл. Всесоюз. Кардиолог. Центра*, **1**, 46-51.
44. Галаган М. Е., Орановская Е. В., Мордвинцев П. И., Медведев О. С., Ванин А. Ф. (1988) Гипотензивный эффект динитрозильных комплексов железа на бодрствующих животных, *Бюлл. Всесоюз. Кардиолог. Центра*, **2**, 75-79.
45. Lakomkin, V. L., Vanin, A. F., Timoshin, A. A., Kapelko, V. I., and Chazov, E. I. (2007) Long-lasting hypotensive action of dinitrosyl-iron complexes with thiol-containing ligands in conscious normotensive and hypertensive rats, *Nitric Oxide Biol. Chem.*, **16**, 413-418, doi: 10.1016/j.niox.2007.03.002.
46. Chazov, E. I., Rodnenkov, O. V., Zorin, A. V., Lakomkin, V. L., Gramovich, V. V., et al. (2012) Hypotensive effect of Oxacom® containing a dinitrosyl iron complex with glutathione: animal studies and clinical trials on healthy volunteers, *Nitric Oxide Biol. Chem.*, **26**, 148-156, doi: 10.1016/j.niox.2012.01.008.
47. Timoshin, A. A., Lakomkin, V. L., Abramov, A. A., Ruuge, E. K., Kapelko, V. I., et al. (1915) The hypotensive effect of the nitric oxide donor Oxacom at different routes of its administration to experimental animals, *Eur. J. Pharmacol.*, **765**, 525-532, doi: 10.1016/j.ejphar.2015.09.011.
48. Галаган М. Е., Киладзе С. В., Ванин А. Ф. (1997) Реакция динитрозильных комплексов негемового железа с диэтилдитиокарбаматом в крови анестезированных крыс: её специфическое проявление на физико-химическом и физиологическом уровнях, *Биофизика*, **42**, 687-692.
49. Shekhter, A. B., Rudenko, T. G., Serezhenkov, V. A., and Vanin, A. F. (2007) Dinitrosyl iron complexes with cysteine or glutathione accelerate skin wound healing, *Nitric Oxide Biol. Chem.*, **52**, 534-538.
50. Shekhter, A. B., Rudenko, T. G., Istranov, L. P., Guller, A. E., Borodulin, R. R., et al. (2015) Dinitrosyl iron complexes with glutathione incorporated into a collagen matrix as a base for the design of drugs accelerating wound healing, *Eur. J. Pharm. Sci.*, **78**, 8-18, doi: 10.1016/j.ejps.2015.06.002.
51. Мордвинцев П. И., Руднева В. Г., Ванин А. Ф., Шимкевич Л. Л., Ходоров Б. И. (1986) Ингибирующее действие низкомолекулярных динитрозильных комплексов железа на агрегацию тромбоцитов, *Биохимия*, **51**, 1851-1857.
52. Архипова М. М., Микоян В. Д., Ванин А. Ф. (2008) Влияние экзогенных доноров оксида азота и ингибиторов его ферментативного синтеза на ишемию вены конъюнктивы глаз кролика при её экспериментальной тромбозе, *Биофизика*, **53**, 315-325.
53. Шамова Е. Б., Бичан О. Д., Дрозд Е. С., Горудко И. В., Чижик С. А. и др. (2011) Регуляция функциональных и механических свойств тромбоцитов и эритроцитов донорами оксида азота, *Биофизика*, **56**, 265-271.
54. Andreev-Andriyevsky, A. A., Mikoyan, V. D., Serezhenkov, V. A., and Vanin, A. F. (2011) Penile erectile activity of dinitrosyl iron complexes with thiol-containing ligands, *Nitric Oxide Biol. Chem.*, **24**, 217-223, doi: 10.1016/j.niox.2011.04.008.
55. Shumaev, K. B., Gubkin, A. A., Serezhenkov, V. A., Lobysheva, I. I., Kosmachevskaya, O. V., et al. (2008) Interaction of reactive oxygen and nitrogen species with albumin- and methemoglobin-bound dinitrosyl-iron complexes, *Nitric Oxide Biol. Chem.*, **18**, 37-46, doi: 10.1016/j.niox.2007.09.085.
56. Giliano, N. Ya., Konevega, L. V., Noskin, L. A., Serezhenkov, V. A., Poltorakov, A. P., et al. (2011) Dinitrosyl iron complexes with thiol-containing ligands and apoptosis: studies with HeLa cell culture, *Nitric Oxide Biol. Chem.*, **24**, 151-159, doi: 10.1016/j.niox.2011.02.005.
57. Stuehr, D. J., Gross, S. S., Sakuma, I., Levi, R., and Nathan, C. F. (1989) Activated murine macrophages secrete a metabolite of arginine with the bioactivity of endothelium-derived relaxing factor and the chemical reactivity of nitric oxide, *J. Exp. Med.*, **169**, 1011-1020, doi: 10.1084/jem.169.3.1011.
58. Lancaster, J. R., and Hibbs, J. B. (1990) EPR demonstration of iron-nitrosyl complex formation by cytotoxic activated macrophages, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **87**, 1223-1227, doi: 10.1073/pnas.87.3.1223.
59. Stadler, J., Bergonia, H. A., DiSilvio, M., Sweetland, M. A., Billiar, T. R., et al. (1993) Nonheme nitrosyl-iron complex formation in rat hepatocyte: detection by EPR spectroscopy, *Arch. Biochem. Biophys.*, **302**, 4-11, doi: 10.1006/abbi.1993.1173.

