

СОДЕРЖАНИЕ

Том 58, номер 5, 2022

Обзорные и теоретические статьи

Ген-иммунная терапия рака. Подходы и проблемы

И. В. Алексеенко, В. В. Плешкан, А. И. Кузьмич,
С. А. Кондратьева, Е. Д. Свердлов

491

Создание рекомбинантных штаммов-продуцентов гиалуроновой
кислоты на основе *Bacillus subtilis*

С. В. Рыков, И. Ю. Батталова, А. С. Миронов

509

Общая генетика

Применение буккального микроядерного цитомного теста для оценки цитогенетического
статуса медперсонала, контактирующего с противоопухолевыми препаратами

К. И. Кирсанов, Л. П. Сычева, Е. А. Лесовая, Е. М. Жидкова, О. А. Власова,
А. В. Осипова, Е. С. Львова, Д. Д. Григорьева, Е. М. Кулакова, Л. Г. Соленова,
Г. А. Белицкий, И. Н. Михайлова, М. Г. Якубовская

530

Молекулярная генетика

Тканеспецифичность активности гена *AqE* у желтого горбыля *Larimichthys crocea*

Л. В. Пузакова, М. В. Пузаков

540

Генетика микроорганизмов

Функциональная значимость модуля токсин–антитоксин *Mycolicibacterium smegmatis*
в устойчивости к антибиотикам и воздействию окислительного стресса

Н. И. Акимова, О. Б. Беккер, В. Н. Даниленко

550

Генетика животных

Стабильность популяционной системы В-хромосом корейской мыши *Apodemus
peninsulae* (Mammalia, Rodentia) в Южном Прибайкалье: 35 лет наблюдений

И. А. Жигарев, И. А. Крищук, З. З. Борисова, Ю. М. Борисов

562

Однородность генофонда западной и восточной популяций даурского
журавля *Antigone vipio* на разных пролетных путях

Е. А. Мудрик, О. А. Горошко, С. Г. Сурмач, Т. А. Кашенцева,
А. В. Нечаева, С. М. Смиренский, Д. В. Политов

570

Генетика человека

Метилирование гена *MART* при нейродегенеративных заболеваниях
из группы синуклеинопатий

Е. В. Яковенко, Н. Ю. Абрамычева, Е. Ю. Федотова, С. Н. Иллариошкин

581

Молекулярно-генетическое исследование причин несиндромальной
нейросенсорной тугоухости у больных из Грузии

А. А. Степанова, О. Р. Исмаилова, Н. М. Галеева, Т. Г. Маркова,
Г. А. Таварткиладзе, О. Квливидзе, А. В. Поляков

591

Полиморфные варианты гена нейтрофильного цитозольного фактора 2:
ассоциации с предрасположенностью к сахарному диабету 2-го типа
и кардиоваскулярной автономной нейропатии

Ю. Э. Азарова, Е. Ю. Клёсова, И. И. Коломоец, А. В. Полонинов

600

Contents

Vol. 58, No. 5, 2022

Reviews and Theoretical Articles

Gene-Immune Cancer Therapy. Perspectives and Problems

I. V. Alekseenko, V. V. Pleshkan, A. I. Kuzmich, S. A. Kondratieva, and E. D. Sverdlov 491

Design of Recombinant *Bacillus subtilis* Strains That Producing Hyaluronic Acid

S. V. Rykov, I. Y. Battalova, and A. S. Mironov 509

General Genetics

Application of Buccal Micronucleus Cytome Assay for the Evaluation of Cytogenetic Status of Healthcare Professionals Contacting with Anti-Cancer Drugs

K. I. Kirsanov, L. P. Sycheva, E. A. Lesovaya, E. M. Zhidkova, O. A. Vlasova, A. V. Osipova, E. S. Lylova, D. D. Grigorieva, E. M. Kulakova, L. G. Solenova, G. A. Belitsky, I. N. Mikhaylova, and M. G. Yakubovskaya 530

Molecular Genetics

Tissue Specificity of the *AqE* Gene Activity in the Yellow Croaker *Larimichthys crocea*

L. V. Puzakova and M. V. Puzakov 540

Genetics of Microorganisms

Functional Significance of the TA Module vapBC2 of *Mycobacterium smegmatis* for Antibiotic Resistance and Exposure to Oxidative Stress

N. I. Akimova, O. B. Bekker, and V. N. Danilenko 550

Animal Genetics

Stability of the Population System of B Chromosomes of the Korean Field Mouse *Apodemus peninsulae* (Mammalia, Rodentia) in the Southern Baikal Region: 35 Years of Observations

I. A. Zhigarev, I. A. Kryshchuk, Z. Z. Borisova, and Yu. M. Borisov 562

Gene Pool Heterogeneity of Western and Eastern Populations of the White-Naped Crane *Antigone vipio* in Different Flyways

E. A. Mudrik, O. A. Goroshko, S. G. Surmach, T. A. Kashentseva, A. V. Nechaeva, S. M. Smirenski, and D. V. Politov 570

Human Genetics

Methylation of *MAPT* Gene in Neurodegenerative Synucleinopathies

E. V. Iakovenko, N. Yu. Abramycheva, E. Yu. Fedotova, and S. N. Illarioshkin 581

Molecular Genetic Study of the Causes of Non-Syndromic Sensorineural Hearing Loss in Patients from Georgia

A. A. Stepanova, O. A. Ismagilova, N. M. Galeeva, N. G. Markova, G. A. Tavartkiladze, O. Kvlividze, and A. V. Polyakov 591

Polymorphic Variants of the Neutrophil Cytosolic Factor 2 Gene: Associations with a Predisposition to Type 2 Diabetes Mellitus and Cardiovascular Autonomic neuropathy

I. E. Azarova, E. Yu. Klyosova, I. I. Kolomoets, and A. V. Polonikov 600

ОБЗОРНЫЕ
И ТЕОРЕТИЧЕСКИЕ СТАТЬИ

УДК 577.27;577.29

ГЕН-ИММУННАЯ ТЕРАПИЯ РАКА. ПОДХОДЫ И ПРОБЛЕМЫ

© 2022 г. И. В. Алексеенко^{1, 2, *}, В. В. Плешкан^{1, 2}, А. И. Кузьмич^{1, 2},
С. А. Кондратьева², Е. Д. Свердлов¹

¹Институт молекулярной генетики Национального исследовательского центра
“Курчатовский институт”, Москва, 123182 Россия

²Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова
Российской академии наук, Москва, 117997 Россия

*e-mail: irina.alekseenko@mail.ru

Поступила в редакцию 17.08.2021 г.

После доработки 10.10.2021 г.

Принята к публикации 14.10.2021 г.

Опухолевая гетерогенность и постоянная селекция в опухоли устойчивых к терапии раковых клеток требуют комбинаторных подходов к лечению рака, воздействующих на разные жизненно важные процессы в опухоли. Иммуноterapia совершила революционный переворот в подходах к лечению рака. Сегодня многие комбинаторные методы сгруппированы вокруг этого вида лечения. Большинство противоопухолевых иммунотерапевтических агентов вводятся внутривенно, что вызывает серьезные, зачастую опасные для жизни, побочные эффекты из-за накопления этих агентов в тканях, не являющихся мишенями. Побочные эффекты могут быть снижены при использовании локальной терапии, ограниченной опухолью, но при этом вызывающей системный противоопухолевый иммунный ответ. Локальность воздействия может быть достигнута посредством внутриопухолевого введения терапевтических генов. Эти гены могут кодировать множество терапевтических продуктов, начиная с ингибиторов контрольных точек и иммуномодуляторов и заканчивая ферментами, которые обеспечивают внутриопухолевое превращение пролекарств в химиотерапевтические агенты (ген-направленная энзиматическая пролекарственная терапия, ГНЭПТ). В данном обзоре мы рассмотрим подходы, использующие внутриопухолевое введение терапевтических генов, кодирующих молекулы иммунных контрольных точек, цитокинов, сигналов опасности, ферментов ГНЭПТ, а также их сочетания для ген-иммунной терапии рака.

Ключевые слова: иммуноterapia, генная терапия, рак, иммунные контрольные точки, цитокины, сигналы опасности, ГНЭПТ.

DOI: 10.31857/S0016675822040026

УСПЕХИ И НЕУДАЧИ ИММУНОТЕРАПИИ ОПУХОЛЕЙ, ГЕН-ИММУННАЯ ТЕРАПИЯ КАК СПОСОБ ПРЕОДОЛЕНИЯ ОГРАНИЧЕНИЙ

Опухоли привлекают к своей эволюции широкий репертуар нормальных клеток, формирующего микроокружение опухоли (МО), что играет важнейшую роль как в эволюции самой первичной опухоли, так и в ее метастазировании. МО солидных опухолей состоит из двух основных компонентов, клеточного и не клеточного, пропорция и состав которых варьируют в зависимости от места возникновения опухоли и стадии ее развития [1]. МО во многом ответственно за создание барьера, который защищает опухоль от внешнего воздействия, в том числе и от клеток иммунной системы. Способность опухолей к созданию иммуносупрессивного микроокружения зависит от ряда механизмов, приводящих, в конечном счете, к ингибированию

иммунных эффекторных клеток, в частности цитотоксических Т-лимфоцитов и натуральных киллеров. Исследование роли взаимодействий раковых клеток с МО в подавлении противоопухолевого иммунного ответа привело к современной революционной иммунотерапии с использованием иммунных контрольных точек (ИКТ) [2]. Наивные Т-клетки активируются после распознавания рецептором Т-клеток антигена, представленного антиген-презентирующими клетками (АПК), с участием коstimулирующих молекул. Активирующие сигналы модулируются сложной сетью “тормозных” рецепторов — так называемых иммунных контрольных точек (ИКТ) (рис. 1) [3]. ИКТ необходимы для поддержания аутоtolерантности и контроля продолжительности и амплитуды физиологических иммунных реакций в периферических тканях [4]. Активация ИКТ происходит когда рецепторы на поверхности Т-клеток распознают и связываются с лигандами на поверх-

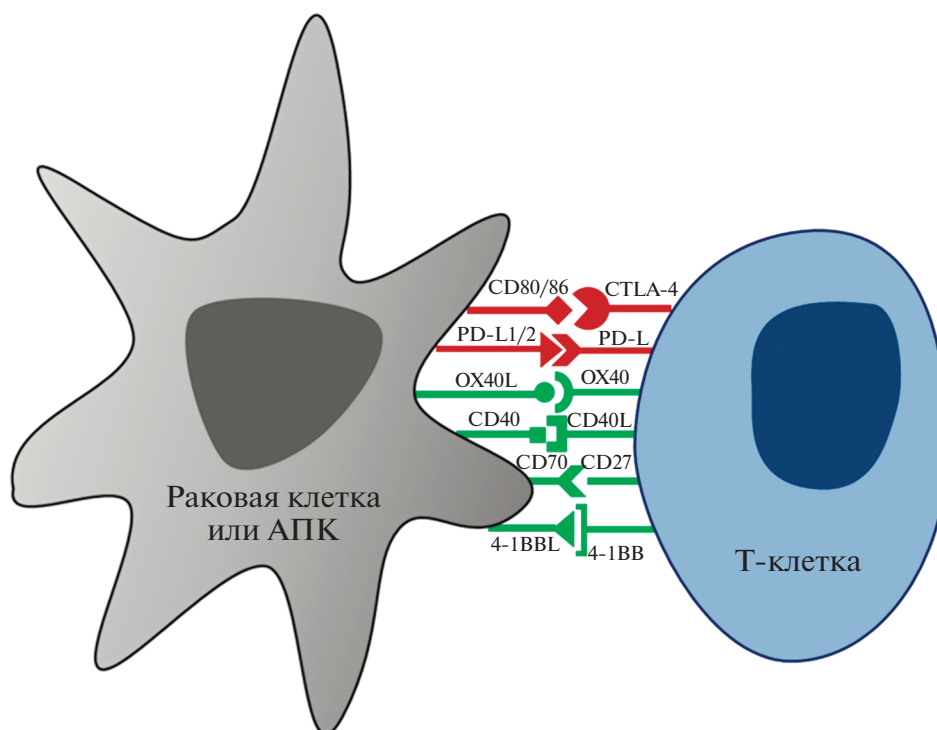


Рис. 1. Ингибиторные и костимулирующие взаимодействия иммунных клеток. Красным обозначены ингибирующие взаимодействия, зеленым — костимулирующие. АПК — антиген-презентирующая клетка.

ности антиген-представляющих или опухолевых клеток [5]. При таком лиганд-рецепторном взаимодействии Т-клетки получают сигнал остановки иммунной реакции.

Раковые клетки используют этот механизм для того, чтобы избежать иммунного надзора. Эти взаимодействия можно блокировать антителами к лиганду или рецептору. Классическим примером являются взаимодействия между лигандами семейства В7 и рецепторами семейства CD28, которые играют важную роль в регуляции ответа Т-клеток, формируя как костимулирующие, так и коингибирующие сигналы. В настоящее время известно десять членов семейства В7, наиболее используемыми из которых являются В7-1 (CD80), В7-2 (CD86), лиганд запрограммированной смерти 1 (PD-L1), лиганд запрограммированной смерти 2 (PD-L2) и пять представителей рецепторов семейства CD28: CD28, CTLA-4, ICOS, PD-1 и аттенуатор В- и Т-лимфоцитов (BTLA) [6]. CD28 — единственный рецептор, который конститутивно экспрессируется на наивных Т-клетках и обеспечивает костимуляторные сигналы, необходимые для активации и выживания Т-клеток. Взаимодействие CD28 и его лигандов CD80 и CD86 участвует в активации Т-клеток, стимуляции пролиферации клеток и продукции цитокинов, а также в стимулировании выживания Т-клеток. Рецептор CTLA-4 имеет сродство к лигандам CD80/CD86 в 20–100 раз более высокое, чем CD28. CTLA-4 немедленно ак-

тивируется после связывания Т-клеточного рецептора (TCR) с антигеном и конкурирует с CD28 за лиганды раковых клеток CD80/86, тем самым блокируя костимуляторный сигнал CD28 и подавляя пролиферацию и активацию Т-клеток. Блокада CTLA-4 освобождает Т-лимфоциты и позволяет иммунной системе уничтожать раковые клетки. Ипилимумаб, моноклональное антитело к цитотоксическому Т-лимфоцит-связанному антигену 4 (CTLA-4), стал первым терапевтическим ингибитором ИКТ, одобренным Управлением по санитарному надзору за качеством пищевых продуктов и медикаментов США (FDA).

Помимо CTLA-4 наиболее широко известны и используются в качестве мишеней в терапевтической практике такие ингибирующие ИКТ как рецептор PD1 (белок запрограммированной гибели клеток, programmed death-1) и его лиганды PD-L1/PD-L2 [7]. Успех ингибиторов ИКТ CTLA-4 и PD-1/PD-L1 стимулировал поиск других ИКТ [8, 9]. Поскольку CTLA-4 и PD-1 регулируют различные ингибирующие пути и имеют неперекрывающиеся механизмы действия, предполагают, что одновременная блокада CTLA-4 и PD-1 может быть более эффективной, чем блокировка только одной ИКТ. Действительно, в ходе клинических испытаний комбинаций анти-CTLA-4 и анти-PD-1 было показано, что комбинированная терапия ассоциирована с более высокой частотой позитивного ответа, но при этом также и с более

частыми и более выраженными нежелательными эффектами [10, 11]. Иммуноterapia с использованием ИКТ значительно увеличили продолжительность жизни многих пациентов со злокачественными новообразованиями, однако большинство пациентов с распространенными формами рака слабо отвечают или не отвечают вовсе на терапию. Кроме того, вследствие ингибирования иммунных контрольных точек развиваются многочисленные, иногда фатальные побочные эффекты, в основном аутоиммунные воспалительные реакции [12, 13]. Показана кардиотоксичность ингибиторов ИКТ, включающая такие эффекты как миокардит, перикардит, атеросклероз, аритмию и васкулит [14].

Данные эффекты являются результатом избыточного иммунного ответа против органов и тканей пациентов. Все противоопухолевые препараты на основе антител к иммунным контрольным точкам предназначены для внутривенного введения, и поэтому существует проблема достижения терапевтических внутриопухолевых концентраций в отсутствие системной токсичности. Данные проблемы особенно актуальны для солидных опухолей [15]. Системная токсичность, возникающая при внутривенном введении препаратов ИКТ, зачастую не позволяет использовать оптимальные дозы лекарственных средств [16].

Уменьшить токсичность, свойственную иммунотерапии с использованием ИКТ, можно посредством локализации ее внутри опухоли за счет контролируемой экспрессии терапевтических генов либо с помощью внутриопухолевого введения генотерапевтических конструкций. Одним из перспективных путей дальнейшего развития противоопухолевой иммунотерапии является ген-иммунная терапия, которая предполагает доставку в опухоль генов, кодирующих активаторы “противоопухолевого иммунного цикла”. Ген-иммунная терапия может быть направлена на каждый этап “противоопухолевого иммунного цикла” (см. ниже), что может приводить к развитию системного противоопухолевого эффекта (абскопальный эффект, *abscopal effect*). Далее в этом обзоре мы постараемся детально рассмотреть поэтапный механизм формирования противоопухолевого иммунного ответа, известные попытки стимуляции различных его этапов методами генной терапии, а также использование комбинаторных подходов для активации противоопухолевого иммунного ответа.

ПРОТИВООПУХОЛЕВЫЙ ИММУННЫЙ ЦИКЛ

Для формирования эффективного противоопухолевого иммунного ответа необходимо запустить серию поэтапных событий, которые Ченом и Меллманом (Chen and Mellman) были объединены в концепцию “противоопухолевого иммунного цикла” [17]. На первом этапе цикла в результате ги-

бели раковых клеток происходит высвобождение опухоль-ассоциированных антигенов. На втором этапе антиген-презентирующие клетки, например дендритные клетки, захватывают высвободившиеся антигены, процессируют и экспонируют их в комплексе с молекулами МНСII (главного комплекса гистосовместимости второго типа) наивным Т-лимфоцитам, в результате чего происходит активация и созревание антиген-специфичных Т-клеток (этап 3). Затем активированные эффекторные Т-клетки мигрируют к опухоли (этап 4) и инфильтрируют ее (этап 5). Далее на шестом этапе в опухоли происходит специфическое распознавание и связывание Т-клеточными рецепторами опухолевого антигена, связанного с МНСI на поверхности раковых клеток. Результатом такого распознавания является уничтожение целевой раковой клетки (этап 7). Далее гибель раковых клеток приводит к высвобождению новой порции опухолевых антигенов, цикл повторяется, расширяя свои границы.

У онкологических больных противоопухолевый иммунный цикл происходит неэффективно, раковым клеткам удается реализовать механизмы защиты от иммунной системы. Помимо эксплуатации ИКТ, упомянутых выше, раковые клетки могут снижать уровень презентации антигенов на своей поверхности, избегая узнавания цитотоксическими клетками, и секретировать противовоспалительные цитокины, угнетающие активацию Т-лимфоцитов. Также продукция факторов роста и противовоспалительных цитокинов клетками МО приводит к рекрутированию иммуносупрессорных популяций миелоидных и лимфоидных клеток, в частности регуляторных Т-клеток (Tregs), макрофагов II типа, миелоидных супрессорных клеток (*myeloid-derived suppressor cells*, MDSCs), подавляющих иммунный ответ [18].

Цель иммунотерапии рака – инициирование или стимулирование самоподдерживающегося противоопухолевого иммунного цикла с минимальными побочными явлениями, что можно реализовать с помощью локальной ген-иммунной терапии. Локальность воздействия может достигаться, как уже упоминалось выше, посредством внутриопухолевого введения генотерапевтических препаратов и за счет опухолеспецифической экспрессии терапевтических генов.

Важно отметить, что внутриопухолевая доставка также дает преимущество немедленного доступа агента к лимфатическим узлам, дренирующим опухоль, которые считаются ключевым центром для инициации и поддержания противоопухолевого иммунного ответа [19]. Нами будут рассмотрены подходы, использующие внутриопухолевое введение конструкций, кодирующих молекулы ИКТ и цитокинов, ген-направленную энзиматическую пролекарственную терапию (ГНЭПТ) в контексте иммунотерапии, а также возможность сочетания

этих методов для достижения лучшего терапевтического эффекта.

ГЕНЕТИЧЕСКИ КОДИРУЕМЫЕ ИНГИБИТОРЫ ИКТ И КОСТИМУЛЯТОРЫ Т-КЛЕТОК

Снять некоторые ограничения взаимодействия раковых клеток с эффекторными клетками иммунной системы (шестой этап иммунного цикла) позволяет использование препаратов, нацеленных на ингибирующие и стимулирующие взаимодействия иммунных и опухолевых клеток. Использование ингибиторов ИКТ и костимуляторных молекул в настоящее время активно развивается (разнообразие перспективных молекул описано, например, в обзоре [6]). Однако такой подход сопряжен с высокой токсичностью иммунотерапевтических препаратов, вводимых системно, что обсуждалось выше. Использование генетически кодируемых молекул ИКТ, синтезируемых локально, способно нивелировать их токсическое действие. Недавно такой подход был применен для локального подавления PD-L1 с помощью белка, названного “PD-L1 trap (ловушка для PD-L1)” [20]. Авторы создали плазмиду, кодирующую внеклеточный домен белка PD-L1, слитый с тримеризующим доменом. Системное введение наночастиц с такой плазмидой мышам с привитой опухолью СТ26 приводило к торможению роста опухоли. Был выявлен синергизм действия при комбинировании PD-L1 trap с оксалиплатином, широко применяемым цитостатическим препаратом.

Хотя блокада PD-1/L1 является эффективным терапевтическим подходом для многих пациентов с солидными и гематологическими злокачественными новообразованиями, ее недостаточно для индукции регрессии опухоли у большинства пациентов. Оптимальные Т-клеточные ответы требуют костимуляции Т-клеточного рецептора, что может быть обеспечено посредством активации членов семейства рецепторов фактора некроза опухоли, таких как OX40. Активация OX40 его лигандом OX40L в присутствии распознаваемого Т-клеточным рецептором антигена способствует размножению CD4⁺ и CD8⁺ Т-клеток, усиливает первичные цитотоксические реакции Т-лимфоцитов и Т-лимфоцитов памяти, а также подавляет регуляторную функцию Т-клеток. На мышинных моделях было показано, что внутриопухолевая монотерапия с помощью мРНК OX40L индуцировала иммунные ответы в опухолях, до этого только частично отвечавших на системное лечение ингибиторами PD-1/PD-L1 [21]. На данный момент инициированы клинические испытания (КИ) препаратов, включающих мРНК OX40L (см. табл. 1). Так, мРНК-2416 (Moderna, Inc.), которая кодирует OX40L человека, используется как терапевтический агент в составе липидных наночастиц.

Проведено первое КИ (NCT03323398, табл. 1) мРНК-2416. В ходе КИ мРНК-2416 вводили внутриопухолево пациентам с рецидивирующими или не отвечающими на лечение солидными злокачественными опухолями или лимфомами. Результаты свидетельствуют об активации иммунного ответа после лечения: наблюдались повышение показателей цитолитической активности и стимуляция экспрессии воспалительных генов Т-клеток [22].

Другое клиническое исследование предполагает внутриопухолевое введение мРНК – TriMix, кодирующей костимулирующую молекулу CD70, лиганд CD40 и конститутивно-активный Toll-подобный рецептор 4 (TLR 4). В настоящее время в данное КИ идет набор пациентов с ранней стадией рака молочной железы (NCT03788083, табл. 1).

Рецептор костимулирующей ИКТ 4-1BB относится к семейству рецепторов факторов некроза опухолей, его экспрессия обнаруживается на поверхности активированных эффекторных и регуляторных Т-лимфоцитов, а также на дендритных клетках и естественных киллерах. Взаимодействие 4-1BB с его лигандом 4-1BBL усиливает пролиферацию эффекторных Т-клеток, секрецию ими IL-2, увеличивает их выживаемость и цитолитическую активность [23].

Онколитические вирусы, кодирующие гены лигандов OX40L или 4-1BBL, на мышинных моделях продемонстрировали выраженный противоопухолевый эффект [24–26]. Показано, что онколитический аденовирус LOAd703 (delolimogene mupadepoervesc), несущий гены тримеризованного CD40L и 4-1BBL, обеспечивает избирательный лизис опухолевых клеток, индукцию противоопухолевых цитотоксических Т-клеточных реакций, уменьшение инфильтрации клеток-супрессоров миелоидного происхождения (MDSC) и индукцию регрессии опухоли в доклинических исследованиях [27]. В исследовании [28] LOAd703 инициировал устойчивый противоопухолевый иммунный ответ в отношении экспериментальной модели карциномы поджелудочной железы. В настоящее время эффективность LOAd703 оценивается в КИ на пациентах с раком поджелудочной железы (NCT02705196).

Еще одним примером такого подхода служит препарат RP3, который представляет собой генетически модифицированный вирус простого герпеса типа 1 (HSV-1), несущий сразу три гена, кодирующих антитела против CTLA-4 и лиганды CD40 и h4-1BBL. В настоящее время проводятся КИ препарата RP3 (фаза I/II) на пациентах с солидными опухолями (NCT04735978, NCT04336241, NCT04050436, NCT04349436, NCT03767348, см. табл. 1). Таким образом, ген-иммунная терапия, использующая доставку в опухоль генов-ингибиторов ИКТ и генов-костимуляторов Т-клеток, активно развивается.

Таблица 1. Примеры клинических исследований генотерапевтических препаратов, кодирующих гены-активаторы иммунной системы, предназначенных для внутриопухолевого введения

Название	Способ доставки	Кодирует	Тип опухоли	КИ
Препараты с невирусной системой доставки				
mRNA-2416	LNP*	OX40L	Рецидивирующие/не отвечающие на лечение солидные опухоли поздней стадии или лимфомы, карцинома яичника	NCT03323398
mRNA-2752	LNP	Триплет OX40L + IL-23 + IL-36γ	Рецидивирующие/не отвечающие на лечение солидные опухоли поздней стадии или лимфомы РМЖ, плоскоклеточный рак головы и шеи, неходжкинская лимфома, уротелиальный рак	NCT03739931
MEDI1191 (mRNA-2905)	LNP	IL-12	Протоковая карцинома <i>in situ</i> высокой степени дифференцировки	NCT02872025
IT-pIL12-EP	Электропорация	IL-12	Солитные опухоли	NCT03946800
Tavokinogene telseplasimid (tavo)	Электропорация	IL-12	РМЖ	NCT02531425 NCT00323206
hIL-2	DOTMA/Cholesterol	IL-2	Карцинома Меркеля, меланома, метастатический и рецидивирующий рак головы и шеи	NCT01440816 NCT01502293 NCT03823131
SAR441000	–	IL-12sc + IL-15sushi + IFNα + GM-CSF	Рак головы и шеи	NCT00006033
TriMix mRNA solution	–	CD70, CD40 L, TLR 4	Метастатические опухоли	NCT03871348
CYL-02	Линейный PEI	SST2 + DCK::UMK	РМЖ	NCT03788083
IFx-Hu2.0	Линейный PEI	Emm55	Протоковая аденокарцинома поджелудочной железы	NCT 01274455 NCT02806687
			Меланома кожи III-IV стадии, карцинома Меркеля, плоскоклеточная карцинома кожи, базальноклеточная эпителиома	NCT03655756 NCT04925713 NCT04853602 NCT04160065
Препараты с вирусной системой доставки				
ProstAtak (aglatimagene besadenovex, CAN-2409)	Аденовирус	HSVtk	Рак простаты	NCT01436968
T-VEC (talimogene laherparepvec)	ВПГ-1**	GM-CSF	Меланома	Зарегистрирован

Таблица 1. Окончание

Название	Способ доставки	Кодирует	Тип опухоли	КИ
Rexa-Vec (rexastimogene devacirpvec)	Вирус осповакцины	GM-CSF	Гепатоцеллюлярная карцинома, колоректальный рак, нейробластома, рабдомосаркома, лимфома и другие типы опухолей	NCT04849260 NCT03206073 NCT02562755 + еще 15 КИ
LOAd703 (delolimogene tiradenopirpvec)	Аденовирус 5/35	TMZ-CD40L + 4-1BBL	Злокачественная меланома, протоковая аденокарцинома поджелудочной железы, карцинома яичника, карцинома печени, колоректальный рак	NCT04123470 NCT02705196 NCT03225989 NCT03555149
RIVAL-01/ТАК-605 (TBio-6517)	Вирус осповакцины	Flt3 ligand + anti-CTLA-4 + IL-12	РМЖ, колоректальный рак	NCT04301011
RP1	ВППГ-1	GALV-GP R- + GM-CSF	Меланома и прочие злокачественные новообразования кожи	NCT04050436 NCT04349436 NCT03767348
RP3	ВППГ-1	anti-CTLA-4 + CD40L + 4-1BBL	Распространенная солидная опухоль	NCT04735978
TNFerade	Аденовирус	TNF α	Рак пищевода, местнораспространенный рак простаты	NCT00051480 NCT01048151
INGN 241 (Ad-mda7)	Аденовирус	MDA-7 (IL-24)	Злокачественная меланома, метастазы	NCT00116363
BT-001 (TG6030)	Вирус осповакцины	anti-CTLA4 + GM-CSF	Различные типы опухолей	NCT04725331
ADV-hIL12	Аденовирус	IL-12	РМЖ	NCT00849459
Ad-RTS-hIL-12	Аденовирус	IL-12	Диффузная глиома ствола головного мозга, опухоли головного мозга у детей, глиобластома	NCT03330197 NCT03636477 + еще 6 КИ
Ad5-yCD/mut-TKSR39rep-hIL12	Аденовирус	IL-12 + yCD/TK мутант	Метастатический рак поджелудочной железы, рак простаты	NCT03281382 NCT02555397
VG161	ВППГ-1	IL12/15 + PDL1B	Первичный рак печени, развитые злокачественные солидные опухоли	NCT04806464 NCT04758897
INXN-2001	Аденовирус	IL-12	Меланома	NCT01397708
ALVAC-hB7.1	Вирус оспы канареек	B7-1/CD80	Неоперабельная меланома	NCT00003556
ALVAC-hIL-12	Аденовирус	IL-12	РМЖ	NCT04095689
IL-12 gene therapy	Аденовирус	IL-12	Рак простаты	NCT02654938
Mobilan (M-VM3)	Аденовирус	TLR5 – рецептор и агонист	Распространенная солидная опухоль	[56]
H103	Аденовирус 2-го типа	HSP70		

* LNP – липидные наночастицы (Lipid Nanoparticle). ** Вирус простого герпеса человека первого типа (herpes simplex type 1 (HSV-1) virus).

ГЕНЕТИЧЕСКИ КОДИРУЕМЫЕ ЦИТОКИНЫ

Другим хорошо проработанным направлением ген-иммунной терапии является использование генетически кодируемых цитокинов. Эти малые сигнальные белки участвуют в нескольких этапах противоопухолевого иммунного цикла, таких как презентация опухолевых антигенов (этап 2), праймирование и активация Т-клеток (этап 3), инфильтрация эффекторных Т-клеток в опухоль (этап 5) и гибель раковых клеток (этап 7). Цитокины являются активными иммуномодуляторами [29]. Активируемые цитокинами сигнальные пути координируют сигнал-зависимый иммунный отклик [30] и определяют эффективность противоопухолевого иммунитета [31]. Провоспалительные цитокины, такие как IL-2, IL-12 и фактор некроза опухоли (TNF), способны опосредовать приток лейкоцитов, включая В- и Т-клетки, К опухоли. Однако внутривенное введение рекомбинантных цитокинов часто связано с дозозависимой токсичностью и даже с угрожающими жизни последствиями [32]. Возможно по этой причине на сегодняшний день только использование рекомбинантного IL-2 было одобрено для терапии опухолей. При этом внутриопухолевое введение цитокинов при терапии может значительно снижать токсичность [29]. Это дает основания полагать, что внутриопухолевая ген-иммунная терапия на основе генов или мРНК, кодирующих цитокины, может быть хорошей альтернативой их системному введению.

Tavokinogene telseplasmid (tavo) – генотерапевтический препарат, кодирующий IL-12, был разработан компанией OncoSec (США) для лечения различных видов рака. Терапия основана на внутриопухолевом введении синтетической плазмидной ДНК, несущей ген IL-12, эффективность доставки ДНК увеличена с помощью электропорации. Испытания препарата показали безопасность и эффективность в отношении метастазирующих опухолей [33, 34]. В настоящее время в США, Австралии и Канаде ведутся КИ препарата на пациентах с раком молочной железы, Т-клеточной лимфомой кожи, раком головы и шеи со злокачественной меланомой и карциномой Меркеля (NCT02531425, NCT01440816, NCT01502293, NCT03823131, NCT02345330, NCT03823131 [35], табл. 1). Ведется разработка плазмидных препаратов, кодирующих другие цитокины. Так, внутриопухолевая доставка наночастиц из хитозана, содержащих гены цитокинов IL-15 и IL-21 в составе плазмидного вектора, продемонстрировала подавление роста опухоли и увеличение выживаемости у модельных организмов [36, 37].

В последние годы активно развивается разработка препаратов на основе мРНК, кодирующей различные цитокины. В исследовании I фазы КИ

препарата MEDI1191 (компания Модерна, США) на основе мРНК, кодирующей IL-12, с последующим применением моноклональных антител к PD-L1 (препарат дурвалумаб) показана безопасность и эффективность такой терапии у пациентов с солидными опухолями, нечувствительными к стандартной терапии. В КИ (NCT03871348) препарат SAR441000, содержащий мРНК, кодирующую цитокины IL-12sc, IFN- α 2b, GM-CSF и IL-15sushi [38], изучался в монотерапии и в комбинации с цемиплимабом (моноклональное антитело против PD-1). Было показано, что SAR441000 вызывает иммуномодулирующий эффект и в целом хорошо переносится пациентами.

Многие исследователи считают перспективными векторами для цитокиновой генной терапии онколитические вирусы, в частности аденовирусы, вирусы герпеса, парамиксовирусы, поксвирусы и рабдовирусы [39]. Обычно такие вирусы кодируют IL-2, IL-12, IL-15, IL-6, IL-21, IL-18, IL-24 и гранулоцитарно-макрофагальный колониестимулирующий фактор (GM-CSF), которые действуют на различные элементы иммунной системы. Показано, что введение модельным животным онколитических вирусов, несущих гены цитокинов, такие как интерферон- β , GM-CSF, IL-12, IL-24, IL-4, IL-18, подавляет опухолевый рост, метастазирование и индуцирует противоопухолевый иммунитет [40].

Препарат Imlygic® (Amgen Inc., США) стал первым генотерапевтическим противоопухолевым препаратом, одобренным FDA США и ЕМА (European Medicines Agency, Европейское агентство по лекарственным средствам). Препарат Imlygic® (T-VEC, talimogene laherparepvec) – генетически модифицированный репликационно-компетентный вирус простого герпеса 1-го типа, экспрессирующий гранулоцитарно-макрофагальный колониестимулирующий фактор человека (hGM-CSF). Экспрессия GM-CSF в условиях вирусного лизиса опухолевых клеток способствует вовлечению и активации антиген-презентирующих клеток, таким образом усиливая противоопухолевый иммунный ответ организма. Препарат рекомендован для лечения больных с нерезектабельными из-за множественности, но доступными для внутриопухолевого введения очагами меланомы кожи и пораженными метастазами лимфатическими узлами. Talimogene laherparepvec продемонстрировал значительное повышение частоты устойчивого ответа, а также выживаемости без прогрессии опухоли в рандомизированном КИ III фазы пациентов с меланомой [41]. Примеры КИ других препаратов, кодирующих цитокины, с невирусной и вирусной системами доставки представлены в табл. 1.

Также в настоящее время разрабатываются генотерапевтические препараты, кодирующие одновременно иммунные контрольные точки и ци-

токсины, например, препарат mRNA-2752 компании Модерна, кодирующий одновременно OX40L, IL-23 и IL-36γ. В доклинических испытаниях [21] показано, что внутриопухолевая инъекция mRNA-2752 приводила к повышенному рекрутированию иммунных клеток в опухоли, индуцировала экспрессию различных цитокинов и хемокинов и активацию дендритных и Т-клеток. В 2018 г. было инициировано КИ (NCT03739931, табл. 1) с целью оценки безопасности внутриопухолевого введения mRNA-2752 у пациентов с рецидивирующими/рефрактерными злокачественными солидными опухолями и лимфомами. В ходе исследования будет оценена безопасность как монотерапии mRNA-2752, так и комбинированной терапии mRNA-2752 с дурвалумабом.

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ СИГНАЛОВ ОПАСНОСТИ ДЛЯ ЦЕЛЕЙ ГЕННОЙ ТЕРАПИИ РАКА

Увеличить эффективность второго этапа иммунного цикла, захват и процессирование опухолевых антигенов АПК можно посредством использования “сигналов опасности”. В 1994 г. Мацингер предложил “теорию опасности”, согласно которой иммунная система отслеживает повреждения и активируется в ответ на “сигналы опасности” от поврежденных тканей, а не на чужеродные агенты [42]. “Сигналы опасности” — молекулы DAMPs (damage-associated molecular patterns, молекулярные фрагменты, ассоциированные с повреждениями), которые вырабатываются поврежденными клетками в ответ на воздействие патогенов, токсинов, механических повреждений и т.д. и индуцируют сильный иммунный ответ за счет активации созревания дендритных клеток. “Сигналами опасности” могут быть как молекулы, связанные с экзогенными патогенами — PAMPs (pathogen-associated molecular patterns, патоген-ассоциированные молекулярные структуры), такие как бактериальные липополисахариды, CpG-олигонуклеотиды или белок жгутика флагеллин, так и эндогенные продукты поврежденных и мертвых клеток. Эндогенными молекулами DAMPs могут быть белки, ДНК, РНК, продукты метаболизма, АТФ, мочевая кислота, сульфат гепарина и другие компоненты клетки в зависимости от условий [43]. Например, к белковым DAMPs относятся внеклеточные белки, такие как бигликан и тенасцин С, и внутриклеточные белки, такие как гистоны, S100 белки, белки теплового шока (HSP), негистоновый хромосомный белок HMGB1 (high-mobility group protein B1) и белки плазмы, такие как фибриноген, Gc-глобулин и сывороточный амилоид А (SAA) [44]. Их взаимодействие со специальными рецепторами, например TLR-рецепторами (toll-like receptor, толл-подобные рецепторы), вызывает ответную реакцию на “опас-

ность” внутри клеток и в их микроокружении [45]. Эти рецепторы известны как “рецепторы опознавания паттерна” или PRRs (Pattern recognition receptor) (см., например, [46, 47]). После взаимодействия между DAMP и PRR на клетках-мишенях запускаются внутриклеточные сигнальные каскады, активирующие экспрессию генов — медиаторов воспаления, которые координируют устранение патогенов и поврежденных или инфицированных клеток.

К основным PRRs относятся: TLR-рецепторы, семейство RIG-I-подобных рецепторов (RLR), цитоплазматические РНК-хеликазы, стимуляторы генов интерферона (STING), Nod-подобные рецепторы (NLR), лектиновые рецепторы С-типа (CLR) и сенсорные белки цитозольной ДНК [48]. Агонисты PRRs могут способствовать врожденным и специфическим иммунным реакциям, стимулируя опухолевые и окружающие их иммунные клетки к секреции цитокинов и хемокинов, регулируя поляризацию иммунных клеток, а также могут перепрограммировать иммуносупрессивное микроокружение опухоли [49, 50]. Среди множества агонистов особый интерес для генной терапии представляют пептидные агонисты, экспрессия которых в опухоли может достигаться доставкой в опухоль кодирующих их генов. Внутриопухолевая генная иммунотерапия агонистами PRRs направлена на индуцирование или усиление локального воспаления, приводящего к активации АПК. Кроме того, такой подход может приводить к формированию в опухоли иммунного ответа, характерного для заражения внутриклеточными патогенами (вирусами или бактериями), в ходе которого происходит активация CD8⁺ Т-клеток и выработка IFNγ CD4⁺ Т-клетками [51].

Одним из хорошо изученных белковых “сигналов опасности” является белок бактериальных жгутиков, флагеллин — агонист TLR5-рецептора [52]. Показано, что его синтез способствует стимуляции противоопухолевого иммунного ответа: он стимулирует пролиферацию Т-клеток, усиливает эффекторный ответ, увеличивает инфильтрацию Т-клеток и уменьшает рекрутирование и активацию Treg-клеток и миелоидных супрессорных клеток [53]. В исследовании [54] было показано, что аденовирус, экспрессирующий слитые белки флагеллин и Grp170, самый большой шаперон эндоплазматического ретикула, индуцирует мощный противоопухолевый ответ против меланомы B16, карциномы предстательной железы и карциномы толстой кишки мышей. Также в качестве белковых сигналов опасности, кодируемых онколитическими вирусами, были использованы гены белков теплового шока HSP-70, HSP-90 и транскрипционный фактор HSF1. Такие вирусы могут индуцировать специфический иммунный ответ в меланомах, колоректальных и других раковых опухолях у иммунокомпетентных мышей

Таблица 2. Использование молекул “сигналов опасности” в составе противоопухолевых генных препаратов

Молекула	Ссылки
Модифицированные аденовирусы	
Аденовирус, экспрессирующий слитые белки флагеллин и Grp170	[54]
Аденовирусы, кодирующие HSP-70, HSP-90, HSF1	[55, 56, 94]
Mobilan: рекомбинантный аденовирус, несущий самоактивирующуюся кассету TLR5	[95]
Онколитический вирус, кодирующий декорин и GM-CSF	[96]
Онколитический вирус, кодирующий декорин и IL-12	[97]
Модифицированные Т-клетки	
Трансдуцированные ретровирусным вектором, содержащим ген флагеллина, Т-клетки	[53]
Невирусные векторы	
Плазмидная ДНК с геном ESAT6	[98]
Плазмидная ДНК с генами ESAT6 и IL-2	[99]

[55]. В доклинических испытаниях HSP70-сверхэкспрессирующего онколитического вируса было показано, что его внутриопухолевое введение может ингибировать первичные и метастатические опухоли за счет усиленной онколитической активности и HSP70-опосредованного иммунного ответа. В ходе КИ данного вируса у некоторых пациентов наблюдались регрессия отдаленных метастазов и увеличение количества иммунных CD4+ и CD8+ Т-клеток и NK-клеток [56]. Примеры использования других молекул “сигналов опасности” в составе противоопухолевых генных препаратов можно найти в табл. 2.

В зависимости от инициирующего стимула гибель раковых клеток может быть иммуногенной или неиммуногенной. В результате иммуногенной гибели клеток (ICD, immunogenic cell death) высвобождаются растворимые медиаторы воспаления, которые действуют на рецепторы дендритных клеток, а также доступные для захвата опухолевые антигены, что в конечном счете усиливает презентацию опухолевых антигенов Т-клеткам. ICD в отличие от неиммуногенной гибели представляет собой важный путь активации иммунной системы против рака [57, 58]. Первоначально только некроз и аутофагия считались воспалительными и иммуногенными. Однако недавние исследования в химио- и лучевой терапии показали, что апоптотическую гибель клеток также можно разделить на иммуногенную и неиммуногенную. Например, апоптотическая гибель клеток, вызванная некоторыми онколитическими вирусами, является иммуногенной [59, 60].

Использование “сигналов опасности” в составе генотерапевтических препаратов усиливает привлечение и активацию АПК. Однако для формирования более эффективного противоопухолевого ответа также необходимо высвобождение опухолевых антигенов в процессе гибели раковых клеток. Таким образом, можно предположить,

что для эффективной стимуляции первых стадий иммунного цикла необходимо сочетать “сигналы опасности” с цитотоксическими воздействиями, стимулирующими ICD. Среди генотерапевтических подходов такими свойствами обладает ГНЭПТ.

ПРИНЦИПЫ ГНЭПТ

ГНЭПТ (ген-направленная энзиматическая пролекарственная терапия), ранее названная нами генной хирургией, — генная терапия с использованием генетических конструкций, в состав которых входят так называемые “гены-убийцы”, которые кодируют ферменты, способные превращать пролекарство в цитотоксин [61] (рис. 2). Экспрессия “генов-убийц” может контролироваться опухолеспецифичными промоторами, в этом случае фермент и связанная с ним ферментативная реакция преимущественно происходят в опухолевых клетках при минимальном воздействии на здоровые клетки. Таким образом, терапевтический индекс ГНЭПТ может быть намного выше, чем при обычной химиотерапии [62].

Цитотоксин может выходить из раковых клеток, в которых он был синтезирован, и проникать в соседние опухолевые клетки, не получившие “ген-убийцу”, приводя к их гибели тоже. Данное явление получило название “эффект свидетеля” (bystander effect), он может значительно увеличить эффективность ГНЭПТ [63].

ГНЭПТ направлена на уничтожение опухолевых клеток за счет использования присущих им свойств, например, повышенной скорости митотических делений. В этом отношении подход подобен химиотерапии. Однако, в отличие от последней, цитотоксин, убивающий раковые клетки путем ингибирования систем репликации, образуется внутри клеток, так что свойственная химиотерапии токсичность в данном случае резко снижается [64].

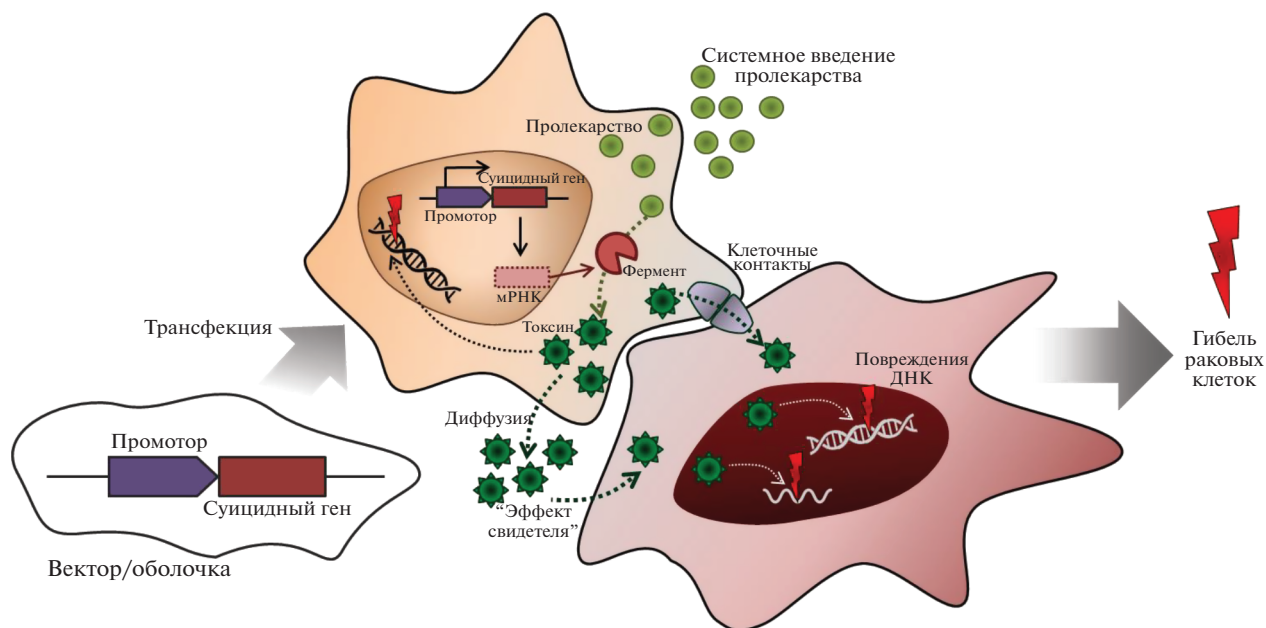


Рис. 2. Механизм действия ген-направленной энзиматической пролекарственной терапии (ГНЭПТ). Пунктирные стрелки обозначают возможные пути воздействия на раковую клетку, зависящие от конкретного токсина и типа клеток.

Кроме того, как уже упоминалось выше, гибель клеток от ГНЭПТ является иммуногенной [65]. Таким образом, препараты на основе ГНЭПТ способны не только уничтожать раковые клетки (этап 1 иммунного цикла), но и активировать противоопухолевый иммунный ответ (этап 2 иммунного цикла).

Системы ГНЭПТ на основе тимидинкиназы вируса простого герпеса

Наиболее изученной в настоящее время считается система ГНЭПТ “тимидинкиназа вируса простого герпеса (HSVtk)/ганцикловир (Гц)”, достигшая поздних стадий клинических испытаний.

Тимидинкиназа вируса простого герпеса (HSVtk) – фермент, катализирующий реакцию фосфорилирования нуклеозидов с образованием нуклеозидмонофосфатов. Ганцикловир (Гц) – синтетический аналог 2'-дезоксигуанозина, противовирусный препарат, в настоящее время используется в терапии цитомегаловирусной (ЦМВ) инфекции.

HSVtk обладает способностью фосфорилировать ганцикловир до ганцикловирмонофосфата, который клеточные киназы впоследствии фосфорилируют до ганцикловирдифосфата и ганцикловиртрифосфата. Цитотоксическое действие комбинации HSVtk/Гц реализуется за счет: 1) конкурентного ингибирования встраивания дезоксигуанозинтрифосфата в ДНК опухолевой клетки под действием ДНК-полимеразы; 2) включения ганцикловиртрифосфата в ДНК опухолевой клетки,

приводящего к прекращению удлинения цепи ДНК во время клеточного деления. Вновь образующийся ганцикловиртрифосфат может выходить из опухолевых клеток, в которых он образовался, и проникать в соседние опухолевые клетки, приводя к их гибели (“эффект свидетеля”) [66, 67]. “Эффект свидетеля” проявляется за счет пассивной диффузии ганцикловира-монофосфата в соседние клетки через межклеточные щелевые контакты (gap-junctions). Недостаточная щелевая межклеточная коммуникация между делящимися раковыми клетками может ограничивать транспорт фосфорилированных производных ганцикловира в соседние клетки, ослабляя “эффект свидетеля” [68]. Опосредованная комбинацией HSVtk/ганцикловир гибель клеток может быть вызвана различными механизмами: апоптозом и некрозом, а также иммуногенной гибелью клеток с высвобождением опухолеспецифических антигенов и молекулярных фрагментов, ассоциированных с повреждениями (DAMPs), что приводит к инфильтрации опухоли различными антигенпрезентирующими клетками, включая дендритные и Т-клетки.

К настоящему времени инициировано более 200 клинических исследований ГНЭПТ-систем, и только некоторые из них достигли III фазы КИ. Препарат Cerepro (sitimagene ceradenovec) компании Ark Therapeutics представляет собой аденовирусный вектор, несущий ген *HSVtk*. Препарат предназначен для внутриопухолевого введения пациентам с глиомой высокой степени злокачественности, получил статус орфанного препарата

в 2002 г. В I и II фазах клинических исследований применение Сегерго было ассоциировано со значительным увеличением выживаемости. Предварительные результаты клинического исследования фазы III продемонстрировали значительный положительный эффект Сегерго в отношении времени до повторного вмешательства или смерти по сравнению со стандартным лечением (отношение рисков: 1.43; 95% ДИ: 1.06–1.93; $p < 0.05$) [69]. Однако сотрудники Европейского агентства по лекарственным средствам (ЕМА), изучив представленные Ark Therapeutics документы, не нашли достаточных доказательств клинической пользы препарата Сегерго и он не был зарегистрирован для клинического применения [70].

В настоящее время клинические исследования системы HSVtk/Гц в основном включают исследование комбинации этого подхода с другими методами противоопухолевой терапии для достижения лучших клинических результатов [71, 72]. Значительное внимание в области оптимизации систем ГНЭПТ и повышения их эффективности уделяется комбинации систем фермент–пролекарство с подходами, направленными на повышение иммуногенности опухолевых клеток. Использование вирусных векторов может приводить к дополнительной стимуляции иммунного ответа.

Так, испытания препарата ProstAtak (Aglatim-agene besadenovex, CAN-2409, <https://www.candeltx.com/platforms/>), который представляет собой аденовирус, несущий ген *HSVtk*, и применяется в сочетании с перорально вводимым пролекарством валацикловиrom, показали, что комбинация локального цитолитического действия с провоспалительным эффектом, обусловленным вирусным вектором, приводит к индукции опухоли-инфильтрующих лимфоцитов, которые вызывают активацию адаптивного иммунного ответа. В настоящее время проводится III фаза клинических исследований CAN-2409 на пациентах с впервые диагностированным локализованным раком простаты, у которых промежуточный или высокий риск прогрессирования (NCT01436968, табл. 1). Ожидается, что окончательные данные по эффективности CAN-2409 будут получены в 2024 г.

Одним из основных способов усиления противоопухолевой активности системы HSVtk/Гц является ее комбинация с различными модуляторами иммунной системы. Так, комбинация в одном рекомбинантном аденовирусе генов, кодирующих модифицированную тимидинкиназу вируса простого герпеса, HSV-sr39tk и IL-3, позволила повысить эффективность терапии благодаря более эффективной индукции иммунного ответа [73]. Также неоднократно было показано, что эффективность системы HSVtk/Гц резко возрастает, если в клетки опухоли совместно вводить гены HSVtk и GM-CSF [74–76]. Например, в работе

[77] изучалась противоопухолевая активность двух аденовирусных векторов, один из которых (AV-TK) содержал ген HSVtk, а второй (AV-GM/IL2)—гены цитокинов GM-CSF и IL-2 (интерлейкин-2). На мышах с привитой высокометастазирующей опухолью 4T1 было показано, что только при одновременном введении аденовирусных векторов AV-TK и AV-GM/IL2 в опухоли наблюдается существенное подавление метастазирования и сильный опухолеспецифический цитотоксический ответ Т-лимфоцитов. В некоторых других исследованиях также было показано возникновение более сильного противоопухолевого иммунного ответа при использовании GM-CSF в сочетании с HSVtk/Гц [78–80].

В случае использования вирусных векторов иммунная система естественным образом активирует врожденный и адаптивный иммунные ответы на сами вирусные частицы, что препятствует длительному лечению [81]. Системы невирусной доставки обычно считаются неиммуногенными или низкоиммуногенными (см., например, [82]). Однако они менее эффективно проникают в опухолевые клетки и вследствие этого меньшая доля клеток разрушается, вызывая иммунный ответ. Поэтому для увеличения эффективности ГНЭПТ-систем на основе систем невирусной доставки необходимо дополнительно использовать гены, которые могут активировать иммунный ответ и увеличить эффективность противоопухолевой терапии. Такая стратегия может усилить системный эффект ГНЭПТ за счет обеспечения абскопального эффекта, тем самым обуславливая повышение общей эффективности применяемого противоопухолевого воздействия. Ее преимущества были продемонстрированы экспериментально. В нашей работе [64] мы использовали плазмиду, несущую экспрессионную кассету с генами HSVtk и GM-CSF под контролем CMV промотора, которая была инкапсулирована в поликатионную оболочку ПЭГ-ПЭИ. На опухолевых моделях было показано, что такая комбинация усиливает ингибирование роста опухоли, увеличивает продолжительность жизни животных и подавляет метастазирование по сравнению с конструкциями, несущими одиночный ген HSVtk или GM-CSF.

Системы ГНЭПТ на основе цитозиндезаминазы

Другой перспективной парой фермент/пролекарство для осуществления суицидной генной терапии является бактериальная или дрожжевая цитозиндезаминаза (CD) и пролекарство 5-фторцитозин (5-ФЦ), используемое в качестве противоопухолевого препарата. Цитозиндезаминаза в норме катализирует реакцию гидролитического дезаминирования цитозина с образованием урацила, а в организмах дрожжей и бактерий принимает участие в утилизации пиримидина. Благодаря

реакции дезаминирования пролекарство 5-фторцитозин (5-ФЦ) в опухолевых клетках превращается в 5-фторурацил (5-ФУ), обладающий сильным противоопухолевым действием [83, 84]. Цитотоксический эффект 5-ФУ достигается следующими путями: 1) производное 5-ФУ, монофосфат (5-ФдУМФ), за счет необратимого ингибирования фермента тимидилатсинтазы останавливает синтез ДНК; 2) другие производные 5-ФУ, трифосфаты (5-ФУТФ и 5-ФдУТФ), могут встраиваться в нуклеотидную последовательность при репликации и останавливать синтез ДНК; 3) 5-ФУТФ предотвращает процессинг РНК и индуцирует апоптоз [85]. Помимо прямого воздействия благодаря “эффекту свидетеля” 5-ФУ из клеток, в которых он был синтезирован, проникает в соседние клетки и поражает их [86]. В отличие от системы ГНЭПТ на основе HSVtk/ганцикловира, система CD/5-ФЦ действует не только на делящиеся, но и на покоящиеся клетки. 5-ФУ свободно диффундирует между клетками, что обуславливает более сильный “эффект свидетеля”. Так, в *in vivo* модели показано, что даже 2% клеток, экспрессирующих CD, может быть достаточно для значительной регрессии опухоли при использовании нетоксичных доз 5-ФЦ [86].

Так же как и в системах, использующих HSVtk, существует несколько примеров того, как эффективность данной суицидной системы возрастает при использовании в сочетании с генами, кодирующими те или иные активаторы иммунного ответа. Так, комбинация аденовирусов, кодирующих CD и IL-12, в присутствии 5-фторцитозина позволила достичь существенно лучшей эффективности лечения экспериментальных опухолей мыши по сравнению с каждой из монотерапий. Комбинированная терапия также увеличивала активность НК-клеток селезенки и продукцию IFN-гамма спленоцитами [87]. Другим примером может служить аденовирусный вектор, несущий гены цитозиндезаминазы (CD) и гранулоцитарно-макрофагального колоние-стимулирующего фактора (GM-CSF) под контролем CMV промотора (Ad-CD-GMCSF) [88]. У мышей, получавших лечение Ad-CD-GMCSF в сочетании с 5-ФЦ, значительно замедлялся рост опухоли и увеличивалась продолжительность жизни по сравнению с мышами, получившими конструкцию, содержащую только ген CD (Ad-CD), и мышами, не получившими лечения. Кроме того, отмечалось накопление опухолеспецифичных Т-клеток.

Приведенные примеры указывают на ведущую роль иммунной системы для достижения системного противоопухолевого эффекта. Эти данные показывают, что для системы ГНЭПТ необходим подбор второго компонента, который сможет наиболее эффективно запустить каскад противоопухолевого иммунного цикла.

Наиболее известным генотерапевтическим препаратом на основе системы CD/5-ФЦ, достигшим III фазы клинических исследований, является препарат Тоса 511, разработанный компанией Tosagen, США и предназначенный для внутриопухолевого введения. Тоса 511 (vocimagene amiretrorepvec) — нелитический ретровирусный реплицирующийся вектор, несущий ген цитозиндезаминазы дрожжей, способный инфицировать только делящиеся клетки. Разработчиками использована “гуманизированная” форма гена цитозиндезаминазы *y*CD2 (с оптимизированным набором кодонов, характерных для гена человека), в которой дополнительно изменены три аминокислотных остатка для того, чтобы добиться стабильности работы цитозиндезаминазы при 37°C. Испытания на животных показали, что Тоса 511 стабильно реплицируется в ксенотрансплантатах опухолей человека и после введения 5-фторцитозина вызывает полную регрессию таких ксенотрансплантатов [89]. В КИ (NCT01470794, NCT01156584, NCT01985256) была доказана безопасность внутриопухолевого введения Тоса 511 пациентам с глиомами с последующим лечением Тоса FC (5-фторцитозин с пролонгированным периодом высвобождения) как в составе монотерапии, так и в комбинации с другими видами терапии. Тоса 511 показал многообещающие результаты на ранних стадиях клинических испытаний. У ряда пациентов с глиомами высокой степени злокачественности, получивших Тоса 511 + Тоса FC, наблюдалась многолетняя стойкая ремиссия [90]. В 2017 г. Управление по санитарному надзору за качеством пищевых продуктов и медикаментов США (FDA) присвоило Тоса 511 статус “прорывной терапии” для лечения рецидивирующей глиомы высокой степени злокачественности [91].

Однако в многоцентровом исследовании III фазы, в ходе которого проводилась оценка эффективности лечения с помощью Тоса 511 + Тоса FC по сравнению со стандартной терапией у пациентов с рецидивирующей глиомой высокой степени злокачественности, подвергшейся резекции, не было выявлено статистически значимых различий между медианами общей выживаемости в группах. Медиана общей выживаемости составила 11.5 мес. при терапии препаратом Тоса 511 и 12.2 мес. при стандартной терапии соответственно (отношение рисков 1.06; $p = 0.6154$). Кроме того, по всем вторичным конечным точкам также не было выявлено значимых различий между исследуемыми группами [92]. Провал Тоса 511 в КИ III фазы стал большим разочарованием для всех разработчиков генотерапевтических препаратов. Выдвигаются различные предположения, почему терапия Тоса 511 оказалась недостаточно эффективной, в частности неуспех связывают с низкой эффективностью начальной доставки вируса к месту опухоли, с на-

личием физических и биологических барьеров для репликации вируса, отсутствием в составе препарата генов системы активации иммунного ответа и как следствие — с отсутствием развития адекватного противоопухолевого иммунного ответа.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Внутриопухолевое введение иммунотерапевтических средств набирает обороты благодаря множеству преимуществ, включающих возможность достижения высоких локальных концентраций, значительное снижение системной токсичности и развитие абскопальных эффектов. Ген-иммунная внутриопухолевая терапия включает в себя ряд подходов, основанных на усилении противоракового иммунного ответа, и открывает принципиальную возможность сочетать в одной терапевтической конструкции несколько противораковых агентов и доставлять их непосредственно к опухоли, тем самым снижая побочные эффекты, наблюдаемые при системном введении. Локальная активация иммунных клеток в месте локализации опухоли способствует также развитию глобального иммунного ответа организма и позволяет воздействовать на отдаленные метастатические опухолевые очаги (абскопальный эффект). Такая стратегия “локальная доставка для глобального эффекта” была сформулирована и хорошо обоснована в обзоре с выразительным названием “Intratumoral Delivery of Immunotherapy — Act Locally, Think Globally” (“Внутриопухолевая иммунотерапия — действуйте локально, мыслите глобально”) [93]. Благодаря множеству преимуществ, таких как высокая локальная концентрация, индукция абскопального эффекта, сниженная нецелевая токсичность, это направление активно развивается в последнее время, что подтверждается растущим числом доклинических и клинических испытаний препаратов, относящихся к категории “ген-иммунная терапия рака”.

В состав генно-инженерных конструкций могут входить гены, кодирующие ферменты, превращающие пролекарства в лекарства, как это используется в ГНЭПТ, гены, кодирующие ингибиторы иммунных контрольных точек или костимуляторы Т-клеточной активации, или, наконец, гены, кодирующие неспецифические модуляторы иммунного ответа. Несмотря на множество свидетельств эффективности генотерапевтических препаратов, предназначенных для внутриопухолевого введения и кодирующих отдельные гены системы активации иммунного ответа, для широкого внедрения в клиническую практику необходимо добиваться более высокой эффективности такой терапии. На сегодняшний день общепринято мнение, что ключ к улучшению лечения заключается в комбинации подходов, которые позволяют восполнить недо-

статки каждого в отдельности. Мы полагаем, что комбинация ген-иммунных препаратов, действующих на различные этапы противоопухолевого иммунного цикла, может преодолеть существующие ограничения и значительно повысить эффективность такой терапии. Кроме того, существенного синергического эффекта можно ожидать от совместного использования ингибиторов иммунных контрольных точек на основе моноклональных антител и внутриопухолевой ген-иммунной терапии, способствующей формированию иммуноактивированного микроокружения опухоли.

Ген-иммунная терапия может хорошо сочетаться с традиционными методами лечения рака — химио- и радиотерапией. Оптимальный набор негенетических компонентов комбинированной терапии невозможно подобрать теоретически из-за непредсказуемости эффектов их взаимодействия. Тем не менее самые общие требования к этим агентам можно сформулировать *a priori*. В частности, побочные эффекты, возможно, могут быть уменьшены при местном, ограниченном пределами опухоли терапевтическом лечении, вызывающем также иммунологические ответы в удаленных от места введения опухолевых очагах, включая метастазы. С этой точки зрения наиболее очевидным и экспериментально и клинически наиболее изученным кандидатом на комбинированную терапию с ген-иммунными препаратами является местная лучевая терапия, которая вызывает иммуногенную смерть клеток и демонстрирует явный абскопальный эффект. Следует при этом иметь в виду значительные индивидуальные вариации пациентов, которые требуют улучшения диагностических методов, позволяющего персонализировать использование как ген-иммунной терапии, так и ее комбинаторных партнеров.

Исследование выполнено при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (РФФИ) в рамках научного проекта № 20-115-50440.

Настоящая статья не содержит каких-либо исследований с использованием в качестве объекта животных.

Настоящая статья не содержит каких-либо исследований с участием в качестве объекта людей.

Авторы заявляют, что у них нет конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Hanahan D., Coussens L.M. Accessories to the crime: Functions of cells recruited to the tumor microenvironment // *Cancer Cell*. 2012. V. 21. № 3. P. 309–322. <https://doi.org/10.1016/j.ccr.2012.02.022>
2. Smyth M.J., Ngiew S.F., Ribas A., Teng M.W. Combination cancer immunotherapies tailored to the tumour microenvironment // *Nat. Rev. Clin. Oncol.* 2016.

- V. 13. № 3. P. 143–158.
<https://doi.org/10.1038/nrclinonc.2015.209>
3. *Chen L., Flies D.B.* Molecular mechanisms of T cell co-stimulation and co-inhibition // *Nat. Rev. Immunol.* 2013. V. 13. № 4. P. 227–242.
<https://doi.org/10.1038/nri3405>
4. *Forster M.D., Devlin M.J.* Immune checkpoint inhibition in head and neck cancer // *Front. Oncol.* 2018. V. 8. P. 310.
<https://doi.org/10.3389/fonc.2018.00310>
5. *Hude I., Sasse S., Engert A., Brockelmann P.J.* The emerging role of immune checkpoint inhibition in malignant lymphoma // *Haematologica.* 2017. V. 102. № 1. P. 30–42.
<https://doi.org/10.3324/haematol.2016.150656>
6. *Marin-Acevedo J.A., Dholaria B., Soyano A.E. et al.* Next generation of immune checkpoint therapy in cancer: new developments and challenges // *J. Hematol. Oncol.* 2018. V. 11. № 1. P. 39.
<https://doi.org/10.1186/s13045-018-0582-8>
7. *Rotte A.* Combination of CTLA-4 and PD-1 blockers for treatment of cancer // *J. Exp. Clin. Cancer Res.* 2019. V. 38. № 1. P. 255.
<https://doi.org/10.1186/s13046-019-1259-z>
8. *Sharma P., Allison J.P.* The future of immune checkpoint therapy // *Science.* 2015. V. 348. № 6230. P. 56–61.
<https://doi.org/10.1126/science.aaa8172>
9. *Sharpe A.H.* Introduction to checkpoint inhibitors and cancer immunotherapy // *Immunol. Rev.* 2017. V. 276. № 1. P. 5–8.
<https://doi.org/10.1111/imr.12531>
10. *Postow M.* Toxicities associated with checkpoint inhibitor immunotherapy // UpToDate. This topic last updated: Aug 12, 2021. <https://www.uptodate.com/contents/toxicities-associated-with-checkpoint-inhibitor-immunotherapy>
11. *Alexander W.* The checkpoint immunotherapy revolution: what started as a trickle has become a flood, despite some daunting adverse effects; new drugs, indications, and combinations continue to emerge // *P T.* 2016. V. 41. № 3. P. 185–191.
12. *Postow M.A., Sidlow R., Hellmann M.D.* Immune-related adverse events associated with immune checkpoint blockade // *N. Engl. J. Med.* 2018. V. 378. № 2. P. 158–168.
<https://doi.org/10.1056/NEJMra1703481>
13. *Abdin S.M., Zaher D.M., Arafa E.A., Omar H.A.* Tackling cancer resistance by immunotherapy: updated clinical impact and safety of PD-1/PD-L1 inhibitors // *Cancers (Basel).* 2018. V. 10. № 2. P. 32.
<https://doi.org/10.3390/cancers10020032>
14. *Stein-Merlob A.F., Rothberg M.V., Ribas A., Yang E.H.* Cardiotoxicities of novel cancer immunotherapies // *Heart.* 2021. heartjnl-2020-318083.
<https://doi.org/10.1136/heartjnl-2020-318083>
15. *Portsmouth D., Hlavaty J., Renner M.* Suicide genes for cancer therapy // *Mol. Aspects. Med.* 2007. V. 28. № 1. P. 4–41.
<https://doi.org/10.1016/j.mam.2006.12.001>
16. *Ascierto P.A., Del Vecchio M., Mackiewicz A. et al.* Overall survival at 5 years of follow-up in a phase III trial comparing ipilimumab 10 mg/kg with 3 mg/kg in patients with advanced melanoma // *J. Immunother. Cancer.* 2020. V. 8. № 1. P.e000391.
<https://doi.org/10.1136/jitc-2019-000391>
17. *Chen D.S., Mellman I.* Oncology meets immunology: the cancer-immunity cycle // *Immunity.* 2013. V. 39. № 1. P. 1–10.
<https://doi.org/10.1016/j.immuni.2013.07.012>
18. *Ziani L., Chouaib S., Thiery J.* Alteration of the antitumor immune response by cancer-associated fibroblasts // *Front. Immunol.* 2018. V. 9. P. 414.
<https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.00414>
19. *Milling L., Zhang Y., Irvine D.J.* Delivering safer immunotherapies for cancer // *Adv. Drug. Deliv. Rev.* 2017. V. 114. P. 79–101.
<https://doi.org/10.1016/j.addr.2017.05.011>
20. *Song W., Shen L., Wang Y. et al.* Synergistic and low adverse effect cancer immunotherapy by immunogenic chemotherapy and locally expressed PD-L1 trap // *Nat. Commun.* 2018. V. 9. № 1. P. 2237.
<https://doi.org/10.1038/s41467-018-04605-x>
21. *Hewitt S.L., Bai A., Bailey D. et al.* Durable anticancer immunity from intratumoral administration of IL-23, IL-36gamma, and OX40L mRNAs // *Sci. Transl. Med.* 2019. V. 11. № 477. P. eaat9143.
<https://doi.org/10.1126/scitranslmed.aat9143>
22. *Jimeno A., Gupta S., Sullivan R. et al.* Abstract CT032: A phase 1/2, open-label, multicenter, dose escalation and efficacy study of mRNA-2416, a lipid nanoparticle encapsulated mRNA encoding human OX40L, for intratumoral injection alone or in combination with durvalumab for patients with advanced malignancies // *Cancer Res.* 2020. V. 76. № 14. Supplement. P. CT032.
<https://doi.org/10.1158/1538-7445.AM2020-CT032>
23. *Bartkowiak T., Curran M.A.* 4-1BB Agonists: Multi-potent potentiators of tumor immunity // *Front. Oncol.* 2015. V. 5. P. 117.
<https://doi.org/10.3389/fonc.2015.00117>
24. *Andarini S., Kikuchi T., Nukiwa M. et al.* Adenovirus vector-mediated in vivo gene transfer of OX40 ligand to tumor cells enhances antitumor immunity of tumor-bearing hosts // *Cancer Res.* 2004. V. 64. № 9. P. 3281–3287.
<https://doi.org/10.1158/0008-5472.can-03-3911>
25. *Huang J.H., Zhang S.N., Choi K.J. et al.* Therapeutic and tumor-specific immunity induced by combination of dendritic cells and oncolytic adenovirus expressing IL-12 and 4-1BBL // *Mol. Ther.* 2010. V. 18. № 2. P. 264–274.
<https://doi.org/10.1038/mt.2009.205>
26. *Shin C.A., Cho H.W., Shin A.R. et al.* Co-expression of CD40L with CD70 or OX40L increases B-cell viability and antitumor efficacy // *Oncotarget.* 2016. V. 7. № 29. P. 46173–46186.
<https://doi.org/10.18632/oncotarget.10068>
27. *Eriksson E., Milenova I., Wenthe J. et al.* Shaping the tumor stroma and sparking immune activation by CD40 and 4-1BB signaling induced by an armed oncolytic virus // *Clin. Cancer Res.* 2017. V. 23. № 19. P. 5846–5857.
<https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-17-0285>
28. *Svensson E., Milenova I., Moreno R. et al.* Abstract 297: Immunotherapy with a CD40L/4-1BBL double-

- armed oncolytic adenovirus drives Th1 immunity and control tumor progression in a pancreas cancer model // *Cancer Res.* 2015. V. 75. № 15. Supplement. P. 297. <https://doi.org/10.1158/1538-7445.AM2015-297>
29. *De Lombaerde E., De Wever O., De Geest B.G.* Delivery routes matter: Safety and efficacy of intratumoral immunotherapy // *Biochim. Biophys. Acta. Rev. Cancer.* 2021. V. 1875. № 2. P. 188526. <https://doi.org/10.1016/j.bbcan.2021.188526>
 30. Cytokines in the balance // *Nat. Immunol.* 2019. V. 20. № 12. P. 1557. <https://doi.org/10.1038/s41590-019-0557-0>
 31. *Qiu Y., Su M., Liu L. et al.* Clinical application of cytokines in cancer immunotherapy // *Drug. Des. Devel. Ther.* 2021. V. 15. P. 2269–2287. <https://doi.org/10.2147/DDDT.S308578>
 32. *Neri D., Sondel P.M.* Immunocytokines for cancer treatment: past, present and future // *Curr. Opin. Immunol.* 2016. V. 40. P. 96–102. <https://doi.org/10.1016/j.coi.2016.03.006>
 33. *Daud A.I., DeConti R.C., Andrews S. et al.* Phase I trial of interleukin-12 plasmid electroporation in patients with metastatic melanoma // *J. Clin. Oncol.* 2008. V. 26. № 36. P. 5896–5903. <https://doi.org/10.1200/JCO.2007.15.6794>
 34. *Daud A., Algazi A.P., Ashworth M.T. et al.* Systemic antitumor effect and clinical response in a phase 2 trial of intratumoral electroporation of plasmid interleukin-12 in patients with advanced melanoma // *J. Clin. Oncol.* 2014. V. 32. № 15. Suppl. P. 9025. https://doi.org/10.1200/jco.2014.32.15_suppl.9025
 35. *Algazi A., Bhatia S., Agarwala S. et al.* Intratumoral delivery of tavokinogene telseplasmid yields systemic immune responses in metastatic melanoma patients // *Ann. Oncol.* 2020. V. 31. № 4. P. 532–540. <https://doi.org/10.1016/j.annonc.2019.12.008>
 36. *Yan C., Jie L., Yongqi W. et al.* Delivery of human NKG2D-IL-15 fusion gene by chitosan nanoparticles to enhance antitumor immunity // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2015. V. 463. № 3. P. 336–343. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2015.05.065>
 37. *Tan L., Han S., Ding S. et al.* Chitosan nanoparticle-based delivery of fused NKG2D-IL-21 gene suppresses colon cancer growth in mice // *Int. J. Nanomedicine.* 2017. V. 12. P. 3095–3107. <https://doi.org/10.2147/IJN.S128032>
 38. *Bechter O., Utikal J., Baurain J.-F. et al.* A first-in-human study of intratumoral SAR441000, an mRNA mixture encoding IL-12sc, interferon alpha2b, GM-CSF and IL-15sushi as monotherapy and in combination with cemiplimab in advanced solid tumors // *J. Immunother. Cancer.* 2020. V. 8. Suppl. 3. P. Abstract 391. <https://doi.org/10.1136/jitc-2020-SITC2020.0391>
 39. *Pol J.G., Workenhe S.T., Konda P. et al.* Cytokines in oncolytic virotherapy // *Cytokine Growth. Factor. Rev.* 2020. V. 56. P. 4–27. <https://doi.org/10.1016/j.cytogfr.2020.10.007>
 40. *Aurelian L.* Oncolytic viruses as immunotherapy: progress and remaining challenges // *Onco. Targets. Ther.* 2016. V. 9. P. 2627–2637. <https://doi.org/10.2147/OTT.S63049>
 41. *Andtbacka R.H., Kaufman H.L., Collichio F. et al.* Talimogene laherparepvec improves durable response rate in patients with advanced melanoma // *J. Clin. Oncol.* 2015. V. 33. № 25. P. 2780–2788. <https://doi.org/10.1200/JCO.2014.58.3377>
 42. *Gallucci S., Matzinger P.* Danger signals: SOS to the immune system // *Curr. Opin. Immunol.* 2001. V. 13. № 1. P. 114–119. [https://doi.org/10.1016/s0952-7915\(00\)00191-6](https://doi.org/10.1016/s0952-7915(00)00191-6)
 43. *Guo Z.S., Liu Z., Bartlett D.L.* Oncolytic immunotherapy: Dying the right way is a key to eliciting potent antitumor immunity // *Front. Oncol.* 2014. V. 4. P. 74. <https://doi.org/10.3389/fonc.2014.00074>
 44. *Roh J.S., Sohn D.H.* Damage-associated molecular patterns in inflammatory diseases // *Immune Netw.* 2018. V. 18. № 4. P. e27. <https://doi.org/10.4110/in.2018.18.e27>
 45. *Galluzzi L., Buque A., Kepp O. et al.* Immunogenic cell death in cancer and infectious disease // *Nat. Rev. Immunol.* 2017. V. 17. № 2. P. 97–111. <https://doi.org/10.1038/nri.2016.107>
 46. *Heil M., Land W.G.* Danger signals - damaged-self recognition across the tree of life // *Front. Plant. Sci.* 2014. V. 5. P. 578. <https://doi.org/10.3389/fpls.2014.00578>
 47. *van der Burg S.H., Arens R., Ossendorp F. et al.* Vaccines for established cancer: overcoming the challenges posed by immune evasion // *Nat. Rev. Cancer.* 2016. V. 16. № 4. P. 219–233. <https://doi.org/10.1038/nrc.2016.16>
 48. *Okude H., Ori D., Kawai T.* Signaling through nucleic acid sensors and their roles in inflammatory diseases // *Front. Immunol.* 2020. V. 11. P. 625833. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2020.625833>
 49. *Aleynick M., Svensson-Arvelund J., Flowers C.R. et al.* Pathogen molecular pattern receptor agonists: treating cancer by mimicking infection // *Clin. Cancer Res.* 2019. V. 25. № 21. P. 6283–6294. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-18-1800>
 50. *Bai L., Li W., Zheng W. et al.* Promising targets based on pattern recognition receptors for cancer immunotherapy // *Pharmacol. Res.* 2020. V. 159. P. 105017. <https://doi.org/10.1016/j.phrs.2020.105017>
 51. *Jin B., Sun T., Yu X.H. et al.* The effects of TLR activation on T-cell development and differentiation // *Clin. Dev. Immunol.* 2012. V. 2012. P. 836485. <https://doi.org/10.1155/2012/836485>
 52. *Vijayan A., Rumbo M., Carnoy C., Sirard J.C.* Compartmentalized antimicrobial defenses in response to flagellin // *Trends. Microbiol.* 2018. V. 26. № 5. P. 423–435. <https://doi.org/10.1016/j.tim.2017.10.008>
 53. *Geng D., Kaczanowska S., Tsai A. et al.* TLR5 Ligand-secreting T cells reshape the tumor microenvironment and enhance antitumor activity // *Cancer Res.* 2015. V. 75. № 10. P. 1959–1971. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-14-2467>
 54. *Yu X., Guo C., Yi H. et al.* A multifunctional chimeric chaperone serves as a novel immune modulator inducing therapeutic antitumor immunity // *Cancer Res.* 2013. V. 73. № 7. P. 2093–2103. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-12-1740>

55. Huang X.F., Ren W., Rollins L. *et al.* A broadly applicable, personalized heat shock protein-mediated oncolytic tumor vaccine // *Cancer Res.* 2003. V. 63. № 21. P. 7321–7329.
56. Li J.L., Liu H.L., Zhang X.R. *et al.* A phase I trial of intratumoral administration of recombinant oncolytic adenovirus overexpressing HSP70 in advanced solid tumor patients // *Gene Ther.* 2009. V. 16. № 3. P. 376–382.
<https://doi.org/10.1038/gt.2008.179>
57. Golden E.B., Pellicciotta I., Demaria S. *et al.* The convergence of radiation and immunogenic cell death signaling pathways // *Front. Oncol.* 2012. V. 2. P. 88.
<https://doi.org/10.3389/fonc.2012.00088>
58. Kroemer G., Galluzzi L., Kepp O., Zitvogel L. Immunogenic cell death in cancer therapy // *Annu. Rev. Immunol.* 2013. V. 31. P. 51–72.
<https://doi.org/10.1146/annurev-immunol-032712-100008>
59. Woller N., Gurlevik E., Ureche C.I. *et al.* Oncolytic viruses as anticancer vaccines // *Front. Oncol.* 2014. V. 4. P. 188.
<https://doi.org/10.3389/fonc.2014.00188>
60. Uusi-Kerttula H., Hulin-Curtis S., Davies J., Parker A.L. Oncolytic adenovirus: Strategies and insights for vector design and immuno-oncolytic applications // *Viruses.* 2015. V. 7. № 11. P. 6009–6042.
<https://doi.org/10.3390/v7112923>
61. Sverdlov E.D. Genetic surgery – a right strategy to attack cancer // *Curr. Gene Ther.* 2011. V. 11. № 6. P. 501–531.
<https://doi.org/10.2174/156652311798192842>
62. Hamstra D.A., Lee K.C., Tychewicz J.M. *et al.* The use of 19F spectroscopy and diffusion-weighted MRI to evaluate differences in gene-dependent enzyme prodrug therapies // *Mol. Ther.* 2004. V. 10. № 5. P. 916–928.
<https://doi.org/10.1016/j.ymthe.2004.07.022>
63. Azatian A., Yu H., Dai W. *et al.* Effectiveness of HSV-tk suicide gene therapy driven by the Grp78 stress-inducible promoter in esophagogastric junction and gastric adenocarcinomas // *J. Gastrointest. Surg.* 2009. V. 13. № 6. P. 1044–1051.
<https://doi.org/10.1007/s11605-009-0839-1>
64. Alekseenko I.V., Snezhkov E.V., Chernov I.P. *et al.* Therapeutic properties of a vector carrying the HSV thymidine kinase and GM-CSF genes and delivered as a complex with a cationic copolymer // *J. Transl. Med.* 2015. V. 13. P. 78.
<https://doi.org/10.1186/s12967-015-0433-0>
65. Hojeij R., Domingos-Pereira S., Nkosi M. *et al.* Immunogenic human papillomavirus pseudovirus-mediated suicide-gene therapy for bladder cancer // *Int. J. Mol. Sci.* 2016. V. 17. № 7. P. 1125.
<https://doi.org/10.3390/ijms17071125>
66. Greco R., Oliveira G., Stanghellini M.T. *et al.* Improving the safety of cell therapy with the TK-suicide gene // *Front. Pharmacol.* 2015. V. 6. P. 95.
<https://doi.org/10.3389/fphar.2015.00095>
67. Yi Q.Y., Bai Z.S., Cai B. *et al.* HSVTK/GCV can induce cytotoxicity of retinoblastoma cells through autophagy inhibition by activating MAPK/ERK // *Oncol. Rep.* 2018. V. 40. № 2. P. 682–692.
<https://doi.org/10.3892/or.2018.6454>
68. Ram Z., Culver K.W., Oshiro E.M. *et al.* Therapy of malignant brain tumors by intratumoral implantation of retroviral vector-producing cells // *Nat. Med.* 1997. V. 3. № 12. P. 1354–1361.
<https://doi.org/10.1038/nm1297-1354>
69. Immonen A., Vapalahti M., Tynnelä K. *et al.* AdvHSV-tk gene therapy with intravenous ganciclovir improves survival in human malignant glioma: a randomised, controlled study // *Mol. Ther.* 2004. V. 10. № 5. P. 967–972.
<https://doi.org/10.1016/j.ymthe.2004.08.002>
70. EMA. Ark Therapeutics Ltd withdraws its marketing authorisation application for Cerepro (sitimagene ceradenovec) // Press Release 11/03/2010. <https://www.ema.europa.eu/en/news/ark-therapeutics-ltd-withdraws-its-marketing-authorisation-application-cerepro-sitimagene>
71. Shen C.H., Lin M.C., Fang C.Y. *et al.* Suppression of bone metastatic castration-resistant prostate cancer cell growth by a suicide gene delivered by JC polyomavirus-like particles // *Gene Ther.* 2021. Online ahead of print.
<https://doi.org/10.1038/s41434-021-00280-8>
72. Emamian M., Abbaspour A., Shahani T. *et al.* Non-viral suicide gene therapy: Cytosine deaminase gene directed by VEGF promoter and 5-fluorocytosine as a gene directed enzyme/prodrug system in breast cancer model // *Drug. Res. (Stuttg.)* 2021. V. 71. № 7. P. 395–406.
<https://doi.org/10.1055/a-1488-6054>
73. Yu C.F., Hong J.H., Chiang C.S. The roles of macrophages and nitric oxide in interleukin-3-enhanced HSV-Sr39tk-mediated prodrug therapy // *PLoS One.* 2013. V. 8. № 2. P. e56508.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0056508>
74. Majumdar A.S., Zolotarev A., Samuel S. *et al.* Efficacy of herpes simplex virus thymidine kinase in combination with cytokine gene therapy in an experimental metastatic breast cancer model // *Cancer Gene Ther.* 2000. V. 7. № 7. P. 1086–1099.
<https://doi.org/10.1038/sj.cgt.7700215>
75. Lechanteur C., Delvenne P., Princen F. *et al.* Combined suicide and cytokine gene therapy for peritoneal carcinomatosis // *Gut.* 2000. V. 47. № 3. P. 343–348.
<https://doi.org/10.1136/gut.47.3.343>
76. Finocchiaro L.M., Fiszman G.L., Karara A.L., Glikin G.C. Suicide gene and cytokines combined nonviral gene therapy for spontaneous canine melanoma // *Cancer Gene Ther.* 2008. V. 15. № 3. P. 165–172.
<https://doi.org/10.1038/sj.cgt.7701096>
77. Brockstedt D.G., Diagana M., Zhang Y. *et al.* Development of anti-tumor immunity against a non-immunogenic mammary carcinoma through in vivo somatic GM-CSF, IL-2, and HSVtk combination gene therapy // *Mol. Ther.* 2002. V. 6. № 5. P. 627–636.
78. Castleden S.A., Chong H., Garcia-Ribas I. *et al.* A family of bicistronic vectors to enhance both local and systemic antitumor effects of HSVtk or cytokine expression in a murine melanoma model // *Hum. Gene Ther.* 1997. V. 8. № 17. P. 2087–2102.
<https://doi.org/10.1089/hum.1997.8.17-2087>

79. Lee K.H., Piao H., Son B.R. et al. Herpes simplex virus thymidine kinase and granulocyte macrophage colony-stimulating factor combination gene therapy in a murine CT26 cell colon cancer model // *Cancer Gene Ther.* 2004. V. 11. № 8. P. 570–576. <https://doi.org/10.1038/sj.cgt.7700736>
80. Braun B., Lange M., Oeckler R., Mueller M.M. Expression of G-CSF and GM-CSF in human meningiomas correlates with increased tumor proliferation and vascularization // *J. Neurooncol.* 2004. V. 68. № 2. P. 131–140. <https://doi.org/10.1023/b:neon.0000027751.87894.f0>
81. Lemos de Matos A., Franco L.S., McFadden G. Oncolytic viruses and the immune system: the dynamic duo // *Mol. Ther. Methods Clin. Dev.* 2020. V. 17. P. 349–358. <https://doi.org/10.1016/j.omtm.2020.01.001>
82. Ke L., Cai P., Wu Y.-L. Polymeric nonviral gene delivery systems for cancer immunotherapy // *Advanced Therapeutics.* 2020. V. 3. № 6. P. 1900213. <https://doi.org/10.1002/adtp.201900213>
83. Lu M., Freytag S.O., Stricker H. et al. Adaptive seamless design for an efficacy trial of replication-competent adenovirus-mediated suicide gene therapy and radiation in newly-diagnosed prostate cancer (ReCAP Trial) // *Contemp. Clin. Trials.* 2011. V. 32. № 3. P. 453–460. <https://doi.org/10.1016/j.cct.2011.01.013>
84. Ostertag D., Amundson K.K., Lopez Espinoza F. et al. Brain tumor eradication and prolonged survival from intratumoral conversion of 5-fluorocytosine to 5-fluorouracil using a nonlytic retroviral replicating vector // *Neuro. Oncol.* 2012. V. 14. № 2. P. 145–159. <https://doi.org/10.1093/neuonc/nor199>
85. Twitty C.G., Diago O.R., Hogan D.J. et al. Retroviral replicating vectors deliver cytosine deaminase leading to targeted 5-fluorouracil-mediated cytotoxicity in multiple human cancer types // *Hum. Gene Ther. Methods.* 2016. V. 27. № 1. P. 17–31. <https://doi.org/10.1089/hgtb.2015.106>
86. Huber B.E., Austin E.A., Richards C.A. et al. Metabolism of 5-fluorocytosine to 5-fluorouracil in human colorectal tumor cells transduced with the cytosine deaminase gene: Significant antitumor effects when only a small percentage of tumor cells express cytosine deaminase // *Proc. Natl Acad. Sci. USA.* 1994. V. 91. № 17. P. 8302–8306. <https://doi.org/10.1073/pnas.91.17.8302>
87. Hwang K.S., Cho W.K., Yoo J. et al. Adenovirus-mediated interleukin-12 gene transfer combined with cytosine deaminase followed by 5-fluorocytosine treatment exerts potent antitumor activity in Renca tumor-bearing mice // *BMC Cancer.* 2005. V. 5. P. 51. <https://doi.org/10.1186/1471-2407-5-51>
88. Akbulut H., Coleri A., Sahin G. et al. A bicistronic adenoviral vector carrying cytosine deaminase and granulocyte-macrophage colony-stimulating factor increases the therapeutic efficacy of cancer gene therapy // *Hum. Gene Ther.* 2019. V. 30. № 8. P. 999–1007. <https://doi.org/10.1089/hum.2018.245>
89. Perez O.D., Logg C.R., Hiraoka K. et al. Design and selection of Toca 511 for clinical use: modified retroviral replicating vector with improved stability and gene expression // *Mol. Ther.* 2012. V. 20. № 9. P. 1689–1698. <https://doi.org/10.1038/mt.2012.83>
90. Cloughesy T.F., Landolfi J., Vogelbaum M.A. et al. Durable complete responses in some recurrent high-grade glioma patients treated with Toca 511 + Toca FC // *Neuro. Oncol.* 2018. V. 20. № 10. P. 1383–1392. <https://doi.org/10.1093/neuonc/noy075>
91. National Brain Tumor Society. National Brain Tumor Society Statement on Tocagen Designation // Press Release 23/02/2017. https://blog.brainumor.org/press_releases/national-brain-tumor-society-statement-on-tocagen-designation/
92. Collins S.A., Shah A.H., Ostertag D. et al. Clinical development of retroviral replicating vector Toca 511 for gene therapy of cancer // *Expert. Opin. Biol. Ther.* 2021. V. 10. P. 1–16. <https://doi.org/10.1080/14712598.2021.1902982>
93. Aznar M.A., Tinari N., Rullan A.J. et al. Intratumoral delivery of immunotherapy—act locally, think globally // *J. Immunol.* 2017. V. 198. № 1. P. 31–39. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1601145>
94. Wang W., Ji W., Hu H. et al. Survivin promoter-regulated oncolytic adenovirus with Hsp70 gene exerts effective antitumor efficacy in gastric cancer immunotherapy // *Oncotarget.* 2014. V. 5. № 1. P. 150–160. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.1430>
95. Mett V., Komarova E.A., Greene K. et al. Mobilan: A recombinant adenovirus carrying Toll-like receptor 5 self-activating cassette for cancer immunotherapy // *Oncogene.* 2018. V. 37. № 4. P. 439–449. <https://doi.org/10.1038/onc.2017.346>
96. Liu Z., Yang Y., Zhang X. et al. An oncolytic adenovirus encoding decorin and granulocyte macrophage colony stimulating factor inhibits tumor growth in a colorectal tumor model by targeting pro-tumorigenic signals and via immune activation // *Hum. Gene Ther.* 2017. V. 28. № 8. P. 667–680. <https://doi.org/10.1089/hum.2017.033>
97. Oh E., Choi I.K., Hong J., Yun C.O. Oncolytic adenovirus coexpressing interleukin-12 and decorin overcomes Treg-mediated immunosuppression inducing potent antitumor effects in a weakly immunogenic tumor model // *Oncotarget.* 2017. V. 8. № 3. P. 4730–4746. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.13972>
98. Ushigusa T., Koyama Y., Ito T. et al. Innate immunity mediated by dendritic cells/macrophages plays a central role in the early period in tumor treatment using gene of *Mycobacterium tuberculosis* antigen // *J. Vet. Med. Sci.* 2018. V. 80. № 2. P. 190–196. <https://doi.org/10.1292/jvms.17-0466>
99. Koyama Y., Yoshihara C., Ito T. Novel antitumor strategy utilizing a plasmid expressing a *Mycobacterium tuberculosis* antigen as a “Danger Signal” to block immune escape of tumor cells // *Pharmaceutics.* 2015. V. 7. № 3. P. 165–174. <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics7030165>

Gene-Immune Cancer Therapy. Perspectives and Problems

I. V. Alekseenko^{a, b, *}, V. V. Pleshkan^{a, b}, A. I. Kuzmich^{a, b}, S. A. Kondratieva^b, and E. D. Sverdlov^a

^a*Institute of Molecular Genetics of National Research Centre "Kurchatov Institute", Moscow, 123182 Russia*

^b*Shemyakin–Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry of the Russian Academy of Sciences, Moscow, 117997 Russia*

^{*}*e-mail: irina.alekseenko@mail.ru*

Successful therapy of complex and heterogeneous malignant tumors requires the use of combinatorial approaches that combine the use of several methods that affect various processes vital for the development of tumors. The emergence of novel strategy for check-point immunotherapy (ICT) offers fundamentally new opportunities for cancer therapy, and many combinatorial methods are grouped around this type of treatment: from combinations of impact on various check-points to their combinations with traditional methods such as chemotherapy or radiation therapy. Despite important clinical benefits, checkpoint inhibition is associated with numerous side effects, probably caused by generalized immune activation. Combinations with other agents possessing their own toxicity can only increase the overall toxicity. Side effects can be reduced when using local therapy that is limited to the tumor, but elicits immunological responses in tumor foci distant from the site of treatment, including metastases. Tumor-confined therapeutic impact can be achieved with gene therapy, either by intratumoral delivery of the desired genes, or by their specific expression in the tumor. These genes can encode a variety of therapeutic products, from checkpoint inhibitors and immunomodulators to enzymes that mediate intratumoral conversion of prodrugs into chemotherapeutic agents (suicide gene therapy, Gene-Directed Enzyme Prodrug Therapy, GDEPT). Intratumoral injection of these genes can have a strong effect not only against injected tumors, but also against distant metastases, due to the abscopal effect. We will consider approaches using intratumoral administration of constructs encoding ICT, cytokines, danger signals, GDEPT enzymes, as well as and their combinations for gene-immune cancer therapy.

Keywords: immunotherapy, gene therapy, cancer, immune checkpoints, cytokines, danger signals, GDEPT.

СОЗДАНИЕ РЕКОМБИНАНТНЫХ ШТАММОВ-ПРОДУЦЕНТОВ ГИАЛУРОНОВОЙ КИСЛОТЫ НА ОСНОВЕ *Bacillus subtilis*

© 2022 г. С. В. Рыков^{1, 2, *}, И. Ю. Батталова¹, А. С. Миронов³

¹ООО “Центр трансфера биотехнологий Ока-Биотех”, Москва, 119421 Россия

²Национальный исследовательский центр “Курчатовский институт” – ГосНИИгенетика,
Курчатовский геномный центр, Москва, 117545 Россия

³Институт молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта Российской академии наук, Москва, 119991 Россия

*e-mail: enterru@yandex.ru

Поступила в редакцию 22.11.2021 г.

После доработки 14.12.2021 г.

Принята к публикации 17.12.2021 г.

Гиалуроновая кислота находит все более широкое применение в производстве фармацевтических и косметических средств, что обуславливает возрастающую потребность в высококачественной субстанции. Основными промышленными способами получения гиалуроновой кислоты являются экстракция из сырья животного происхождения и ферментация условно-патогенных штаммов *Streptococcus*. Рекombинантная продукция на основе безопасных для человека микроорганизмов представляется рациональным и экономически обоснованным способом получения гиалуроновой кислоты. Созданные на основе платформы *Bacillus subtilis* рекombинантные штаммы-продуценты позволяют получать выход и качество продукта, сопоставимые с таковыми у промышленно освоенных штаммов стрептококков. Варьирование генетических, биохимических и биотехнологических факторов позволяет получать продукты с различной целевой молекулярной массой. Несмотря на достигнутые результаты, потенциал платформы *B. subtilis* для создания продуцентов гиалуроновой кислоты не исчерпан.