60. Watts, R. N., Hawkins, C., Ponka, P., and Richardson, D. R. (2006) Nitrogen monoxide (NO) – mediated iron release from cells is linked with NO-induced glutathione efflux via multidrug resistance-associated proteins, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **103**, 7670-7675, doi: 10.1073/pnas.0602515103.
61. Vanin, A. F., Men'shikov, G. B., Moroz, I. A., Mordvintsev, P. I., Serezhenkov, V. A., et al. (1992) The source of non-heme iron that binds nitric oxide in cultivated macrophages, *Biochim. Biophys. Acta*, **1135**, 275-279, doi: 10.1016/0167-4889(92)90231-y.
62. Tangeras, A., Flatmark, T., and Bakstrom, D. (1980) Mitochondrial iron not bound in heme and iron-sulfur centers, *Biochim. Biophys. Acta*, **589**, 162-175, doi: 10.1016/0005-2728(80)90035-3.
63. Voevodskaya, N. V., Serezhenkov, V. A., Cooper, C. E., Kubrina, L. N., and Vanin, A. F. (2002) Exogenous ferrous iron is required for the nitric oxide-catalyzed destruction of the iron-sulphur center in adrenodoxin, *Biochem. J.*, **368**, 633-639, doi: 10.1042/BJ20020788.
64. Crack, J. C., Smith, L. J., Stapleton, M. R., Peck, J., Watmough, N. J., et al. (2011) Mechanistic insight the nitrosylation of [4Fe-4S] cluster of WhiB-like proteins, *J. Am. Chem. Soc.*, **133**, 1112-1121, doi: 10.1021/ja109581t.
65. Tucker, N. P., Hicks, M. G., Clarke, T. A., Crack, J. C., Chandra, G., et al. (2008) The transcriptional repressor protein NsrR senses nitric oxide directly via a [2Fe-2S] cluster, *PLoS One*, **11**, e3623, doi: 10.1371/journal.pone.0003623.
66. Kudhair, B. K., Hounslow, A. M., Rolfe, M. D., Crack, J. C., Hunt, D. M., et al. (2017) Structure of a WbI protein and implications for NO sensing by *M. tuberculosis*, *Nature*, **8**, 2280, doi: 10.1038/s41467-017-02418-y.
67. Ванин А. Ф. (2020) Динитрозильные комплексы железа с тиол-содержащими лигандами как доноры катионов нитрозония могут подавлять вирусные инфекции (гипотеза), *Биофизика*, **65**, 818-823, doi: 10.31857/S0006302920040250.
68. Шиповалов А. В., Ванин А. Ф., Пьянков О. В., Багрянская Е. Г., Микоян В. Д., и др. (2022) Противовирусная активность катионов нитрозония в отношении SARS-CoV-2 на модели сирийского хомячка, *Биофизика*, **67**, 969-981, doi: 10.31857/S0006302922050167.
69. Burgova, E. N., Tkachev, N. A., Paklina, O. V., Miko-yan, V. D., Adamyan, L. V., et al. (2014) The effect of dinitrosyl iron complexes with glutathione and S-nitrosoglutathione on the development of experimental endometriosis in rats, *Eur. J. Pharmacol.*, **741**, 37-44, doi: 10.1016/j.ejphar.2014.07.017.
70. Vanin, A. F., Burgova, E. N., and Adamyan, L. V. (2015) Dinitrosyl iron complexes with glutathione suppress surgically induced experimental endometriosis in rats, *Austin J. Reprod. Med. Infertil.*, **2**, 1019-1032, doi: 10.26420/austinjreprodmedinfertil.2015.1019.
71. Burgova, E. N., Khristidis, Y. I., Kurkov, A. V., Miko-yan, V. D., Shekhter, A. B., et al. (2019) The inhibiting effect of dinitrosyl iron complexes with thiol-containing ligands on the growth of endometrioid tumours in rats with experimental endometriosis, *Cell Biochem. Biophys.*, **77**, 69-77, doi: 10.1007/s12013-019-00865-6.

POSITIVE (REGULATORY) AND NEGATIVE (CYTOTOXIC) ACTION OF DINITROSYL IRON COMPLEXES ON LIVING ORGANISMS

Review

A. F. Vanin

*Semenov Federal Research Center for Chemical Physics, Russian Academy of Sciences,
119991 Moscow, Russia; e-mail: vanin.dnic@gmail.com*

Proposed mechanism of dinitrosyl iron complex (DNIC) formation the main step of which is the disproportion of two NO molecules bound with Fe^{2+} ion leads to resonance structure of dinitrosyl-iron fragment as the $[Fe^{2+}(NO)(NO^+)]$. The latter allows to say about the complex capacity to function as donors of both neutral NO molecules as well as nitrosonium cations (NO^+) that has been supported by experimental way. The consideration of biological activity of DNIC with thiol-containing ligands demonstrates that NO molecules and nitrosonium cations released from the complexes exert respectively positive (regulatory) or negative (cytotoxic) effect on living organisms. Enhancement of selective release of nitrosonium cations with simultaneous including of releasing NO molecules and iron ions into biologically non-active mononitrosyl iron complexes with dithiocarbamate derivatives can be achieved by this derivative using as an approach for DNIC decomposition in living organisms.

Keywords: nitric oxide, nitrosonium cations, dinitrosyl iron complexes, thiols