Ключевые слова: гиалуроновая кислота, *Bacillus subtilis*, рекombинантные штаммы-продуценты.

DOI: 10.31857/S0016675822050083

Гиалуроновая кислота (ГК) является высокомолекулярным линейным несulfатированным гликозаминогликаном, состоящим из повторяющихся дисахаридных звеньев, соединенных β -1,4-гликозидными связями. Дисахаридное звено состоит из фрагментов D-глюкуроновой кислоты и N-ацетил-D-глюкозамина, соединенных β -1,3-гликозидной связью [1, 2]. Наличие многочисленных sulfатированных групп у родственных гликозаминогликанов является причиной существования многочисленных изомеров, чего не наблюдается у гиалуроновой кислоты, которая всегда химически идентична, вне зависимости от методов и источников получения. В водном растворе ГК стабилизируется во вторичную структуру в виде одноцепочечной левозакрученной спирали. Дуплексы из спиралей образуют третичную структуру в виде вытянутой сетки, свойства которой зависят от молекулярного веса (МВ) и концентрации ГК [3]. Структурные характеристики и полиэлектролитная природа определяют уникальные реологические свойства растворов ГК [4, 5].

В организме человека ГК является одним из основных компонентов внеклеточного матрикса.

Значительные количества ГК обнаружены в дерме и эпидермисе кожи, синовиальной суставной жидкости, гиалиновом хряще, стекловидном теле глаза [6]. ГК функционирует и как структурная, и как сигнальная молекула. Молекулярный вес является ключевым фактором, определяющим биологические функции ГК [7]. Высокомолекулярная ГК ($\geq 10^6$ Да) служит смазывающим фактором синовиальной жидкости, поддерживает водно-электролитный баланс и структуру внеклеточного матрикса [8], обладает анти-ангиогенным эффектом, участвует в процессах воспаления и раневого восстановления тканей через взаимодействие с фибриногеном и контроле активации клеток иммунной системы, регуляции цитокинов и миграции стволовых клеток [9, 10]. При ряде патологических состояний, таких как астма, фиброз легких и ревматоидный артрит, происходит образование низкомолекулярной ГК (10^4 – 10^6 Да), которая демонстрирует провоспалительную и проангиогенную активность. Низкомолекулярная ГК стимулирует выработку провоспалительных цитокинов [7], а также провоцирует перестройку внеклеточного матрикса [11]. Фрагменты и олигосахариды ГК ($\leq 10^4$ Да) в

зависимости от типа ткани и физиологического состояния демонстрируют как провоспалительные [12], так и противовоспалительные эффекты [13].

Гиалуроновая кислота различного МВ может применяться в создании средств доставки терапевтических агентов, терапии новообразований, заболеваний глаз, суставов, легких, верхних дыхательных путей, мочевыводящей системы и в эстетической медицине [2]. В повседневную практику прочно вошли созданные на основе ГК лекарственные средства и изделия: протезы синовиальной жидкости, средства для лечения травм и ожогов кожи, вискоэластики для катарактальной хирургии и глазные капли, средства для лечения ринитов, дермальные филлеры [14]. Значительный эстетический и поддерживающий эффект обеспечивает широкое применение ГК в косметических средствах и биологически активных добавках.

В обзоре проанализированы результаты, полученные при работах по созданию рекомбинантных штаммов-продуцентов ГК на основе платформы *Bacillus subtilis*.

СПОСОБЫ ПРОМЫШЛЕННОГО ПОЛУЧЕНИЯ ГК

В промышленных масштабах ГК получают двумя способами — экстракцией из сырья животного происхождения и ферментацией штаммов природных микробных продуцентов. Способ получения ГК из сырья животного происхождения является отработанной технологией, которая позволяет получать продукт с высоким МВ и приемлемыми затратами. Сырьем для крупномасштабного производства являются гребни домашних кур и стекловидное тело глаза крупного рогатого скота [15]. Недостаток способа — низкий выход продукта с высокой вариабельностью по МВ, что связано с низкой концентрацией полимера в ткани, неконтролируемой деградацией эндогенными гиалуронидазами и жесткими условиями экстракции. Препарат, полученный данным способом, может содержать инфекционные агенты — вирусы или прионы, а также следовые количества белков и нуклеиновых кислот, которые могут вызывать аллергические реакции [16, 17].

Ферментация штаммов природных продуцентов — основной промышленный способ получения ГК [18]. В качестве продуцентов применяются селекционные штаммы *Streptococcus equi* subsp. *zooepidemicus* и *S. equi* subsp. *equi*, которые способны давать в оптимальных условиях выход продукта в 6–7 г/л с МВ 2.0–3.5 МДа [19]. Главным недостатком способа является применение штаммов, созданных на основе патогенного для сельскохозяйственных животных и условно-патогенного для человека вида стрептококков. Целевому продукту необходимо пройти многие стадии очистки для

исключения попадания эндо- и экзотоксинов, что негативно сказывается на экономических характеристиках.

Идентификация генов биосинтеза ГК позволила проводить работы по созданию рекомбинантных продуцентов на различных платформах, лишенных недостатков стрептококков, с достижением таких же показателей продуктивности и МВ. Созданы штаммы-продуценты ГК как на основе промышленных платформ — *Escherichia coli*, так и на основе платформ с GRAS-статусом — *Corynebacterium glutamicum*, *Lactobacillus acidophilus*, *Lactococcus lactis*, *B. subtilis* [18, 20]. Перспективным методом является хемоэнзиматический способ биосинтеза ГК, который позволяет получать монодисперсные фракции высокой степени чистоты [21]. Однако, несмотря на достигнутые результаты, к настоящему моменту на рынке не представлены продукты на основе субстанции ГК, полученной ферментацией рекомбинантных штаммов отличных от стрептококков или хемоэнзиматическим способом. Поэтому получение высококачественной ГК с высоким выходом и низкой стоимостью представляет собой актуальную проблему в области молекулярной генетики и биотехнологии.

ПУТЬ БИОСИНТЕЗА ГИАЛУРОНОВОЙ КИСЛОТЫ

Природными продуцентами ГК являются штаммы грамположительных бактерий — *Streptococcus pyogenes*, *S. uberis*, *S. equi* subsp. *zooepidemicus*, *S. equi* subsp. *equi*, *S. iniae*, *S. equisimilis*, *Bacillus cereus* штамм G9241 и грамотрицательных бактерий — *Pasteurella multocida* [19, 22–25]. Все природные продуценты ГК — патогенные и условно-патогенные микроорганизмы, вызывающие заболевания животных и человека. ГК составляет основу клеточной капсулы и выступает фактором вирулентности, позволяя микроорганизму избегать узнавания и противодействия иммунной системы, а также способствует колонизации слизистых поверхностей [26]. Несмотря на очевидные преимущества для усиления вирулентности, только некоторые виды бактерий приобрели способность синтезировать капсулярную ГК.

Гены биосинтеза ГК входят в состав оперона, в котором ключевым ферментом является гиалуронсинтаза (EC 2.4.1.212) — фермент, синтезирующий ГК из активированных форм мономеров — УДФ-глюкуроната и УДФ-N-ацетилглюкозамина. Существуют два класса бактериальных гиалуронсинтаз, которые различаются структурой молекулы и аминокислотной последовательностью [27]. Наиболее распространенным является класс 1, который отвечает за биосинтез ГК у стрептококков и позвоночных и представляет собой мембранный фермент [28]. Класс 2 представлен только гиалу-

ронсинтазой оперона *P. multocida* и является ассоциированным с мембраной ферментом [25]. Оперон биосинтеза ГК стрептококков также включает от двух до четырех генов биосинтеза предшественников активированных мономеров, а в случае *P. multocida* включает также гены с функцией транслокации во внеклеточное пространство растущей цепи ГК.

Путь биосинтеза ГК детально исследован у стрептококков [29, 30]. УДФ-глюкуронат и УДФ-N-ацетилглюкозамин являются производными глюкозо-6-фосфата и фруктозо-6-фосфата соответственно. Путь биосинтеза ГК представлен на рис. 1. Первой реакцией биосинтеза УДФ-глюкуроната является обратимая конверсия глюкозо-6-фосфата в глюкозо-1-фосфат с помощью α -фосфоглюкомутазы (ЕС 5.4.2.2). Далее глюкозо-1-фосфат уридилтрансфераза (ЕС 2.7.7.9) катализирует образование УДФ-глюкозы из УТФ и глюкозо-1-фосфата. Затем образуется УДФ-глюкуроновая кислота в реакции окисления первичной спиртовой группы УДФ-глюкозы с помощью УДФ-глюкозодегидрогеназы (ЕС 1.1.1.22).

Первой реакцией биосинтеза УДФ-N-ацетилглюкозамина является перенос аминогруппы с глутамина на фруктозо-6-фосфат посредством амидотрансферазы (ЕС 2.6.1.16) с образованием глюкозамин-6-фосфата. Затем происходит перегруппировка фосфатных групп с помощью мутазы (ЕС 5.4.2.10) с образованием глюкозамин-1-фосфата. Далее происходит перенос ацетильной группы ацетилтрансферазой (ЕС 2.3.1.157) с образованием N-ацетилглюкозамин-1-фосфата и пирофосфорилазы (ЕС 2.7.7.23) в реакции с УТФ синтезирует УДФ-N-ацетилглюкозамин.

УДФ-N-ацетилглюкозамин, УДФ-глюкоза и глюкозо-1-фосфат участвуют в биосинтезе пептидогликана и других компонентов клеточной стенки, что создает очевидную конкуренцию пути биосинтеза ГК. Для обеспечения метаболических потребностей клетки в нуклеотидных сахарах геном стрептококков содержит дополнительные гены глюкозо-1-фосфат уридилтрансферазы (*hasC2*), α -фосфоглюкомутазы (*pgm1*, *pgm2*) и ацетилтрансферазы/пирофосфорилазы (*gcaD*). В то же время ген УДФ-глюкозодегидрогеназы (*hasB*) представлен единственной копией в опероне биосинтеза ГК. Таким образом, метаболизм стрептококков способен поддерживать синтез большого количества ГК во внеклеточной капсуле.

Пути биосинтеза УДФ-N-ацетилглюкозамина и УДФ-глюкозы у стрептококков и *B. subtilis* биохимически идентичны. Геном *B. subtilis* содержит гомологи всех генов биосинтеза предшественников ГК. Это позволяет использовать гены *B. subtilis* для создания эффективных искусственных оперонов, поскольку известно, что собствен-

ные гены лучше экспрессируются, чем гомологичные чужеродные.

РЕКОМБИНАНТНЫЕ ПРОДУЦЕНТЫ ГИАЛУРОНОВОЙ КИСЛОТЫ НА ОСНОВЕ ШТАММОВ *B. subtilis*

Рекомбинантные штаммы-продуценты ГК на основе *B. subtilis*, полученные к настоящему времени, представлены в табл. 1 и 2.

Первая работа по гетерологичной продукции ГК в *B. subtilis* подтвердила высокий потенциал платформы [31, 32]. Продемонстрирована способность рекомбинантных штаммов секретировать ГК во внеклеточное пространство и накапливать продукт в культуральной жидкости. По характеристикам ГК соответствовала продукту природных микробных продуцентов на основе штаммов *Streptococcus*. Гетерологичная экспрессия только гиалуронсинтазы *seHas*, в отличие от штаммов *E. coli*, не оказывала негативного влияния на скорость роста *B. subtilis* и не приводила к биосинтезу ГК без дополнительной экспрессии генов биосинтеза УДФ-глюкуроната [33]. Комбинирование в опероне генов биосинтеза двух предшественников позволило выявить лимитирующую стадию биосинтеза, которой является синтез УДФ-глюкуроната. Оперон из *seHasA* и собственной УДФ-глюкозодегидрогеназы *tuaD* достаточен для эффективной продукции ГК. Дополнение оперона генами биосинтеза УДФ-N-ацетилглюкозамина *gcaD* и УДФ-глюкуроната *gtaB* увеличивает выход ГК на 10–20%. Разнесение генов *seHasA* и *tuaD-gtaB* по разным оперонам в хромосоме *B. subtilis* не приводит к заметным изменениям в выходе или МВ продукта по сравнению с единым опероном *seHasA-tuaD-gtaB*. Искусственный оперон на основе собственных генов синтеза предшественников в *B. subtilis* демонстрировал большую эффективность по выходу, чем созданный на основе генов оперона биосинтеза ГК из природного продуцента *S. equisimilis*. Неожиданным оказался эффект делеции гена устойчивости к хлорамфениколу *cat* и оксидазы семейства цитохром C450, задействованной в синтезе красного пигмента, *surX*, который выражался в увеличении выхода высокомолекулярной ГК.

Биосинтез ГК как штаммами стрептококков, так и рекомбинантными продуцентами *B. subtilis* — энергетически затратный процесс. Способом интенсификации энергетического метаболизма бактериальной клетки является повышение доступности кислорода с помощью бактериального гемоглобина [34]. Гетерологичная экспрессия Vhb оказала положительное влияние на культуральные свойства штамма и выход продукта у штамма-продуцента ГК на основе *B. subtilis* [35]. Штамм с *vhb* демонстрировал характерный пролонгированный лаг-период и увеличенную скорость роста и достигал

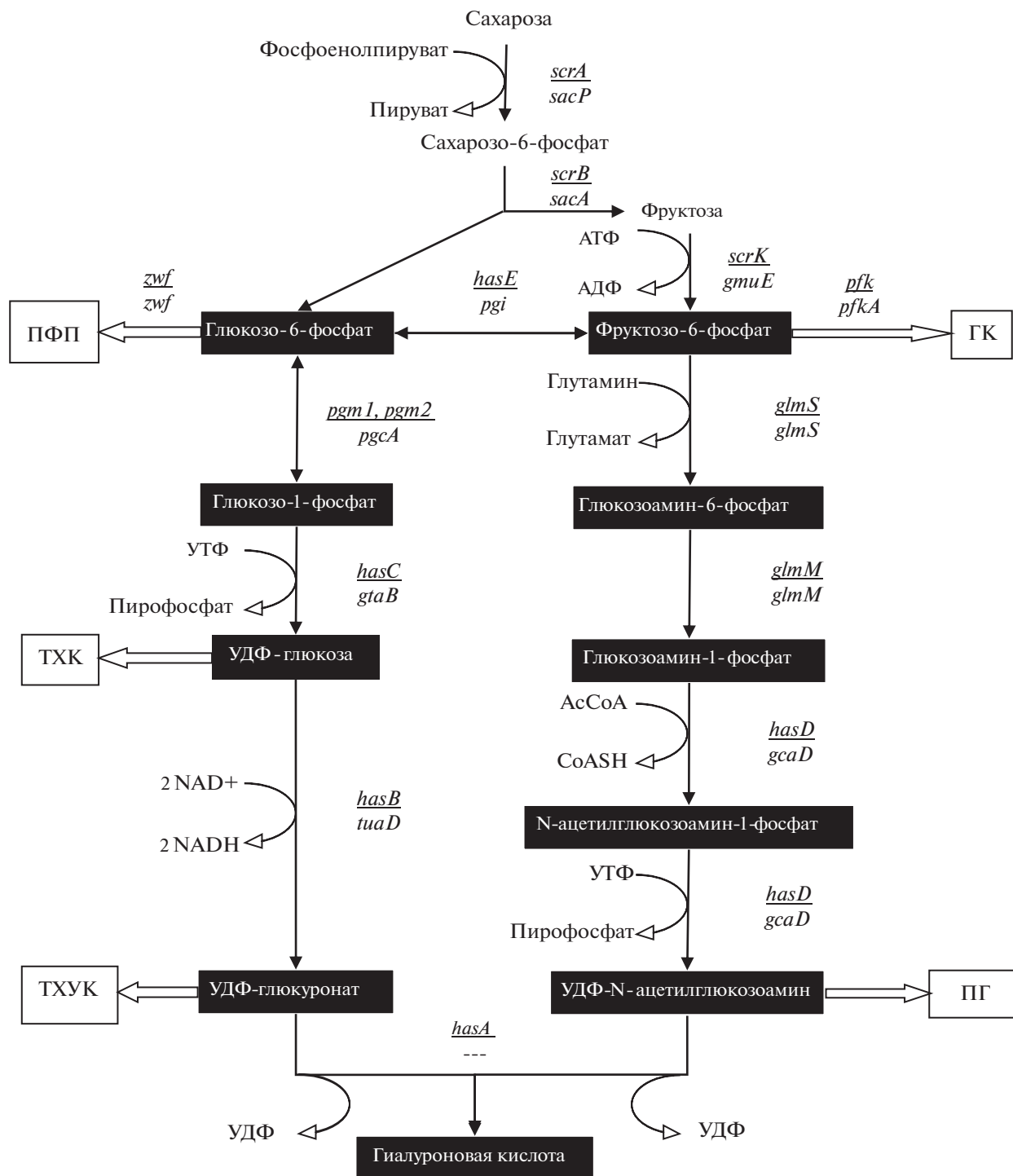


Рис. 1. Путь биосинтеза гиалуроновой кислоты и ассоциированные биохимические пути. ПФП – пентозофосфатный путь, ТХК – тейхоевые кислоты, ТХУК – тейхурановые кислоты, ГК – гликолиз, ПГ – пептидогликан. Приведены гены-гомологи: подчеркнутые надстрочные из генома *Streptococcus*, подстрочные из генома *B. subtilis*.

большой на 25% конечной плотности культуры (7.5 против 6.2 ОД). Выход ГК увеличился в 2 раза – с 0.9 до 1.8 г/л. Также был экспериментально подтвержден эффект влияния экспрессии собственных генов биосинтеза предшественников на выход про-

дукта. Штаммы с опероном из гиалуронсинтазы с УДФ-глюкозодегидрогеназой разного происхождения демонстрировали различие в продуктивности. Активность УДФ-глюкозодегидрогеназы была выше в 3 раза у штамма с собственным геном *tuaD*,

Таблица 1. Штаммы-продуценты гиалуроновой кислоты на основе *B. subtilis* (культивирование в колбах при 37°C)

Название штамма	Генотип	Источник гена гиалуронсинтазы	Промотор оперона	Выход, г/л	МВ, МДа	ОД ₆₀₀	Ссылка
RB-AB	1A751 amyE::(<i>P_{vegI}</i> - <i>seHasA-seHasB</i>)	<i>S. equi</i> subsp. <i>zooepidemicus</i>	Конститутивный <i>P_{vegI}</i>	0.84	н/д	6.5	[35]
RB-AD	1A751 amyE::(<i>P_{vegI}</i> - <i>seHasA-TuaD</i>)			1.14	н/д	6.0	
RB-ADV	1A751 amyE::(<i>P_{vegI}</i> - <i>seHasA-TuaD, P_{vegI}-vhh</i>)			1.8	н/д	7.5	
TPG223	168 lacA::(<i>P_{xyI}</i> - <i>PmHAS</i>), [<i>pHCMC05</i> ::(<i>P_{spac}</i> - <i>tuaD-gtaB</i>)]	<i>Pasteurella multocida</i>	Индукцибельный <i>P_{xyI}</i> , индукцибельный <i>P_{spac}</i>	6.8	4.55	н/д	[37]
PG6181	168 lacA::(<i>P_{xyI}</i> - <i>PmHAS</i>), [<i>pHCMC05</i> ::(<i>P_{spac}</i> - <i>gcaD</i>)]			1.68	0.013	н/д	
PP6502	168 lacA::(<i>P_{xyI}</i> - <i>PmHAS</i>), [<i>pHCMC05</i> ::(<i>P_{spac}</i> - <i>pgi</i>)]			3	4.54	н/д	
E168A	168 lacA::(<i>P_{xyI}</i> - <i>hasA</i>)	<i>S. zooepidemicus</i>	Индукцибельный <i>P_{xyI}</i>	1	1.51	н/д	[38]
E168A/pP43-D	168 lacA::(<i>P_{xyI}</i> - <i>hasA</i>), [<i>pP43NMK</i> ::(<i>P₄₃</i> - <i>tuaD</i>)]			2	1.76	н/д	
E168A/pP43-DB	168 lacA::(<i>P_{xyI}</i> - <i>hasA</i>), [<i>pP43NMK</i> ::(<i>P₄₃</i> - <i>tuaD, gtaB</i>)]			2.5	1.6	н/д	
E168A/pP43-DBA	168 lacA::(<i>P_{xyI}</i> - <i>hasA</i>), [<i>pP43NMK</i> ::(<i>P₄₃</i> - <i>tuaD, gtaB, pgcA</i>)]			2.1	1.56	н/д	
E168A/pP43-U	168 lacA::(<i>P_{xyI}</i> - <i>hasA</i>), [<i>pP43NMK</i> ::(<i>P₄₃</i> - <i>glmU</i>)]			2.2	1.68	н/д	
E168A/pP43-UMS	168 lacA::(<i>P_{xyI}</i> - <i>hasA</i>), [<i>pP43NMK</i> ::(<i>P₄₃</i> - <i>glmU, glmM, glmS</i>)]			2.6	1.83	н/д	
E168A/pP43-UMSI	168 lacA::(<i>P_{xyI}</i> - <i>hasA</i>), [<i>pP43NMK</i> ::(<i>P₄₃</i> - <i>glmU, glmM, glmS, pgi, KanR</i>)]			2.5	1.82	н/д	
E168A/pP43-DU	168 lacA::(<i>P_{xyI}</i> - <i>hasA</i>), [<i>pP43NMK</i> ::(<i>P₄₃</i> - <i>tuaD, glmU</i>)]			2.2	1.4	н/д	
E168A/pP43-DU-PBMS	168 lacA::(<i>P_{xyI}</i> - <i>hasA</i>), [<i>pP43NMK</i> ::(<i>P₄₃</i> - <i>tuaD-gluM, P_{veg}</i> - <i>gtaB-glmM-glmS</i>)]			2.7	1.61	н/д	

Таблица 1. Продолжение

Название штамма	Генотип	Источник гена гиалуронсинтазы	Промотор оперона	Выход, г/л	МВ, МДа	ОД ₆₀₀	Ссылка
E168Т	168 <i>lacA::</i> (<i>P_{xyI}</i> - <i>hasA</i>), <i>pfkA</i> (<i>Δ</i> ТG->ТТG)	<i>S. zooepidemicus</i>	Индукцибельный <i>P_{xyI}</i> , конститутивный <i>P₄₃</i>	1.2	1.57	н/д	
E168G	168 <i>lacA::</i> (<i>P_{xyI}</i> - <i>hasA</i>), <i>pfkA</i> (<i>Δ</i> ТG->ГТG)			1.18	1.59	н/д	
E168Т/pP43-DU-PBMS	168 <i>lacA::</i> (<i>P_{xyI}</i> - <i>hasA</i>), <i>pfkA</i> (<i>Δ</i> ТG->ТТG), [<i>pP43NMK::</i> (<i>P₄₃</i> - <i>tuaD-gluM</i> , <i>P_{veg}</i> - <i>gtaB-glmM-glmS</i>)]			3.2	1.69	н/д	
E168ТН/pP43-DU-PBMS	168 <i>lacA::</i> (<i>P_{xyI}</i> - <i>hasA</i>), <i>pfkA</i> (<i>Δ</i> ТG->ТТG), <i>nagA::</i> (<i>P_{lepA}</i> ^{sp-R17} - <i>H6LHyal</i>), [<i>pP43NMK::</i> (<i>P₄₃</i> - <i>tuaD-gluM</i> , <i>P_{veg}</i> - <i>gtaB-glmM-glmS</i>)]		Индукцибельный <i>P_{xyI}</i> , конститутивные <i>P_{lepA}</i> , <i>P₄₃</i> , <i>P_{veg}</i>	4.35	0.0022	н/д	
E168ТН1/pP43-DU-PBMS	168 <i>lacA::</i> (<i>P_{xyI}</i> - <i>hasA</i>), <i>pfkA</i> (<i>Δ</i> ТG->ТТG), <i>nagA::</i> <i>P_{lepA}</i> ^{sp-R17} - <i>H6LHyal</i>), [<i>pP43NMK::</i> (<i>P₄₃</i> - <i>tuaD-gluM</i> , <i>P_{veg}</i> - <i>gtaB-glmM-glmS</i>)]			2.9	0.0026	н/д	
E168ТН2/pP43-DU-PBMS	168 <i>lacA::</i> (<i>P_{xyI}</i> - <i>hasA</i>), <i>pfkA</i> (<i>Δ</i> ТG->ТТG), <i>nagA::</i> <i>P_{lepA}</i> ^{sp-R27} - <i>H6LHyal</i>), [<i>pP43NMK::</i> (<i>P₄₃</i> - <i>tuaD-gluM</i> , <i>P_{veg}</i> - <i>gtaB-glmM-glmS</i>)]			3.3	0.003	н/д	
AW008	1A751 <i>amyE::</i> (<i>P_{grac}</i> - <i>seHas-tuaD</i>)	<i>S. equisimilis</i>	Индукцибельный <i>P_{grac}</i>	0.48	1.7	4	[45]
AW009	1A751 <i>amyE::</i> (<i>P_{grac}</i> , <i>UPmod</i> - <i>seHas-tuaD</i>)		Индукцибельный <i>P_{grac}</i> , <i>UPmod</i>	0.97	1.5	6	
AW005-3	1A751 <i>amyE::</i> (<i>P_{grac}</i> , <i>UPmod</i> - <i>seHas-tuaD</i>), <i>wprA::</i> (<i>P_{xyI}</i> / <i>A.SphI</i> + <i>Γ</i> - <i>pfkA-gRNA.P41NT</i>)			1.6	1.2	5	
AW006-3	1A751 <i>amyE::</i> (<i>P_{grac}</i> , <i>UPmod</i> - <i>seHas-tuaD</i>), <i>wprA::</i> (<i>P_{xyI}</i> / <i>A.SphI</i> + <i>Γ</i> - <i>pfkA-gRNA.P41NT</i> (10C-A))			1.7	1.3	5.5	
AW014-3	1A751 <i>amyE::</i> (<i>P_{grac}</i> , <i>UPmod</i> - <i>seHas-tuaD</i>), <i>wprA::</i> (<i>P_{xyI}</i> / <i>A.SphI</i> + <i>Γ</i> - <i>zwf-gRNA.P92NT</i> (15C-A))			1.3	1.6	9	
AW016-3	1A751 <i>amyE::</i> (<i>P_{grac}</i> , <i>UPmod</i> - <i>seHas-tuaD</i>), <i>wprA::</i> (<i>P_{xyI}</i> / <i>A.SphI</i> + <i>Γ</i> - <i>zwf-gRNA.P603NT</i> (10U-C))			1.4	1.4	4	

Таблица 1. Окончание

Название штамма	Генотип	Источник гена гиалуронсинтазы	Промотор оперона	Выход, г/л	МВ, МДа	ОД ₆₀₀	Ссылка
AW018-3	1A751 amyE::(<i>P_{grac}</i> UPmod ^{-se} Has-tuaD), wprA::(<i>P_{xyIA.SphI}</i> + <i>Γ</i> - <i>zwf</i> -gRNA.P603NT(10U-C), <i>P_{xyIA.SphI}</i> + <i>Γ</i> - <i>pfkA</i> -gRNA.P41NT)	<i>S. equisimilis</i>	Индукцибельный <i>P_{grac}</i> UPmod	2.2	1.5	7.5	
AW019-3	1A751 amyE::(<i>P_{grac}</i> UPmod ^{-se} Has-tuaD), wprA::(<i>P_{xyIA.SphI}</i> + <i>Γ</i> - <i>zwf</i> -gRNA.P603NT(10U-C), <i>P_{xyIA.SphI}</i> + <i>Γ</i> - <i>pfkA</i> -gRNA.P41NT(10C-A))			2.3	1.7	6.5	
AW008	1A751 amyE::(<i>P_{grac}</i> -seHas-tuaD)	<i>S. equisimilis</i>	Индукцибельный <i>P_{grac}</i>	1.48	1.7	4.2	[48]
AW001-4	1A751 amyE::(<i>P_{grac}</i> -seHas-tuaD), <i>thrC</i> ::(<i>P_{grac}</i> -pgsA-claA)			0.63	2.0	7.7	
AW004-4	1A751 amyE::(<i>P_{grac}</i> -seHas-tuaD), wprA::(<i>P_{xyIA.SphI}</i> + <i>Γ</i> -ftsZ-gRNA.P79NT(15C-U))			0.79	1.5	7.8	
AW005-4	1A751 amyE::(<i>P_{grac}</i> -seHas-tuaD), wprA::(<i>P_{xyIA.SphI}</i> + <i>Γ</i> -ftsZ-gRNA.P79NT(15C-U))			1.46	1.6	7	
AW007-4	1A751 amyE::(<i>P_{grac}</i> -seHas-tuaD), <i>thrC</i> ::(<i>P_{grac}</i> UPmod ^{-pgsA-claA})		Индукцибельные <i>P_{grac}</i> , <i>P_{grac}</i> UPmod	0.8	1.4	7.5	
AW009-4	1A751 amyE::(<i>P_{grac}</i> -seHas-tuaD), <i>thrC</i> ::(<i>P_{grac}</i> UPmod ^{-pgsA-claA}), wprA::(<i>P_{xyIA.SphI}</i> + <i>Γ</i> -ftsZ-gRNA.P244NT)			0.95	2.0	8	
AW011-4	1A751 amyE::(<i>P_{grac}</i> -seHas-tuaD), <i>thrC</i> ::(<i>P_{grac}</i> UPmod ^{-pgsA-claA}), wprA::(<i>P_{xyIA.SphI}</i> + <i>Γ</i> -ftsZ-gRNA.P533NT)			1.05	2.1	7.5	[41]
WA	WB600 Δupp, [pHY300plk::hasA]	<i>S. ubris</i> *	н/д	0.9	н/д	4.3	
WmA	WB600 Δupp, ΔsigF, [pHY300plk::hasA]			1.2	н/д	4.8	
WmB	WB600 Δupp, ΔsigF, [pHY300plk::hasA,tuaD,gtaB]			3.2**	н/д	н/д	
1B	168 [pHY300plk::hasA,tuaD,gtaB]			1.7**	н/д	н/д	

* — *S. ubris* не описан в литературе, возможно авторы или редакторы ошиблись с написанием.

** — данные получены культивированием при 32°C.

Таблица 2. Штаммы-продуценты гиалуроновой кислоты на основе *B. subtilis* (культивирование в ферментерах при 37°C)

Штамм	Генотип	Источник гена гиалуронсинтазы	Промотор оперона	Выход, г/л	МВ, МДа	ОД ₆₀₀	Ссылка
RB163	A164Δ5 <i>amyE</i> ::(<i>P</i> _{scBAN-seHasA-TuaD-gcaD)}	<i>S. equisimilis</i>	Конститутивный P _{amyQ} (P _{scBAN})	н/д	1.5	н/д	[31] [32]
RB161	A164Δ5 <i>amyE</i> ::(<i>P</i> _{scBAN-seHasA-TuaD-gtaB)}			н/д	1.6	н/д	
TH-1	A164Δ5 <i>amyE</i> ::(<i>P</i> _{scBAN-seHasA-seHasB-seHasC-seHasD)}			н/д	1.5	н/д	
RB187	A164Δ5 <i>amyE</i> ::(<i>P</i> _{scBAN-seHasA-TuaD-gtaB), Δ<i>cat</i>}			н/д	3.5	н/д	
RB194	A164Δ5 <i>amyE</i> ::(<i>P</i> _{scBAN-seHasA-TuaD-gtaB), Δ<i>cat</i>, Δ<i>surX</i>}			н/д	3.4	н/д	
RB200	A164Δ5 <i>amyE</i> ::(<i>P</i> _{scBAN-seHasA-TuaD), Δ<i>cat</i>, Δ<i>surX</i>}			н/д	4.5	н/д	
1012/pBS5	1012 [<i>pHT01</i> ::(<i>P</i> _{grac} - <i>hasA-tuaD</i>)]	<i>S. zoepidemicus</i>	Индукцибельный P _{grac}	7.5	0.2–0.4	н/д	[36]
1012/pBS5	1012 [<i>pHT01</i> ::(<i>P</i> _{grac} - <i>hasA-tuaD</i>)]			3.3*	1.5–2*	н/д	
WB800N/pBS5	WB800N [<i>pHT01</i> ::(<i>P</i> _{grac} - <i>hasA-tuaD</i>)]			4.0	0.5–0.8	н/д	
E168T/pP43-DU-PBMS	168 <i>lacA</i> ::(<i>P</i> _{xyI} - <i>hasA</i>), <i>pfkA</i> ^(ATG->TTG) , [<i>pP43NMMK</i> ::(<i>P</i> _{43-tuaD-gluM} , <i>P</i> _{veg-gtaB-glmM-glmS})]	<i>S. zoepidemicus</i>	Индукцибельный P _{xyI} , конститутивные P _{lepA} , P ₄₃ , P _{veg}	6	1.42	21	[38]
E168TH/pP43-DU-PBMS	168 <i>lacA</i> ::(<i>P</i> _{xyI} - <i>hasA</i>), <i>pfkA</i> ^(ATG->TTG) , <i>nagA</i> ::(<i>P</i> _{lepA^{sp-R1}} - <i>H6LHyaI</i>), [<i>pP43NMMK</i> ::(<i>P</i> _{43-tuaD-gluM} , <i>P</i> _{veg-gtaB-glmM-glmS})]			19.38	0.0066	28	
E168THR1/pP43-DU-PBMS	168 <i>lacA</i> ::(<i>P</i> _{xyI} - <i>hasA</i>), <i>pfkA</i> ^(ATG->TTG) , <i>nagA</i> :: <i>P</i> _{lepA^{sp-R1}} - <i>H6LHyaI</i> , [<i>pP43NMMK</i> ::(<i>P</i> _{43-tuaD-gluM} , <i>P</i> _{veg-gtaB-glmM-glmS})]			9.18	0.018	23	

Таблица 2. Окончание

Штамм	Генотип	Источник гена гиалуронсинтазы	Промотор оперона	Выход, г/л	МВ, МДа	ОД ₆₀₀	Ссылка
E168THR2/pP43-DU-PBMS	168 <i>lacA::</i> (<i>P_{xyI}</i> - <i>hasA</i>), <i>pfkA</i> (<i>ATG->TTG</i>); <i>nagA::P_{lepA}</i> <i>sp-R2</i> - <i>H6LHyal</i>), [<i>pP43NNMK::</i> (<i>P₄₃</i> - <i>tuaD-gluM</i> , <i>P_{veg}</i> - <i>gtaB-glmM-glmS</i>)]	<i>S. zooepidermici</i>	Индукцибельный <i>P_{xyI}</i> , конститутивные <i>P_{lepA}</i> , <i>P₄₃</i> , <i>P_{veg}</i>	7.13	0.0496	24	[38]
AM2640	168 <i>amyE::</i> (<i>P_{npf-gsib}</i> - <i>seHasA-tuaD</i>)	<i>S. equisimilis</i>	Конститутивный тандемный <i>P_{npf-gsib}</i>	1.8	н/д	н/д	[43]
AM2681	168 <i>amyE::</i> (<i>P_{npf-gsib}</i> - <i>seHasA-tuaD</i>), <i>P_{npf-gsib}</i> - <i>gtaB</i>			2.21	н/д	н/д	
AM2686	168 <i>amyE::</i> (<i>P_{npf-gsib}</i> - <i>seHasA-tuaD</i>), <i>P_{npf-gsib}</i> - <i>gcaD-prs</i>			2.83	н/д	н/д	
AM2694	168 <i>amyE::</i> (<i>P_{npf-gsib}</i> - <i>seHasA-tuaD</i>), <i>P_{npf-gsib}</i> - <i>gtaB</i> , <i>P_{npf-gsib}</i> - <i>gcaD-prs</i>			3.21	н/д	н/д	
WmB	WB600 Δ <i>upp</i> , Δ <i>sigF</i> , [<i>pHY300plk::hasA-tuaD-gtaB</i>]	<i>S. ubris</i> ****	н/д	3.65**	0.392**	20	[41]
				3.4	0.45	17	
				1.6***	6.973***	7.5	
KCNHA10	3NA <i>amyE::</i> (<i>P_{hyper-spank}</i> - <i>szHasA-tuaD-gtaB-gcaD</i>)	<i>S. zooepidermici</i>	Индукцибельный <i>P_{hyper-spank}</i>	7	0.953	н/д	[53]

Примечание. Данные получены культивированием при: * – 30°C, ** – 32°C, *** – 47°C.
**** – *S. ubris* не описан в литературе, возможно авторы или редакторы ошиблись с написанием.

чем с гетерологичным *hasB*. Отличие в активности приводило к увеличению выхода ГК на 36%.

Применение индуцируемого промотора для экспрессии оперона биосинтеза ГК позволило получать ГК с различным МВ [36]. Условия ферментации и время культивирования оказывали определяющее влияние на МВ и выход ГК. Так, проведение ферментации в течение 80–160 ч приводило к получению продукта с МВ 0.1–0.5 МДа, 40–80 ч – 0.5–1 МДа, а 12–40 ч – 1.0–2.0 МДа. Однако для эффективной и безопасной для клеток экспрессии оперона понадобилось проводить селекцию трансформантов на градиенте ИПТГ и экспериментально определять рабочую концентрацию индуктора.

Двухэтапная контролируемая экспрессия с различными индукторами также позволяла варьировать МВ ГК [37]. Экспрессия интегрированной гиалуронсинтазы PmHAS контролируется индуцибельным промотором P_{xyI}, в то время как оперон на плазмиде контролируется индуцибельным промотором P_{spac}. В случае одновременной индукции кассеты и оперона на 2-м часе с начала культивирования штамма TPG223 продукция ГК достигает 6.8 г/л при МВ 3.38–4.55 МДа. Индукция кассеты PmHAS на 8-м часу, а оперона *tuaD-gtaB* на 2-м часу демонстрирует снижение продукции ГК до 3.1 г/л при значительном снижении МВ – до 0.006–0.008 МДа.

Было проведено систематическое исследование влияния гиперэкспрессии генов биосинтеза предшественников УДФ-глюкуроновой кислоты и УДФ-N-ацетилглюкозамина на выход и МВ ГК [38]. Наилучшие показатели с выходом 2.7 г/л и МВ в 1.61 МДа демонстрирует штамм E168A/pP43-DU-PBMS, содержащий в составе оперонов гены полного пути биосинтеза УДФ-глюкуроновой кислоты *tuaD-gluM* и УДФ-N-ацетилглюкозамина *gtaB-glmM-glmS*. Выявлена положительная корреляция между экспрессией генов биосинтеза УДФ-N-ацетилглюкозамина и повышением МВ продукта, что не выявляется для генов биосинтеза УДФ-глюкуроновой кислоты.

Впервые продемонстрирована возможность повышения продуктивности штаммов-продуцентов путем снижения расхода предшественника УДФ-N-ацетилглюкозамина фруктозо-6-фосфата в пути гликолиза. Снижение экспрессии гена 6-фосфофруктокиназы *pfkA*, которая является первым звеном для конверсии фруктозо-6-фосфата в пути гликолиза, осуществлено через замену иницирующего кодона ATG на варианты TTG и GTG. Штамм E168T/pP43-DU-PBMS, который отличается от E168A/pP43-DU-PBMS только заменой кодона ATG на TTG гена *pfkA*, демонстрировал по сравнению с последним увеличенный с 2.7 до 3.2 г/л выход ГК при схожей скорости роста и МВ продукта.

Также продемонстрирована возможность получения низкомолекулярной ГК с помощью гетерологичной экспрессии гиалуронидазы в штамме-продуcente ГК. Низкомолекулярные фракции и олигосахариды ГК с заданной массой ранее получали с помощью ферментативного гидролиза *in vitro* рекомбинантной гиалуронидазой пиявок LHyal [39]. Степень деполимеризации ГК зависит от концентрации гиалуронидазы, поэтому для получения фракций с заданной массой уровень гиалуронидазы LHyal, экспрессируемой с конститутивного промотора P_{lera}, варьировали с помощью библиотеки сайтов связывания с рибосомой [40]. Кассеты с LHyal интегрировали в геном штамма E168T/pP43-DU-PBMS, который содержал модификацию стартового кодона гена *pfkA* и полные пути биосинтеза предшественников. В результате наблюдали увеличение выхода ГК с соответствующим снижением МВ – 4.35, 2.9 и 3.3 г/л при 0.0022, 0.0026 и 0.003 МДа для различных вариантов соответственно. Масштабирование ферментации подтвердило ступенчатый характер изменения масс получаемых фракций и увеличение выхода ГК. Наблюдалась большая плотность культур штаммов с гиалуронидазой, что связано с лучшими условиями по доступности кислорода.

Экспрессия гиалуронидазы пиявки с чувствительной к температуре плазмиды pKSV7 в штамме-продуcente WmB приводила к получению ГК различной массы при различной температуре [41, 42]. Культивирование при перmissive температуре в 32°C приводило к снижению МВ ГК с 0.392 до 0.00861 МДа.

Увеличение выхода ГК также наблюдается при замене промоторов у геномных копий генов биосинтеза предшественников, что приводит к увеличению их экспрессии и позволило обойтись без необходимости расширения рекомбинантного оперона [43, 44]. Замена на сильный tandemный промотор Prpsf-gsib промоторов генов *gtaB* и *gcaD* позволила без расширения минимального оперона *seHasA-tuaD* достичь продуктивности в 2.35 и 3.21 г/л при культивировании в течение 24 и 48 ч соответственно. Применение tandemного промотора Prpsf-gsib позволяет обеспечить более эффективный профиль экспрессии целевых генов и соответственно более эффективную продукцию целевого продукта. Промотор PrpsF относится к наиболее сильным промоторам в геноме *B. subtilis* и обеспечивает максимально высокий уровень транскрипции на логарифмической стадии роста. Инициация транскрипции гена *gsiB* иницируется с участием альтернативной сигма-субъединицы σ^B и достигает максимума на стационарной фазе роста. Увеличение экспрессии генов биосинтеза предшественников положительно сказывается на выходе продукта, что подтверждает и дополняет выводы предшествующих исследований.

Дальнейшее развитие подхода с частичным перенаправлением метаболических потоков с пентозофосфатного пути и гликолиза на биосинтез ГК продемонстрировало существенный потенциал данного направления для увеличения выхода ГК [45]. Глюкозо-6-фосфат расходуется в пентозо-фосфатном пути через конверсию глюкозо-6-фосфат-1-дегидрогеназой, кодируемой геном *zwf*, в 6-фосфоглюконолактон. Фруктозо-6-фосфат расходуется в пути гликолиза через конверсию 6-фосфофруктокиназой, кодируемой геном *pfkA*, в фруктозо-1,6-бифосфат. Инактивация гена *zwf* приводит к значительному перенаправлению метаболического потока в путь гликолиза, а инактивация гена *pfkA* летальна для *B. subtilis* [46]. Для контролируемого подавления экспрессии генов *zwf* и *pfkA* применен метод CRISPR интерференции, который позволяет варьировать эффективность транскрипции в широких пределах [47]. Подавление транскрипции гена *pfkA* привело, по сравнению с исходным штаммом, к увеличению выхода ГК до 50% с небольшим уменьшением МВ ГК и плотности культуры. Подавление транскрипции гена *zwf* привело к повышению выхода ГК на 44 и 74% только в случае двух вариантов гидовой РНК AW014-3 и AW016-3 соответственно, в то время как остальные снижали выход и МВ продукта.

Одновременное подавление транскрипции генов *pfkA* и *zwf* оказывало значительный эффект на продуктивность штаммов *B. subtilis*. Штаммы с одновременным подавлением транскрипции генов *pfkA* и *zwf* AW018-3 и AW019-3 демонстрировали, по сравнению с базовым штаммом AW009, повышение выхода ГК на 98 и 108% соответственно, при незначительном повышении МВ. Скорость роста штаммов AW018-3 и AW019-3 не отличалась от AW009, однако оказалась выше, чем у штаммов с подавлением либо *pfkA*, либо *zwf*. Также подавление *pfkA* и *zwf* в штаммах AW018-3 и AW019-3 приводило к уменьшению накопления ацетона в культуральной среде по сравнению с AW009 на 167 и 118% соответственно, что отражало снижение метаболического потока через путь гликолиза. Подавление экспрессии *pfkA* и *zwf* на штамме AW009 дает значительно больший эффект, чем генетическая экспрессия генов биосинтеза предшественников *pgcA* и *glmS*.

Предшественники ГК расходуются также в процессах синтеза компонентов клеточной стенки. УДФ-N-ацетилглюкозамин участвует в синтезе тейхоевых кислот и компонентов пептидогликана с помощью ферментов, которые кодируются генами *tagO* и *murAA*. Подавление экспрессии генов *tagO* и *murAA* с помощью интерференции приводило к значительному снижению скорости роста штаммов, генетической нестабильности и потере характерного мукоидного фенотипа.

Создание условий для эффективного функционирования мембранных гиалуронсинтаз с помощью мембранной инженерии позволяет увеличить продуктивность штаммов-производителей ГК [48]. Гиалуронсинтазам 1-го типа требуется наличие в составе мембраны фосфолипида кардиолипина, с которым фермент образует функциональный комплекс *in vivo* и *in vitro* [49]. Кардиолипин составляет незначительную часть липидов клеточной мембраны *B. subtilis*. Биосинтез кардиолипина осуществляется с помощью кардиолипинсинтазы ClsA из фосфатидилглицерола, который в свою очередь синтезируется с помощью фосфатидилглицеролсинтазы PgsA [50]. Штамм *B. subtilis* AW001-4 с конститутивной экспрессией генов *pgsA* и *clsA* продемонстрировал по сравнению с контрольным штаммом AW008 увеличение выхода ГК на 32%, МВ до 2.06 МДа и конечной плотности культуры на 83%. Флуоресцентная микроскопия зафиксировала увеличение содержания кардиолипина в районах полюсов и септы клеток. Инактивация генов биосинтеза других липидов клеточной мембраны фосфатидилэтаноламина *pssA* и нейтральных гликолипидов *ugtP* не оказала эффекта на продуктивность и скорость роста контрольного штамма AW008.

Локализация кардиолипинсинтазы ClsA происходит в районе септы и зависит от гомолога тубулина FtsZ [51]. Подавление экспрессии FtsZ потенциально может привести к распределению ClsA и повысить концентрацию кардиолипина по всей мембране [52]. Подавление транскрипции *ftsZ* у штамма AW001-4 с сильной конститутивной экспрессией *pgsA* и *clsA* приводило к генетической нестабильности. Только штамм AW004-4 сохранял мукоидный фенотип после восстановления из глицеринового стока и синтезировал на 25% больше ГК, чем AW001-4 при незначительном снижении МВ. Подавление транскрипции *ftsZ* у контрольного штамма AW008 тем же вариантом гидовой РНК, что и у AW004-4, приводило к увеличению выхода ГК на 204%, увеличению конечной плотности культуры и снижению МВ до 1.67 МДа. На основе штамма AW007-4 с ослабленной конститутивной экспрессией *pgsA* и *clsA* удалось получить генетически стабильные штаммы с четырьмя вариантами гидовой РНК. Штаммы AW009-4 и AW011-4 продемонстрировали увеличение выхода, МВ и конечной плотности культуры на 10–15% по сравнению со штаммом AW007-4.

Инактивация генов факторов споруляции оказывает влияние на выход и МВ ГК. Штамм WmA с делецией гена сигма-фактора *sigF*, который участвует в активации генной сети ранней споруляции, демонстрирует больший на 30% выход ГК по сравнению со штаммом WA без делеции [41]. Производители на основе штамма WB600 демонстрировали больший выход ГК по сравнению с производителями на основе штамма *B. subtilis* 168.

Так, в оптимальных условиях созданный на основе WB600 штамм WmB с делецией *sigF* накапливал в культуральной среде 3.21 г/л продукта, в то время как штамм 1B на основе 168 только 1.7 г/л. Обнаружен интересный эффект влияния температуры культивирования на МВ ГК. Культивирование при повышенной температуре 47°C приводило к резкому увеличению МВ ГК до 6.973 МДа. Культивирование при 32°C, при котором наблюдалось наибольшее количество продукта, приводило к синтезу ГК с МВ до 0.392 МДа.

Инактивация способности к споруляции в штаммах, полученных путем ненаправленного мутагенеза, положительно влияет на продукцию ГК. Так, штамм 3NA, содержащий мутацию гена инициации споруляции *spo0A*, способен достигать плотности культуры в 75 г/л в условиях ферментации с подпиткой, что делает его отличным кандидатом для использования в промышленности [53]. Оптимизация процесса культивирования и питательной среды позволила штамму KСNNA10, содержащему рекомбинантный оперон с генами *szHasA*, *tuaD*, *gtaB* и *gcaD*, достичь за 12 ч плотности культуры в 29.4 г/л и синтезировать 7 г ГК с МВ 1 МДа на литр культуры. Технико-экономический анализ данного производственного процесса продемонстрировал большую экономическую эффективность, чем у процесса на основе штаммов стрептококков.

ФАКТОРЫ, ВЛИЯЮЩИЕ НА ХАРАКТЕРИСТИКИ ШТАММА- ПРОДУЦЕНТА И ПРОДУКТА, И ПУТИ ДАЛЬНЕЙШЕГО РАЗВИТИЯ ШТАММОВ- ПРОДУЦЕНТОВ

Данные, полученные в результате создания бактериальных штаммов-продуцентов ГК, позволяют сделать выводы о влиянии различных генетических факторов на выход и технические характеристики продукта.

Базовый штамм и его модификации

При создании рекомбинантных продуцентов были использованы различные штаммы *B. subtilis*, самым распространенным из которых является штамм 168 и его производные (табл. 3). Важными преимуществами штамма 168 являются способность расти на простых средах, изученная биохимия и генетика, простота генетических манипуляций и высокая эффективность трансформации. Штаммы WB600 и WB800N создавались на базе штамма 168 как платформы для эффективной гетерологической экспрессии белков [54]. Для увеличения стабильности секретируемых белков в штамме WB800N сделаны делеции генов восьми внеклеточных протеаз — *nprE*, *aprE*, *epr*, *bpr*, *mpr*, *nprB*, *vpr* и *wprA*, а в штамме WB600 делетированы

гены шести протеаз — *nprE*, *aprE*, *epr*, *bpr*, *mpr*, *nprB*. Такие модификации позволяют добиться повышения секреции и стабильности рекомбинантных белков, что актуально и для мембранных белков вроде HasA. Единственное описанное в литературе прямое сравнение эффективности штаммов показало преимущество дефицитного по внеклеточной протеазной активности штамма WB600 с делецией гена *sigF* над штаммом 168 при продукции ГК [41]. Штамм 3NA является мутантной версией штамма 168 со сдвигом рамки считывания гена *spo0A* и характеризуется отсутствием споруляции, низкой экспрессией протеаз и способностью достигать высокой клеточной плотности в условиях ферментации с подпиткой [53]. Штамм 168 и штаммы с мутациями сигма-факторов споруляции в условиях синтетической среды достигают плотности культуры 5–15 г/л, что существенно ниже такового у 3NA [55]. В сравнении со штаммом 168 геном штамма 3NA содержит 425 генетических вариаций, поэтому однозначно сделать вывод о мутации *spo0A* как причине приобретения улучшенных технологических свойств нельзя.

В то же время *B. subtilis* 168 является модельным лабораторным штаммом и в процессе создания прошел многочисленные стадии ненаправленного мутагенеза, что привело к накоплению в его геноме многочисленных мутаций [56]. Сообщается о генетической нестабильности штамма 168 с интегрированным в геном опероном P_{grac} -*seHas-tuaD* [48]. По неизвестной причине при восстановлении из криохранения этот штамм формировал сегрегированные популяции с большинством клеток дикого немуконидного фенотипа. Такую же генетическую нестабильность демонстрировал штамм-продуцент на основе BGSC 1A786 (*amyE::cat*, *lacA::spec*, *leuC8*, *metA4*, *hsd(RI)R+M-*). Только продуценты на основе BGSC 1A751 демонстрировали генетическую стабильность характерного мукоидного фенотипа. Штамм 1A751, являющийся потомком штамма DB104, содержит мутации в генах протеаз *nprE* и *aprE*, а также делеции генов эндо- β -1,3-1,4-глюканазы *bglS* и эндо- β -1,4-глюканазы *bglC* [57].

Штаммы, отличные от *B. subtilis* 168, могут обладать свойствами, которые позволяют ожидать возможный положительный эффект на продукцию ГК. Так, промышленный штамм A164 Δ 5, применяемый для рекомбинантной продукции белков, отличается улучшенными ростовыми характеристиками и высоким выходом секретируемых белков [32]. Штамм A164 Δ 5 является улучшенной модификацией штамма ATCC 6051a, который также превосходит *B. subtilis* 168 по продукции рекомбинантных белков [58]. Модификации, которые позволили улучшить технологические свойства штамма ATCC 6051a, включают делецию генов: биосинтеза сурфактина *surfC* (снижение пенообра-

Таблица 3. Штаммы *B. subtilis*, использованные при создании штаммов-продуцентов гиалуроновой кислоты

Штамм	Генотип	Номер штамма в коллекциях	Ссылки
168	<i>trpC2</i>	BGSC 1A1	[37, 38]
1012	<i>trpC2, leuA8, metB5, hsdRM1</i>	DSM 8773	[36]
WB600	<i>trpC2, ΔnprE, ΔaprE, ΔnprB::EmR, Δbpr, Δmpr, Δepr</i>	—	[41]
WB800N	<i>trpC2, ΔnprE, ΔaprE, nprB::bsr, Δbpr, mpr::ble, Δepr, Δvpr, wprA::hyg, cm::NeoR</i>	—	[36]
3NA	<i>trpC2, spo0A</i>	BGSC 1S1	[53]
A164Δ5	ATCC 6051a <i>ΔamyE, ΔspoIIAC, ΔaprE, ΔnprE, ΔsrfC</i>	—	[31, 32]
BGSC 1A751	<i>His, ΔnprE, ΔaprE, ΔbglS, ΔbglC</i>	BCRC 51921	[35, 45, 48]

Примечание. ATCC – American Type Culture Collection, BGSC – Bacillus Genetic Stock Center, BCRC – Bioresource Collection and Research Center, DSM – Deutsche Sammlung von Mikroorganismen.

зования), сигма-фактора F *SpoIIAC* (блокировка спорообразования), протеаз *nprE* и *aprE*, альфа-амилазы *amyE*. Недостатком штамма A164Δ5 является низкая эффективность трансформации, что привело к необходимости использования для генно-инженерных манипуляций промежуточного штамма *B. subtilis* 16844 [32].

Гиалуронсинтаза

Выбор гена гиалуронсинтазы оказывает влияние на продукцию и МВ ГК. При создании штаммов-продуцентов ген гиалуронсинтазы выбирали основываясь либо на данных немногочисленных исследований каталитических свойств ферментов [31, 45, 48], либо по характеристикам продуктивности природных продуцентов [38, 53]. Так, рекомбинантная синтаза seHAS из *S. equisimilis* демонстрирует двукратно большую скорость элонгации, чем рекомбинантная синтаза spHAS из *S. pyogenes* [23, 59].

Прямое сравнение эффективности гиалуронсинтаз из *Streptococcus* было проведено *in vitro* и *in vivo* на платформе *L. lactis* [22]. В одинаковых условиях гиалуронсинтазы различаются по МВ синтезируемой ГК. Максимальный МВ ГК, синтезируемой рекомбинантными штаммами *L. lactis in vivo*, коррелирует с результатами, полученными *in vitro*, и составляет для suHAS из *S. uberis* и spaHAS из *S. parauberis* ~2.2 МДа, для szHAS из *S. zooepidemicus* ~1.4 МДа, для spHAS ~0.4 МДа. Величина МВ ГК хорошо согласуется с филогенетической группировкой по аминокислотным последовательностям гиалуронсинтаз. Так, suHAS и spaHAS образуют одну филогенетическую группу, отличную от szHAS и spHAS. Однако авторам не удалось получить результатов с генами гиалуронсинтаз из *S. equi* subsp. *equi* и *S. iniae* на платформе *Lactococcus in vivo*, хотя штаммы *S. equi* subsp. *equi* известны как эффективные продуценты ГК.

Получены интересные результаты с гиалуронсинтазой 2-го типа из *P. multocida* [37]. В отличие

от синтаз из стрептококков гиалуронсинтаза PmHAS не является мембранным белком и содержит на С-конце якорный домен, который удерживает фермент с внутренней стороны плазматической мембраны. В оперон биосинтеза ГК *P. multocida* входят дополнительные гены, гомологичные белкам мембранных транспортеров – *hexA, hexB, hexC, hexD* [60]. Функции синтеза ГК и трансмембранного переноса ГК у *P. multocida* разделены между синтазой PmHAS и белками *hexA, hexB, hexC* и *hexD* [61, 62]. Гиалуронсинтазы 1-го типа, к которым относятся синтазы стрептококков, совмещают функции синтеза и транслокации цепи ГК во внеклеточное пространство [63]. Было сделано предположение, что в транслокации ГК во внеклеточное пространство *S. pyogenes* задействован АВС-транспортный комплекс [64]. Однако данная гипотеза опровергается как данными *in vitro* исследований [65, 66], так и опытом успешной гетерологичной продукции ГК на различных микробных платформах с помощью гиалуронсинтаз 1-го типа [18]. Гиалуронсинтаза PmHAS была использована при создании продуцентов ГК на платформах *E. coli* [67], *Agrobacterium* sp. [68] и *Synechococcus* sp. [69]. Экспрессия PmHAS в штаммах *E. coli* и *Agrobacterium* sp. приводила к повышению вязкости культуральной жидкости, что свидетельствовало о внеклеточном накоплении ГК. Распределение синтезированной ГК между внеклеточной, сорбированной на поверхности и внутриклеточной фракциями было выяснено при изучении штаммов-продуцентов, созданных на основе цианобактерии *Synechococcus*. Обнаружено, что от 42 до 88% тотальной ГК накапливалось во внутриклеточном пространстве данных штаммов. Внутриклеточное накопление ГК являлось одной из причин снижения скорости роста продуцентов. Вопрос о механизме экспорта ГК во внеклеточное пространство у рекомбинантных штаммов, экспрессирующих PmHAS, остается открытым. Гиалуронсинтаза PmHAS обладает значительным биотехнологическим по-

тенциалом и способна синтезировать высокомолекулярную ГК. Делеция якорного домена позволяет получить PmHAS в растворимом виде, что делает ее очевидным кандидатом для бесклеточного способа синтеза ГК, который позволяет получать моодисперсный высокомолекулярный продукт [21]. Также фермент PmHAS превосходит стрептококковые гиалуронсинтазы по кинетическим характеристикам: величины K_m ниже стрептококковых в 2 раза и составляют 75 и 20 мкМ для УДФ-N-ацетилглюкозамина и УДФ-глюкуроновой кислоты соответственно [70]. Необходима дальнейшая работа для прояснения роли транспортных систем в транслокации ГК во внеклеточное пространство как у штаммов *P. multocida*, так и у рекомбинантных штаммов на основе PmHAS на различных платформах.

Возможность получения PmHAS в растворимой форме облегчает задачу улучшения характеристик фермента эволюционными методами и методами рационального конструирования. Так, комбинирование найденных с помощью эволюционного метода KnowVolution четырех аминокислотных замен позволило получить вариант PmHAS, способный синтезировать ГК с массой до 4.7 МДа [71]. Рациональное конструирование улучшенных вариантов гиалуронсинтаз 1-го типа осложняется отсутствием модели трехмерной структуры белка, хотя методами численного моделирования частично восполняется данный пробел [72]. К настоящему моменту известна только одна работа по улучшению характеристик гиалуронсинтазы szHAS с помощью эволюционного метода [73]. С помощью отбора *in vivo* на штаммах *B. subtilis* удалось выявить вариант szHAS, который демонстрировал увеличение выхода ГК с 1.22 до 2.24 г/л при увеличении МВ с 1.20 до 1.36 МДа.

Путь биосинтеза предшественников

Геном *B. subtilis* содержит все гены биосинтеза УДФ-глюкуроната и УДФ-N-ацетилглюкозамина, однако гетерологичная экспрессия только гиалуронсинтазы не приводит к синтезу ГК. Эффективный биосинтез ГК рекомбинантными продуцентами может осуществляться только с минимального оперона, в который входит, помимо гиалуронсинтазы, ген УДФ-глюкозодегидрогеназы, катализирующий последний этап биосинтеза УДФ-глюкуроната. Дополнение минимального оперона генами биосинтеза УДФ-N-ацетилглюкозамина приводит к значительно меньшему эффекту повышения выхода ГК по сравнению с добавлением гена УДФ-глюкозодегидрогеназы [31]. Необходимость гетерологичной экспрессии УДФ-глюкозодегидрогеназы связана с отсутствием экспрессии гена *tuaD* (гомолога гена *ugd* из *E. coli* и *hasB* из *Streptococcus*), который входит в состав оперона биосинтеза теихуруновой кислоты *tuaABCDEFGH*. Теихуруновая

кислота является анионным полимером, синтез которого активируется в условиях фосфатного голодания для замены в составе клеточной стенки богатой фосфором теихоевой кислоты [74]. Также о принципиальной важности УДФ-глюкозодегидрогеназы свидетельствует факт обязательного наличия гена *hasB* в оперонах биосинтеза ГК у представителей рода *Streptococcus*, где минимальный оперон состоит из генов *hasA* и *hasB* (как у *S. uberis*). Выдвинута гипотеза о возникновении у предкового штамма оперона биосинтеза ГК как пары *hasA/hasB*, в который остальные гены биосинтеза предшественников (*hasC*, *hasD*, *hasE*) добавлялись в процессе эволюции [75]. Делеция гена *hasB* у *S. zooepidemicus* приводит к полной инактивации биосинтеза ГК и оказывает незначительный эффект на ростовые свойства штамма [30]. В ряде работ продемонстрировано накопление ГК штаммами-продуцентами *B. subtilis* с рекомбинантными оперонами, которые не содержат гена *tuaD* или его гомолога [37, 38]. С учетом роли УДФ-глюкозодегидрогеназы и принимая во внимание характер ее экспрессии, представляется необходимым провести дальнейшие исследования по данному вопросу.

Расширение рекомбинантного оперона генами биосинтеза предшественников приводит к увеличению выхода ГК у рекомбинантных штаммов на основе платформ *B. subtilis*, *C. glutamicum* и *L. lactis* [18]. Комбинация различных генов приводит к увеличению выхода ГК с разной эффективностью. Включение в состав искусственного оперона, содержащего *szHas* и *tuaD*, генов *gluB*, *glmM* и *gcaD* приводит к увеличению выхода ГК на 30% [38].

Расширенный оперон биосинтеза ГК оказывает значительное влияние на продукцию ГК у природных продуцентов. Так, штаммы *S. equi* и *S. zooepidemicus*, содержащие в геноме оперон *hasABCDE*, продуцируют существенно больше ГК, чем *S. uberis* и *S. pyogenes*, содержащие *hasABC* и *hasAB* соответственно [75]. Вероятно, включение дополнительных генов в оперон подвидов *S. equi* происходило под давлением селективного отбора на продукцию ГК, что привело к способности направлять до 10% поступающих сахаров в биосинтез ГК [76].

Важным аспектом, влияющим на производительность штамма и МВ продукта, является уровень экспрессии гиалуронсинтазы и генов биосинтеза предшественников. Высокий уровень экспрессии *tuaD*, который является токсичным для *E. coli* и осложняет создание генно-инженерных конструкций [38], может оказать негативное влияние и на физиологию *B. subtilis* [36]. Так, снижение эффективности промотора *P_{gras}* оперона *seHas-tuaD* привело к увеличению выхода ГК на

100%, снижению МВ на 17% и увеличению конечной плотности культуры на 47% [45].

Уровень экспрессии гиалуронсинтазы и генов биосинтеза предшественников, который зависит от состава рекомбинантного оперона и силы промоторов, определяет баланс УДФ-глюкуроната и УДФ-N-ацетилглюкозамина в клетке и в конечном итоге МВ продукта. Повышенная по отношению к *hasB* экспрессия *hasA* приводит к снижению МВ ГК, синтезируемой рекомбинантным штаммом *L. lactis* [77]. Гиперэкспрессия генов пути биосинтеза УДФ-глюкуроната у штамма *S. equi* снижает МВ ГК, в то время как гиперэкспрессия генов пути биосинтеза УДФ-N-ацетилглюкозамина приводит к повышению МВ с 1.8 до 3.4 МДа. Выявлена корреляция между МВ ГК и концентрацией УДФ-N-ацетилглюкозамина. Биосинтез высокомолекулярной ГК является результатом баланса концентраций предшественников, который может быть доведен до оптимального значения генетическими методами [78]. Для рекомбинантных продуцентов на платформе *L. lactis* оптимальными условиями для синтеза высокомолекулярной ГК являлись: эквимоллярная внутриклеточная концентрация УДФ-N-ацетилглюкозамина и УДФ-глюкуроната и повышенная по отношению к *hasA* экспрессия *hasB* [79]. Схожим эффектом повышения МВ ГК обладает добавление в культуральную среду N-ацетилглюкозамина, причем как в случае природных продуцентов, так и в случае рекомбинантных продуцентов на основе *B. subtilis* [45].

Энергетический и основной метаболизм

Биосинтез ГК является энергетически затратным процессом. Для получения 1 моля УДФ-N-ацетилглюкозамина и 1 моля УДФ-глюкуроната клетка затрачивает 2 моля глюкозы, 3 моля АТФ, 2 моля УТФ и 1 моль ацетил-КоА. Перспективными подходами к увеличению выхода ГК являются инактивация путей конкурентной утилизации предшественников и повышение уровня синтеза АТФ.

Гомоферментативное брожение, в основе которого лежит гликолиз, — основной способ получения энергии для молочнокислых бактерий, таких как *S. zooepidemicus* и *L. lactis*. Результатом этого процесса является образование двух молекул пирувата, двух молекул $\text{НАД} \cdot \text{H}_2$ и двух молекул АТФ на одну молекулу глюкозы. Регенерация НАД^+ осуществляется путем переноса двух электронов с $\text{НАД} \cdot \text{H}_2$ на молекулу пирувата, что приводит к образованию лактата. Однако в аэробных условиях молочнокислые бактерии, в клетках которых отсутствует электронно-транспортная цепь, регенерируют НАД^+ с помощью фермента $\text{НАД} \cdot \text{H}_2$ оксидазы (NOX), что приводит к перенаправле-

нию метаболического потока в сторону образования ацетата и образованию дополнительной молекулы АТФ на молекулу глюкозы в реакции, катализируемой ацетаткиназой (АК) [80]. Синтез дополнительного АТФ в ацетаткиназной реакции и повышение скорости регенерации НАД^+ благодаря NOX коррелируют с повышением уровня синтеза ГК продуцентами на основе молочнокислых бактерий. В аэробных условиях *S. zooepidemicus* не только быстрее росли и накапливали биомассу, но и демонстрировали более высокие МВ и уровень биосинтеза ГК по сравнению с анаэробными условиями [81, 82]. Однако прямая гиперэкспрессия NOX в штамме *S. zooepidemicus*, несмотря на увеличение уровня синтеза АТФ на 33% и продукции биомассы на 15%, не приводила к увеличению выхода ГК или изменению МВ. Вероятно, в этом случае основным лимитирующим фактором являлась активность пируватдегидрогеназного комплекса, осуществляющего конверсию пирувата в ацетил-КоА [83]. В то же время рекомбинантные продуценты ГК на основе штамма *L. lactis* с делецией гена *ldh* демонстрировали трехкратное увеличение продукции ГК и МВ ГК [84].

В отличие от стрептококков, которые в присутствии кислорода регенерируют НАД^+ с помощью NOX и синтезируют дополнительный АТФ с помощью фермента АК, *B. subtilis* используют для этого электронно-транспортную цепь и цикл трикарбоновых кислот [85]. При аэробном культивировании рекомбинантных продуцентов ГК на основе *B. subtilis* побочными продуктами ферментации были ацетат и ацетонин [45]. Однако снижение уровня синтеза ацетата путем инактивации пируват-дегидрогеназного комплекса создает дефицит ацетил-КоА для цикла трикарбоновых кислот, что приводит к снижению выработки АТФ [86]. Инактивация гена *alsD* 2-ацетолактат-декарбоксилазы, участвующей в синтезе ацетона, негативно отражается на росте штаммов *B. subtilis*, хотя выяснение механизма данного явления требует дальнейших исследований [86].

Увеличение доступности кислорода для клеток является эффективной стратегией активизации биосинтеза ГК, несмотря на то что механизм эффекта различается для молочнокислых бактерий и бацилл. Концентрация кислорода в культуральной среде — лимитирующий фактор при биосинтезе ГК штаммами *S. zooepidemicus* и *B. subtilis* в силу низкой растворимости газообразного кислорода и высокой вязкости растворов ГК [87, 88]. Технологическим решением этой проблемы является повышение кислородной емкости среды путем оптимизации скорости перемешивания и применения кислородных векторов — гидрофобных жидкостей, в которых кислород имеет более высокую растворимость, чем в воде. Такой подход увеличивает выход ГК штаммами *S. zooepi-*

demicus [89]. Существенное увеличение выхода ГК и повышение плотности культуры рекомбинантного штамма *B. subtilis* наблюдалось при применении н-гептана, н-гексадиена, перфлуорометилдекалина и перфлуоро-1,3-диметилциклогексана. Оптимизация условий ферментации — концентрации кислородного вектора, времени его добавления и скорости перемешивания позволяло достичь концентрации ГК в 4.5 г/л всего за 10 ч культивирования [88].

При конструировании штаммов-продуцентов активно используется бактериальный гемоглобин VHb из грамотрицательной бактерии *Vitreoscilla* [34]. Гемоглобин VHb усиливает поток кислорода к терминальным оксидазам в условиях гипоксии, поэтому гиперэкспрессия VHb приводит к увеличению плотности культур, усилению окислительного метаболизма и выхода целевого продукта, особенно в условиях ограниченной доступности кислорода. Экспрессия VHb в *B. subtilis* приводила к увеличению секреции белков и повышению выхода альфа-амилазы и нейтральной протеазы [90]. Гетерологичная экспрессия VHb штаммом *S. zooepidemicus* ATCC 39920, продуцирующим ГК, приводила к повышению выхода ГК с 1.61 до 2.16 г/л при снижении МВ с 1.8 до 1.6 МДа [91]. При этом наблюдалось снижение продукции молочной кислоты на 35% на фоне снижения активности лактатдегидрогеназы *ldh* на 41% и повышение активности ацетаткиназы и NOX на 9 и 106% соответственно. Более впечатляющие результаты были получены на продуценте на основе *B. subtilis*, однако влияние коэкспрессии VHb на МВ ГК в данной работе исследовано не было [35].

УДФ-глюкуронат и УДФ-N-ацетилглюкозамин используются клеткой в биосинтезе компонентов клеточной стенки, а их предшественники глюкозо-6-фосфат и фруктозо-6-фосфат расходуются в пентозофосфатном пути и гликолизе. Инактивация путей конкурентной утилизации УДФ-глюкуроната и УДФ-N-ацетилглюкозоамина оказывала большее влияние на ростовые характеристики штаммов *B. subtilis* и выход ГК, чем гиперэкспрессия генов пути биосинтеза прекурсоров [38, 45]. Кроме того, штаммы со сниженной активностью *pfkA* и *zwf* демонстрировали пониженный уровень продукции ацетата и ацетона, что свидетельствует об эффективном перераспределении метаболического потока с побочных продуктов биосинтеза на ГК [45].

Утилизация сахаров

Способом улучшения штаммов-продуцентов является увеличение транспорта и метаболизма источников энергии. Исследована функция генов метаболизма сахарозы и проведена идентификация лимитирующих выход ГК стадий у штамма *S. zooepidemicus* [92]. Первыми стадиями утилизации саха-

розы являются мембранный транспорт с фосфорилированием посредством фосфоенолпируват-зависимой фосфотрансферазной системы (кодируется геном *scrA*) с последующим гидролизом сахарозо-6-фосфата сахарозо-6-фосфатгидролазой (кодируется геном *scrB*) до фруктозы и глюкозо-6-фосфата. Гиперэкспрессия *scrB*, в отличие от обратного эффекта гиперэкспрессии *scrA*, увеличивает биомассу на 26% и выход ГК на 30%. Смещение метаболического потока к фруктозо-6-фосфату через делецию гена транспорта фруктозы *fruA* или фосфофруктокиназы *fruK* приводит к повышению выхода ГК на 22 и 27% соответственно без эффекта на клеточный рост. Гиперэкспрессия *scrB* в штаммах с делецией либо *fruA*, либо *fruK* приводит к увеличению выхода ГК на 44 и 55% соответственно.

Основная система транспорта и утилизации сахарозы у *B. subtilis* идентична таковой у *S. zooepidemicus* и состоит из оперона, кодирующего фосфотрансферазу *SacP* и сахарозо-6-фосфатгидролазу *SacA* [93]. Замена собственной системы транспорта и метаболизма сахарозы у *B. subtilis* на энергетически более выгодную гетерологичную систему продемонстрирована на продуцентах полиглутаминовой кислоты и 2,3-бутандиола. Комбинация сахарозопермеазы *cscB* из *E. coli* и сахарозофосфорилазы *sucP* из *Bifidobacterium adolescentis* продемонстрировала увеличение потребления сахарозы на 49.4% и продукции полиглутаминовой кислоты на 38.5% по сравнению с неизмененным штаммом [94]. Комбинация сахарозопермеазы *cscB* из *E. coli* и сахарозофосфорилазы *gtfA* из *Streptococcus mutans* продемонстрировала увеличение выхода продукта на 36% по сравнению с неизмененными штаммами [95].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В настоящее время создана целая линейка штаммов-продуцентов ГК на основе платформы *B. subtilis*. Важными преимуществами данных штаммов являются статус GRAS (Generally Recognized as Safe), низкая стоимость промышленной ферментации, легкость генетических манипуляций и отсутствие эндо- и экзотоксинов. Созданные на основе *B. subtilis* рекомбинантные штаммы-продуценты ГК позволяют получать выход и МВ продукта, сопоставимого с таковым у промышленно освоенных штаммов стрептококков. В то же время проведенные работы выявили ограничения платформы, которые могут быть преодолены с привлечением опыта создания продуцентов ГК на основе других микробных платформ. Анализ опубликованных в литературе данных позволяет утверждать, что сформированы условия для создания промышленной технологии получения ГК на основе штаммов-продуцентов *B. subtilis*.

Авторы благодарят за помощь в подготовке рукописи и ценные замечания к.б.н. О.В. Березину.

Работа частично поддержана Министерством науки и высшего образования Российской Федерации (Контракт в системе электронный бюджет № 075-10-2021-113, ID проекта: RF—193021X0001).

Настоящая статья не содержит каких-либо исследований с использованием в качестве объекта животных.

Настоящая статья не содержит каких-либо исследований с участием в качестве объекта людей.

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Weissmann B., Meyer K. The structure of hyalobiuronic acid and of hyaluronic acid from umbilical cord // J. Am. Chem. Society. 1954. V. 76. № 7. P. 1753–1757. <https://doi.org/10.1021/ja01636a010>
2. Fallacara A., Baldini E., Manfredini S. et al. Hyaluronic acid in the third millennium // Polymers. 2018. V. 10. № 7. <https://doi.org/10.3390/polym10070701>
3. Scott J.E., Heatley F. Hyaluronan forms specific stable tertiary structures in aqueous solution: a ¹³C NMR study // PNAS. 1999. V. 96. № 9. P. 4850–4855. <https://doi.org/10.1073/pnas.96.9.4850>
4. Rwei S.P., Chen S.W., Mao C.F. et al. Viscoelasticity and wearability of hyaluronate solutions // Biochem. Engineering J. 2008. V. 40. № 2. P. 211–217. <https://doi.org/10.1016/j.bej.2007.12.021>
5. Pisárčik M., Bakoš D., Čepčan M. Non-Newtonian properties of hyaluronic acid aqueous solution // Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects. 1995. V. 97. № 3. P. 197–202. [https://doi.org/10.1016/0927-7757\(95\)03097-W](https://doi.org/10.1016/0927-7757(95)03097-W)
6. Laurent T.C., Fraser J.R.E. Hyaluronan // The FASEB J. 1992. V. 6. № 7. P. 2397–2404. <https://doi.org/10.1096/fasebj.6.7.1563592>
7. Cyphert J.M., Trempus C.S., Garantziotis S. Size matters: Molecular weight specificity of hyaluronan effects in cell biology // Int. J. Cell Biology. 2015. V. 2015. P. 563818. <https://doi.org/10.1155/2015/563818>
8. Robert L., Robert A.M., Renard G. Biological effects of hyaluronan in connective tissues, eye, skin, venous wall. Role in aging // Pathologie-Biologie. 2010. V. 58. № 3. P. 187–198. <https://doi.org/10.1016/j.patbio.2009.09.010>
9. Girish K.S., Kemparaju K. The magic glue hyaluronan and its eraser hyaluronidase: a biological overview // Life Sci. 2007. V. 80. № 21. P. 1921–1943. <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2007.02.037>
10. Jiang D., Liang J., Noble P.W. Hyaluronan in tissue injury and repair // Annual Rev. Cell and Developmental Biol. 2007. V. 23. P. 435–461. <https://doi.org/10.1146/annurev.cellbio.23.090506.123337>
11. Heldin P., Lin C.Y., Kolliopoulos C. et al. Regulation of hyaluronan biosynthesis and clinical impact of excessive hyaluronan production // Matrix Biol. 2019. V. 78–79. P. 100–117. <https://doi.org/10.1016/j.matbio.2018.01.017>
12. Campo G.M., Avenoso A., D'Ascola A. et al. 4-mer hyaluronan oligosaccharides stimulate inflammation response in synovial fibroblasts in part via TAK-1 and in part via p38-MAPK // Current Med. Chemistry. 2013. V. 20. № 9. P. 1162–1172. <https://doi.org/10.2174/0929867311320090005>
13. Toole B.P., Ghatak S., Misra S. Hyaluronan oligosaccharides as a potential anticancer therapeutic // Current Pharmaceutical Biotechnol. 2008. V. 9. № 4. P. 249–252. <https://doi.org/10.2174/138920108785161569>
14. Dovedyts M., Liu Z.J., Bartlett S. Hyaluronic acid and its biomedical applications: A review // Engineered Regeneration. 2020. V. 1. P. 102–113. <https://doi.org/10.1016/j.engreg.2020.10.001>
15. Boeriu C.G., Springer J., Kooy F.K. et al. Production methods for hyaluronan // Int. J. Carbohydrate Chemistry. 2013. V. 2013. P. 1–14. <https://doi.org/10.1155/2013/624967>
16. Shiedlin A., Bigelow R., Christopher W. et al. Evaluation of hyaluronan from different sources: *Streptococcus zooepidemicus*, rooster comb, bovine vitreous, and human umbilical cord // Biomacromolecules. 2004. V. 5. № 6. P. 2122–2127. <https://doi.org/10.1021/bm0498427>
17. Zagorulko Y.Y., Zagorulko E.Y. Features of hyaluronic acid solutions for intra-articular introduction and recent trends in their development (review) // Drug Development & Registration. 2020. V. 9. № 2. P. 45–54. <https://doi.org/10.33380/2305-2066-2020-9-2-45-54>
18. Oliveira J.D. de, Carvalho L.S., Gomes A.M.V. et al. Genetic basis for hyper production of hyaluronic acid in natural and engineered microorganisms // Microbial Cell Factories. 2016. V. 15. № 1. P. 119. <https://doi.org/10.1186/s12934-016-0517-4>
19. Liu L., Liu Y., Li J. et al. Microbial production of hyaluronic acid: current state, challenges, and perspectives // Microbial Cell Factories. 2011. V. 10. P. 99. <https://doi.org/10.1186/1475-2859-10-99>
20. Gunasekaran V., Gowdhaman D., Ponnusami P. Role of membrane proteins in bacterial synthesis of hyaluronic acid and their potential in industrial production // Int. J. Biol. Macromolecules. 2020. V. 164. P. 1916–1926. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2020.08.077>
21. Gottschalk J., Elling L. Current state on the enzymatic synthesis of glycosaminoglycans // Current Opinion in Chem. Biology. 2021. V. 61. P. 71–80. <https://doi.org/10.1016/j.cbpa.2020.09.008>
22. Schulte S., Doss S.S., Jeeva P. et al. Exploiting the diversity of streptococcal hyaluronan synthases for the production of molecular weight-tailored hyaluronan // Applied Microbiol. Biotechnol. 2019. V. 103. № 18. P. 7567–7581. <https://doi.org/10.1007/s00253-019-10023-w>
23. Kumari K., Weigel P.H. Molecular cloning, expression, and characterization of the authentic hyaluronan synthase from group C *Streptococcus equisimilis* // The J. Biol. Chemistry. 1997. V. 272. № 51. P. 32539–32546. <https://doi.org/10.1074/jbc.272.51.32539>

24. Oh S.Y., Budzik J.M., Garufi G. et al. Two capsular polysaccharides enable *Bacillus cereus* G9241 to cause anthrax-like disease // *Mol. Microbiol.* 2011. V. 80. № 2. P. 455–470.
<https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2011.07582.x>
25. DeAngelis P.L., Jing W., Drake R.R. et al. Identification and molecular cloning of a unique hyaluronan synthase from *Pasteurella multocida* // *The J. Biol. Chemistry.* 1998. V. 273. № 14. P. 8454–8458.
<https://doi.org/10.1074/jbc.273.14.8454>
26. Schmidt K.H., Günther E., Courtney H.S. Expression of both M protein and hyaluronic acid capsule by group A streptococcal strains results in a high virulence for chicken embryos // *Med. Microbiol. Immunol.* 1996. V. 184. № 4. P. 169–173.
<https://doi.org/10.1007/BF02456131>
27. DeAngelis P.L. Hyaluronan synthases: Fascinating glycosyltransferases from vertebrates, bacterial pathogens, and algal viruses // *Cell. Mol. Life Sciences: CMLS.* 1999. V. 56. P. 670–682.
<https://doi.org/10.1007/s000180050461>
28. Weigel P.H., DeAngelis P.L. Hyaluronan synthases: A decade-plus of novel glycosyltransferases // *The J. Biol. Chemistry.* 2007. V. 282. № 51. P. 36777–36781.
<https://doi.org/10.1074/jbc.R700036200>
29. Chong B.F., Blank L.M., McLaughlin R. et al. Microbial hyaluronic acid production // *Applied Microbiol. Biotechnol.* 2005. V. 66. № 4. P. 341–351.
<https://doi.org/10.1007/s00253-004-1774-4>
30. Zhang Y., Luo K., Zhao Q. et al. Genetic and biochemical characterization of genes involved in hyaluronic acid synthesis in *Streptococcus zooepidemicus* // *Applied Microbiol. Biotechnol.* 2016. V. 100. № 8. P. 3611–3620.
<https://doi.org/10.1007/s00253-016-7286-1>
31. Widner B., Behr R., Dollen S. von et al. Hyaluronic acid production in *Bacillus subtilis* // *Applied Environmental Microbiol.* 2005. V. 71. № 7. P. 3747–3752.
<https://doi.org/10.1128/AEM.71.7.3747-3752.2005>
32. Sloma A., Behr R., Widner W. et al. Methods for producing hyaluronan in a recombinant host cell. United States Patent 8093036. 2012.
33. DeAngelis P.L., Papaconstantinou J., Weigel P.H. Molecular cloning, identification, and sequence of the hyaluronan synthase gene from group A *Streptococcus pyogenes* // *The J. Biol. Chemistry.* 1993. V. 268. № 26. P. 19181–19184.
[https://doi.org/10.1016/S0021-9258\(19\)36494-4](https://doi.org/10.1016/S0021-9258(19)36494-4)
34. Stark B.C., Pagilla K.R., Dikshit K.L. Recent applications of *Vitreoscilla* hemoglobin technology in bioproduct synthesis and bioremediation // *Applied Microbiol. Biotechnol.* 2015. V. 99. № 4. P. 1627–1636.
<https://doi.org/10.1007/s00253-014-6350-y>
35. Chien L.J., Lee C.-K. Enhanced hyaluronic acid production in *Bacillus subtilis* by coexpressing bacterial hemoglobin // *Biotechnol. Progress.* 2007. V. 23. № 5. P. 1017–1022.
<https://doi.org/10.1021/bp070036w>
36. Corsa V., Negro A., Vaccaro S., Messina L. Method for obtaining recombinant host bacterial cells that produce hyaluronic acid. United States Patent 9290785. 2012.
37. Jia Y., Zhu J., Chen X. et al. Metabolic engineering of *Bacillus subtilis* for the efficient biosynthesis of uniform hyaluronic acid with controlled molecular weights // *Bioresource Technology.* 2013. V. 132. P. 427–431.
<https://doi.org/10.1016/j.biortech.2012.12.150>
38. Jin P., Kang Z., Yuan P. et al. Production of specific-molecular-weight hyaluronan by metabolically engineered *Bacillus subtilis* 168 // *Metabolic Engineering.* 2016. V. 35. P. 21–30.
<https://doi.org/10.1016/j.ymben.2016.01.008>
39. Jin P., Kang Z., Zhang N. et al. High-yield novel leech hyaluronidase to expedite the preparation of specific hyaluronan oligomers // *Sci. Reports.* 2014. V. 4. P. 4471.
<https://doi.org/10.1038/srep04471>
40. Yuan P., Lv M., Jin P. et al. Enzymatic production of specifically distributed hyaluronan oligosaccharides // *Carbohydrate Polymers.* 2015. V. 129. P. 194–200.
<https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2015.04.068>
41. Li Y., Li G., Zhao X. et al. Regulation of hyaluronic acid molecular weight and titer by temperature in engineered *Bacillus subtilis* // *3 Biotech.* 2019. V. 9. № 6. P. 225.
<https://doi.org/10.1007/s13205-019-1749-x>
42. Li Y., Shi Z., Shao Y. et al. Temperature-controlled molecular weight of hyaluronic acid produced by engineered *Bacillus subtilis* // *Biotechnol. Letters.* 2021. V. 43. № 1. P. 271–277.
<https://doi.org/10.1007/s10529-020-03001-0>
43. Миронов А.С., Эрраус Л.Л., Королькова Н.В. и др. Бактерия рода *Bacillus*, продуцирующая гиалуроновую кислоту, и способ получения гиалуроновой кислоты с использованием указанной бактерии. Патент РФ 2719140. 2020.
44. Миронов А.С., Эрраус Л.Л., Баева О.В. и др. Тандемный промотор, функционирующий в бактерии рода *Bacillus*, трансформированная бактерия рода *Bacillus* – продуцент целевого продукта, содержащая указанный промотор, и способ получения целевого продукта с использованием указанной бактерии. Патент РФ 2723722. 2020.
45. Westbrook A.W., Ren X., Oh J. et al. Metabolic engineering to enhance heterologous production of hyaluronic acid in *Bacillus subtilis* // *Metabolic Engineering.* 2018. V. 47. P. 401–413.
<https://doi.org/10.1016/j.ymben.2018.04.016>
46. Fischer E., Sauer U. Large-scale in vivo flux analysis shows rigidity and suboptimal performance of *Bacillus subtilis* metabolism // *Nat. Genetics.* 2005. V. 37. № 6. P. 636–640.
<https://doi.org/10.1038/ng1555>
47. Westbrook A.W., Moo-Young M., Chou C.P. Development of a CRISPR-Cas9 tool kit for comprehensive engineering of *Bacillus subtilis* // *Applied Environmental Microbiol.* 2016. V. 82. № 16. P. 4876–4895.
<https://doi.org/10.1128/AEM.01159-16>
48. Westbrook A.W., Ren X., Moo-Young M. et al. Engineering of cell membrane to enhance heterologous production of hyaluronic acid in *Bacillus subtilis* // *Biotechnol. Bioengineering.* 2018. V. 115. № 1. P. 216–231.
<https://doi.org/10.1002/bit.26459>

49. Triscott M.X., van de Rijn I. Solubilization of hyaluronic acid synthetic activity from streptococci and its activation with phospholipids // The J. Biol. Chemistry. 1986. V. 261. № 13. P. 6004–6009. [https://doi.org/10.1016/S0021-9258\(17\)38485-5](https://doi.org/10.1016/S0021-9258(17)38485-5)
50. Salzberg L.I., Helmann J.D. Phenotypic and transcriptomic characterization of *Bacillus subtilis* mutants with grossly altered membrane composition // J. Bacteriology. 2008. V. 190. № 23. P. 7797–7807. <https://doi.org/10.1128/JB.00720-08>
51. Kawai F., Shoda M., Harashima R. et al. Cardiolipin domains in *Bacillus subtilis* marburg membranes // J. Bacteriology. 2004. V. 186. № 5. P. 1475–1483. <https://doi.org/10.1128/jb.186.5.1475-1483.2004>
52. Nishibori A., Kusaka J., Hara H. et al. Phosphatidylethanolamine domains and localization of phospholipid synthases in *Bacillus subtilis* membranes // J. Bacteriology. 2005. V. 187. № 6. P. 2163–2174. <https://doi.org/10.1128/JB.187.6.2163-2174.2005>
53. Cerminati S., Leroux M., Anselmi P. et al. Low cost and sustainable hyaluronic acid production in a manufacturing platform based on *Bacillus subtilis* 3NA strain // Applied Microbiol. Biotechnol. 2021. V. 105. № 8. P. 3075–3086. <https://doi.org/10.1007/s00253-021-11246-6>
54. Wu S.C., Yeung J.C., Duan Y. et al. Functional production and characterization of a fibrin-specific single-chain antibody fragment from *Bacillus subtilis*: Effects of molecular chaperones and a wall-bound protease on antibody fragment production // Applied Environmental Microbiol. 2002. V. 68. № 7. P. 3261–3269. <https://doi.org/10.1128/aem.68.7.3261-3269.2002>
55. Reuß D.R., Schuldes J., Daniel R. et al. Complete genome sequence of *Bacillus subtilis* subsp. *subtilis* strain 3NA // Genome Announcements. 2015. V. 3. № 2. <https://doi.org/10.1128/genomeA.00084-15>
56. Zeigler D.R., Prágai Z., Rodriguez S. et al. The origins of 168, W23, and other *Bacillus subtilis* legacy strains // J. Bacteriology. 2008. V. 190. № 21. P. 6983–6995. <https://doi.org/10.1128/JB.00722-08>
57. Wolf M., Geczi A., Simon O. et al. Genes encoding xylan and beta-glucan hydrolysing enzymes in *Bacillus subtilis*: Characterization, mapping and construction of strains deficient in lichenase, cellulase and xylanase // Microbiology (Reading, England). 1995. V. 141 (Pt 2). P. 281–290. <https://doi.org/10.1099/13500872-141-2-281>
58. Kabisch J., Thürmer A., Hübel T. et al. Characterization and optimization of *Bacillus subtilis* ATCC 6051 as an expression host // J. Biotechnology. 2013. V. 163. № 2. P. 97–104. <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2012.06.034>
59. Tlapak-Simmons V.L., Baggenstoss B.A., Kumari K. et al. Kinetic characterization of the recombinant hyaluronan synthases from *Streptococcus pyogenes* and *Streptococcus equisimilis* // The J. Biol. Chemistry. 1999. V. 274. № 7. P. 4246–4253. <https://doi.org/10.1074/jbc.274.7.4246>
60. Chung J.Y., Zhang Y., Adler B. The capsule biosynthetic locus of *Pasteurella multocida* A:1 // FEMS Microbiol. Letters. 1998. V. 166. № 2. P. 289–296. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.1998.tb13903.x>
61. Chung J.Y., Wilkie I., Boyce J.D. et al. Role of capsule in the pathogenesis of fowl cholera caused by *Pasteurella multocida* serogroup A // Infection Immunity. 2001. V. 69. № 4. P. 2487–2492. <https://doi.org/10.1128/IAI.69.4.2487-2492.2001>
62. Zhang Y.F. Construction and characterization of an acapsular mutant of *Pasteurella multocida* strain P-1059 (A:3) // J. Vaccines & Vaccination. 2013. V. 04. № 04. <https://doi.org/10.4172/2157-7560.1000184>
63. Hubbard C., McNamara J.T., Azumaya C. et al. The hyaluronan synthase catalyzes the synthesis and membrane translocation of hyaluronan // J. Mol. Biology. 2012. V. 418. № 1–2. P. 21–31. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2012.01.053>
64. Ouskova G., Spellerberg B., Prehm P. Hyaluronan release from *Streptococcus pyogenes*: export by an ABC transporter // Glycobiology. 2004. V. 14. № 10. P. 931–938. <https://doi.org/10.1093/glycob/cwh115>
65. Kumari K., Baggenstoss B.A., Parker A.L. et al. Mutation of two intramembrane polar residues conserved within the hyaluronan synthase family alters hyaluronan product size // The J. Biol. Chemistry. 2006. V. 281. № 17. P. 11755–11760. <https://doi.org/10.1074/jbc.M600727200>
66. Medina A.P., Lin J., Weigel P.H. Hyaluronan synthase mediates dye translocation across liposomal membranes // BMC Biochemistry. 2012. V. 13. P. 2. <https://doi.org/10.1186/1471-2091-13-2>
67. Mao Z., Shin H.D., Chen R. A recombinant *E. coli* bioprocess for hyaluronan synthesis // Applied Microbiol. Biotechnol. 2009. V. 84. № 1. P. 63–69. <https://doi.org/10.1007/s00253-009-1963-2>
68. Mao Z., Chen R.R. Recombinant synthesis of hyaluronan by *Agrobacterium* sp. // Biotechnol. Progress. 2007. V. 23. № 5. P. 1038–1042. <https://doi.org/10.1021/bp070113n>
69. Zhang L., Toscano Selão T., Nixon P.J. et al. Photosynthetic conversion of CO₂ to hyaluronic acid by engineered strains of the cyanobacterium *Synechococcus* sp. PCC 7002 // Algal Research. 2019. V. 44. P. 101702. <https://doi.org/10.1016/j.algal.2019.101702>
70. DeAngelis P.L. Enzymological characterization of the *Pasteurella multocida* hyaluronic acid synthase // Biochemistry. 1996. V. 35. № 30. P. 9768–9771. <https://doi.org/10.1021/bi960154k>
71. Mandawe J., Infanzon B., Eisele A. et al. Directed evolution of hyaluronic acid synthase from *Pasteurella multocida* towards high-molecular-weight hyaluronic acid // ChemBiochem: A Eur. J. Chem. Biology. 2018. V. 19. № 13. P. 1414–1423. <https://doi.org/10.1002/cbic.201800093>
72. Agarwal G., Krishnan K.V., Prasad S.B. et al. Biosynthesis of hyaluronic acid polymer: Dissecting the role of sub structural elements of hyaluronan synthase // Sci. Reports. 2019. V. 9. № 1. P. 12510. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-48878-8>
73. Zhang L., Huang H., Wang H. et al. Rapid evolution of hyaluronan synthase to improve hyaluronan production and molecular mass in *Bacillus subtilis* // Biotechnol. Letters. 2016. V. 38. № 12. P. 2103–2108. <https://doi.org/10.1007/s10529-016-2193-1>

74. Soldo B., Lazarevic V., Pagni M. et al. Teichuronic acid operon of *Bacillus subtilis* 168 // Mol. Microbiol. 1999. V. 31. № 3. P. 795–805.
<https://doi.org/10.1046/j.1365-2958.1999.01218.x>
75. Blank L.M., Hugenholtz P., Nielsen L.K. Evolution of the hyaluronic acid synthesis (has) operon in *Streptococcus zooepidemicus* and other pathogenic streptococci // J. Mol. Evolution. 2008. V. 67. № 1. P. 13–22.
<https://doi.org/10.1007/s00239-008-9117-1>
76. Blank L.M., McLaughlin R.L., Nielsen L.K. Stable production of hyaluronic acid in *Streptococcus zooepidemicus* chemostats operated at high dilution rate // Biotechnol. Bioengineering. 2005. V. 90. № 6. P. 685–693.
<https://doi.org/10.1002/bit.20466>
77. Sheng J.Z., Ling P.X., Zhu X.Q. et al. Use of induction promoters to regulate hyaluronan synthase and UDP-glucose-6-dehydrogenase of *Streptococcus zooepidemicus* expression in *Lactococcus lactis*: A case study of the regulation mechanism of hyaluronic acid polymer // J. Applied Microbiol. 2009. V. 107. № 1. P. 136–144.
<https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2009.04185.x>
78. Chen W.Y., Marcellin E., Hung J. et al. Hyaluronan molecular weight is controlled by UDP-N-acetylglucosamine concentration in *Streptococcus zooepidemicus* // The J. Biol. Chemistry. 2009. V. 284. № 27. P. 18007–18014.
<https://doi.org/10.1074/jbc.M109.011999>
79. Hmar R.V., Prasad S.B., Jayaraman G. et al. Chromosomal integration of hyaluronic acid synthesis (has) genes enhances the molecular weight of hyaluronan produced in *Lactococcus lactis* // Biotechnology J. 2014. V. 9. № 12. P. 1554–1564.
<https://doi.org/10.1002/biot.201400215>
80. Berezina O.V., Jurgens G., Zakharova N.V. et al. Evaluation of carbon and electron flow in *Lactobacillus brevis* as a potential host for heterologous 1-butanol biosynthesis // Advances in Microbiol. 2013. V. 03. № 05. P. 450–461.
<https://doi.org/10.4236/aim.2013.35061>
81. Fong Chong B., Nielsen L.K. Aerobic cultivation of *Streptococcus zooepidemicus* and the role of NADH oxidase // Biochem. Engineering J. 2003. V. 16. № 2. P. 153–162.
[https://doi.org/10.1016/S1369-703X\(03\)00031-7](https://doi.org/10.1016/S1369-703X(03)00031-7)
82. Armstrong D.C., Johns M.R. Culture conditions affect the molecular weight properties of hyaluronic acid produced by *Streptococcus zooepidemicus* // Applied Environmental Microbiol. 1997. V. 63. № 7. P. 2759–2764.
<https://doi.org/10.1128/AEM.63.7.2759-2764.1997>
83. Chong B., Nielsen L. Amplifying the cellular reduction potential of *Streptococcus zooepidemicus* // J. Biotechnology. 2003. V. 100. № 1. P. 33–41.
[https://doi.org/10.1016/S0168-1656\(02\)00239-0](https://doi.org/10.1016/S0168-1656(02)00239-0)
84. Kaur M., Jayaraman G. Hyaluronan production and molecular weight is enhanced in pathway-engineered strains of lactate dehydrogenase-deficient *Lactococcus lactis* // Metabolic Engineering Communications. 2016. V. 3. P. 15–23.
<https://doi.org/10.1016/j.meten.2016.01.003>
85. García Montes de Oca L.Y.J., Chagolla-López A., González de Vara L. et al. The composition of the *Bacillus subtilis* aerobic respiratory chain supercomplexes // J. Bioenergetics Biomembranes. 2012. V. 44. № 4. P. 473–486.
<https://doi.org/10.1007/s10863-012-9454-z>
86. Li S., Huang D., Li Y. et al. Rational improvement of the engineered isobutanol-producing *Bacillus subtilis* by elementary mode analysis // Microbial Cell Factories. 2012. V. 11. P. 101.
<https://doi.org/10.1186/1475-2859-11-101>
87. Huang W.C., Chen S.J., Chen T.L. The role of dissolved oxygen and function of agitation in hyaluronic acid fermentation // Biochem. Engineering J. 2006. V. 32. № 3. P. 239–243.
<https://doi.org/10.1016/j.bej.2006.10.011>
88. Westbrook A.W., Ren X., Moo-Young M. et al. Application of hydrocarbon and perfluorocarbon oxygen vectors to enhance heterologous production of hyaluronic acid in engineered *Bacillus subtilis* // Biotechnol. Bioengineering. 2018. V. 115. № 5. P. 1239–1252.
<https://doi.org/10.1002/bit.26551>
89. Lai Z.W., Rahim R.A., Ariff A.B. et al. Biosynthesis of high molecular weight hyaluronic acid by *Streptococcus zooepidemicus* using oxygen vector and optimum impeller tip speed // J. Bioscience Bioengineering. 2012. V. 114. № 3. P. 286–291.
<https://doi.org/10.1016/j.jbiosc.2012.04.011>
90. Kallio P.T., Bailey J.E. Intracellular expression of *Vitreoscilla* hemoglobin (VHb) enhances total protein secretion and improves the production of alpha-amylase and neutral protease in *Bacillus subtilis* // Biotechnol. Progress. 1996. V. 12. № 1. P. 31–39.
<https://doi.org/10.1021/bp950065j>
91. Lu J.F., Zhu Y., Sun H.L. et al. Highly efficient production of hyaluronic acid by *Streptococcus zooepidemicus* R42 derived from heterologous expression of bacterial haemoglobin and mutant selection // Letters in Applied Microbiol. 2016. V. 62. № 4. P. 316–322.
<https://doi.org/10.1111/lam.12546>
92. Zhang X., Wang M., Li T. et al. Construction of efficient *Streptococcus zooepidemicus* strains for hyaluronic acid production based on identification of key genes involved in sucrose metabolism // AMB Express. 2016. V. 6. № 1. P. 121.
<https://doi.org/10.1186/s13568-016-0296-7>
93. Reid S.J., Abratt V.R. Sucrose utilisation in bacteria: genetic organisation and regulation // Applied Microbiol. Biotechnol. 2005. V. 67. № 3. P. 312–321.
<https://doi.org/10.1007/s00253-004-1885-y>
94. Feng J., Gu Y., Quan Y. et al. Construction of energy-conserving sucrose utilization pathways for improving poly-γ-glutamic acid production in *Bacillus amyloliquefaciens* // Microbial Cell Factories. 2017. V. 16. № 1. P. 98.
<https://doi.org/10.1186/s12934-017-0712-y>
95. Feng J., Gu Y., Yan P.-F. et al. Recruiting energy-conserving sucrose utilization pathways for enhanced 2,3-butanediol production in *Bacillus subtilis* // ACS Sustainable Chemistry & Engineering. 2017. V. 5. № 12. P. 11221–11225.
<https://doi.org/10.1021/acssuschemeng.7b03636>

Design of Recombinant *Bacillus subtilis* Strains That Producing Hyaluronic Acid**S. V. Rykov^{a, b, *}, I. Y. Battalova^a, and A. S. Mironov^c**^aLLC “Biotechnologies Transfer Center OKA-BIOTECH”, Moscow, 119421 Russia^bNational Research Centre “Kurchatov Institute” – GosNIIGenetika, Kurchatov Genomic Center, Moscow, 117545 Russia^cEngelhardt Institute of Molecular Biology of the Russian Academy of Sciences, Moscow, 119991 Russia

*e-mail: enterru@yandex.ru

A broad application of hyaluronic acid (HA) in the production of cosmetics and pharmaceuticals increases the demand for high quality substance. In industry, HA is extracted from raw materials of animal origin or produced by fermentation of opportunistic pathogen *Streptococcus*. Biotechnological processes based on microorganisms that are safe for humans are rational and economically viable alternative for HA production. Recombinant *B. subtilis* strains may produce HA with yield and quality comparable to those in industrial streptococci. Variation in genetic, biochemical, and biotechnological factors allows to obtain HA with different molecular weights. Despite the impressive achievements, the potential of the *B. subtilis* platform for design of HA producers was not exhausted.

Keywords: hyaluronic acid, *Bacillus subtilis*, recombinant producer strains.

ПРИМЕНЕНИЕ БУККАЛЬНОГО МИКРОЯДЕРНОГО ЦИТОМНОГО ТЕСТА ДЛЯ ОЦЕНКИ ЦИТОГЕНЕТИЧЕСКОГО СТАТУСА МЕДПЕРСОНАЛА, КОНТАКТИРУЮЩЕГО С ПРОТИВООПУХОЛЕВЫМИ ПРЕПАРАТАМИ

© 2022 г. К. И. Кирсанов^{1,2}, Л. П. Сычева^{3,*}, Е. А. Лесовая^{1,4}, Е. М. Жидкова¹, О. А. Власова¹,
А. В. Осипова^{1,5}, Е. С. Лылова¹, Д. Д. Григорьева¹, Е. М. Кулакова¹, Л. Г. Соленова¹,
Г. А. Белицкий¹, И. Н. Михайлова¹, М. Г. Якубовская¹

¹Национальный медицинский исследовательский центр онкологии им. Н.Н. Блохина, Москва, 115478 Россия

²Российский университет дружбы народов, Москва, 117198 Россия

³Федеральный медицинский биофизический центр им. А.И. Бурназяна, Москва, 123182 Россия

⁴Рязанский государственный медицинский университет им. академика И.П. Павлова, Рязань, 390026 Россия

⁵Московский клинический научный центр им. А.С. Логинова, Москва, 111123 Россия

*e-mail: lpsycheva@mail.ru

Поступила в редакцию 25.11.2021 г.

После доработки 09.12.2021 г.

Принята к публикации 14.12.2021 г.

Медперсонал химиотерапевтических отделений регулярно контактирует с противоопухолевыми препаратами, обладающими генотоксическими свойствами. Впервые проведен анализ цитогенетического статуса медперсонала (54 человека) с использованием нового перспективного неинвазивного метода — буккального микроядерного цитомного теста с расчетом интегральных показателей. Эффект оценивали при разной продолжительности воздействия химиопрепаратов — после выхода сотрудника из отпуска, через месяц после отпуска и перед отпуском. Выявлены статистически значимые повышения практически всех исследованных показателей цитогенетических нарушений, пролиферации и апоптоза по сравнению с контрольной группой офисных работников (47 человек). Среди медперсонала установлено увеличение доли людей с повышенным уровнем цитогенетических нарушений при максимальной продолжительности экспозиции с 24 до 38% (в контроле 11%). Среди онкобольных (9 человек) доля лиц с высоким уровнем цитогенетических нарушений составила 56% до проведения очередного курса химиотерапии и 87% после его проведения.

Ключевые слова: буккальный микроядерный цитомный тест, противоопухолевые препараты, цитогенетические нарушения, медперсонал химиотерапевтических отделений, больные злокачественными новообразованиями.

DOI: 10.31857/S0016675822050058

Проблема риска развития онкологических заболеваний у медицинских работников онкологического профиля была поднята в 1970-х гг. после проведения первых эпидемиологических исследований. Поскольку развитие онкогенных процессов при действии различных факторов связано в основном с повреждением ДНК, были начаты экспериментальные исследования и выявлены генотоксические свойства ряда препаратов, применяющихся при химиотерапии онкобольных. В настоящее время по классификации Международного агентства по изучению рака (МАИР) 14 противоопухолевых химиопрепаратов, проявляющих в том числе генотоксическое действие, отнесены к канцерогенам для человека [1]. Цикло-

фосфамид, азатиоприн, бусульфид, хлорамбуцил, этопозид, мелфалан являются доказанными канцерогенами (группа 1), азацитидин, адриамицин, цисплатин, тиотеп, треоосульфид и семустин — вероятными канцерогенами (группа 2А), хлорозотоцин, блеомицин, дакарбазин, дауномицин и митоксантрол — возможными (группа 2В). Эти препараты применяют не только при лечении онкологических заболеваний, но и в ревматологии, трансплантологии, гинекологии, урологии, хирургии, офтальмологии. Непосредственный контакт с противоопухолевыми препаратами имеют фармацевты, а также сотрудники, занятые в области изучения канцерогенеза и экспериментальной химиотерапии. Несмотря на соблюдение рекомен-

двух мер безопасности, избежать загрязнения производственной среды этими препаратами в помещениях медицинских учреждений не удастся. Увеличение масштабов использования и расширение спектра противоопухолевых препаратов и их комбинаций приводят к повышению онкологического риска у медперсонала, что показано в ряде зарубежных исследований [2–4] и в единичных исследованиях в России [5, 6]. Следует учесть и другой негативный эффект противоопухолевых препаратов — их влияние на репродуктивную функцию. Показано повышение риска врожденных пороков развития у ребенка в 3.3 раза при профессиональной экспозиции матери к цитостатикам до зачатия [7]. В исследовании [8] продемонстрировано статистически значимое повышение риска спонтанных аборт.

Поиск методов ранней диагностики цитогенетических нарушений, которые считаются предикторами канцерогенеза, является актуальной задачей генотоксикологии. И такая диагностика имеет первостепенное значение при обследовании человека. Для оценки канцерогенной опасности при воздействии генотоксических агентов на человека используются методы, основанные на выявлении хромосомных aberrаций, микроядер и повреждений ДНК в лимфоцитах периферической крови. Однако эти методы требуют забора крови из вены (т.е. являются инвазивными), а также культивирования лимфоцитов с использованием дорогостоящих реактивов. Кроме того, многие химические соединения, воздействующие на человека, обладают цитостатическим или цитотоксическим действием, что затрудняет процесс культивирования. В качестве альтернативы для оценки хромосомных повреждений все чаще применяют неинвазивный (без взятия крови), не требующий культивирования микроядерный метод на эпителиальных клетках слизистой оболочки щеки. Эпителий представляет особый интерес, поскольку является первым барьером на пути воздействия факторов, поступающих с водой, пищей и воздухом, а его активная пролиферация обеспечивается интенсивным кровоснабжением. При этом переносимые кровью генотоксические соединения или их метаболиты также воздействуют на эпителиоциты.

К настоящему времени микроядерный тест на буккальном эпителии усовершенствован нами и дополнен анализом широкого спектра состояния ядра эксфолиативных клеток по цитогенетическим показателям, показателям пролиферации и апоптоза [9, 10]. Параллельно этот расширенный вариант метода был принят международным сообществом. Для гармонизации исследований с использованием микроядерного теста в 2007 г. запущен проект HUMNxL. В настоящее время этот подход является общепринятым и получил название “буккальный микроядерный цитомный тест” (БМЦТ) [11]. Мы впервые включили в оценку

БМЦТ интегральные показатели цитогенетических нарушений, пролиферации и апоптоза, определение уровня цитогенетического стресса в зависимости от превышения ориентировочных нормативных величин и комплексного индекса накопления цитогенетических нарушений, который объединяет весь спектр показателей структуры ядра клеток [12–14].

В связи с этим целью настоящего исследования была оценка цитогенетического статуса медицинского персонала в условиях профессиональной экспозиции разной длительности к противоопухолевым препаратам с использованием нового перспективного метода — буккального микроядерного цитомного теста (БМЦТ) в расширенном варианте.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Исследование проведено в соответствии с Руководством ВОЗ [15] согласно опубликованным нами методическим рекомендациям [13].

Исследовали мазки буккального эпителия сотрудников ФГБУ “НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина” Минздрава России, имеющих регулярный контакт с противоопухолевыми препаратами. В исследовании участвовали врачи и медицинские сестры, всего 54 сотрудника (49 женщин и 5 мужчин) в возрасте от 19 до 63 лет. Применяли сравнение группы воздействия с отрицательным и положительным контролем, а также подход сопряженных выборок, который подразумевает анализ изменений показателя у одной и той же группы лиц до и после воздействия какого-либо фактора (табл. 1). У каждого обследуемого из группы медперсонала биологический материал брали в трех временных точках: при минимальной экспозиции — в первый рабочий день после отпуска (группа 2), через месяц активной работы после отпуска (группа 3) и точке максимальной экспозиции противоопухолевыми препаратами — за день до отпуска (группа 4). Отпуск работников, участвующих в исследовании, составлял 14–28 календарных дней. В группу сравнения (группа 1, далее — отрицательный контроль) вошли сотрудники московского офиса, 47 женщин в возрасте до 25–40 лет, не имеющие контакта с генотоксическими соединениями, условно здоровые на момент обследования. Также проведена оценка цитогенетического статуса девяти онкологических больных (женщин в возрасте от 40 до 64 лет, страдающих раком молочной железы, раком яичников или раком тела матки) до и через неделю после лечения цитостатиками (циклофосфамидом и цисплатином), соответственно 5 и 6 группа. Эти группы служили положительным контролем. От каждого обследуемого получено информированное согласие на проведение данного неинвазивного обследования и заполнена соответствующая анкета.

Микроскопические препараты клеток слизистой оболочки щеки готовили в соответствии с [13]: стерильным деревянным шпателем делали соскоб с двух сторон с внутренней стороны щеки, наносили на предметные стекла, высушивали. Препараты фиксировали этанолом—уксусной кислотой (3 : 1), ДНК окрашивали ацетоорсеином, цитоплазму — светлым зеленым. Микроскопический анализ проводили на зашифрованных препаратах, считали по 1000 клеток от каждого индивида при увеличении $\times 1000$, оценивали показатели цитогенетического и цитотоксического действия. Биологическое значение, классификация и критерии определения этих показателей описаны ранее [9]. Каждую из анализируемых клеток относили к следующим категориям: клетки в норме; клетки с цитогенетическими нарушениями (микроядрами, протрузиями, ядрами атипичной формы); клетки с двумя ядрами (изолированными, сдвоенными), которые являются показателями нарушения пролиферации; клетки на ранней стадии деструкции ядра (с перинуклеарной вакуолью, с повреждением ядерной мембраны, конденсация хроматина, ранним кариолизисом) и на поздней стадии деструкции ядра (с кариорексисом, пикнозом, полным кариолизисом), которые являются показателями физиологической гибели клеток. Также определяли интегральный показатель цитогенетических нарушений (Icyt) — сумму клеток с микроядрами и протрузиями, интегральный показатель пролиферации — сумму клеток с двумя ядрами и сдвоенными ядрами (Ipr) и апоптотический индекс, включающий клетки на ранней и поздней стадии деструкции ядра (Iapop), за исключением клеток с перинуклеарной вакуолью и повреждением ядерной мембраны. Комплексную оценку цитогенетического статуса проводили по двум показателям: уровню цитогенетического стресса и индексу накопления цитогенетических повреждений. Уровень цитогенетического стресса определяли для каждого индивида в баллах в зависимости от превышения ориентировочных нормативных величин (ОНВ) [13]. При отсутствии превышения ОНВ показатель равен 1 (низкий уровень), при превышении какого-либо или нескольких показателей пролиферации или деструкции ядра клеток этот показатель равен 2 (допустимый уровень), если же выявлено превышение по цитогенетическим показателям (наиболее опасное) — показатель равен 3 (высокий уровень). В соответствии со среднегрупповыми значениями можно выделить следующие уровни цитогенетического стресса: 1 — низкий уровень (у всех в группе нет превышения ОНВ); ≤ 2 — допустимый уровень (у части обследуемых в группе есть превышение ОНВ); > 2 — высокий (у большинства обследуемых в группе есть превышение ОНВ, преимущественно по цитогенетическим показателям). Индекс накопления цитогенетических повреждений, предложенный ранее [12] (In-

dex of accumulation of cytogenetic damages, Iac), рассчитывали по формуле $Iac = (Icyt \times Ipr/Iapop) \times 100$, где в числителе — интегральный показатель цитогенетических нарушений (Icyt) и интегральный показатель пролиферации (Ipr), а в знаменателе — апоптотический индекс (Iapop). Этот показатель позволяет охарактеризовать цитогенетический статус человека и в отличие от показателя “частота клеток с микроядрами” учитывает соотношение между частотой цитогенетических нарушений и “интенсивностью” клеточной кинетики. Определение индекса накопления цитогенетических повреждений позволяет выделить три группы риска — низкий ($Iac \leq 2$), умеренный ($2 < Iac < 4$) и высокий ($Iac \geq 4$).

Статистический анализ данных проводили с помощью компьютерных программ Excel и Statistica 10.0 for Windows. Сравнение данных по группам проводили с помощью критерия Манна—Уитни. Различия считали значимыми при $p < 0.05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Сравнение цитогенетического статуса медперсонала в группах с разной экспозицией противоопухолевых препаратов

Средние значения частоты клеток с микроядрами составили 0.64, 0.71 и 0.9‰ в группах 2—4. В соответствии с международным проектом HUMNXL фоновая частота буккальных клеток с микроядрами равна 1.1‰ [11], т.е. частота этого показателя у медперсонала не превышает фоновый уровень. Клетки с ядерными протрузиями составили 0.76, 0.73 и 1.12‰; Icyt — 1.41, 1.45 и 2.02‰ (табл. 1). Очевидно, что средние значения увеличиваются с возрастанием нагрузки, однако различия между группами статистически незначимы.

Средние значения Ipr составили 7.0, 7.31 и 7.78‰ соответственно в группе после отпуска, через месяц после отпуска и перед отпуском. Они не различались статистически значимо и не превышали ОНВ.

Определены близкие значения показателей ранних и поздних стадий деструкции ядра клеток на трех сроках воздействия, которые в небольшой степени увеличивались к последнему сроку, однако отличия не были статистически значимы. В среднем эти значения не превышали ОНВ, кроме апоптоза (в очень малой степени). Апоптотический индекс оказался повышен на 7% (статистически незначимо) при наибольшей длительности экспозиции.

Уровень цитогенетического стресса был немного повышен при максимальной длительности экспозиции и соответствовал во 2—4 группах 1.70, 1.55 и 1.86 ($p < 0.05$). Он определен как допустимый (не низкий). Наиболее выраженные изменения отмечены по индексу накопления цитогене-

Таблица 1. Показатели БМЦТ в группах медицинских работников, контактирующих с противоопухолевыми препаратами, и контрольных, хер. $\pm m$ (95% ДИ)

Показатели	Группа 1 – негативный контроль, 47 человек	Группа 2 – медперсонал после отпуска, 54 человека	Группа 3 – медперсонал через месяц после отпуска, 49 человек	Группа 4 – медперсонал перед отпуском	Группа 5 – положительный контроль, онкобольные до лечения, 9 человек	Группа 6 – положительный контроль, онкобольные после лечения, 8 человек
Интегральный показатель цитогенетических нарушений, ‰ (Icyt)[0–5]	0.53 $\pm$ 0.14 (0.25–0.82)	1.41 $\pm$ 0.19 (1.02–1.80)	1.45 $\pm$ 0.19 (1.06–1.83)	2.02 $\pm$ 0.28 (1.46–2.58)	5.78 $\pm$ 1.89* (1.41–10.14)	16.4 $\pm$ 5.69* (2.93–29.8)
Интегральный показатель пролиферации (Ipr), ‰ [0–8]	1.95 $\pm$ 0.25 (1.45–2.46)	7.0 $\pm$ 0.53 (5.93–8.07)	7.31 $\pm$ 0.67 (5.96–8.65)	7.78 $\pm$ 0.66 (6.45–9.10)	11.9 $\pm$ 3.33 (4.23–19.6)	67.6 $\pm$ 33.1* (–10.7–146.0)
Апоптотический индекс (Iapop), ‰ [0–600]	167.1 $\pm$ 11.0 (145.0–189.3)	373.3 $\pm$ 12.7 (347.9–398.7)	375.7 $\pm$ 11.8 (352.0–11.8)	402.4 $\pm$ 12.7 (376.9–427.8)	369.9 $\pm$ 55.9 (240.9–498.9)	293.6 $\pm$ 31.87* (218.3–369.0)
Индекс накопления цитогенетических нарушений (Iac)	1.90 $\pm$ 0.31 (1.28–2.53)	3.48 $\pm$ 0.47 (2.55–4.43)	3.90 $\pm$ 0.83 (2.34–5.56)	5.10 $\pm$ 0.95 (3.18–7.02)	28.6 $\pm$ 13.8* (–3.19–60.3)	1101 $\pm$ 821.4* (–841.1–3043)
Уровень цитогенетического стресса в баллах	1.13 $\pm$ 0.05 (1.03–1.23)	1.70 $\pm$ 0.07 (1.57–1.84)	1.55 $\pm$ 0.10* (1.36–1.75)	1.86 $\pm$ 0.08 (1.70–2.02)	2.33 $\pm$ 0.24* (1.79–2.88)	2.75 $\pm$ 0.16* (2.36–3.14)

Примечание. Все исследованные показатели в группе отрицательного контроля статистически значимо отличаются от соответствующих показателей в других группах по U-критерию Манна–Уитни при $p < 0.05$. При сравнении с группой 4 * $p < 0.05$.

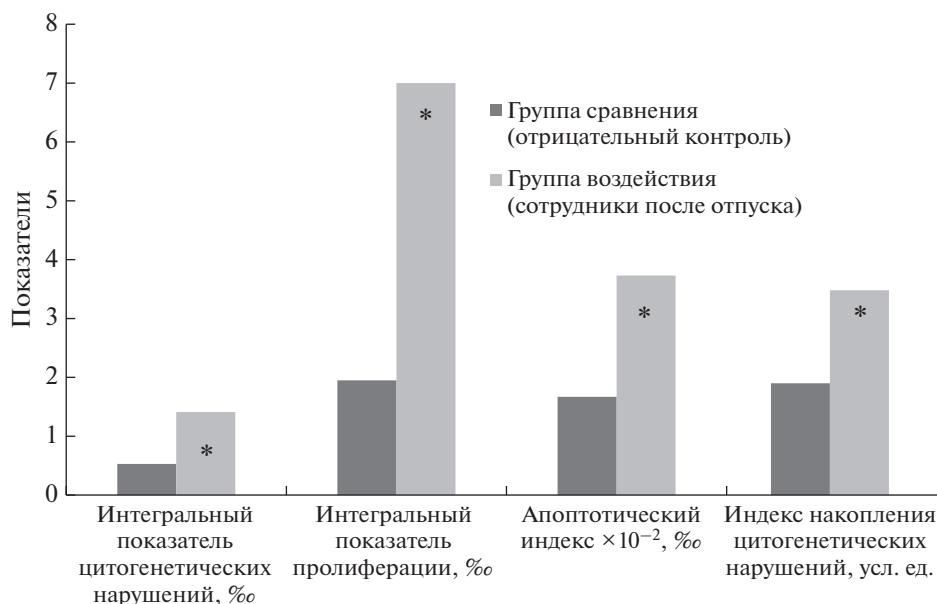


Рис. 1. Средние значения интегральных показателей цитогенетического статуса. Звездочка — $p < 0.05$.

тических нарушений, который составил 3.48, 3.90 и 5.10. Превышение эффекта на последнем сроке воздействия составило 46%. Причем учитывая этот показатель медперсонал, обследованный сразу и через месяц после отпуска, можно охарактеризовать как группу умеренного риска воздействия на цитогенетический статус, тогда как эта же группа, обследованная до отпуска, является группой высокого уровня риска [13].

Сравнение цитогенетического статуса медперсонала и группы отрицательного контроля

Средние значения всего спектра показателей цитогенетического статуса группы 1 (отрицательный контроль) статистически значимо отличаются от соответствующих показателей во всех других группах по U -критерию Манна–Уитни при $p < 0.05$. Средние значения частоты клеток с микроядрами в этой группе составили 0.3‰, с ядерными протрузиями — 0.23‰, Icyt — 0.53‰. Средние значения этих показателей в группах 2–4 медперсонала существенно выше ($p < 0.05$).

Irg соответствовал 1.95‰ в контроле и 7.0, 7.31 и 7.78‰ в группах 2–4 ($p < 0.05$), при этом превышения ОНВ не отмечено. Уровень показателей деструкции ядра клеток в группе 1 был в 2–3 раза ниже, чем в группе 2 медперсонала в сравнении с группой отрицательного контроля (минимальный уровень экспозиции). Это относится и к апоптотическому индексу в целом, что характеризует более быструю элиминацию клеток с цитогенетическими нарушениями в группе медперсонала ($p < 0.001$).

И в контроле, и в группе 2 отмечен низкий уровень цитогенетического стресса (1.13 и 1.70), но доля людей, у которых отмечено повышение частоты показателей цитотоксического действия, среди медперсонала все-таки больше, чем в контроле (рис. 1).

Iас составил 1.9 в группе 1, а у медперсонала с увеличением экспозиции повышался с 3.48 до 3.90 (допустимый уровень риска) и 5.1 (высокий уровень риска) ($p < 0.01$).

Сравнение цитогенетического статуса онкобольных до и после приема противоопухолевых препаратов

В качестве положительного контроля определили цитогенетический статус девяти онкобольных до и через неделю после проведения курса лечения цитостатиками. Средние значения частоты клеток с микроядрами у онкобольных до и после лечения составили 5.22 и 9.37‰ ($p > 0.05$), с протрузиями — 0.56 и 7.0‰ ($p < 0.05$), Icyt — 5.78 и 16.4‰ ($p < 0.05$) соответственно. Очевидно, что средние значения значительно увеличиваются после лечения пациентов цитостатиками, и это закономерно, так как оба препарата, которые они получали (циклофосамид и цисплатин), характеризуются сильным мутагенным действием.

Частота клеток с двумя ядрами составила 8.0 и 16.6‰ (выше ОНВ), отмечены клетки с тремя, четырьмя, пятью ядрами или даже группы из 7–8 мелких приблизительно одинаковых по размеру ядер. Частота клеток со сдвоенными ядрами была еще более высокой — 3.9 и 51‰. В некоторых

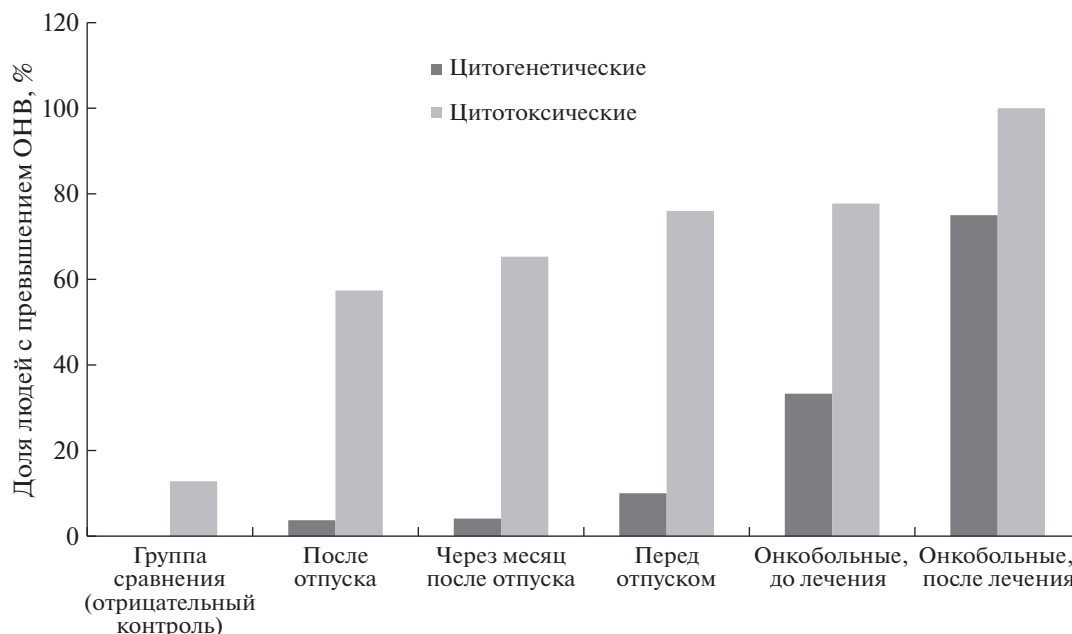


Рис. 2. Доля людей с превышением ОНВ по цитогенетическим и цитотоксическим показателям.

клетках отмечено по несколько ядерных аномалий — отдельно и вдвое лежащие ядра, протрузии и микроядра. Такие картины характерны для процессов значительных нарушений деления ядра, повреждения веретена деления и ДНК. Irg у больных до лечения был 11.9, после лечения — 67.6, что значительно превышает ОНВ. Этот феномен характерен для препаратов, характеризующихся цитостатическим действием.

Отмечено снижение почти всех показателей апоптоза у больных после лечения: частоты клеток с конденсацией хроматина (с 207.3 до 184.2‰), началом кариолизиса (с 53.3 до 15.0‰), с апоптотическими телами (с 16.3 до 5.5‰), пикнозом (с 94.7 до 74.0‰), Iarop в целом (с 369.9 до 293.6‰). Уровень цитогенетического стресса — высокий и составляет 2.33 и 2.75 у больных до и после лечения ($p > 0.05$). Iас у онкобольных после лечения составил 1101, что в 40 раз превышает значение Iас у этих же пациентов до терапии (28.6, $p = 0.075$). В целом отмечено значительное ухудшение цитогенетического статуса онкобольных через неделю после лечения.

Сравнение цитогенетического статуса медперсонала и групп положительного контроля

Сравнивали группу 4 (медперсонал с наиболее длительной экспозицией) с группами 5 и 6 (онкобольные до и после лечения). Средние значения частоты клеток с микроядрами в группе медперсонала и онкобольных составили 0.90, 5.22, 9.37‰ ($p < 0.05$), частоты клеток с ядерными протрузиями — 1.12, 0.56 и 7.0‰; Icyt — 2.02, 5.78 и

16.4‰ соответственно (табл. 1). Очевидно, что показатели в группах онкобольных существенно выше, особенно в группе больных после лечения ($p < 0.001$). Irg составил 7.8, 11.89 и 67.6‰ соответственно. В группах онкобольных он существенно превышал ОНВ. Уровень показателей деструкции ядра клеток, в том числе апоптотический индекс, в группе медперсонала был выше.

Уровень цитогенетического стресса составил 1.86, 2.33 и 2.75, т.е. доля людей, у которых отмечено превышение частоты показателей цитотоксического действия, в группе онкобольных больше. Iас в группе онкобольных в 5.6 и 220 раз выше, чем у медперсонала.

Результаты сравнения групп по доле лиц с превышением ОНВ по цитогенетическим и цитотоксическим показателям приведены на рис. 2. Отмечено увеличение доли лиц с превышением ОНВ по цитогенетическим и цитотоксическим показателям в ряду групп 1–6.

ОБСУЖДЕНИЕ

В соответствии с целью данного исследования необходимо было наиболее полно охарактеризовать цитогенетический статус медперсонала, имеющего контакт с противоопухолевыми препаратами. Для этого мы применили три подхода: сравнили группы, имеющие и не имеющие контакт с этими препаратами; определили цитогенетический статус медперсонала одной и той же группы при разной длительности экспозиции; определили цитогенетический статус пациентов этого же отделения до

и через неделю после приема противоопухолевых препаратов и провели сравнение с показателями медперсонала.

Средние значения показателей цитогенетического стресса, нарушения пролиферации и апоптоза в 1–4 группах в целом входят в диапазон, определенный для ряда обследованных нами и другими исследовательскими группами популяций [14–16]. Однако в группе медперсонала даже при минимальной длительности экспозиции определены более высокие уровни показателей ($p < 0.05$) по сравнению с таковыми у офисных работников.

При анализе длительности экспозиции уровень цитогенетического стресса был статистически значимо повышен в группе с максимальной длительностью воздействия. Доля людей с высоким риском цитогенетических нарушений при обследовании до отпуска (максимальная длительность экспозиции) составила 38%, что оказалось в 1.6 раза выше по сравнению с группами после отпуска (рис. 3). Следует учесть, что буккальный эпителий обновляется за 7–10 дней, т.е. после отпуска у медперсонала были собраны клетки, преимущественно не подвергавшиеся воздействию негативных производственных факторов. В условиях работы с противоопухолевыми препаратами такое воздействие возможно, несмотря на соблюдение рекомендуемых мер безопасности. По данным литературы в медицинских учреждениях противоопухолевые препараты определяются в воздухе и на поверхностях помещений [17, 18]. Метаанализ показал наличие во внутрибольничных помещениях остаточных количеств хотя бы одного лекарственного средства [19]. Следовые количества препаратов выявлены в местах приготовления растворов, на посуде и упаковках [20]. Причем и вторичная упаковка флаконов не предотвращает контаминацию [21]. Изучение стабильности некоторых препаратов (метотрексат, циклофосфамид, 5-фторурацил, паклитаксел) показало, что даже через 6 сут после поступления во внешнюю среду они сохраняют активность [22]. Следовые количества противоопухолевых препаратов обнаружены в анализах мочи медперсонала [20]. Но поскольку действующие концентрации препаратов чрезвычайно малы, выявить генотоксический эффект у медперсонала довольно сложно, что и показало наше исследование.

Метаанализ исследований по изучению цитогенетического статуса медперсонала, имеющего контакт с противоопухолевыми препаратами, представленный в публикации [23], показал значимое повышение уровня хромосомных aberrаций в лимфоцитах периферической крови по сравнению с контролем. Такое же заключение следует из публикации [24], в которой представлен метаанализ по оценке цитогенетического статуса медперсонала с использованием микроядерного теста на лимфоци-

тах периферической крови. Повышенная частота лимфоцитов с микроядрами выявлена в 15 исследованиях из 24 (1988–2015 гг.). В 16 исследованиях были дополнительно определены другие показатели цитогенетического действия препаратов — хромосомные aberrации, сестринские хроматидные обмены, ДНК-кометы, микроядра в буккальных эпителиоцитах. Отмечено хорошее соответствие результатов генотоксических тестов. Наши данные совпадают с исследованиями, проведенными в Италии [25–27]. Частота буккальных эпителиоцитов с микроядрами у обследованных медсестер в онкологической клинике составила 0.89 и 0.94‰ (дневные медсестры и сестры отделения), что значимо отличалось от контроля (0.46‰). Также повышение частоты буккальных эпителиоцитов с микроядрами выявлено в работах [28–31], однако этот показатель был высоким даже в контроле (1.6, 2.7, 3.4‰). Это может быть связано с окраской препаратов по методу Гимза, при которой трудно различить микроядра и бактериальные клетки, практически всегда присутствующие в ротовой полости. В исследовании [32] эффект противоопухолевых препаратов не был выявлен: в группе экспонированных медсестер частота клеток с микроядрами составила 0.89‰ (в нашем исследовании 0.9‰), в контроле — 0.84‰. При этом группа контроля была представлена сотрудниками больниц, которые могли контактировать с другими генотоксическими соединениями. Учитывая указанные особенности проведения исследований, можно отметить, что наши данные хорошо согласуются с результатами других исследовательских групп. В то же время примененный нами подход имеет определенные преимущества. Анализ микроядер по сравнению с хромосомными aberrациями позволяет выявлять цитогенетическое действие не только кластогенов, но и анеугенов. Анализ буккального эпителия имеет широкие перспективы в связи с неинвазивным взятием материала, отсутствием необходимости культивировать клетки, возможностью анализировать широкий спектр состояний ядра клеток, в том числе нарушение пролиферации и апоптоз. Такой углубленный цитогенетический анализ мы применили впервые, подтвердив и расширив представления о влиянии условий работы с противоопухолевыми препаратами на цитогенетический статус медперсонала.

Чрезвычайно высокий Iac отмечен в группе положительного контроля. При этом доля больных с высоким риском накопления цитогенетических нарушений составила 56 и 87% соответственно. Повышенный уровень цитогенетических нарушений в буккальном эпителии онкобольных отмечен в ряде публикаций [33], но в настоящем исследовании мы представили картину более полно с определением в соответствии с нашим подходом интегральных показателей. Анализ этой группы до и после лечения показывает, что цитогенетический

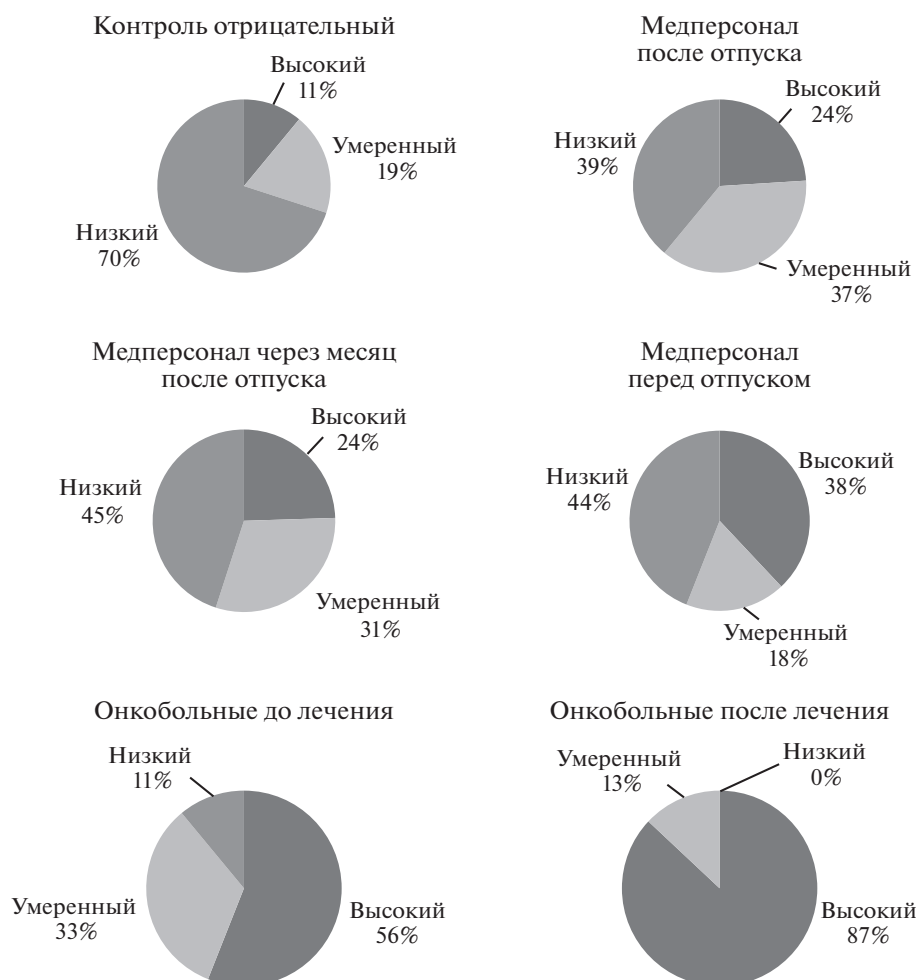


Рис. 3. Доля людей с низким, умеренным (самый светлый цвет) и высоким (самый темный цвет) риском цитогенетических нарушений в обследованных группах в соответствии с индексом накопления цитогенетических нарушений.

статус онкобольных значительно нарушен, эти нарушения определяются не только в опухолях, но и других тканях организма. По-видимому, у таких больных в организме присутствуют как экзогенные генотоксиканты (различные лекарственные препараты), так и эндогенные генотоксические метаболиты.

В процессе эволюции в клетках эукариот сформирована иерархия защитных систем, включающая преграды на пути поступления токсикантов, их детоксикации, репарации повреждений ДНК и других высокомолекулярных соединений. Причем каждый организм имеет свои особенности, связанные с полиморфизмом генов. Тем не менее отмечаемое в мире повышение частоты онкопатологии, по-видимому, зависит от срыва адаптационных механизмов и нарушения стабильности клеточного генома. БМЦТ, позволяющий проводить такой мониторинг неинвазивно, имеет хорошие перспективы для определения групп риска по уровню цитогенетических нарушений и прогноза

канцерогенного действия, а главное для выявления людей с высоким индексом накопления цитогенетических нарушений.

Исследование состояния здоровья медперсонала, контактирующего с противоопухолевыми препаратами, проведено путем определения ранних предикторов неблагоприятных изменений, а именно — показателей цитогенетического статуса с использованием БМЦТ. Это особенно актуально, поскольку основными препаратами, с которыми работают сотрудники химиотерапевтических отделений, являются препараты, обладающие генотоксичностью, цитостатическим и канцерогенным действием. Группу медперсонала можно охарактеризовать как группу с допустимым уровнем цитогенетического стресса и с высоким уровнем риска по индексу накопления цитогенетических нарушений, что значимо отличает ее от группы отрицательного контроля. Это же подтверждает определение доли лиц с превышением ОНВ (77% по сравнению с 13% в контрольной группе), а также

определение доли лиц с высоким индексом накопления цитогенетических нарушений (38% против 11%). Результаты показывают, что медицинский персонал подвергается воздействию канцерогенных факторов в производственной среде и нуждается в дополнительных мерах безопасности, снижающих риск неблагоприятного воздействия противоопухолевых препаратов. При этом БМЦТ может рутинно использоваться для цитогенетического мониторинга медперсонала для выявления индивидов с повышенным уровнем накопления цитогенетических повреждений.

Все процедуры, выполненные в исследовании с участием людей, соответствуют этическим стандартам институционального и/или национального комитета по исследовательской этике и Хельсинкской декларации 1964 г. и ее последующим изменениям или сопоставимым нормам этики.

От каждого из включенных в исследование участников было получено информированное добровольное согласие.

Авторы заявляют, что у них нет конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. International Agency for Research of Cancer [WWW Document]. List of Classifications. 2020. URL: <https://monographs.iarc.fr/list-of-classifications> (Accessed 01.12.2021).
2. Skov T., Lyng E., Maarup B. et al. Risks for physicians handling antineoplastic drugs // *Lancet*. 1990. V. 336. № 8728. P. 1446. [https://doi.org/10.1016/0140-6736\(90\)93148-i](https://doi.org/10.1016/0140-6736(90)93148-i)
3. Gunnarsdottir H.K., Aspelund T., Karlsson T., Rafnsson V. Occupational risk factors for breast cancer among nurses // *Int. J. Occup. Environ. Health*. 1997. V. 3. P. 254–258. <https://doi.org/10.1179/oeh.1997.3.4.254>
4. Ratner P.A., Spinelli J.J., Beking K. et al. Cancer incidence and adverse pregnancy outcome in registered nurses potentially exposed to antineoplastic drugs // *BMC Nurs*. 2010. V. 9. P. 15–25. <https://doi.org/10.1186/1472-6955-9-15>
5. Соленова Л.Г. Производственные факторы и онкологический риск у онкологов // *Вестник РОНЦ им. Н.Н. Блохина РАМН*. 2009. Т. 20. № 2. С. 41–47.
6. Соленова Л.Г. Эпидемиологический мониторинг онкологического риска у работников онкологического центра // *Успехи мол. онкологии*. 2019. Т. 6. С. 63–70. <https://doi.org/10.17650/2313-805X-2019-6-3-63-70>
7. Тихонова Г.И., Рубцова Н.Б., Яковлева Т.П. Условия труда родителей как фактор риска развития врожденных пороков у детей // *Безопасность жизнедеятельности*. 2006. Т. 2. С. 52–57.
8. Dranitsaris G., Johnston M., Poirier S. et al. Are health care providers who work with cancer drugs at an increased risk for toxic events? A systematic review and meta-analysis of the literature // *J. Oncol. Pharm. Pract*. 2005. V. 11. № 2. P. 69–78. <https://doi.org/10.1191/1078155205jp155oa>
9. Сычева Л.П. Биологическое значение, критерии определения и пределы варьирования полного спектра кариологических показателей при оценке цитогенетического статуса человека // *Мед. генетика*. 2007. Т. 6. № 11. С. 3–11.
10. Сычева Л.П. Цитогенетический мониторинг для оценки влияния факторов внешней среды на здоровье человека. Здоровье здорового человека: научные основы организации здравоохранения, восстановительной и экологической медицины. Руководство. Изд. 3-е, перераб. М.: АНО “Международный университет восстановительной медицины”, 2016. С. 221–225.
11. Fenech M., Holland N., Zeiger E. et al. The HUMN and HUMNXL international collaboration projects on human micronucleus assays in lymphocytes and buccal cells—past, present and future // *Mutagenesis*. 2011. V. 26. № 1. P. 239–245. <https://doi.org/10.1093/mutage/geq051>
12. Сычева Л.П. Цитогенетический мониторинг для оценки безопасности среды обитания человека // *Гигиена и санитария*. 2012. Т. 91. № 6. С. 68–72.
13. Методические рекомендации “Оценка состояния здоровья персонала предприятий, осуществляющих деятельность по обращению с отработавшим ядерным топливом и радиоактивными отходами” // *МР ФМБА России* 12.031-2020. Утв. 14.07.2020. 27 с.
14. Sycheva L.P., Kiselev S.M., Shandala N.K. Cytogenetic analysis (buccal micronucleus cytome assay) of radioactive waste management workers // *Mutat. Res. Genet. Toxicol. Environ. Mutagen*. 2021. V. 870–871. P. 503403. <https://doi.org/10.1016/j.mrgentox.2021.503403>
15. Guidelines for the study of genetic effects in human populations. International programme of chemical safety. Environmental health criteria 46. World Health Organization. Geneva. 1985.
16. Sycheva L.P., Umnova N.V., Kovalenko M.A. et al. Dioxins and cytogenetic status of villagers after 40 years of agent Orange application in Vietnam // *Chemosphere*. 2016. V. 144. P. 1415–1420. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2015.10.009>
17. Connor T.H., DeBord D.G., Pretty J.R. et al. Evaluation of antineoplastic drug exposure of health care workers at three university-based US cancer centers // *J. Occup. Environ. Med*. 2010. V. 52. P. 1019–1027. <https://doi.org/10.1097/JOM.0b013e3181f72b63>
18. Santos A.N., Oliveira R.J., Pessatto L.R. et al. Biomonitoring of pharmacists and nurses at occupational risk from handling antineoplastic agents // *Int. J. Pharm. Pract*. 2020. V. 28. P. 506–511. <https://doi.org/10.1111/ijpp.12590>
19. Hon C.-Y., Barzan C., Astrakianakis G. Identification of knowledge gaps regarding healthcare workers’ exposure to antineoplastic drugs: Review of Literature, North America versus Europe // *Saf. Health Work*. 2014. V. 5. P. 169–174. <https://doi.org/10.1016/j.shaw.2014.06.001>
20. Hon C.-Y., Teschke K., Shen H. et al. Antineoplastic drug contamination in the urine of Canadian healthcare workers // *Int. Arch. Occup. Environ. Health*. 2015. V. 88. P. 933–941. <https://doi.org/10.1007/s00420-015-1026-1>
21. Cotteret C., Secretan P.-H., Gilles-Afchain L. et al. External contamination of antineoplastic drug vials: an occupational risk to consider // *Eur. J. Hosp. Pharm*. 2020. <https://doi.org/10.1136/ejpharm-2020-002440>

22. Jeronimo M., Colombo M., Astrakianakis G., Hon C.-Y. A surface wipe sampling and LC-MS/MS method for the simultaneous detection of six antineoplastic drugs commonly handled by healthcare workers // *Anal. Bioanal. Chem.* 2015. V. 407. P. 7083–7092. <https://doi.org/10.1007/s00216-015-8868-y>
23. Roussel C., Witt K.L., Shaw P.B., Connor T.H. Meta-analysis of chromosomal aberrations as a biomarker of exposure in healthcare workers occupationally exposed to antineoplastic drugs // *Mutat. Res.* 2019. V. 781. P. 207–217. <https://doi.org/10.1016/j.mrrev.2017.08.002>
24. Villarini M., Gianfredi V., Levorato S. et al. Occupational exposure to cytostatic/antineoplastic drugs and cytogenetic damage measured using the lymphocyte cytokinesis-block micronucleus assay: A systematic review of the literature and meta-analysis // *Mutat. Res. Rev. Mutat. Res.* 2015. V. 770. P. 35–45. <https://doi.org/10.1016/j.mrrev.2016.05.001>
25. Cavallo D., Ursini C.L., Perniconi B. et al. Evaluation of genotoxic effects induced by exposure to antineoplastic drugs in lymphocytes and exfoliated buccal cells of oncology nurses and pharmacy employees // *Mutat. Res.* 2005. V. 587. № 1–2. P. 45–51. <https://doi.org/10.1016/j.mrgentox.2005.07.008>
26. Cavallo D., Ursini C.L., Omodeo-Salè E., Iavicoli S. Micronucleus induction and FISH analysis in buccal cells and lymphocytes of nurses administering antineoplastic drugs // *Mutat. Res.* 2007. V. 628. № 1. P. 11–18. <https://doi.org/10.1016/j.mrgentox.2006.10.014>
27. Cavallo D., Ursini C.L., Rondinone B., Iavicoli S. Evaluation of a suitable DNA damage biomarker for human biomonitoring of exposed workers // *Environ. Mol. Mutagen.* 2009. V. 50. P. 781–790. <https://doi.org/10.1002/em.20501>
28. Machado-Santelli G.M., Cerqueira E.M., Oliveira C.T., Pereira C.A. Biomonitoring of nurses handling antineoplastic drugs // *Mutat. Res.* 1994. V. 322. № 3. P. 203–208. [https://doi.org/10.1016/0165-1218\(94\)90007-8](https://doi.org/10.1016/0165-1218(94)90007-8)
29. Burgaz S., Karahalil B., Bayrak P. et al. Urinary cyclophosphamide excretion and micronuclei frequencies in peripheral lymphocytes and in exfoliated buccal epithelial cells of nurses handling antineoplastics // *Mutat. Res.* 1999. V. 439. № 1. P. 97–104. [https://doi.org/10.1016/s1383-5718\(98\)00180-6](https://doi.org/10.1016/s1383-5718(98)00180-6)
30. Rekhadevi P.V., Sailaja N., Chandrasekhar M. et al. Genotoxicity assessment in oncology nurses handling anti-neoplastic drugs // *Mutagenesis.* 2007. V. 22. № 6. P. 395–401. <https://doi.org/10.1093/mutage/gem032>
31. El-Ebiary A.A., Abuelfadl A.A., Sarhan N.I. Evaluation of genotoxicity induced by exposure to antineoplastic drugs in lymphocytes of oncology nurses and pharmacists // *J. Appl. Toxicol.* 2013. V. 33. № 3. P. 196–201. <https://doi.org/10.1002/jat.1735>
32. Bolognesi C., Nucci M.C., Colacci A.M. et al. Biomonitoring of nurses occupationally exposed to antineoplastic drugs: the IMEPA Project // *Epidemiol Prev.* 2005. V. 29. P. 91–95.
33. Byakhova M.M., Byakhova V.M. Cytogenetic changes in the buccal and nasal epithelium in patients with cancer of different localization // *Mutagenesis.* 2017. V. 32. № 6. C. 607–628.

Application of Buccal Micronucleus Cytome Assay for the Evaluation of Cytogenetic Status of Healthcare Professionals Contacting with Anti-Cancer Drugs

K. I. Kirsanov^{a, b}, L. P. Sycheva^{c, *}, E. A. Lesovaya^{a, d}, E. M. Zhidkova^a, O. A. Vlasova^a,
A. V. Osipova^{a, e}, E. S. Lylova^a, D. D. Grigorieva^a, E. M. Kulakova^a, L. G. Solenova^a,
G. A. Belitsky^a, I. N. Mikhaylova^a, and M. G. Yakubovskaya^a

^a*Blokhin National Medical Research Center of Oncology, Moscow, 115478 Russia*

^b*Peoples' Friendship University of Russia, Moscow, 117198 Russia*

^c*Burnasyan Federal Medical Biophysical Center, Moscow, 123182 Russia*

^d*Pavlov Ryazan State Medical University, Ryazan, 390026 Russia*

^e*Loginov Moscow Clinical Scientific Center, Moscow, 111123 Russia*

^{*}*e-mail: lpsycheva@mail.ru*

Healthcare professionals of chemotherapy departments contact with anti-cancer drugs with genotoxic properties. In presented paper for the first time we analyzed the cytogenetic status of healthcare workers (54 persons) using the novel prospective non-invasive approach, (buccal micronucleus cytome assay) with the evaluation of integral indexes. The effect was evaluated after different exposure time: (1) after vacation; (2) one month after vacation; (3) before vacation. We revealed the statistically significant increases in analyzed biomarkers of cytogenetic damages, impaired proliferation and apoptosis in comparison with the control group of office staff (47 persons). We demonstrated the increase of the level of cytogenetic damages from 24 to 38% among the healthcare personnel with the maximal exposure time (compared to 11% in control group). In cancer patient (9 persons) the percentage of people with high level of cytogenetic damages was 56% before chemotherapy and 87% after the treatment.

Keywords: buccal micronucleus cytome assay, anti-cancer drugs, cytogenetic damages, healthcare professionals of chemotherapy departments, cancer patients.

ТКАНЕСПЕЦИФИЧНОСТЬ АКТИВНОСТИ ГЕНА *AqE* У ЖЕЛТОГО ГОРБЫЛЯ *Larimichthys crocea*

© 2022 г. Л. В. Пузакова¹, *, М. В. Пузаков¹

¹Федеральный исследовательский центр Институт биологии южных морей им. А. О. Ковалевского
Российской академии наук, Севастополь, 299011 Россия

*e-mail: kvluda@yandex.ru

Поступила в редакцию 19.11.2021 г.

После доработки 13.12.2021 г.

Принята к публикации 14.12.2021 г.

Изучение разнообразия метаболических путей является важным аспектом для понимания эволюционных связей между метаболическими путями и их биохимическими предшественниками. Недавно был описан сульфолактатдегидрогеназа-подобный белок, кодируемый у эукариот геном *AqE*, который у костистых рыб сохраняет высокую консервативность. Однако до сих пор остается неизвестной роль этого фермента в метаболизме. В настоящей работе изучалась транскрипционная активность гена *AqE*, а также других генов, связанных с энергообменом у большого желтого горбыля *Larimichthys crocea*. Количественный анализ экспрессии показал тканеспецифичность активности гена *AqE* у желтого горбыля. Ген активен в печени, коже и жабрах. Исходя из анализа экспрессии гена в различных органах в нормальных условиях и под воздействием стрессирующих факторов, предполагается, что фермент, кодируемый геном *AqE*, участвует в малат-аспартатном челноке или в выведении конечных метаболитов (сульфолактат) из организма.

Ключевые слова: сульфолактатдегидрогеназа, *AqE*, *Larimichthys crocea*, гипоксия, транскрипционная активность.

DOI: 10.31857/S0016675822050071

Низкая растворимость кислорода в воде — один из основных факторов, обуславливающих особенности метаболизма организмов, обитающих постоянно или на какой-либо стадии онтогенеза в водной (жидкой) среде. Поскольку первые формы жизни появились и впоследствии эволюционировали в жидкой среде, “гипоксические” типы энергообмена появились раньше и, вероятно, более разнообразны. Известно, что активность NADH-зависимых оксидоредуктаз, таких как малатдегидрогеназа (МДГ) и лактатдегидрогеназа (ЛДГ), меняется в зависимости от концентрации кислорода в воде [1]. Эти белки катализируют восстановление 2-кетокислот через кофактор NADH и объединены в семейство ЛДГ/МДГ-оксидоредуктаз [2]. ЛДГ обеспечивает обратимое превращение лактата в пируват. МДГ катализирует взаимопревращения между малатом и оксалоацетатом. ЛДГ/МДГ-оксидоредуктазы были описаны и секвенированы у бактерий, архей и эукариот [2]. Позднее были выявлены другие NADH-зависимые оксидоредуктазы, некоторые представители которых также используют в качестве субстратов лактат или малат [3, 4]. Эти ферменты были объединены в семейство

ЛДГ2/МДГ2-оксидоредуктазы (ЛДГ/МДГ-оксидоредуктазы типа 2) [5].

Преобладающая доля ЛДГ2/МДГ2-оксидоредуктаз была обнаружена только у архей и бактерий [5]. Однако гомологи гена *comC*, который у архей и бактерий кодирует сульфолактатдегидрогеназу (СЛДГ) [6–8], были обнаружены и у эукариот [9]. При этом было установлено, что гомологи гена *comC* присутствуют и в геномах грибов, растений, животных. Однако в царстве растений этот гомологичный ген обнаружен только у водорослей, тогда как у мхов и семенных растений отсутствует. У животных гомологи гена найдены у представителей большинства эволюционных групп, но утеряны у четвероногих (земноводных, рептилий, птиц и млекопитающих) [9]. Поскольку ген, кодирующий неизвестный фермент, встречается только в тех таксонах, образ жизни или стадии онтогенеза представителей которых связаны с водной (жидкой) средой, он был условно назван *AqE* (aquatic enzyme, водный фермент). В результате детального исследования гена *AqE* у костистых рыб было установлено, что у карпообразных (Cypriniformes) он был утерян полностью, а у представителей лососеобразных (Salmoniformes) претерпел значительные делеции. Тем не менее у преобладающего числа ис-

следованных рыб (50 отрядов) ген *AqE* сохраняет высокую консервативность и следовательно кодируемый им фермент задействован в пока еще неизвестных метаболических путях [10]. Кроме того, было предположено, что продукт гена *AqE* участвует в анаэробном энергообмене и потеря гена у отдельных животных и растений связана с выходом на сушу и соответствующей перестройкой метаболизма, обусловленной насыщенностью среды кислородом и отсутствием естественной гипоксии, характерной для гидробионтов [9].

Экспериментально показано, что субстратами для СЛДГ бактерий и архей, кодируемой геном *comC*, могут быть сульфолактат, малат и α -кетоглутарат [5]. Некоторые исследователи [6] предполагают, что преобразование сульфолактата в сульфопируват у эукариот не имеет смысла, поскольку отсутствуют соответствующие метаболические процессы. Однако в более ранней работе описано опосредованное МДГ-обратимое превращение сульфопирувата в сульфолактат у мышей при метаболизме цистеата [11]. При этом сульфолактат является конечным метаболитом, преобладающая доля которого выводится из организма с мочой. Только 12% сульфолактата вновь преобразуется в сульфопируват, который затем метаболизируется в таурин и углекислый газ. Другие два субстрата малат и α -кетоглутарат являются ключевыми соединениями в малат-аспартатном челноке [12]. Этот биохимический механизм считается наиболее эффективным процессом, который позволяет водным организмам выживать в условиях гипоксии (аноксии) [1]. В связи с этим были предположения, что продукт гена *AqE* (СЛДГ-подобный белок) может быть вовлечен в малат-аспартатный челнок или сопряженные процессы [10].

Для того чтобы приблизиться к пониманию роли гена *AqE* в метаболизме эукариот мы изучили его транскрипционную активность, а также активность генов, кодирующих ферменты, участвующие в малат-аспартатном челноке и сопряженных процессах. В качестве объекта исследования был выбран большой желтый горбыль (*Larimichthys crocea*) — вид морских рыб из семейства горбылевых (Sciaenidae). Поскольку *L. crocea* является достаточно важным промысловым видом (и поэтому модельным объектом), его геном был секвенирован и аннотирован [13]. Ген *AqE* у *L. crocea* локализован на 21-й хромосоме и включает, как и у большинства костистых рыб, 11 экзонов [10]. В результате более десяти исследований на желтом горбыле для более 200 образцов были получены транскриптомы, которые и были использованы в настоящей работе.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Для исследования дифференциальной экспрессии генов из базы NCBI были выбраны первичные

данные (архивы коротких фрагментов транскриптомов, SRA, sequence read archive), полученные в десяти исследованиях, направленных на изучение влияния гипоксии, голода, температуры и других воздействий на активность генов (табл. 1).

Экспрессию генов количественно оценивали с помощью совместного использования программ Kallisto и Sleuth. Количественная оценка была выполнена с помощью Kallisto (v0.46.1) [14], где на основе метода псевдо-выравнивания коротких фрагментов и транскриптов подсчитывается количество содержания РНК в образце и выражается в величине TPM (транскриптов на миллион пн). Для увеличения достоверности при подсчете было осуществлено 100 повторов (bootstrap 100). Для выравнивания использовалась сборка кДНК транскриптов (TSA) большого желтого горбыля *L. crocea* GBIF000000000. Последующая оценка дифференциальной экспрессии генов была выполнена с использованием пакета Sleuth R (v0.30.0) [15], в котором на основе предварительных количественных оценок, полученных с помощью Kallisto, создается нормализованная на уровне генов матрица TPM. Нормализованные значения были также скорректированы с учетом возможных погрешностей в данных РНК-секвенирования, полученных в результате применения различных методов определения последовательности нуклеотидов.

Для визуализации кластерного анализа использовалась функция `Plot_transcript_heatmap` в программе Sleuth. При построении тепловых карт учитывались данные оценки количественной экспрессии гена *AqE*, маркерных генов (*actb*, *hprt1* и *18S-rRNA*), генов ферментов метаболических путей, в которых предположительно задействован *AqE* (*mdh1*, *mdh2*, *aat1* и *aat2*), и генов ферментов возможных сопряженных процессов (*ldha*, *ldhb*, *ldhc* и *ldhgdh*). Транскрибируемые мРНК перечисленных генов были выявлены в TSA желтого горбыля (GBIF000000000) с помощью tBLASTn (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>). Некоторые гены были представлены в TSA двумя последовательностями (табл. 2).

РЕЗУЛЬТАТЫ

Транскрипционная активность гена *AqE*

В данном исследовании был впервые проведен количественный анализ экспрессии гена *AqE* в различных органах желтого горбыля. Кроме того, была изучена динамика изменения уровня транскрипционной активности *AqE* в отдельных органах после воздействия на желтого горбыля различными стрессирующими факторами (гипоксия, тепловой/холодовой стресс, голодание), а также в ходе раннего развития и в процессе регенерации тканей. Также в анализ были включены маркерные гены (*actb*, *hprt1*, *18S-rRNA*), гены некоторых

Таблица 1. Транскриптомные данные, использованные в работе

Идентификатор исследования в NCBI	Органы	Контрольные точки	Детали эксперимента (на основе данных, представленных в NCBI)
PRJNA246784	Мозг	Контроль, 1 ч, 3 ч, 6 ч, 12 ч, 24 ч, 48 ч	Изучалось влияние гипоксии. Эксперименты проводились при 25°C.
PRJNA574876	Селезенка, надпочечник	Контроль, 6 ч, 24 ч, 48 ч	Содержание кислорода в резервуаре было снижено со 100% (7.8 мг/л) до 20% (1.6 ± 0.2 мг/л) в течение 30 мин.
PRJNA576086	Жабры, сердце	Контроль, 6 ч, 24 ч, 48 ч	В соответствующие временные точки отбирали пробы и секвенировали мРНК. Пол не указан
PRJNA296537	Мышца	Контроль, 21 день	Изучалось влияние голодания. Секвенировали мРНК из двух образцов мышц, взятых у нормально кормящихся рыб и у рыб, подвергшихся 21-дневному голоданию. Пол не указан
PRJNA563184	Печень (1)	Контроль, 6 ч, 24 ч, 48 ч, 96 ч, 120 ч	Изучалось влияние гипоксии. Использовали особей обоего пола
PRJNA280841	Печень (2)	Контроль, 12 ч (тепло), 12 ч (холод), 21 день (голод)	Секвенировали мРНК из четырех образцов (по два повтора), взятых у контрольной группы рыб, у рыб, подвергшихся термическому стрессу (12 ч), у рыб, подвергшихся воздействию холодового стресса (12 ч), и у рыб, подвергшихся 21-дневному голоданию. Пол не указан
PRJNA326556	Печень (3)	Контроль	Секвенировали мРНК печени в нормальных условиях. Пол не указан
PRJNA279244	Печень (4)	Контроль	Секвенировали мРНК печени в нормальных условиях. Объединенные образцы особей обоего пола
PRJNA357970	Эмбрион	1 клетка, 2 клетки, 8 клеток, 16 клеток, 256 клеток, бластула, гастрюла	Секвенировали мРНК из образцов, взятых на различных стадиях раннего развития. Пол не указан
PRJNA303096	Кожа	Контроль, 0.5 ч, 2 ч	Изучение процессов регенерации. Были произведены повреждения кожи брюшной области. В соответствующие временные точки отбирали пробы и секвенировали мРНК. Пол не указан

ферментов малат-аспартатного челнока (*mdh1*, *mdh2*, *aat1*, *aat2*) и гены ферментов возможных сопряженных процессов (*ldha*, *ldhb*, *ldhc* и *l2hgdh*).

В экспрессии гена *AqE* в различных органах выявлена ярко выраженная неоднородность (рис. 1,а). Низкий уровень транскрипционной активности отмечен в мышце, надпочечнике, селезенке, мозге и сердце. Кожа и жабры демонстрируют средний уровень активности гена. В печени (в большинстве

контрольных образцов) выявлен высокий уровень экспрессии (рис. 1,а). Активность в печени после теплового и холодового стресса осталась неизменной, тогда как зафиксировано некоторое снижение экспрессии в результате голодания (рис. 2,з). Также присутствует некоторое снижение уровня экспрессии *AqE* в мышцах после голодания (рис. 2,д). В процессе регенерации кожи явных изменений в активности не было выявлено (рис. 1,е). Замечено усиление транскрипционной активности на

Таблица 2. Соответствие транскриптов и генов, взятых в анализ

Ген	Транскрипты	Ген	Транскрипты
<i>AqE</i>	GBIF01041602	<i>ldha</i>	GBIF01031803
<i>actb</i>	GBIF01031352		GBIF01031802
<i>hprt1</i>	GBIF01037543 GBIF01032011	<i>ldhb</i>	GBIF01048565 GBIF01029835
<i>aat1</i>	GBIF01018893	<i>ldhc</i>	GBIF01007540
<i>aat2</i>	GBIF01033704		GBIF01049052
<i>mdh1</i>	GBIF01032153	<i>l2hgdh</i>	GBIF01044688
<i>mdh2</i>	GBIF01033562		GBIF01044690
<i>18S-rRNA</i>	GBIF01045948		

стадии бластулы и гастролы во время раннего эмбриогенеза (рис. 1,б). Однако из-за отсутствия транскриптомных данных пока невозможно оценить на каком уровне поддерживается экспрессия в ходе последующего развития. При исследовании влияния гипоксии на транскрипционную активность гена *AqE* видима неоднородность выявлена в сердце, надпочечнике, мозге и печени (рис. 2,а). При этом в сердце и надпочечниках показано пиковое повышение экспрессии через 48 и 6 ч после гипоксии соответственно (рис. 2,а). В мозге изменение уровня экспрессии носит волнообразный характер (рис. 2,б) от небольшого повышения (1 ч), последующего снижения (3 ч), очередного повышения (6 и 12 ч) и снижения (24 и 48 ч). В печени выявлено повышение уровня экспрессии после гипоксии относительно контроля, однако в одной точке (24 ч) уровень был снижен практически до нулевого значения (рис. 2,в). В селезенке и жабрах видимых изменений активности гена в результате гипоксии установлено не было (рис. 2,а).

*Транскрипционная активность генов
actb, hprt1 и 18S-rRNA*

Для оценки качества транскриптомов были выбраны гены *actb*, *hprt1* и *18S-rRNA*. Ген *actb* кодирует бета-актин (компонент цитоскелета). Актины участвуют в подвижности, структуре и целостности клеток. Ген *hprt1* кодирует фермент гипоксантингуанинфосфорибозилтрансферазу (фермент пуринового обмена эукариот). Ген *18S-rRNA* кодирует 18S рибосомную РНК, которая является частью эукариотической малой субъединицы рибосомы (40S) и, таким образом, одним из основных компонентов всех эукариотических клеток. Данные гены облигатно экспрессируются практически во всех тканях и поэтому используются в качестве маркеров экспрессии [16, 17].

Количественный анализ транскрипционной активности показал, что уровень экспрессии мар-

керных генов *18S-rRNA* и *actb* во всех органах высокий, вне зависимости от условий и процессов, тогда как ген *hprt1* в большинстве органов и в течение раннего эмбриогенеза экспрессируется на среднем уровне или несколько ниже среднего (рис. 1, 2). В печени уровень экспрессии заметно выше, чем в других исследованных органах (рис. 1,а). Наблюдается неоднородность активности в печени после гипоксии (повышение уровня экспрессии через 6 и 48 ч) (рис. 2,в). Есть заметное повышение активности в мышцах после голодания (рис. 2,д). В общем можно заключить, что все транскриптомы пригодны для анализа дифференциальной экспрессии, а некоторые флуктуации в активности *hprt1* возможно связаны с тканеспецифичностью.

*Транскрипционная активность генов
ферментов малат-аспартатного челнока
mdh1, mdh2, aat1 и aat2*

Гены *mdh1* и *mdh2* кодируют фермент МДГ, который катализирует НАД/НАДН-зависимое обратимое окисление малата до оксалоацетата во многих метаболических путях, включая цикл лимонной кислоты. В эукариотических клетках существуют два основных изофермента: один находится в митохондриальном матриксе (ген *mdh2*), а другой — в цитоплазме (ген *mdh1*). Ген *mdh1* кодирует цитозольный изофермент, который играет ключевую роль в малат-аспартатном челноке и позволяет малату проходить через митохондриальную мембрану и превращаться в оксалоацетат для дальнейших клеточных процессов. Белок, кодируемый геном *mdh2*, локализован в митохондриях, участвует в цикле лимонной кислоты и также может играть ключевую роль в малат-аспартатном челноке [12, 18].

Другие два ключевых гена малат-аспартатного челнока *aat1* и *aat2* кодируют аспаратамино-трансферазу (ААТ), которая катализирует взаимное превращение аспартата и α -кетоглутарата в

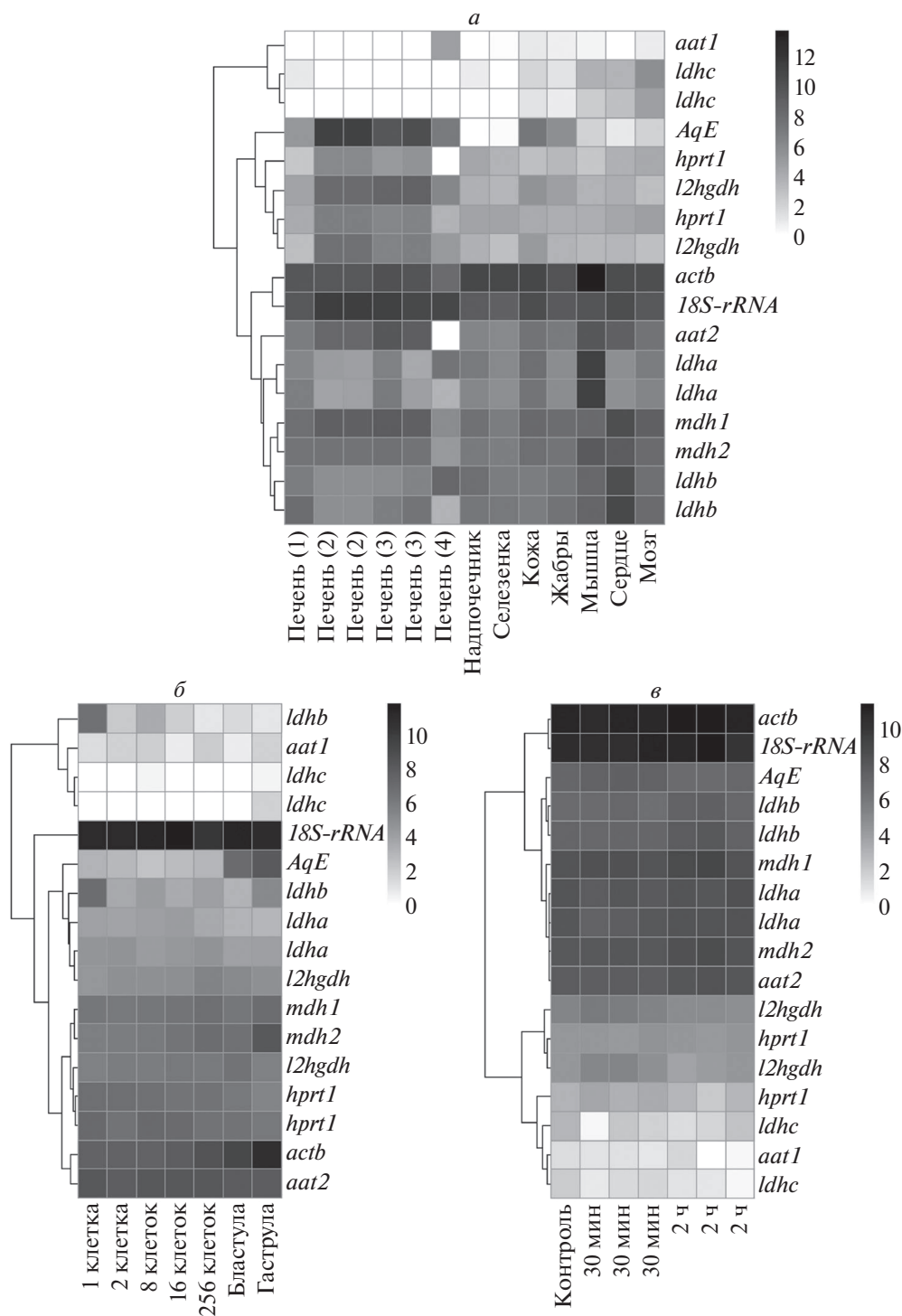


Рис. 1. Дифференциальная экспрессия генов большого желтого горбыля. *a* – активность генов в различных органах горбыля при нормальных условиях (PRJNA574876 (селезенка и надпочечник), PRJNA576086 (жабры и сердце), PRJNA246784 (мозг), PRJNA563184 (печень 1), PRJNA280841 (печень 2), PRJNA326556 (печень 3), PRJNA279244 (печень 4), PRJNA296537 (мышца), PRJNA303096 (кожа)); *б* – активность генов в ходе раннего развития горбыля (PRJNA357970); *в* – активность генов в процессе регенерации кожи горбыля (PRJNA303096).

оксалоацетат и глутамат. Этот фермент имеет решающее значение как для деградации аминокислот, так и для биосинтеза. Известны два изофер-

мента: цитозольный (ген *aat1*) и митохондриальный (ген *aat2*) [19]. Кроме того, известно, что ААТ вместо аспартата в качестве альтернативного суб-

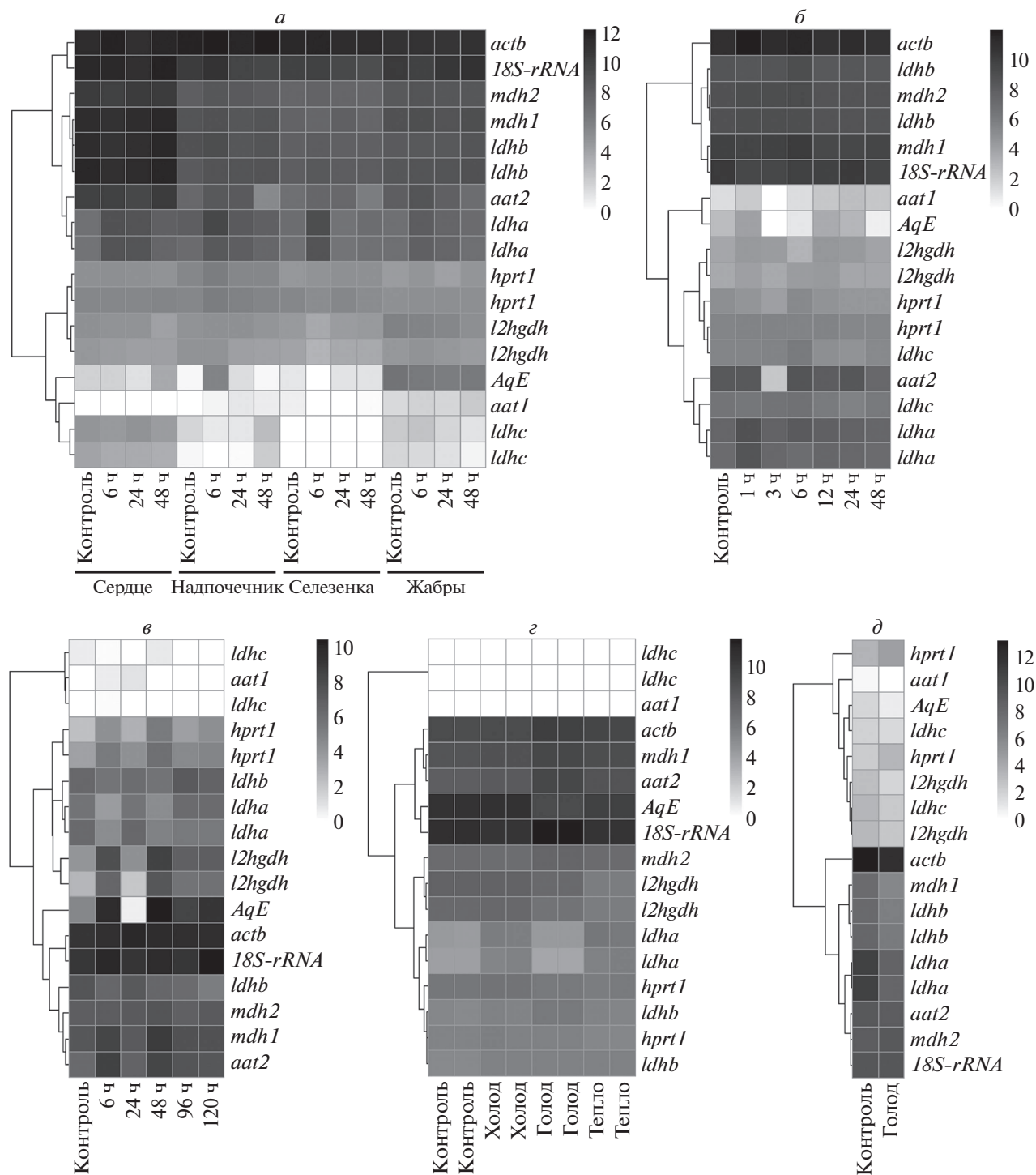


Рис. 2. Дифференциальная экспрессия генов после стрессовой индукции. *а* – активность генов в селезенке, надпочечнике, сердце и жабрах горбыля после 30-минутной гипоксии при комнатной температуре (PRJNA574876, PRJNA576086); *б* – активность генов в мозге горбыля после 30-минутной гипоксии при комнатной температуре (PRJNA246784); *в* – активность генов в печени горбыля (печень 1) после гипоксии (время воздействия не указано) (PRJNA563184); *г* – активность генов в печени горбыля (печень 2) после теплового и холодового стресса, а также 21-дневного голодания (PRJNA280841); *д* – активность генов в мышцах горбыля после 21-дневного голодания (PRJNA296537).

страта может эффективно использовать цистеин, обратимо превращая его в сульфопируват [11].

Активность генов *mdh1* и *mdh2* во всех образцах находится на среднем уровне или выше среднего (рис. 1, 2). В сердце зафиксирован наивысший уровень активности обоих генов (рис. 1,а). В жабрах, коже, мозге, сердце, селезенке и надпочечниках гены экспрессируются синхронно (рис. 1,а). Однако в печени и мышцах наблюдается асимметричная активность: в печени выше уровень экспрессии *mdh1* (цитозольный изофермент), а в мышцах — *mdh2* (митохондриальный изофермент) (рис. 1,а). В раннем развитии выявлено значительное повышение уровня экспрессии *mdh2* на стадии гастролы, тогда как повышение активности *mdh1* на этой стадии менее интенсивное (рис. 1,б). Слабое повышение уровня активности обоих генов зафиксировано в печени после теплового стресса и голодания (рис. 2,з). Заметное повышение уровня экспрессии гена цитозольной малатдегидрогеназы отмечено в печени через 6 и 48 ч после гипоксии (рис. 2,в). В результате голодания снизился уровень активности *mdh1* в мышцах (рис. 2,д).

В экспрессии генов *aat1* и *aat2* наблюдаются значительные отличия. Ген *aat1* в большинстве органов и в течение раннего эмбриогенеза экспрессируется на низком или очень низком уровне (рис. 1, 2). В одном из образцов печени (4) уровень экспрессии находится на среднем уровне (рис. 1,а). Некоторая неоднородность (с тенденцией к повышению уровня экспрессии) наблюдается в печени спустя 6 и 24 ч после гипоксии с последующим возвращением к исходному уровню (рис. 2,в). Кроме того, в мозге выявлено снижение активности через 3 ч после гипоксии и последующее возвращение к исходному уровню (рис. 2,б). Ген *aat2* демонстрирует высокий уровень транскрипционной активности в печени, сердце и мышцах, тогда как в остальных органах экспрессия на среднем уровне (рис. 1,а). В одном из образцов печени (4) активность *aat2* не выявлена (рис. 1,а). Не было отмечено какой-либо динамики в экспрессии гена в ходе раннего развития и в процессе регенерации (рис. 1,б, в). После воздействия гипоксии отмечено снижение уровня экспрессии *aat2* в надпочечниках, селезенке и жабрах по прошествии 48 ч. В сердце изменений отмечено не было. В мозге транскрипционная активность снизилась через 3 ч после гипоксии и затем вновь восстановилась (рис. 2,б). В печени выявлены пиковые повышения уровня экспрессии после гипоксии относительно контроля, в точках 6 и 48 ч (рис. 2,в). Отмечено некоторое снижение уровня активности *aat2* в мышцах после голодания (рис. 2,д). Однако зафиксировано повышение уровня активности после голодания в печени (рис. 2,з).

Транскрипционная активность генов лактатдегидрогеназы и гидроксиглутаратдегидрогеназы

Гены *ldha*, *ldhb* и *ldhc* кодируют различные субъединицы ЛДГ. Этот фермент катализирует превращение лактата в пируват на последней стадии анаэробного гликолиза [20].

Ген *l2hgdh* кодирует L-2-гидроксиглутаратдегидрогеназу (ГДГ), FAD-зависимый фермент, который окисляет L-2-гидроксиглутарат до α -кетоглутарата в различных тканях. L-2-гидроксиглутарат образуется из α -кетоглутарата в результате неспецифического действия МДГ и соответственно ГДГ превращает бесполезный продукт обратно в ключевой метаболит цикла Кребса [21].

Активность генов, кодирующих субъединицы А, В и С фермента ЛДГ (*ldha*, *ldhb* и *ldhc* соответственно), имела различия как в зависимости от органов, так и от условий. Высокий уровень экспрессии *ldha* отмечен в мышцах. В надпочечниках, мозге, коже, жабрах выявлена средняя активность гена *ldha*, тогда как в селезенке и сердце ниже среднего (рис. 1,а). *ldhb* экспрессируется на высоком уровне в сердце, тогда как в надпочечниках, мозге, коже, жабрах, селезенке, печени и мышцах выявлена средняя активность гена. Активность гена субъединицы С заметно отличается. Средний уровень экспрессии *ldhc* зафиксирован в мозге, тогда как в мышцах и сердце ген экспрессируется на уровне ниже среднего, а в остальных органах активность очень низкая или отсутствует (рис. 1,а). Среди разных образцов печени наблюдается неоднородность уровня экспрессии как *ldha*, так и *ldhb*. В ходе раннего развития активность генов ЛДГ также имеет различия (рис. 1,б). Есть неоднородность в активности *ldha* в ходе раннего развития, однако явной закономерности не установлено. При этом экспрессия была на среднем уровне. Активность *ldhb* на стадии одной клетки заметно выше, чем на всех последующих исследованных стадиях. У гена *ldhc* отмечено повышение уровня экспрессии на стадии гастролы. Изучение активности *ldha*, *ldhb* и *ldhc* после индукции регенеративных процессов в коже не выявило какой-либо существенной динамики (рис. 1,в).

При исследовании гипоксии выявлено повышение уровня транскрипционной активности *ldha* в сердце, надпочечниках, селезенке и жабрах (рис. 2,а). При этом в селезенке происходит возврат к исходному уровню уже к 24 ч, тогда как в сердце, надпочечниках и жабрах снижение более плавное. В мозге наблюдается точечное повышение экспрессии *ldha* через 1 ч после воздействия (рис. 2,б). Явного изменения уровня транскрипционной активности гена субъединицы В после гипоксии отмечено не было во всех органах (рис. 2,а, б). Ответ активности *ldhc* на гипоксию зафиксирован только в надпочечниках (увеличение уровня

активности через 48 ч) и в жабрах (снижение через 48 ч). Активность генов *ldha*, *ldhb* и *ldhc* в печени после гипоксии имела неоднозначный волнообразный характер (рис. 2,в). Кроме того, в печени установлено повышение уровня экспрессии *ldha* в результате холодового и теплового стресса (рис. 2,з). Воздействие голода вызвало некоторое повышение активности *ldhb*. Влияние голода, а также теплового и холодового стресса на активность в печени гена *ldhc* не выявлено. Однако голодание вызвало снижение уровня экспрессии всех трех генов ЛДГ в мышце (рис. 3,д).

В надпочечниках, мозге, коже, жабрах, селезенке, сердце и мышцах выявлена средняя активность гена *l2hgdh*, тогда как в печени уровень экспрессии выше среднего (рис. 1,а). В ходе эмбриогенеза замечено некоторое возрастание транскрипционной активности (рис. 1,б), также выявлены повышение уровня экспрессии через 30 мин после индукции регенеративных процессов в коже и последующий возврат к контрольным значениям через 2 ч (рис. 1,в). Изучение влияния гипоксии не выявило очевидных изменений уровня активности *l2hgdh* ни в одном из исследуемых органов, за исключением печени (рис. 2,а, в). В печени наблюдается точечное повышение активности через 6 и 48 ч после воздействия. Кроме того, в печени выявлено снижение уровня экспрессии *l2hgdh* при тепловом стрессе (рис. 2,з).

ОБСУЖДЕНИЕ

При сопоставлении результатов количественной оценки транскрипционной активности мы выявили коэкспрессию гена *AqE* с *mdh2* (повышение уровня в ходе раннего развития), с генами *aat1* и *aat2* (снижение активности в мозге через 3 ч после гипоксии и снижение активности в мышце в результате голодания). Дифференциальная экспрессия отмечена в печени, где в результате голодания уровень активности *AqE* снизился, тогда как уровень *aat2* и *mdh2* вырос.

Вызывают недоверие результаты анализа экспрессии в печени после воздействия гипоксии. Создается впечатление, что образцы были перепутаны, вследствие чего возник представленный на рис. 2,в мозаичный профиль экспрессии практически всех генов. Если бы такое явление было выявлено у одного гена, то его можно было бы отнести к особенностям транскрипционной активности, но в данном случае возникает подозрение на некорректность представленных образцов.

Поскольку белок СЛДГ, кодируемый геном *comC* архей, помимо сульфолактата может использоваться в качестве субстрата малат и α -кетоглутарат, есть гипотеза, что продукт гена *AqE* может быть включен в малат-аспартатный челнок [10]. Малат-аспартатный челнок, в котором ключевыми соеди-

нениями являются малат и α -кетоглутарат, принято считать наиболее эффективным процессом, позволяющим водным организмам выживать в условиях гипоксии (аноксии) [1].

МДГ катализирует обратимое окисление малата до оксалацетата, последней стадии цикла трикарбоновых кислот [22], а также участвует в глюконеогенезе и липогенезе и участвует в аэробном гликолизе в малат-аспартатном челноке [23]. Ключевым компонентом цикла трикарбоновых кислот является митохондриальная МДГ [24]. Другой компонент малат-аспартатного челнока это ААТ — фермент, переносящий аминокислоты, который используется для оценки стрессовой реакции, вызванной изменением температуры, низким содержанием кислорода, рН, аммиаком или тяжелыми металлами [25]. Более того, ААТ связывает метаболизм углеводов с метаболизмом аминокислот. У рыб аминокислоты представляют собой один из основных субстратов для производства энергии, который они получают либо с пищей, либо в результате распада тканевых белков [26]. Белки также могут стать источником энергии в стрессовых условиях, предоставляя аминокислоты, которые могут служить глюконеогенетическими или кетогенными предшественниками. Трансаминирование или дезаминирование аминокислот облегчает глюконеогенный путь. Производство энергии из промежуточных продуктов трансаминирования и дезаминирования происходит либо через цикл Кребса, либо через окисление [27].

Таким образом, если продукт гена *AqE* участвует в малат-аспартатном челноке, как альтернатива МДГ, то его экспрессия должна быть согласована с экспрессией генов других компонентов системы. В настоящем исследовании мы наблюдаем сопряженное изменение активности генов лишь в нескольких случаях. Так, например, выявлено синхронное повышение уровня активности генов *AqE* и *mdh2* в ходе раннего развития, отмечено снижение активности *AqE*, *aat1* и *aat2* в мозге через 3 ч после гипоксии и в мышце в результате голодания. Однако отмечено разнонаправленное изменение экспрессии в печени, где в результате голодания уровень активности *AqE* снизился, тогда как уровень *aat2* и *mdh2* вырос. Следовательно, участие в малат-аспартатном челноке вызывает сомнения.

Малат-аспартатный челнок считается основным путем окисления NADH в тканях млекопитающих, таких как печень и сердце [12]. Высокая транскрипционная активность *aat2* в печени и сердце согласуется с этим фактом. Однако установленная нами тканеспецифичность экспрессии гена *AqE* также ставит под сомнение участие этого фермента в малат-аспартатном челноке. Уровень активности *AqE* высок в печени, жабрах и коже, тогда как в других тканях он низкий. Жаб-

ры и кожа рыб участвуют в дыхании. Однако помимо этого кожа и жабры обладают выделительной функцией, кроме того, постоянно соприкасаются с внешней средой и имеют системы защиты от внешних химических воздействий. Также и у печени одной из важных функций является детоксикация организма [28, 29]. Поэтому вполне вероятно, что функция белка, кодируемого *AqE*, связана с выведением продуктов метаболизма. Если фермент рыб, подобно СЛДГ архей, преобразует сульфопируват в сульфолактат, а у эукариотических организмов нет известных метаболических процессов использования сульфолактата [6], то, возможно, он выводится из организма как конечный продукт.

Работа проведена в рамках Государственного задания ФИЦ ИнБЮМ “Функциональные, метаболические и токсикологические аспекты существования гидробионтов и их популяций в биотопах с различным физико-химическим режимом”, номер гос. регистрации 121041400077-1 и при финансовой поддержке РФФИ и города Севастополя в рамках научного проекта № 20-44-920006.

Все применимые международные, национальные и/или институциональные принципы ухода и использования животных были соблюдены.

Авторы заявляют, что у них нет конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Hochachka P.W., Somero G.N. Biochemical adaptation: mechanisms and process of physiological evolution // N.Y.: Oxford University Press, 2002.
2. Madern D. Molecular evolution within the L-malate and L-lactate dehydrogenase super-family // J. Mol. Evol. 2002. V. 54. № 6. P. 825–840. <https://doi.org/10.1007/s00239-001-0088-8>
3. Honka E., Fabry S., Niemann T. et al. Properties and primary structure of the L-malate dehydrogenase from the extremely thermophilic archaeobacterium *Methanothermobacter fervidus* // Eur. J. Biochem. 1990. V. 188. № 3. P. 623–632. <https://doi.org/10.1111/j.1432-1033.1990.tb15443.x>
4. Jendrossek D., Kratzin H.D., Steinbüchel A. The *Alcaligenes eutrophus* *ldh* structural gene encodes a novel type of lactate dehydrogenase // FEMS Microbiol. Lett. 1993. V. 112. № 2. P. 229–235. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.1993.tb06453.x>
5. Muramatsu H., Mihara H., Goto M. et al. A new family of NAD(P)H-dependent oxidoreductases distinct from conventional Rossmann-fold proteins // J. Biosci. Bioeng. 2005. V. 99. № 6. P. 541–547. <https://doi.org/10.1263/jbb.99.541>
6. Irimia A., Madern D., Zaccari G., Vellieux F.M. Methanobacterial sulfolactate dehydrogenase: prototype of a new family of NADH-dependent enzymes // EMBO J. 2004. V. 23. № 6. P. 1234–1244. <https://doi.org/10.1038/sj.emboj.7600147>
7. Denger K., Cook A.M. Racemase activity effected by two dehydrogenases in sulfolactate degradation by *Chromohalobacter salexigens*: purification of (S)-sulfolactate dehydrogenase // Microbiology (Reading). 2010. V. 156. № 3. P. 967–974. <https://doi.org/10.1099/mic.0.034736-0>
8. Zhang Y., Schofield L.R., Sang C. et al. Expression, purification, and characterization of (R)-sulfolactate dehydrogenase (ComC) from the rumen methanogen *Methanobrevibacter millerae* SM9 // Archaea. 2017. 5793620. <https://doi.org/10.1155/2017/5793620>
9. Puzakova L.V., Puzakov M.V., Soldatov A.A. Gene encoding a novel enzyme of LDH2/MDH2 family is lost in plant and animal genomes during transition to land // J. Mol. Evol. 2019. V. 87. № 1. P. 52–59. <https://doi.org/10.1007/s00239-018-9884-2>
10. Puzakova L.V., Puzakov M.V., Gostyukhina O.L. Newly discovered *AqE* gene is highly conserved in non-tetrapod vertebrates // J. Mol. Evol. 2021. V. 89. № 4–5. P. 214–224. <https://doi.org/10.1007/s00239-021-09997-x>
11. Weinstein C.L., Griffith O.W. Cysteinesulfonate and beta-sulfo-pyruvate metabolism. Partitioning between decarboxylation, transamination, and reduction pathways // J. Biol. Chem. 1988. V. 263. № 8. P. 3735–3743.
12. Borst P. The malate-aspartate shuttle (Borst cycle): How it started and developed into a major metabolic pathway // IUBMB Life. 2020. V. 72. № 11. P. 2241–2259. <https://doi.org/10.1002/iub.2367>
13. Wu C., Zhang D., Kan M. et al. The draft genome of the large yellow croaker reveals well-developed innate immunity // Nat. Communications. 2014. V. 5. P. 5227. <https://doi.org/10.1038/ncomms6227>
14. Bray N.L., Pimentel H., Melsted P., Pachter L. Near-optimal probabilistic RNA-seq quantification // Nat. Biotechnol. 2016. V. 34. № 5. P. 525–527. <https://doi.org/10.1038/nbt.3519>
15. Pimentel H., Bray N.L., Puente S. et al. Differential analysis of RNA-seq incorporating quantification uncertainty // Nat. Methods. 2017. V. 14. № 7. P. 687–690. <https://doi.org/10.1038/nmeth.4324>
16. Kessler Y., Helfer-Hungerbuehler A.K., Cattori V. et al. Quantitative TaqMan real-time PCR assays for gene expression normalisation in feline tissues // BMC Mol. Biol. 2009. V. 10. P. 106. <https://doi.org/10.1186/1471-2199-10-106>
17. Leal M.F., Astur D.C., Debieux P. et al. Identification of suitable reference genes for investigating gene expression in anterior cruciate ligament injury by using reverse transcription-quantitative PCR // PLoS One. 2015. V. 10. № 7. P. e0133323. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0133323>
18. Minárik P., Tomášková N., Kollárová M., Antalík M. Malate dehydrogenases—structure and function // Gen. Physiol. Biophys. 2002. V. 21. № 3. P. 257–265.
19. Otto-Ślusarczyk D., Graboń W., Mielczarek-Pruta M. Aminotransferaza asparaginianowa—kluczowy enzym w metabolizmie ogólnoustrojowym człowieka [Aspartate aminotransferase—key enzyme in the human sys-

- temic metabolism] // Postepy Hig. Med. Dosw. (On-line). 2016. V. 70. P. 219–230.
<https://doi.org/10.5604/17322693.1197373>
20. Laganá G., Barreca D., Calderaro A., Bellocco E. Lactate dehydrogenase inhibition: biochemical relevance and therapeutical potential // Curr. Med. Chem. 2019. V. 26. № 18. P. 3242–3252.
<https://doi.org/10.2174/0929867324666170209103444>
 21. Steenweg M.E., Jakobs C., Errami A. et al. An overview of L-2-hydroxyglutarate dehydrogenase gene (L2HGDH) variants: a genotype-phenotype study // Hum. Mutat. 2010. V. 31. № 4. P. 380–390.
<https://doi.org/10.1002/humu.21197>
 22. Musrati R.A., Kollárová M., Mernik N., Mikulášová D. Malate dehydrogenase: distribution, function and properties // Gen. Physiol. Biophys. 1998. V. 17. № 3. P. 193–210.
 23. Mitrakou A. Kidney: Its impact on glucose homeostasis and hormonal regulation // Diabetes Res. Clin. Pract. 2011. V. 93. Suppl. 1. P. S66–S72.
[https://doi.org/10.1016/S0168-8227\(11\)70016-X](https://doi.org/10.1016/S0168-8227(11)70016-X)
 24. Walsh K., Koshland D.E., Jr. Determination of flux through the branch point of two metabolic cycles. The tricarboxylic acid cycle and the glyoxylate shunt // J. Biol. Chem. 1984. V. 259. № 15. P. 9646–9654.
 25. Pan Y., Chen H., Siu F., Kilberg M.S. Amino acid deprivation and endoplasmic reticulum stress induce expression of multiple activating transcription factor-3 mRNA species that, when overexpressed in HepG2 cells, modulate transcription by the human asparagine synthetase promoter // J. Biol. Chem. 2003. V. 278. № 40. P. 38402–38412.
<https://doi.org/10.1074/jbc.M304574200>
 26. Bever K., Chenoweth M., Dunn A. Amino acid gluconeogenesis and glucose turnover in kelp bass (*Paralabrax* sp.) // Am. J. Physiol. 1981. V. 240. № 3. P. 246–252.
<https://doi.org/10.1152/ajpregu.1981.240.3.R246>
 27. Kumar V., Sahu N.P., Pal A.K. Modulation of key enzymes of glycolysis, gluconeogenesis, amino acid catabolism, and TCA cycle of the tropical freshwater fish *Labeo rohita* fed gelatinized and non-gelatinized starch diet // Fish Physiol. Biochem. 2010. V. 36. № 3. P. 491–499.
<https://doi.org/10.1007/s10695-009-9319-5>
 28. Арцимович Н.Г., Настоящая Н.Н., Казанский Д.Б., Ломакин М.С. Печень как орган иммунобиологической системы гомеостаза // Успехи соврем. биологии. 1992. Т. 112. Вып. 1. С. 116–124.
 29. Земков Г.В., Журавлева Г.Ф. Кинетика патологических изменений при кумулятивном токсикозе в организме как критерий сопротивляемости популяции рыб // Успехи соврем. естествознания. 2004. № 1. С. 41–47.

Tissue Specificity of the *AqE* Gene Activity in the Yellow Croaker *Larimichthys crocea*

L. V. Puzakova^a, * and M. V. Puzakov^a

^aKovalevsky Institute of Biology of the Southern Seas of Russian Academy of Sciences, Sevastopol, 299011 Russia

*e-mail: kvluda@yandex.ru

The study of the diversity of metabolic pathways is an important aspect for understanding the evolutionary relationships between metabolic pathways and their biochemical precursors. Recently, a sulfolactate dehydrogenase-like protein encoded in eukaryotes by the *AqE* gene, which remains highly conserved in teleosts, has been described. However, the role of this enzyme in metabolism is still unknown. In this work, we studied the transcriptional activity of the *AqE* gene, as well as other genes associated with energy exchange in the great yellow croaker *Larimichthys crocea*. The quantitative analysis of expression showed the tissue-specificity of the *AqE* gene activity in the yellow croak. The gene is active in the liver, skin, and gills. Based on the analysis of gene expression in various organs and under the influence of stressful conditions, it is assumed that the enzyme encoded by the *AqE* gene is involved in the malate-aspartate shuttle or in the elimination of the final metabolites (sulfolactate) from the organism.

Keywords: sulfolactate dehydrogenase, *AqE*, *Larimichthys crocea*, hypoxia, transcriptional activity.

**ФУНКЦИОНАЛЬНАЯ ЗНАЧИМОСТЬ МОДУЛЯ ТОКСИН–АНТИТОКСИН
Mycolicibacterium smegmatis В УСТОЙЧИВОСТИ К АНТИБИОТИКАМ
И ВОЗДЕЙСТВИЮ ОКИСЛИТЕЛЬНОГО СТРЕССА**© 2022 г. Н. И. Акимова¹ *, О. Б. Беккер¹ **, В. Н. Даниленко¹¹Институт общей генетики им. Н.И. Вавилова Российской академии наук, Москва, 119991 Россия

*e-mail: akimovanata@mail.ru

**e-mail: obbekker@mail.ru

Поступила в редакцию 29.11.2021 г.

После доработки 20.12.2021 г.

Принята к публикации 28.12.2021 г.

Системы токсин–антитоксин широко распространены у бактерий, включая такие патогены как *Mycobacterium tuberculosis*. Возможные функции систем токсин–антитоксин у разных групп бактерий могут быть различными и активно обсуждаются и уточняются в последние годы. Предметом настоящего исследования является изучение функции генов модуля токсин–антитоксин *varBC2* *M. smegmatis*. Были получены и исследованы мутанты *M. smegmatis* с делецией модуля *varBC2* и штамм с дополнительной копией гена токсина. Было показано, что экспрессия дополнительной копии гена токсина приводила к замедлению скорости роста, но не ингибировала его полностью. Эти данные могут указывать на слабую РНКазную активность токсина. Обнаружено, что введение дополнительной копии гена токсина приводит к повышению чувствительности *M. smegmatis* к воздействию окислительного стресса. Инактивация модуля *varBC2* приводила к увеличению чувствительности к канамицину. Введение дополнительной копии гена токсина с использованием интегративного вектора pKW08-MCS-Int приводило к повышению чувствительности к канамицину, тетрациклину и эритромицину. Определение точного механизма участия модуля *varBC2* в природной лекарственной устойчивости/чувствительности является предметом наших дальнейших исследований.

Ключевые слова: *Mycolicibacterium smegmatis*, *Mycobacterium tuberculosis*, системы токсин–антитоксин, устойчивость к антибиотикам, окислительный стресс.

DOI: 10.31857/S0016675822050022

Системы токсин–антитоксин (ТА) представляют собой оперон, состоящий, как правило, из двух генов, один из которых кодирует токсин, а другой – его антагонист, антитоксин [1, 2]. Токсин характеризуется высокой стабильностью, в отличие от антитоксина, который лабилен и быстро разрушается при стрессовых воздействиях [3].

Системы токсин–антитоксин обнаружены в геномах большинства видов бактерий и архей [4, 5]. В зависимости от механизма взаимодействия токсина и антитоксина системы токсин–антитоксин делятся на восемь типов [6, 7]. Наиболее распространенными и хорошо изученными являются системы токсин–антитоксин II типа, у которых взаимодействующие токсин и антитоксин – белки [5]. Системы токсин–антитоксин играют важную роль в регуляции роста и деления бактериальных клеток [4, 8]. В нормальных условиях роста антитоксин подавляет активность токсина путем формирования с ним комплекса [9]. При стрессовых воздействиях активируются клеточ-

ные протеазы, которые расщепляют белок антитоксина, что приводит к высвобождению и последующей активации токсина [10]. Активный токсин способен воздействовать на различные клеточные процессы, среди которых – репликация, транскрипция, трансляция, синтез клеточной стенки [3] и деление клетки [2].

Активация систем ТА при воздействии стрессовых факторов среды может привести к переходу бактерий из активной фазы роста в дормантное (покоящееся) состояние, для которого характерно выраженное замедление метаболических процессов, а также практически полное прекращение клеточных делений [11–13]. В таком состоянии бактериальные клетки становятся невосприимчивыми (толерантными) к действию большинства известных антимикробных агентов [14]. Это является причиной возникновения персистирующих форм патогенных бактерий, которые при прекращении стрессовых воздействий способны вернуться в метаболически активное состояние, что приведет

к реактивации заболевания [15]. Однако чрезмерная активация систем токсин–антитоксин может привести к накоплению высоких концентраций токсина и, как следствие, к гибели бактериальной клетки [7]. В связи с этим системы токсин–антитоксин рассматриваются в качестве одной из наиболее перспективных биомошеней [16]. Системы токсин–антитоксин участвуют в формировании природной лекарственной устойчивости [10]. Кроме того, системы ТА участвуют в формировании приобретенной лекарственной устойчивости у патогенных бактерий [2]. Также системы токсин–антитоксин могут быть ассоциированы с шаперонами. Существуют трехкомпонентные системы токсин–антитоксин, содержащие шаперон, который связывается с антитоксином и защищает его от деградации в условиях стресса [17]. В некоторых системах токсин–антитоксин с шапероном взаимодействует токсин [18].

В геномах различных видов бактерий и архей содержится разное число генов, кодирующих системы токсин–антитоксин [2]. Наибольшее число модулей зафиксировано в геноме *M. tuberculosis* – 88 [19]. У *M. smegmatis* – модельного объекта для изучения молекулярной генетики возбудителя туберкулеза *M. tuberculosis* – обнаружено пять пар систем токсин–антитоксин II типа. Одна из них – MsmeG_6760–6762 (VarBC2) была впервые описана в 2016 г. Vajaj et al. [20]. Исследователями были проведены биоинформатический и рентгеноструктурный анализы белка токсина (MsmeG_6760, или VarC2) [20]. Система токсин–антитоксин VarBC2 является вторым представителем семейства VarBC у *M. smegmatis* с биоинформатически предсказанной функцией и составленной методом рентгеноструктурного анализа 3D-модели белка токсина. Интересен тот факт, что помимо свойственного системам VarBC PIN-домена и РНКазной активности VarC2, предположительно, может регулировать активность шаперонного белка DnaK [16]. DnaK – один из главных шаперонных белков микобактерий [21]. Кроме того, было обнаружено, что белки VarC2 и VarB2 *M. smegmatis* являются структурными гомологами белков *M. tuberculosis* – Rv2035 и Rv2034 соответственно. Показано, что гомолог антитоксина – Rv2034 активирует экспрессию оперона *dosR*, который индуцирует переход бактерии в состояние покоя (ключевой регулятор адаптации *M. tuberculosis* к гипоксии при нахождении бактерий внутри макрофагов). Поэтому наиболее высокие уровни экспрессии оперона *Rv2034–Rv2035* отмечаются у антибиотико-резистентных персистирующих бактерий *M. tuberculosis* [22]. В связи с вышеперечисленными особенностями данная система токсин–антитоксин *M. smegmatis* представляет особый интерес для изучения и понимания возможных механизмов, лежащих в основе формирования лекарственной устойчивости и толерант-

ности. В настоящей статье обсуждается предполагаемая роль системы токсин–антитоксин VarBC2 *M. smegmatis* как компонента системы природной лекарственной устойчивости, а также роль модуля *varBC2* в ответе на окислительный стресс.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Штаммы бактерий и условия инкубации

Клетки *E. coli* DH5α [23] выращивали в жидкой среде Лурия Бертани (LB) при 37°C с перемешиванием (200 rpm) и на агаризованной среде LB (Amresco). Твердая среда содержала 2% агара. Клетки *M. smegmatis* штамм mc2155 [24] выращивали в жидкой среде Middlebrook 7H9 (Himedia) с добавлением OADC (олеиновая кислота, альбумин, декстроза, каталаза), 0.05% Tween 80, 0.4% глицерина в жидкой среде Lemco-Tween. Состав среды Lemco-Tween (на 1 л): 5 г пептона (Oxoid), 5 г LabLemco (Oxoid), 5 г NaCl, 0.05% Tween 80. Для проведения окислительного стресса в среду добавляли перекись водорода (H₂O₂) до достижения конечной концентрации 0.5 мМ. Трансформантов *M. smegmatis* выращивали при 37°C. Селективные среды содержали канамицин (50 мкг/мл для *E. coli*, 20 мкг/мл для *M. smegmatis*), гиромидин (200 мкг/мл для *E. coli*, 50 мкг/мл для *M. smegmatis*), X-gal (50 мкг/мл для *E. coli* и *M. smegmatis*), 10%-ный раствор сахарозы.

Получение мутанта *M. smegmatis*, несущего делецию модуля *varBC2*

Для получения конструкции с модулем *varBC2* и фланкирующим его участком длиной около 1000 пн, геномная ДНК *M. smegmatis* mc²155 была амплифицирована по праймерам MSMEG_6760–62 nF и MSMEG_6760–62 del R (левое плечо) и по праймерам MSMEG_6760–62 del F и MSMEG_6760–62 nR (правое плечо). Праймеры MSMEG_6760–62 del F и MSMEG_6760–62 del R содержат участки, перекрывающиеся друг с другом, длиной 18 пн (см. табл. 1).

Полученные фрагменты (левое и правое плечи) использовали во втором этапе амплификации с праймерами MSMEG_6760–62 nF и MSMEG_6760–62 nR для получения ПЦР-продукта, содержащего фланкирующие участки и модуль *varBC2*, в котором 60% генов делетированы. Столь протяженная делеция приводит к тому, что неизменным остается лишь небольшой участок с N-конца антитоксина (24 аминокислоты), в состав которого не входят функционально значимые домены. Кроме того, делеция приводит к сдвигу рамки считывания, в результате которого образуется стоп-кодон, что приводит к преждевременной терминации синтеза белка, синтезируемого по остатку нуклеотидной

Таблица 1. Олигонуклеотиды, использованные в работе

Праймеры	Название	5'–3'-последовательность
Использованные для клонирования	MSMEG_6760 F	TTT TGA TAT CAT GCC CGT GAC CGA TGT GA
	MSMEG_6760 R	TTT TAA GCT TTC GAT GAT TAC ACC GCG GAC
Использованные для мутагенеза	MSMEG_6760-62 nF	TTT TAA GCT TTG CCC CCG GGA AAA TGG TGG
	MSMEG_6760-62 nR	TTT TGG TAC CCT GGG CCG TGC AAG GAC ACT
	MSMEG_6760-62 del F	CGA CAT CAT GAG AAG TAC GCC GGC TAC
	MSMEG_6760-62 del R	GTA CTT CTC ATG ATG TCG CGC CTC GTG
Использованные для ПЦР в режиме реального времени	polA-F	GGT CTG GTT GAA CGT CGT GTG GAT G
	polA-R	GCT GGA GAT GCC GAA GAC CAA GAA G
	MSMEG_6760-6762 F	GTG ACC GTG ATC GAC GAG GA
	MSMEG_6760-6762 R	CAG CTC GAT GAT TAC ACC GC
	MSMEG_6762 F	TTT TGA TAT CGT ACG TTG TGT GGG TGA CCG
	MSMEG_6762 R	TTT TAA GCT TTT CAC ATC GGT CAC GGG CAT
	MSMEG_6760 F	TTT TGA TAT CAT GCC CGT GAC CGA TGT GA

последовательности гена токсина и к полной замене аминокислот (рис. 1).

Значительную часть составляют несинонимичные замены. Все вышеизложенное приводит к тому, что происходит потеря функциональной активности модуля даже без его полной делеции. Далее была проведена очистка полученного ПЦР-продукта методом вырезания из геля с использованием набора для выделения ДНК из агарозного геля (Евроген). Далее было осуществлено клонирование полученной конструкции в плазмиду p2NIL по сайтам рестрикции *KpnI* и *HindIII* (Fast digest, Thermo Scientific, США). Для наработки полученной конструкции осуществляли трансформацию компетентных клеток *E. coli* (как уже было описано ранее) с последующим выделением конструкции. Оценка наличия целевой вставки нужной длины проводилась методом ПЦР-скрининга колоний. Далее осуществлялось выделение целевой конструкции с помощью набора для выделения плазмидной ДНК (Евроген). После этого обрабатывали рестриктазой *PacI* (Thermo Scientific) полученную конструкцию и плазмиду pGOAL19. Данный этап необходим для вырезания из pGOAL19 дополнительного селективного маркера: кассеты устойчивости к гиромизину длиной 2500 пн. Далее с помощью Т4-ДНК-лигазы (Thermo Scientific) осуществлялось лигирование маркерной кассеты, состоящей из гена устойчивости к гиромизину (*hygR*), гена чувствительности к сахарозе (*sacB*), гена (*lacZ*) для сине-белой селекции на среде с X-gal, с плазмидой p2NIL, содержащей модуль ТА, несущий делецию. Для наработки полученной конструкции трансформировали компетентные клетки *E. coli* с последующим выделением плазмидной ДНК. Для получения делеционных мутантов осуществляли трансформацию

компетентных клеток *M. smegmatis* mc²155 конструкцией с модулем *varBC2*, несущим делецию. Перед трансформацией конструкцию подвергали УФ-облучению с длиной волны 250 нм в течение 45 с. Данный этап был необходим для получения одноцепочечных разрывов в молекуле ДНК и активации первого акта рекомбинации. Дальнейший отбор трансформантов *M. smegmatis*, несущих делецию, осуществлялся по методике [25].

Клонирование гена токсина *varC2*

Ген токсина *M. smegmatis* *varC2* был амплифицирован с геномной ДНК *M. smegmatis* mc²155 по праймерам, подобранным с помощью primer BLAST (см. табл. 1). Оптимальная температура отжига праймеров была подобрана с помощью градиентной ПЦР на приборе Bio-Rad T100 (США). Для амплификации использовали набор Tersus Plus PCR kit (Евроген). Амплифицированный фрагмент был клонирован в челночный интегративный вектор pKW08-MCS-Int [26, 27] по сайтам рестрикции *EcoRV* и *HindIII* (Fast digest, Thermo Scientific). Векторная плазида pKW08-MCS-Int является модификацией pKW08-Lx, в которую добавлен полилинкер (множественный сайт клонирования). Для лигирования использовали Т4-ДНК-лигазу (Thermo Scientific). Полученными конструкциями трансформировали компетентные клетки *E. coli* по стандартной методике [28]. Данный этап необходим для наработки необходимой конструкции, так как плазида pKW08-MCS-Int малокопийна. Из клеток *E. coli* конструкции со вставкой гена *varC2* выделяли с помощью набора для выделения плазмидной ДНК (Евроген). Полученные конструкции были трансформированы в

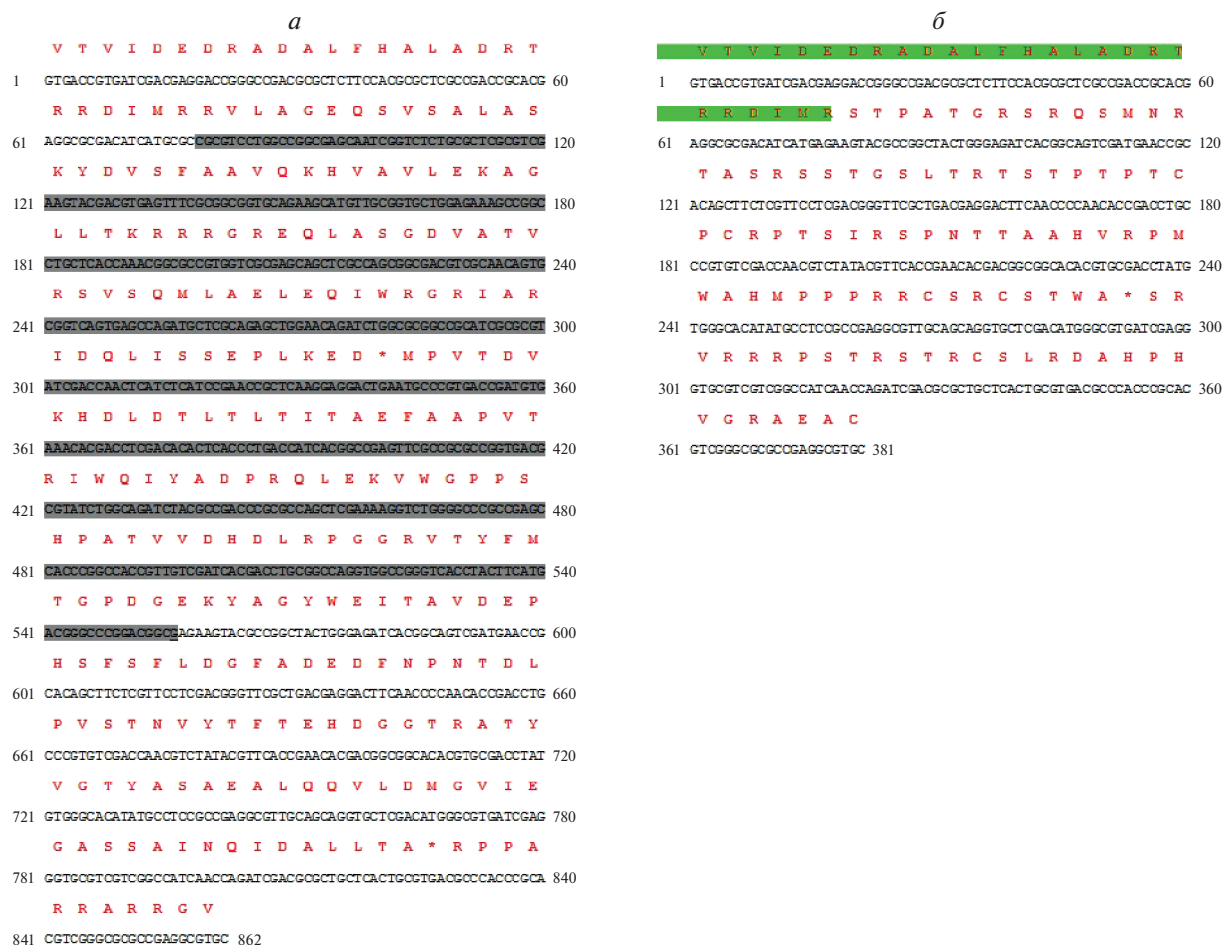


Рис. 1. Нуклеотидная и аминокислотная последовательности модуля *varBC2* *M. smegmatis* до (а) и после (б) внесения делеции. На рис. а цветом выделен делетированный участок, на рис. б цветом выделены аминокислоты, которые сохранились после делеции; аминокислоты, не выделенные цветом, изменились из-за сдвига рамки считывания в результате делеции.

компетентные клетки *M. smegmatis* mc²155 методом электропорации по методике [25].

Проведение транскрипционного анализа модуля *varBC2* *M. smegmatis*

После инкубации клетки *M. smegmatis* осаждали центрифугированием (10 мин, 4000*g, 4°C), добавляли Trizol (Invitrogen) и выделяли РНК по методике [25]. Для удаления контаминирующей геномной ДНК использовали ДНКазу I (TURBO DNA-free™ Kit, Ambion) согласно рекомендациям производителя. Реакцию обратной транскрипции проводили на приборе Thermal Cycler T 100 (Bio-Rad) с использованием набора iScript Select cDNA Synthesis kit, следуя рекомендациям фирмы-производителя. Реакцию амплификации в режиме реального времени осуществляли на приборе Bio-Rad CFX96, применяя набор iTaq Universal SYBR Green Supermix (Bio-Rad) согласно рекомендациям производителя. Была использо-

вана следующая программа амплификации: 95°C – 30 с, далее 40 циклов 95°C – 10 с, 65.2°C – 30 с, затем – градиент температур плавления 65–95°C – 5 с. Праймеры для амплификации в режиме реального времени представлены в табл. 1. В качестве референсного гена для нормализации уровня экспрессии использовали ген *polA* (кодирует ДНК-полимеразу I типа). Все эксперименты проводили в трех независимых повторях. Вычисление относительного нормализованного уровня экспрессии модуля *varBC2* осуществляли по методу $\Delta\Delta C_q$ [29].

Анализ скорости роста *M. smegmatis* в жидкой среде

Для оценки скорости роста все штаммы *M. smegmatis* инкубировали в среде Lemco-Tween до OD₆₀₀ = 1.5–1.8, после чего культуры разбавляли свежей средой Lemco-Tween до OD₆₀₀ ~ 0.05 и инкубировали при 37°C и 250 rpm. В среду добавля-

ли гигромицин (селективный маркер, 50 мкг/мл) и тетрациклин (индуктор транскрипции, 20 нг/мл). Каждые 3 ч осуществляли измерение оптической плотности. Общее время инкубации составляло 60 ч.

Определение минимальной ингибирующей концентрации антибиотиков (МИК)

Оценку величины МИК осуществляли в жидкой среде с использованием 96-луночных планшетов с низкоадгезивным покрытием. Были использованы антибиотики класса аминогликозидов (канамицин), макролидов (эритромицин) и тетрациклинов (тетрациклин). Инкубацию осуществляли до проявления видимого роста культуры. Анализ роста штаммов осуществляли после 24, 48 и 72 ч инкубации. В качестве МИК рассматривалась наименьшая концентрация антибиотика, при которой отсутствовал видимый рост культуры.

Статистическая обработка данных

Статистическую обработку данных проводили с использованием метода ANOVA (дисперсионный анализ). Показаны статистически значимые отличия штаммов с делецией модуля *varBC2* и с дополнительной копией гена *varC2* от штамма дикого типа.

Постановка окислительного стресса

Клетки *M. smegmatis* выращивали в жидкой среде Lemco-Tween-80 до $OD_{600} \sim 1.0$, после чего культуру разбавляли в 100 раз свежей средой Lemco-Tween-80 и инкубировали до $OD_{600} \sim 0.3$. К штаммам *M. smegmatis* добавляли гигромицин (50 мкг/мл) и тетрациклин (20 нг/мл). Затем к культуре клеток *M. smegmatis* добавляли перекись водорода до достижения конечной концентрации 0.5 мМ. В качестве контроля использовали культуру, в которую не добавляли перекись водорода. В работе не были использованы более высокие концентрации перекиси водорода в связи с выраженным бактерицидным эффектом, который наблюдался даже при кратковременной инкубации при добавлении высоких концентраций перекиси водорода. Далее осуществляли инкубацию 37°C и 250 rpm в течение двух часов. Более длительная инкубация не является целесообразной, так как происходит разрушение перекиси водорода. После 15 мин, 1 и 2 ч инкубации осуществляли измерение оптической плотности и отбор проб для приготовления разведений и последующего засева на агаризованную среду M290 для подсчета числа колониеобразующих единиц (КОЕ).

РЕЗУЛЬТАТЫ

*Получение мутантных штаммов *M. smegmatis**

С помощью двустадийного ПЦР-мутагенеза была получена делеция модуля *varBC2*. Далее было проведено получение делеционных мутантов *M. smegmatis* по методике Parish, Brown (2009) [25].

Для получения штамма с дополнительной копией гена токсина ген *varC2* был клонирован в челночный интегративный вектор pKW08-MCS-Int. Таким образом, в исследовании использовали штамм с дополнительной копией гена токсина (2**varC2*), штамм дикого типа с пустой векторной плазмидой (mc²155) и штамм с делецией модуля *varBC2*, несущий пустую плазмиду pKW08-MCS-Int (Δ *varBC2*). Штаммы с пустыми плазмидами использовали для более точного сопоставления результатов.

*Анализ транскрипционной активности генов модуля *varBC2* в полученных штаммах *M. smegmatis* методом ПЦР в реальном времени*

Для того чтобы проверить наличие делеции модуля *varBC2* в штамме Δ *varBC2* *M. smegmatis* и экспрессии дополнительной копии гена токсина в штамме 2**varC2* *M. smegmatis*, методом ПЦР в реальном времени была проанализирована транскрипционная активность генов антитоксина (*varB2*), токсина (*varC2*) и целого модуля *varBC2*. РНК была выделена из штамма дикого типа и штаммов Δ *varBC2* и 2**varC2* на поздней логарифмической стадии роста. Праймеры, использованные для транскрипционного анализа, представлены в табл. 1. Анализ транскрипционной активности генов модуля показал двукратное повышение уровня транскрипции гена *varC2* в штамме 2**varC2* (рис. 2).

Кроме того, было показано отсутствие экспрессии гена токсина в делеционном штамме *M. smegmatis*. Уровни экспрессии гена антитоксина примерно одинаковы в штамме дикого типа и в штамме с дополнительной копией гена токсина. При этом ген антитоксина, так же, как и ген токсина, не экспрессируется в делеционном штамме *M. smegmatis*.

Таким образом, было показано, что дополнительная копия гена токсина экспрессируется в штамме 2**varC2*, однако его экспрессия не влияет на транскрипционную активность гена антитоксина.

*Анализ скорости роста штаммов *M. smegmatis**

Штаммы *M. smegmatis* с делецией модуля *varBC2*, с дополнительной копией гена токсина *varC2* и штамм *M. smegmatis* дикого типа инкубировали в течение 2.5 сут до достижения поздней стационарной стадии роста. Каждые 3 ч осуществляли измерение оптической плотности (OD_{600}). По результа-

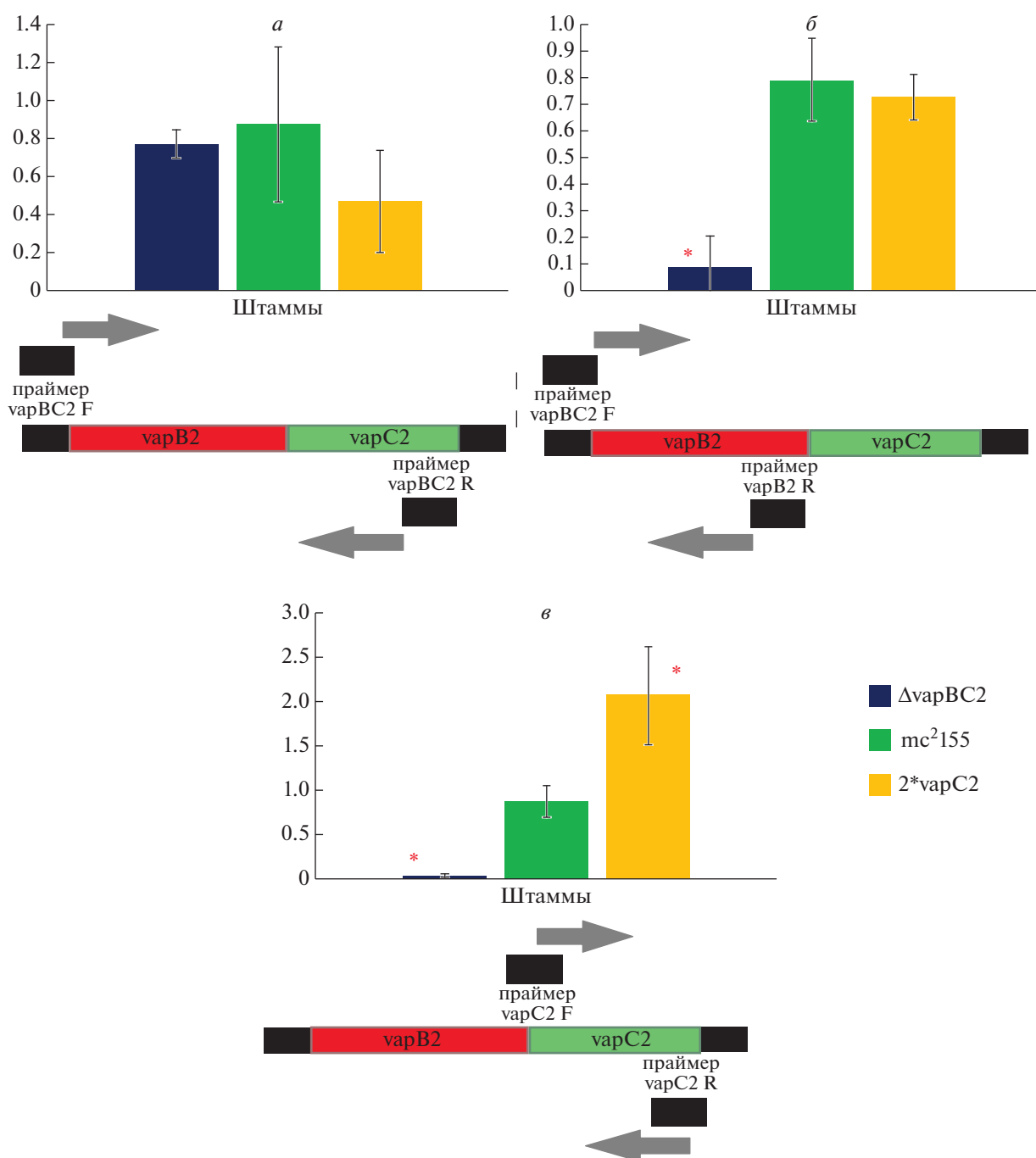


Рис. 2. Экспрессия генов модуля *varBC2* в штаммах *M. smegmatis*. Экспрессия нормализована относительно гена *polA*. На диаграммах представлен относительный уровень экспрессии: *а* – по праймерам к модулю *varBC2*, *б* – по праймерам к гену антитоксина *varB2*, *в* – по праймерам к гену токсина *varC2*. Предел погрешности – стандартное отклонение. * – результаты, статистически достоверно отличающиеся от показателей штамма дикого типа, согласно статистическому критерию ANOVA. Под диаграммами представлены схемы, иллюстрирующие сайты посадки праймеров.

там измерений была построена кривая роста. В качестве контроля использовали штамм дикого типа. Анализ кривых роста показал, что делеция модуля *varBC2* приводила к замедлению роста клеток *M. smegmatis* на поздней логарифмической стадии роста (рис. 3). Статистическая значимость

полученных различий была проверена с помощью критерия ANOVA.

Замедление скорости роста делеционного мутанта в отсутствие стрессовых воздействий в совокупности с наличием экспрессии модуля *varBC2* на поздней логарифмической стадии роста может

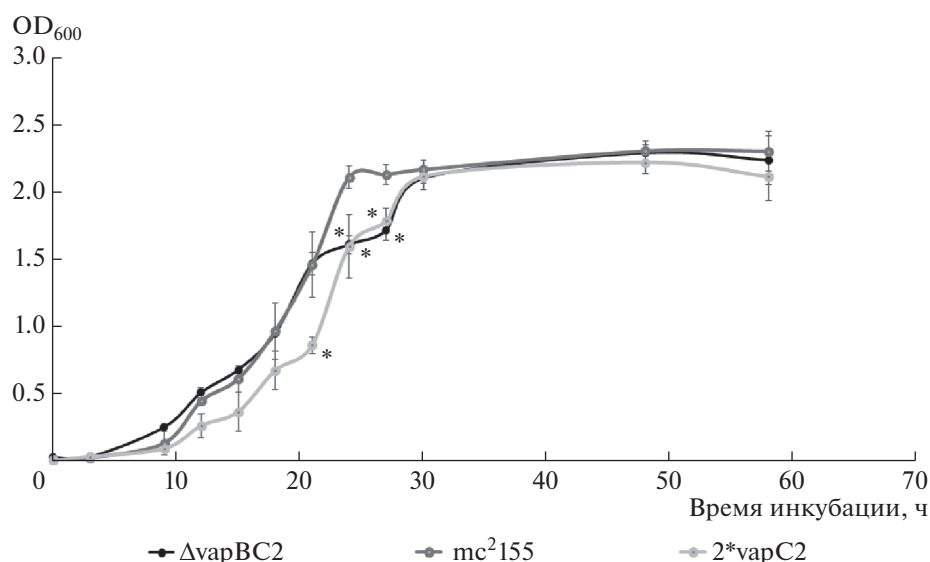


Рис. 3. Кривая роста культуры *M. smegmatis* штамма дикого типа mc^2155 , делеционного мутанта $\Delta vapBC2$ и штамма с дополнительной копией гена $vapC2$ *M. smegmatis*. Предел погрешности — стандартное отклонение. * — статистически достоверные отличия от показателей штамма дикого типа, согласно критерию ANOVA.

указывать на возможное участие данной системы ТА в переходе клеток *M. smegmatis* в стационарную фазу роста. Вставка дополнительной копии гена приводила к замедлению роста, начиная с ранней логарифмической стадии роста до ранней стационарной фазы роста (рис. 3).

Оценка минимальных ингибирующих концентраций антибиотиков (МИК)

Для определения МИК были использованы следующие антибиотики: эритромицин (макролиды), канамицин (аминогликозиды) и тетрациклин (тетрациклины). Как было указано выше, оценка МИК осуществлялась для трех штаммов *M. smegmatis*: mc^2155 , 2^*vapC2 и $\Delta vapBC2$. Штамм дикого типа (mc^2155) использовали в качестве контроля для остальных штаммов. Для определения динамики изменения МИК в процессе инкубации измерение МИК осуществлялось несколько раз: после 24, 48 и 72 ч инкубации (табл. 2).

Анализ полученных данных показал, что делеция модуля $vapBC2$ приводила к снижению МИК канамицина в 1.5 раза, но не влияла на МИК тетрациклина и эритромицина. Экспрессия дополнительной копии гена $vapC2$ приводила к 2–4 кратному снижению МИК эритромицина, канамицина и тетрациклина на протяжении 72 ч инкубации с антибиотиками (табл. 2).

Анализ влияния модуля $vapBC2$ на устойчивость к окислительному стрессу

Измерение оптической плотности культуры *M. smegmatis* после 15 мин, 1 и 2 ч инкубации в присутствии 0.5 мМ перекиси водорода показало отсутствие различий между штаммами с делецией и вставкой дополнительной копии гена токсина относительно контроля на протяжении всего периода инкубации (рис. 4).

Кроме того, отсутствует выраженное снижение оптической плотности культуры на протяжении всего периода инкубации. Таким образом, ни

Таблица 2. Минимальные ингибирующие концентрации антибиотиков (мкг/мл) для штаммов *M. smegmatis* после 24, 48 и 72 ч инкубации

Штамм	После 24 ч			После 48 ч			После 72 ч		
	Ery	Km	Tet	Ery	Km	Tet	Ery	Km	Tet
$\Delta vapBC2$	17.3 ± 4.6	0.07 ± 0.03	0.12 ± 0.03	34.7 ± 4.6	0.12 ± 0.03*	0.13 ± 0.03	34.7 ± 4.6	0.13 ± 0.06	0.13 ± 0.03
mc^2155	16 ± 4	0.12 ± 0.02	0.13 ± 0.06	28 ± 6.9	0.18 ± 0.2	0.13 ± 0.03	32 ± 0.001	0.2 ± 0.001	0.15 ± 0.05
2^*vapC2	7.33 ± 1.15*	0.03 ± 0.01*	0.04 ± 0.01	10 ± 2*	0.05 ± 0.006*	0.05 ± 0.001*	12.7 ± 3.05*	0.05 ± 0.006*	0.08 ± 0.03

Примечание. Ery — эритромицин, Km — канамицин, Tet — тетрациклин. * — статистически достоверные отличия от показателей штамма дикого типа, согласно критерию ANOVA.

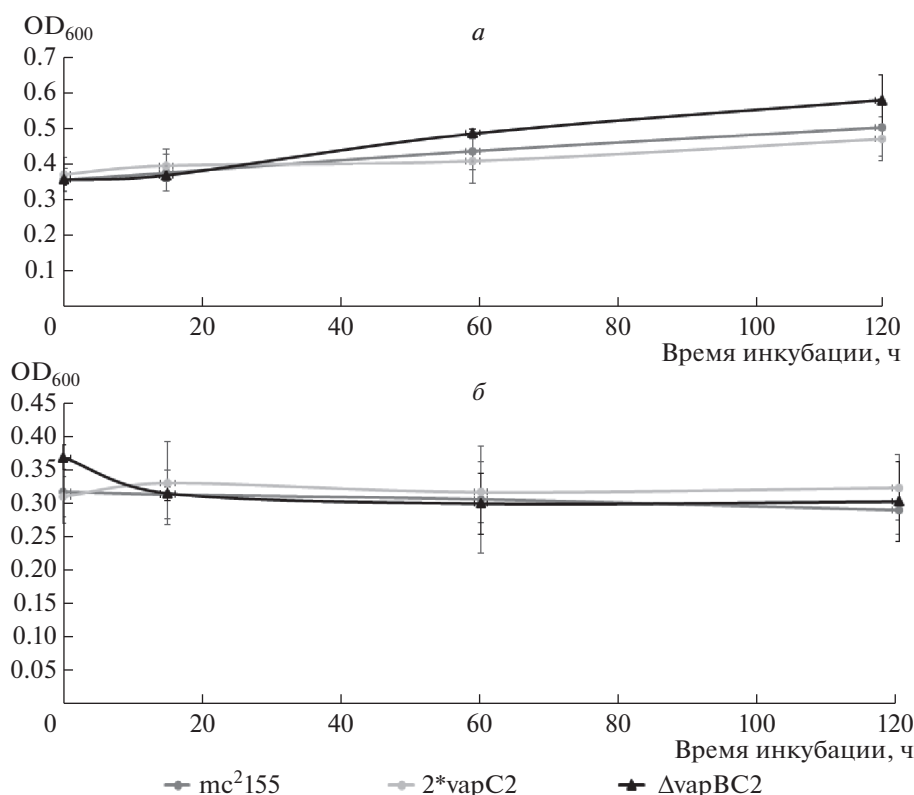


Рис. 4. Динамика изменения оптической плотности штаммов *M. smegmatis* в среде без перекиси водорода (а), в присутствии 0.5 mM перекиси водорода (б). Предел погрешности — стандартное отклонение.

делеция *varBC2*, ни экспрессия дополнительной копии гена *varC2* не влияют на скорость роста культуры *M. smegmatis* в присутствии 0.5 mM H₂O₂.

Анализ выживаемости штаммов *M. smegmatis* в условиях воздействия различных концентраций перекиси водорода показал снижение выживаемости у всех исследуемых штаммов при воздействии окислительного стресса (рис. 5).

Показано, что вставка дополнительной копии гена токсина приводит к повышению чувствительности клеток *M. smegmatis* к воздействию окислительного стресса.

ОБСУЖДЕНИЕ

Одной из хорошо известных функций систем токсин–антитоксин II типа является участие в формировании лекарственной устойчивости. Для исследований в настоящей работе использовали *M. smegmatis* — достаточно популярную суррогатную модель [30] для изучения отдельных проблем молекулярной генетики возбудителя туберкулеза *M. tuberculosis*. *M. smegmatis* содержит только пять модулей токсин–антитоксин, один из которых (*varBC2*) является объектом настоящих исследований. Его гомолог Rv2034-2035 в геноме *M. tu-*

berculosis играет важную роль в персистенции и устойчивости к антибиотикам.

В данной работе введение дополнительной копии гена токсина приводило лишь к замедлению роста при благоприятных условиях, но не к его полному ингибированию. Это может указывать на слабую РНКазную активность токсина, которая была предсказана *in silico* в более ранних работах [20].

Результаты, полученные на штаммах *M. smegmatis* с делецией *varBC2* и с экспрессией дополнительной копии гена *varC2*, позволяют предположить об участии модуля *varBC2* в формировании природной лекарственной устойчивости (чувствительности) *M. smegmatis*. Введение дополнительной копии гена токсина приводило к изменению устойчивости к эритромицину, канамицину и тетрациклину. Схема, описывающая предполагаемые механизмы участия модуля *varBC2* в формировании природной лекарственной устойчивости, представлена на рис. 6.

Природная лекарственная устойчивость обеспечивается за счет сложной сети взаимодействий между белками. Эта сеть включает в себя эффекторные белки, регуляторные белки и индукторы [31]. Одним из важнейших транскрипционных регуляторов является WhiB7. Он активируется в

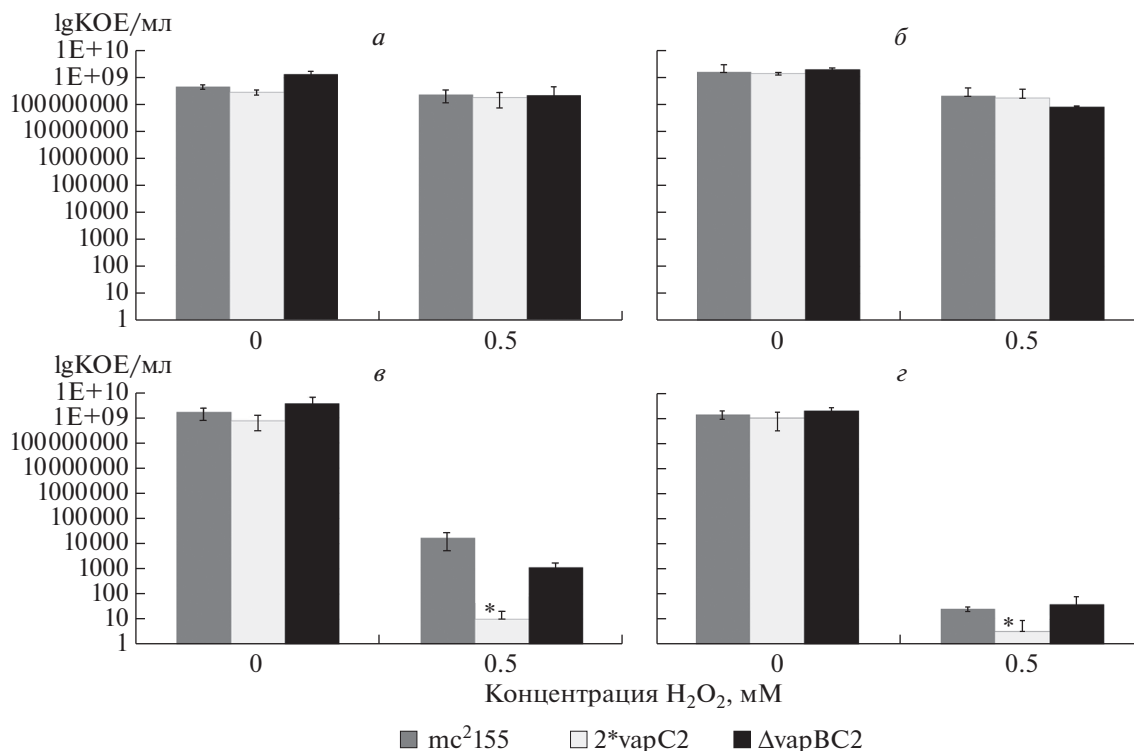


Рис. 5. Число колониеобразующих единиц *M. smegmatis* при инкубации в среде без перекиси водорода и в присутствии 0.5 мМ перекиси водорода в различные периоды инкубации: в начальный момент времени (а), после 15-минутной инкубации (б), после 1 ч инкубации (в), после 2 ч инкубации (г). Предел погрешности — стандартное отклонение. * — статистически достоверные отличия от показателей штамма дикого типа, согласно критерию ANOVA.

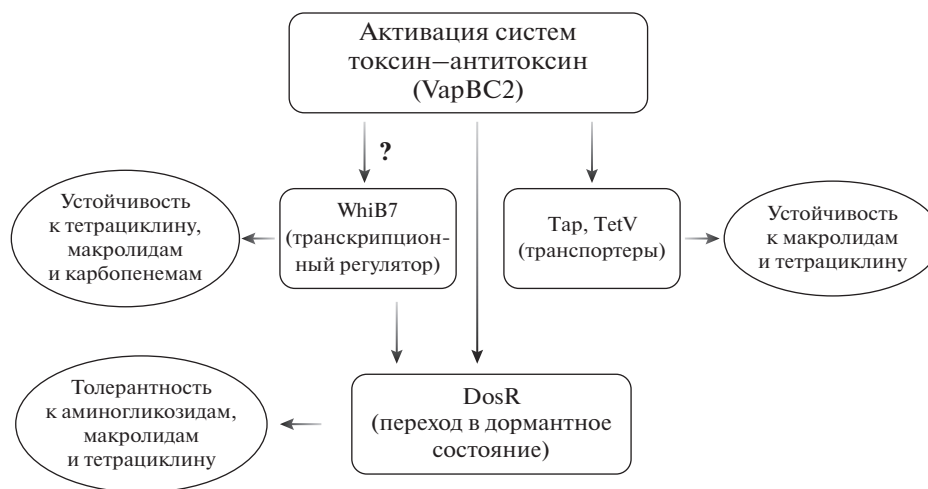


Рис. 6. Предполагаемая роль модуля *varBC2* *M. smegmatis* в природной лекарственной устойчивости.

ответ на стрессовые воздействия различной природы и участвует в регуляции экспрессии различных генов, в числе которых *erm*, *eis*, *tap* и оперон *dosR* [32]. Оперон *dosR* играет важную роль в регуляции перехода клеток в дормантное состояние. В геноме *M. smegmatis* обнаружено 25 гомологов

оперона *dosR* [33]. Существуют различные пути активации этого оперона. В частности, предполагается, что одним из таких активаторов может служить антитоксин VarB2 (у *M. smegmatis*) или его гомолог Rv2035 у *M. tuberculosis*. Учитывая это, на наш взгляд, наиболее вероятным механизмом

влияния *varBC2* является его взаимодействие с системой *dosR*.

На основании анализа доменной структуры белка VarC2 можно предположить наличие взаимодействий между белками VarC2 и DnaK. DnaK является главным шаперонным белком микобактерий, обеспечивающим фолдинг белков в условиях стресса, включая воздействие антибиотиков.

Штамм *M. smegmatis* с дополнительной копией гена токсина становится более чувствительным к трем классам антибиотиков: аминогликозиды (канамицин), тетрациклины (тетрациклин) и макролиды (эритромицин). Такой широкий спектр изменения чувствительности указывает на то, что VarC2, вероятно, взаимодействует с системами транспорта антибиотиков. Наиболее распространенным способом защиты у патогенных микроорганизмов от проникающих внутрь клетки антибиотиков является их обратный транспорт, осуществляемый клеточными транспортерами [31]. В физиологическом отношении функцией этих белков является транспорт нутриентов, метаболитов, токсинов или сигнальных молекул [34]. У микобактерий описано по меньшей мере 18 транспортеров. Все они обеспечивают фоновый уровень устойчивости к антибиотикам [35]. Устойчивость к тетрациклину у *M. smegmatis* обеспечивается за счет белка TetV (рис. 6), который осуществляет транспорт тетрациклина из бактериальной клетки. Еще одним транспортером, обеспечивающим устойчивость к тетрациклину и аминогликозидам, является белок Tar [35].

Другая немаловажная функция систем токсин–антитоксин II типа – участие в формировании устойчивости бактериальной клетки на стрессовые воздействия, в частности на оксидативный стресс, вызываемый перекисью водорода [36]. Перекись водорода H_2O_2 является одним из важных агентов процессов в бактериальной клетке, приводящих к повреждению липидных, белковых, мембранных компонентов и ее ДНК и РНК и в конечном счете к ее гибели [36]. В клетке существует целый набор генов и их продуктов, обеспечивающих ее антиоксидантный потенциал [37, 38].

Показано, что введение дополнительной копии гена токсина приводит к повышению чувствительности к воздействию 0.5 мМ перекиси водорода после 1 ч инкубации.

Сопоставление кривых, описывающих динамику изменения оптической плотности и выживаемости штаммов *M. smegmatis* в условиях воздействия окислительного стресса, позволяет сделать вывод о том, что при воздействии перекиси водорода происходит не лизис клеток, а активация системы токсин–антитоксин и накопление токсина, что приводит к переходу клеток в dormantное состояние. Выход из dormantного состояния осуществляется лишь в небольшом количе-

стве покоящихся клеток. Поэтому клетки после воздействия перекиси водорода образуют мало колоний на твердой среде.

Для более точного определения механизмов участия модуля в формировании природной лекарственной устойчивости в дальнейших исследованиях будет проведен анализ транскриптома *M. smegmatis*. Также в дальнейшей работе предполагается изучение механизмов активации шаперонного белка DnaK.

Исследование выполнено при финансовой поддержке РФФИ в рамках научного проекта № 20-34-90124 от 20.08.2020.

Настоящая статья не содержит каких-либо исследований с использованием в качестве объекта животных.

Настоящая статья не содержит каких-либо исследований с участием в качестве объекта людей.

Авторы заявляют, что у них нет конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Le Roux M., Culviner P., Liu Y. Stress induces the transcription of toxin–antitoxin systems, but does not activate toxin // Mol. Cell. 2020. V. 79. № 2. P. 1–35. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2020.05.028>
2. Sala A., Bordes P., Genevaux P. Multiple toxin–antitoxin systems in *Mycobacterium tuberculosis* // Toxins. 2014. V. 6. № 3. P. 1002–1020. <https://doi.org/10.3390/toxins6031002>
3. Chandra B., Ramisetty M. Regulation of type II toxin–antitoxin systems: the translation-responsive model // Front. Microbiol. 2020. V. 11. № 895. P. 1–6. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.00895>
4. Fernandes-Garcia L., Blasco L., Lopez M. et al. Toxin–antitoxin systems in clinical pathogens // Toxins. 2016. V. 8. № 227. P. 1–23. <https://doi.org/10.3390/toxins8070227>
5. Peltier J., Hamiot A., Garneau J.R. et al. Type I toxin–antitoxin systems contribute to the maintenance of mobile genetic elements in *Clostridioides difficile* // Commun. Biol. 2020. V. 3. № 718. P. 1–13. <https://doi.org/10.1038/s42003-020-01448-5>
6. Wang X., Yao J., Sun Y.C. Type VII toxin/antitoxin classification system for antitoxins that enzymatically neutralize toxins // Trends Microbiol. 2021. V. 29. № 5. P. 388–393. <https://doi.org/10.1016/j.tim.2020.12.001>
7. Choi J.C., Kim W., Suk S. et al. The small RNA, SdsR, acts as a novel type of toxin in *Escherichia coli* // RNA Biol. 2018. V. 15. № 10. P. 1319–1335. <https://doi.org/10.1080/15476286.2018.1532252>
8. Mikhecheva N.E., Zaychikova M.V., Melerzanov A.V., Danilenko V.N. A nonsynonymous SNP catalog of *Mycobacterium tuberculosis* virulence genes and its use for detecting new potentially virulent sublineages // Ge-

- nome Biol. Evol. 2017. V. 9. № 4. P. 887–899.
<https://doi.org/10.1093/gbe/evx053>
9. Rownicki M., Lasek R., Trylska J., Bartosik D. Targeting type II toxin–antitoxin systems as antibacterial strategies // *Toxins*. 2020. V. 12. № 568. P. 1–16.
<https://doi.org/10.3390/toxins12090568>
10. Chan W.T., Balsa D., Espinosa M. One cannot rule them all: are bacterial toxins–antitoxins druggable? // *FEMS Microbiol. Rev.* 2015. V. 39. P. 522–540.
<https://doi.org/10.1093/femsre/fuv002>
11. Gupta A., Venkataraman B., Vasudevan M., Bankar K.G. Co-expression network analysis of toxin–antitoxin loci in *Mycobacterium tuberculosis* reveals key modulators of cellular stress // *Sci. Rep.* 2017. V. 7. № 5868. P. 1–14.
<https://doi.org/10.1038/s41598-017-06003-7>
12. Song S., Wood T.K. A primary physiological role of toxin/antitoxin systems is phage inhibition // *Front. Microbiol.* 2020. V. 11. № 1895. P. 1–7.
<https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.01895>
13. Прозоров А.А., Федорова И.А., Беккер О.Б., Даниленко В.Н. Факторы вирулентности *Mycobacterium tuberculosis*: генетический контроль, новые концепции // *Генетика*. 2014. Т. 50. № 8. С. 885–909.
14. Fraikin N., Goormaghtigh F., Van Melderren L. Type II toxin–antitoxin systems: evolution and revolutions // *J. Bacteriol.* 2020. V. 202. № 7. P. 1–14.
<https://doi.org/10.1128/JB.00763-19>
15. Wood T.K. Combatting bacterial persister cells // *Bio-technol. Bioeng.* 2016. V. 113. № 3. P. 476–483.
<https://doi.org/10.1002/bit.25721>
16. Jurenas D., Van Melderren L. The variety in the common theme of translation inhibition by type II toxin–antitoxin systems // *Front. Genet.* 2020. V. 11. № 262. P. 1–19.
<https://doi.org/10.3389/fgene.2020.00262>
17. Bordes P., Sala A.J., Ayala S. Chaperone addiction of toxin–antitoxin systems // *Nat. Commun.* 2016. V. 7. № 13339. P. 1–12.
<https://doi.org/10.1038/ncomms13339>
18. Rosendahl S., Ainelo A., Horak R. The disordered C-terminus of the chaperone DnaK increases the competitive fitness of *Pseudomonas putida* and facilitates the toxicity of GraT // *Microorganisms*. 2021. V. 9. № 375. P. 1–17.
<https://doi.org/10.3390/microorganisms9020375>
19. Yu X., Gao X., Zhu K. et al. Characterization of a toxin–antitoxin system in *Mycobacterium tuberculosis* suggests neutralization by phosphorylation as the antitoxicity mechanism // *Commun. Biol.* 2020. V. 3. № 216. P. 1–15.
<https://doi.org/10.1038/s42003-020-0941-1>
20. Bajaj R.A., Arbing M.A., Shin A. et al. Crystal structure of the toxin Msmeg_6760, the structural homolog of *Mycobacterium tuberculosis* Rv2035, a novel type II toxin involved in the hypoxic response // *Acta Crystallogr. F. Struct. Biol. Commun.* 2016. V. 72. P. 863–869.
<https://doi.org/10.1107/S2053230X16017957>
21. Fay A., Glickman M.S. An essential nonredundant role for *Mycobacterium* DnaK in native protein folding // *PLoS Genet.* 2014. V. 10. № 7. P. 1–17.
<https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1004516>
22. Keren I., Minami S., Rubin E., Lewis K. Characterization and transcriptome analysis of *Mycobacterium tuberculosis* persists // *mBio*. 2011. V. 2. № 3. P. 1–10.
<https://doi.org/10.1128/mBio.00100-11>
23. Inoue H., Nojima H., Okayama H. High efficiency transformation of *Escherichia coli* with plasmids // *Gene*. 1990. V. 96. № 1. P. 23–28.
[https://doi.org/10.1016/0378-1119\(90\)90336-p](https://doi.org/10.1016/0378-1119(90)90336-p)
24. Snapper S.B., Melton R.E., Mustafa S. et al. Isolation and characterization of efficient plasmid transformation mutants of *Mycobacterium smegmatis* // *Mol. Microbiol.* 1990. V. 4. № 11. P. 1911–1919.
<https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.1990.tb02040.x>
25. Parish T., Brown A.C. *Mycobacteria Protocols. Methods in Molecular Biology*. Second ed. N.Y.: Humana Press, 2009. 456 p.
26. Williams K.J., Joyce G., Robertson B.D. Improved mycobacterial tetracycline inducible vectors // *Plasmid*. 2010. V. 64. № 2. P. 69–73.
<https://doi.org/10.1016/j.plasmid.2010.04.003>
27. Lewis J.A., Hatfull G.F. Control of directionality in L5 integrase-mediated site-specific recombination // *J. Mol. Biol.* 2003. V. 326. № 3. P. 805–821.
[https://doi.org/10.1016/s0022-2836\(02\)01475-4](https://doi.org/10.1016/s0022-2836(02)01475-4)
28. Sambrook J., Fritsch E.F., Maniatis T. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. N.Y.: Cold Spring Harbor Lab. Press, 1989. 1659 p.
29. Haimes J., Kelley M. Demonstration of a $\Delta\Delta Cq$ Calculation Method to Compute Relative Gene Expression from qPCR Data. Lafayette: A Horizon Discovery Group Comp., 2018. 4 p.
30. Sundarsingh J.A., Ranjitha J., Rajan A., Shankar V. Features of the biochemistry of *Mycobacterium smegmatis*, as a possible model for *Mycobacterium tuberculosis* // *J. Infect. Public Health*. 2020. V. 13. № 9. P. 1255–1264.
<https://doi.org/10.1016/j.jiph.2020.06.023>
31. Шыр К.В., Маслов Д.А., Мухеева Н.Е. и др. WhiB7 и Tar – модуляторы природной лекарственной устойчивости микобактерий к β -лактамам антибиотикам, макролидам и фторхинолонам // *Генетика*. 2017. Т. 53. № 9. С. 1061–1070.
32. Maarsingh J.D., Yang S., Park J.G., Haydel S.E. Comparative transcriptomics reveals PrrAB mediated control of metabolic, respiration, energy-generating, and dormancy pathways in *Mycobacterium smegmatis* // *BMC Genomics*. 2019. V. 20. № 942. P. 1–16.
<https://doi.org/10.1186/s12864-019-6105-3>
33. Nguen L. Antibiotic resistance mechanisms in *M. tuberculosis*: an update // *Arch. Toxicol.* 2016. V. 90. № 7. P. 1585–1604.
<https://doi.org/10.1007/s00204-016-1727-6>
34. Ebbensgaard A.E., Olesen A.L., Moller J.F. The role of efflux pumps in the transition from low-level to clinical antibiotic resistance // *Antibiotics*. 2020. V. 9. № 12. P. 1–7.
<https://doi.org/10.3390/antibiotics9120855>

35. Viveiros M., Martins M., Rodrigues L. Inhibitors of mycobacterial efflux pumps as potential boosters for anti-tubercular drugs // *Expert Rev. Anti Infect. Ther.* 2012. V. 10. № 9. P. 983–998.
<https://doi.org/10.1586/eri.12.89>
36. Marsova M., Abilev S., Poluektova E. et al. Abioluminescent test system reveals valuable antioxidant properties of lactobacillus strains from human microbiota // *World J. Microbiol. Biotechnol.* 2018. V. 34. № 27. P. 1–9.
<https://doi.org/10.1007/s11274-018-2410-2>
37. Culotta V.C., Daly M.J. Manganese complexes: Diverse metabolic routes to oxidative stress resistance in prokaryotes and yeast // *Antioxid. Redox Signal.* 2013. V. 19. № 9. P. 933–944.
<https://doi.org/10.1089/ars.2012.5093>
38. Imlay J.A. Cellular defenses against superoxide and hydrogen peroxide // *Annu. Rev. Biochem.* 2008. V. 77. P. 755–776.
<https://doi.org/10.1146/annurev.biochem.77.061606.161055>

Functional Significance of the TA Module vapBC2 of *Mycolicibacterium smegmatis* for Antibiotic Resistance and Exposure to Oxidative Stress

N. I. Akimova^{a, *}, O. B. Bekker^{a, **}, and V. N. Danilenko^a

^aVavilov Institute of General Genetics, Russian Academy of Sciences, Moscow, 119991 Russia

*e-mail: akimovanata@mail.ru

**e-mail: obbekker@mail.ru

Toxin–antitoxin systems are widespread among bacteria, including pathogens such as *Mycobacterium tuberculosis*. Since the functions of toxin–antitoxin systems vary among different groups of bacteria, they have been actively discussed and amended in recent years. The aim of this study was to investigate the function of the genes making up the toxin–antitoxin module *vapBC2* *M. smegmatis*. We obtained *M. smegmatis* mutants containing a deletion in the module *vapBC2* and a strain containing an additional copy of the *vapC2* toxin gene. It was shown that the expression of an additional copy of the toxin gene slowed the growth rate, but did not completely inhibit growth. These data may indicate a weak RNase activity of the toxin. The introduction of an additional copy of the toxin gene has been shown to increase the sensitivity of *M. smegmatis* to oxidative stress. Inactivation of the *vapBC2* module resulted in an increase in susceptibility to kanamycin. Introduction of an additional copy of the *vapC2* toxin gene using an integrative vector pKW08-MCS-Int led to an increase in sensitivity to kanamycin, tetracycline, and erythromycin. The role of VapBC2 in the system of intrinsic drug resistance/sensitivity will be addressed in our future projects.

Keywords: *Mycolicibacterium smegmatis*, *Mycobacterium tuberculosis*, toxin–antitoxin systems, antibiotic resistance, oxidative stress.

СТАБИЛЬНОСТЬ ПОПУЛЯЦИОННОЙ СИСТЕМЫ В-ХРОМОСОМ КОРЕЙСКОЙ МЫШИ *Apodemus peninsulae* (Mammalia, Rodentia) В ЮЖНОМ ПРИБАЙКАЛЬЕ: 35 ЛЕТ НАБЛЮДЕНИЙ

© 2022 г. И. А. Жигарев^{1, *}, И. А. Кришчук^{2, **}, З. З. Борисова³, Ю. М. Борисов³

¹Московский педагогический государственный университет, Москва, 119991 Россия

²Научно-практический центр Национальной академии наук Беларуси по биоресурсам, Минск, 220072 Беларусь

³Институт проблем экологии и эволюции им. А.Н. Северцова Российской академии наук, Москва, 119071 Россия

*e-mail: i.zhigarev@gmail.com

**e-mail: ikryshchuk@yandex.ru

Поступила в редакцию 02.11.2021 г.

После доработки 26.12.2021 г.

Принята к публикации 30.12.2021 г.

В течение 35 лет, с 1984 по 2019 гг., в Южном Прибайкалье в пяти районах проведены наблюдения за изменениями системы добавочных хромосом восточноазиатских (корейских) мышей (*Apodemus peninsulae*). Количество и структура морфотипов дополнительных хромосом статистически оставались постоянными. Анализ систем В-хромосом демонстрирует стабильность и низкую вариабельность статистических показателей за 35-летний отрезок времени, а также отсутствие статистических различий между выборками разных лет.

Ключевые слова: восточноазиатская (корейская) мышь, *Apodemus peninsulae*, добавочные или В-хромосомы, вариабельность кариотипа.

DOI: 10.31857/S0016675822050125

Многие исследования в области генетики выявили и продолжают выявлять стабильность видовых кариотипов большинства видов животных и растений. Параллельно этим наблюдениям было обнаружено, что микроэволюционные процессы в популяциях некоторых видов формируют определенные и не всегда стабильные полиморфные видовые кариотипы [1]. Наиболее загадочным явлением считается полиморфизм по так называемым дополнительным хромосомам, или В-хромосомам (Bs), присутствующим, помимо основного набора хромосом, в кариотипе многих видов. Например, подобный полиморфизм выявлен у 85 из 4380 кариологически изученных видов млекопитающих (1.9%), среди них чаще В-хромосомы встречаются у видов отряда грызуны (Rodentia) [2]. Еще в 1974 г. В.Н. Орловым [1] была опубликована сводка по полиморфизму В-хромосом для восьми видов млекопитающих. Позже М. Вуйошевич с соавт. [2] обобщили данные о В-хромосомах уже для 85 видов млекопитающих. Дополнительные сведения о млекопитающих с В-хромосомами приведены в работах [3, 4 и др.]. Современные исследования указывают на то, что добавочные хромосомы функционально активны, по крайней мере многие из них содержат гены, кодирующие белки [2, 5–9]. Следовательно представления о

том, что В-хромосомы инертны можно считать устаревшими. Однако понимание роли добавочных хромосом в жизнедеятельности клеток и тем более в формировании адаптивных, в том числе микроэволюционных, процессов еще далеко от определенности. Добавочные хромосомы могут быть не у всех особей тех видов, которых относят к видам с В-хромосомами. На этом фоне известны виды, у которых практически все особи имеют В-хромосомы, в частности это восточноазиатские (корейские) мыши (*Apodemus peninsulae*, Thomas, 1906) [3, 4, 10–13].

У восточноазиатских мышей выявлен значительный полиморфизм по числу и морфотипам В-хромосом в пределах всего обширного видового ареала [4, 10, 11, 13, 14]. В кариотипе клеток этих грызунов всегда присутствует основной А-набор хромосом, состоящий из 48 акроцентрических хромосом. Дополнительные В-хромосомы обнаружены в клетках практически всех мышей, исследованных континентальных и островных популяций (на данный момент известны лишь популяции о. Сахалин и о. Стенина, представители которой не имеют Bs) [13]. Их количество может быть разным и достигать до 30, таким образом у этого вида встречаются особи, имеющие в клет-

ках от 48 до 78 хромосом, при этом морфотипы В-хромосом также могут существенно отличаться [4, 13–15]. По размеру и морфологии В-хромосомы группируются в пять классов: крупные метацентрические, средние метацентрические, мелкие метацентрические, мелкие акроцентрические и точечные, или микро-В-хромосомы. Почти у каждой особи из сибирских популяций восточноазиатских мышей эти классы В-хромосом образуют индивидуальные комбинации, различающиеся по их числу и соотношению морфотипов. На сегодняшний день не ясны механизмы наследования добавочных хромосом. Учитывая тот факт, что большинство комбинаций морфотипов представлены уникальными наборами ($64.7 \pm 1.3\%$), по крайней мере в выборке исследованных животных (598 особей), можно предположить случайный характер наследования В-хромосом. Однако нужно отметить и другое: в пределах всего ареала восточноазиатской мыши более 35% вариантов — это повторяющиеся комбинации, и они чаще всего приходятся на комбинации относительно некрупных хромосом. Кроме этого установлено, что в популяциях доля животных с большим количеством В-хромосом постепенно уменьшается, пропорционально этому количеству. Одна из гипотез объясняющая этот феномен связана с усложнением процесса наследования большого количества крупных добавочных хромосом в клетках [4].

Можно предположить, что существенная изменчивость добавочных хромосом с их нерегулярным наследованием, предположительным отсутствием гомологичности и аккумуляцией в мейотических клетках [16, 17], вероятно приводят к изменчивости и стохастичности их числа и морфотипов в популяции мышей в различные годы. Для проверки этой гипотезы необходимы ряды многолетних наблюдений. На сегодняшний день в научной литературе не так много публикаций, оценивающих не только анализ временных рядов, но и простую регистрацию динамики систем В-хромосом в конкретных популяциях. Существует лишь незначительное количество подобных исследований [11, 13, 17–21]. Эти работы демонстрируют разноплановость тенденций: как изменчивость, так и постоянство систем В-хромосом в конкретных популяциях. Это в свою очередь требует дополнительных материалов и, желательно, полученных за значительные промежутки времени.

Цель настоящего исследования — определить степень изменчивости популяционной структуры вариантов системы добавочных хромосом восточноазиатских (корейских) мышей (*Apodemus peninsulae*) в Южном Прибайкалье за 35-летний период наблюдений (1984–2019 гг.).

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Отловы восточноазиатских мышей в Южном Прибайкалье осуществляли в разные годы. С 1984 по 2019 гг. — в пяти районах: пункт № 1 — окрестности г. Байкальск, Иркутской обл. (N 51°30'33.7" E 104°09'40.4"); пункт № 2 — окрестности пос. Выдрино, Кабанский р-н, Республика Бурятия (N 51°26'6.7" E 104°38'13.0"); пункт № 3 — окрестности пос. Танхой, Кабанский р-н, Республика Бурятия (N 51°29'18.5" E 104°50'57.0"); пункт № 4 — окрестности г. Бабушкин, Кабанский р-н, Республика Бурятия (N 51°38'35.3" E 105°31'20.4"); пункт № 5 — окрестности пос. Иволгинск, Республика Бурятия (N 51°44'45.3" E 107°16'31.9") (рис. 1).

В пределах 35-летнего периода мы выделили три временных отрезка: 1984–1989 гг. (материалы пунктов № 1, 4, 5), 2002–2003 гг. (№ 2, 3) и 2019 г. (№ 1, 2, 3, 4).

Расстояния между пунктами отловов составляют 20–70 км, между крайними точками — 200 км. Они располагаются на территории, где отсутствуют природные или техногенные преграды для перемещения мышей, что позволяет считать этот район географически единым.

Исследования характеристик популяционных систем добавочных хромосом в этой сейсмически активной зоне Южного Прибайкалья и в зоне аэропромвыбросов целлюлозно-бумажного комбината г. Байкальска (функционировал до 2013 г.), проведенные на начальном этапе, в 1984–2003 гг., отражены в наших предыдущих работах, там же приведены кариотипы мышей [22–24].

В 2019 г. дополнительно изучены кариотипы 42 особей *Apodemus peninsulae*, отловленных в окрестностях г. Байкальск, пос. Выдрино, пос. Танхой, и пос. Бабушкин (табл. 1).

Хромосомные препараты готовили прямым методом из клеток костного мозга с предварительным введением внутривенно 0.5 мл 0.04% раствора колхицина [1]. Для характеристики кариотипа каждого животного мы использовали анализ не менее чем 20 метафазных пластинок.

В настоящей работе нами использована система классификации В-хромосом (Bs) и формула их цифрового кодирования по Ю.М. Борисову [22, 23]. В табл. 1 отображены формулы кодирования добавочных хромосом мышей, отловленных в 2019 г. в районе исследования. В формуле первая цифра обозначает количество крупных двуплечих хромосом, равных по размерам 1–8 парам А-хромосом (I класс). Вторая цифра обозначает количество хромосом II класса (двуплечих, средних размеров, равных 17–23 парам А-хромосом); третья — количество хромосом III класса (также метацентрических, мелких, равных по размерам 17–



Рис. 1. Пункты отлова *Apodemus peninsulae* в Южном Прибайкалье. 1 — окрестности г. Байкальск, Иркутской обл.; 2 — окрестности пос. Выдрино, Кабанский р-н, Республика Бурятия; 3 — окрестности пос. Танхой, Кабанский р-н, Республика Бурятия; 4 — окрестности г. Бабушкин, Кабанский р-н, Республика Бурятия; 5 — окрестности поселка Иволгинск, Республика Бурятия.



Рис. 2. Метафазные пластинки *Apodemus peninsulae*. а — Байкальск (№ 13, табл. 1), б — Выдрино (№ 27, табл. 1), в — Бабушкин (№ 34, табл. 1).

23 парам А-хромосом); четвертая — количество хромосом IV класса (acrocentric, мелких, равных 17–23 парам А-хромосом); пятая цифра — количество микро-В-хромосом V класса. Последние настолько мелкие, что определить положение

центромеры не представляется возможным. На рис. 2 показаны метафазные пластинки *Apodemus peninsulae* из трех пунктов отлова: Байкальск (№ 13, табл. 1); Выдрино (№ 27, табл. 1); Бабушкин (№ 34, табл. 1).

Таблица 1. Формулы изменчивости вариантов системы В-хромосом (Bs) восточноазиатских (корейских) мышей Южного Прибайкалья (2019 г.)

№ п/п	Пол	Количество хромосом		Формула вариантов Bs	Пункт отлова
		(2n = 48) + Bs	Bs		
1	♀	53	5	0.1.0.0.04	Окр. г. Байкальска То же »
2	♀	56	8	0.1.1.0.06	
3	♂	55	7	0.1.2.0.04	
4	♂	53	5	0.2.0.0.03	
5	♂	55	7	0.1.1.0.05	
6	♀	56	8	0.1.0.0.07	
7	♀	59	11	0.1.1.0.09	
8	♀	59	11	0.1.0.0.10	
9	♂	60	12	0.1.0.0.11	
10	♀	60	12	0.0.0.0.12	
11	♀	60	12	0.2.1.0.09	
12	♀	61	13	0.1.1.0.11	
13	♀	55	7	0.1.1.0.05	
14	♂	57	9	0.0.2.0.07	
15	♂	58	10	0.1.1.0.08	
16	♀	58	10	0.1.0.0.09	
17	♂	58	10	0.2.0.0.08	
18	♀	59	11	0.0.3.0.08	
19	♂	59	11	0.0.3.0.08	
20	♀	59	11	0.1.1.0.09	
21	♀	54	6	0.2.3.0.01	
22	♀	60	12	0.2.0.0.10	
23	♂	60	12	0.2.0.0.10	
24	♀	52	4	0.1.1.0.02	Окр. пос. Танхой То же Окр. пос. Выдрино То же Окр. пос. Танхой То же » » » Окр. пос. Бабушкин То же » » » » » » » » » » » »
25	♂	52	4	0.3.0.0.01	
26	♀	59	11	0.2.1.0.08	
27	♂	56	8	0.2.0.0.06	
28	♀	54	6	0.0.1.0.05	
29	♂	57	9	0.0.1.0.08	
30	♂	58	10	0.0.1.0.09	
31	♀	56	8	1.0.0.1.06	
32	♀	54	6	0.1.0.0.05	
33	♂	59	11	0.1.1.0.09	
34	♀	54	6	0.1.1.0.04	
35	♀	55	7	0.2.0.0.05	
36	♂	55	7	0.1.1.0.05	
37	♀	57	9	0.2.1.0.06	
38	♂	59	11	0.1.0.0.10	
39	♂	59	11	0.0.1.0.10	
40	♂	59	11	0.1.0.0.10	
41	♀	60	12	0.1.1.0.10	
42	♂	61	13	0.1.1.0.11	

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Дополнительные хромосомы обнаружены у всех представителей восточноазиатских мышей, обитающих в Южном Прибайкалье. Их число в клетках мышей варьирует от 4 до 13, в то время как в границах всего ареала наблюдаются предельные вариации от 0 (о. Сахалин) до 30 допол-

нительных хромосом (Средняя Сибирь) в клетках конкретного зверька [4]. Таким образом, исследуемую популяцию можно отнести к популяциям, представители которых имеют умеренное содержание добавочных хромосом. Это же подтверждается показателем “индекс условной массы В-хромосом” (см. ниже). Напомним, что избыточное содержание

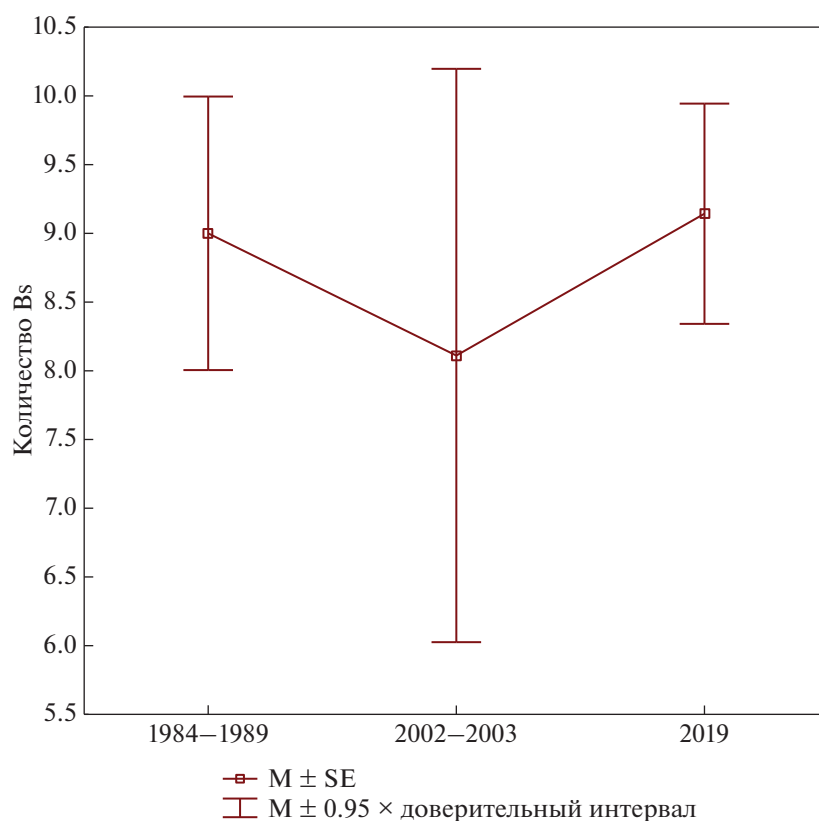


Рис. 3. Динамика статистических показателей среднего количества дополнительных хромосом (Bs) в популяциях *Apodemus peninsulae* Южного Прибайкалья (1984–2019 гг.).

В-хромосом (предположительно) усложняет их наследование.

До сих пор нет ясности, от каких факторов зависит то или иное количество дополнительных хромосом в клетках животных, при том, что основной набор из 48 хромосом у этого вида остается неизменным. В многочисленных работах показано разнообразие сочетаний В-хромосом пяти классов [4, 12, 16, 17, 26]. Таким образом, вариативность сочетаний пяти классов добавочных хромосом носит индивидуальный характер, однако определенные закономерности распределения В-хромосом в пределах географических популяций восточноазиатских мышей все-таки выявлены [4, 13, 19, 22, 23].

За 35 лет наблюдений в Южном Прибайкалье фиксируется удивительная стабильность основных показателей системы В-хромосом у корейских мышей. Среднее число В-хромосом на всем протяжении наблюдений оставалось статистически постоянной величиной, находясь в пределах от 8.11 ± 0.9 до 9.14 ± 0.4 , без достоверных отличий, $p \geq 0.28$ (рис. 3, табл. 2). Дисперсионный анализ (ANOVA) также не подтверждает различие дисперсий ($F(2; 81) = 0.55$; $p = 0.57$).

Структура морфотипов дополнительных хромосом за 35 лет наблюдения практически не менялась. Отсутствуют достоверные отличия, как долей типов хромосом, так и общего распределения, рассчитанного методом χ^2 и через индекс сходства распределений Животовского [25]. У зверьков всегда преобладают точечные минихромосомы (72–76% от всех Bs). Их реальное количество колебалось от 0 до 12, однако среднее значение было стабильным, 6–7 хромосом в клетке (табл. 2). Вторые позиции занимали средние (14–19%) и мелкие (около 10%) метацентрические хромосомы, их среднее количество также было стабильным и не имело статистических отличий в разные годы наблюдений. А вот крупные метацентрики и акросомы встречаются в данной популяции редко и нерегулярно (0–1 хромосома на клетку), причем эта особенность никак не менялась с течением времени.

Г.В. Рослик и И.В. Картавецца ввели удобный показатель, индекс условной массы В-хромосом или индекс Bs, который в целом характеризует весь массив дополнительных хромосом в клетке [26]. Чем он выше, тем “массивнее” этот набор. В Южном Прибайкалье индекс Bs у восточноазиат-

Таблица 2. Статистические показатели изменчивости вариантов системы В-хромосом у восточноазиатских мышей Южного Прибайкалья

Количество хромосом	Годы		
	1984–1989	2002–2003	2019
Bs	$\frac{9.00 \pm 0.49}{4-13, n = 33}$	$\frac{8.11 \pm 0.90}{4-11, n = 9}$	$\frac{9.14 \pm 0.40}{4-13, n = 42}$
Крупные метахромосомы	0.0	$\frac{0.11 \pm 0.11}{0-1, n = 9}$	$\frac{0.02 \pm 0.02}{0-1, n = 42}$
Средние метахромосомы	$\frac{1.09 \pm 0.14}{0-2, n = 33}$	$\frac{1.00 \pm 0.41}{0-3, n = 9}$	$\frac{1.07 \pm 0.12}{0-3, n = 42}$
Мелкие метахромосомы	$\frac{0.82 \pm 0.17}{0-3, n = 33}$	$\frac{0.67 \pm 0.24}{0-2, n = 9}$	$\frac{0.79 \pm 0.13}{0-3, n = 42}$
Акрсомы	0.0	$\frac{0.11 \pm 0.11}{0-1, n = 9}$	$\frac{0.02 \pm 0.02}{0-1, n = 42}$
Точечные (микро) хромосомы	$\frac{7.09 \pm 0.55}{0-12, n = 33}$	$\frac{6.22 \pm 0.98}{1-9, n = 9}$	$\frac{7.24 \pm 0.44}{1-12, n = 42}$

Примечание. Строка над чертой – $M \pm SE$, строка под чертой – min–max, n – объем выборки.

Таблица 3. Статистические показатели изменчивости индекса Bs восточноазиатских мышей Южного Прибайкалья

Годы	Показатели						
	объем выборки (n)	M	Min	Max	Std. Dev.	Coef. Var., %	SE
1984–1989	33	12.0	6	17	2.83	23.57	0.49
2002–2003	9	11.2	7	15	2.73	24.31	0.91
2019	42	12.2	7	17	2.65	21.78	0.41
Всего	84	12.0	6	17	2.71	22.59	0.29

ских мышей в течение 35 лет наблюдений стабилен и статистически не изменяется (рис. 4). Здесь необходимо отметить, что в пределах обширного ареала вида, в разных популяциях, этот показатель достаточно изменчив и принимает значение от 3 до 23 [4, 26]. В исследуемом регионе индекс Bs изменялся от 6 до 17, с незначительными показателями коэффициента вариации (табл. 3) и отсутствием достоверных отличий выборок разных лет (критерий Краскела–Уоллиса $H(2; 84) = 0.81$, $p = 0.67$).

Анализ систем добавочных хромосом 84 особей *A. peninsulae* из Южного Прибайкалья показывает наличие умеренного (в сравнении с другими популяциями) разнообразия вариантов сочетаний В-хромосом, встречающихся у зверьков, их оказалось 46 (в пределах всего ареала на данный момент установлено 292 варианта комбинаций). При этом уникальных наборов В-хромосом (индекс уникальности Bs), встречающихся единожды в пределах всего ареала, только $4.1 \pm 0.76\%$ (для выборки из 598 мышей со всего ареала этот показатель существенно выше – $64.7 \pm 1.3\%$) [4].

Если рассмотреть долю мышей, которая обладает уникальными, не встречающимися в других местах ареала, наборами В-хромосом, то она опять же небольшая и составляет всего 14.3% от всех особей популяции Южного Прибайкалья, остальные зверьки имеют наборы, которые уже отмечены нами у других мышей либо этих, либо иных популяций. Нужно обратить внимание на то, что для всего ареала этот показатель существенно выше – почти треть из всех исследованных зверьков (31%) восточноазиатских мышей имеет уникальные наборы В-хромосом. Таким образом, относительно высокая повторяемость комбинаций наборов В-хромосом у мышей на юге Байкальского побережья, может говорить о более слабом влиянии случайных факторов в формировании этих комбинаций.

Конкретные наборы В-хромосом, отмеченные для мышей Южного Прибайкалья, встречаются у особей разных популяций, однако подавляющее большинство из них – это либо внутривидовые комбинации, либо встречающиеся в соседних популяциях Бурятии, Монголии, а также

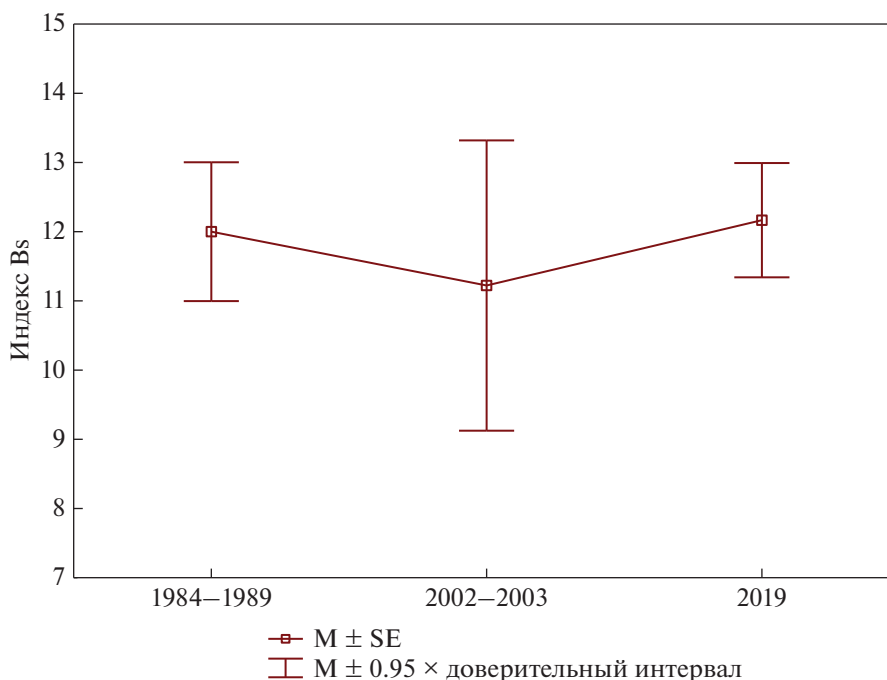


Рис. 4. Динамика среднего значения “индекс условной массы” В-хромосом в популяциях *Apodemus peninsulae* Южного Прибайкалья (1984–2019 гг.).

Центральной Сибири и западных популяций (Новосибирская и Кемеровская обл.), реже Северного Китая и Японии (о. Хоккайдо). Любопытно, что ни разу не были отмечены сходные наборы В-хромосом у зверьков популяций противоположного берега Байкала (Западного и Северного Прибайкалья) и Приморья.

Таким образом, анализ систем В-хромосом в популяции восточноазиатской мыши Южного Прибайкалья показывает стабильность и низкую вариабельность статистических показателей за 35-летний отрезок времени, а также отсутствие статистических различий между выборками разных лет.

Авторы выражают благодарность М.Ю. Борисову, М.В. Борисовой, В.А. Хотилович и И.В. Онищук за оказанную помощь в отлове грызунов.

Все применимые международные, национальные и/или институциональные принципы ухода и использования животных были соблюдены.

Авторы заявляют, что у них нет конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Орлов В.Н. Кариосистематика млекопитающих. (Цитогенетические методы в систематике млекопитающих). М.: Наука, 1974. 208 с.
2. Vujosevic M., Rajcic M., Blagojevic J. B chromosomes in populations of mammals revisited // Genes. 2018. V. 9(10). P. 110–136. <https://doi.org/10.3390/genes9100487>
3. Борисов Ю.М., Мышлявкина Т.А. В-хромосомы // Усп. совр. биологии. 2018. Т. 138. С. 336–351.
4. Borisov Yu.M., Zhigarev I.A. B chromosome system in the Korean field mouse *Apodemus peninsulae* Thomas 1907 (Rodentia, Muridae) // Genes. 2018. V. 9(10). P. 147–158. <https://doi.org/10.3390/genes9100472>
5. Trifonov V.A., Perelman P.L., Kawada S.I. Complex structure of B-chromosomes in two mammalian species: *Apodemus peninsulae* (Rodentia) and *Nyctereutes procyonoides* (Carnivora) // Chromosome Res. 2002. V. 10. P. 109–116. <https://doi.org/10.1023/A:1014940800901>
6. Rubtsov N.B., Karamysheva T.V., Andreenkova O.V. et al. Comparative analysis of micro and macro B chromosomes of Korean field mouse *Apodemus peninsulae* (Rodentia, Murinae) performed by chromosome microdissection and FISH // Cytogenet. Genome Res. 2004. P. 289–294. <https://doi.org/10.1159/000056786>
7. Rubtsov N.B., Borisov Yu.M. Sequence composition and evolution of mammalian B chromosomes // Genes. 2018. V. 9(10). P. 91–109. <https://doi.org/10.3390/genes9100490>
8. Makunin A., Romanenko S., Beklemisheva V. et al. Sequencing of supernumerary chromosomes of red fox and raccoon dog confirms a non-random gene acquisition by B chromosomes // Genes. 2019. V. 9(8). P. 201–215. <https://doi.org/10.3390/genes9080405>
9. Trifonov V.A., Dementyeva P.V., Beklemisheva V.R. et al. Supernumerary chromosomes, segmental duplications, and evolution // Russ. J. Genet. 2010. V. 46. P. 1094–

1096.
https://doi.org/10.1134/S1022795410090206
10. Hayata I. Chromosomal polymorphism caused by supernumerary chromosomes in the field mouse, *Apodemus giliacus* // Chromosome. 1973. V. 42. P. 403–414. https://doi.org/10.1007/BF00399408
 11. Bekasova T.S., Vorontsov N.N., Korobitsyna K.V., Korablev V.P. B-chromosomes and comparative karyology of the mice of the genus *Apodemus* // Genetica. 1980. V. 52–53. P. 33–43.
 12. Картавецова И.В. Кариосистематика лесных и полевых мышей (Rodentia, Muridae). Владивосток: Дальнаука, 2002. 142 с.
 13. Kartavtseva I.V., Roslik G.V. A complex B chromosome system in the Korean field mouse *Apodemus peninsulae* // Cytogenet. Genome Res. 2004. V. 106. № 2–4. P. 271–278. https://doi.org/10.1159/000079298
 14. Борисов Ю.М., Жигарев И.А., Шефтель Б.И. В-хромосомы восточноазиатских мышей (*Apodemus peninsulae* Thomas, 1907 (Rodentia, Muridae)) на восточных склонах Цинхай-Тибетского плато (КНР) // Генетика. 2020. Т. 56. № 10. С. 1184–1188. https://doi.org/10.31857/S0016675820090039
 15. Борисов Ю.М., Шефтель Б.И., Сафронова Л.Д., Александров Д.Ю. Устойчивость популяционных систем В-хромосом восточноазиатской мыши *Apodemus peninsulae* Прибайкалья и Северной Монголии // Генетика. 2012. Т. 48. № 10. С. 1190–1199.
 16. Kolomiets O.L., Borbiev T.E., Safronova L.D. et al. Synaptonemal complex analysis of B-chromosome behavior in meiotic prophase I in the East-Asiatic mouse *Apodemus peninsulae* (Muridae, Rodentia) // Cytogenet. Cell Genet. 1988. V. 48. № 3. P. 183–187.
 17. Борисов Ю.М. Процесс увеличения числа и вариантов системы В-хромосом мышей *Apodemus peninsulae* в популяции Горного Алтая за 26-летний период // Генетика. 2008. Т. 44. № 9. С. 1227–1237.
 18. Борисов Ю.М., Бочкарев М.Н., Карамышева Т.В. и др. Феномен увеличения числа В-хромосом у восточноазиатских мышей *Apodemus peninsulae* (Mammalia, Rodentia) в популяции Горного Алтая // Докл. РАН. 2007. Т. 412. № 1. С. 126–128.
 19. Borisov Y.M., Abramov S.A., Borisova M.Y., Zhigarev I.A. The occurrence of dot-like micro B chromosomes in Korean field mice *Apodemus peninsulae* from the shore of the Teletskoye Lake (Altai Mountains) // Comparative Cytogenetics. 2020. V. 14(1). P. 97–105. https://doi.org/10.3897/CompCytogen.v14i1.47659
 20. Борисов Ю.М. Нестабильность В-хромосом соматических и герминативных клеток мышей *Apodemus peninsulae* // Генетика. 2008. Т. 44. № 8. С. 1101–1107.
 21. Гилева Э.А. Система В-хромосом у копытных леммингов *Dicrostonyx torquatus* Pall., 1779 из природных и лабораторных популяций // Генетика. 2004. Т. 40. № 12. С. 1686–1694.
 22. Борисов Ю.М. Система В-хромосом восточноазиатской мыши – маркер популяций в Прибайкалье // Генетика. 1990. Т. 26. № 12. С. 2215–2224.
 23. Борисов Ю.М. Цитогенетическая дифференциация популяций восточноазиатской мыши в Восточной Сибири // Генетика. 1990. Т. 26. № 10. С. 1828–1839.
 24. Борисов Ю.М., Шефтель Б.И., Сафронова Л.Д., Александров Д.Ю. Устойчивость популяционных систем В-хромосом восточноазиатской мыши *Apodemus peninsulae* в Прибайкалье и Северной Монголии // Генетика. 2012. Т. 48. № 10. С. 1189–1198.
 25. Животовский Л.А. Показатель сходства популяций по полиморфным признакам // Журн. общей биологии. 1979. Т. 40. № 4. С. 587–602.
 26. Рослик Г.В., Картавецова И.В. Морфотипы В-хромосом *Apodemus peninsulae* (Rodentia) Дальнего Востока России // Цитология. 2012. Т. 54. № 1. С. 66–77.

Stability of the Population System of B Chromosomes of the Korean Field Mouse *Apodemus peninsulae* (Mammalia, Rodentia) in the Southern Baikal Region: 35 Years of Observations

I. A. Zhigarev^a, *, I. A. Kryshchuk^b, **, Z. Z. Borisova^c, and Yu. M. Borisov^c

^aMoscow Pedagogical State University, Moscow, 119991 Russia

^bScientific and Practical Center of the National Academy of Sciences of Belarus on Bioresource, Minsk, 220072 Belarus

^cSevertsov Institute of Ecology and Evolution, Russian Academy of Science, Moscow, 119071 Russia

*e-mail: i.zhigarev@gmail.com

**e-mail: ikryshchuk@yandex.ru

For 35 years 1984–2019 in the southern Baikal region were made observations of changes in the system of additional chromosomes of Korean field mouse (*Apodemus peninsulae*) in five regions. The number and structure of morphotypes of additional chromosomes remained statistically constant. Analysis of B chromosome systems demonstrates stability and low variability of statistical indicators over a 35-year period, as well as the lack of statistical differences between samples of different years.

Keywords: Korean field mouse, *Apodemus peninsulae*, B chromosomes, Bs, karyotype variability.

ОДНОРОДНОСТЬ ГЕНОФОНДА ЗАПАДНОЙ И ВОСТОЧНОЙ ПОПУЛЯЦИЙ ДАУРСКОГО ЖУРАВЛЯ *Antigone vipio* НА РАЗНЫХ ПРОЛЕТНЫХ ПУТЯХ

© 2022 г. Е. А. Мудрик^{1, *}, О. А. Горошко^{2, 3}, С. Г. Сурмач⁴, Т. А. Кашенцева⁵,
А. В. Нечаева¹, С. М. Смиренский⁶, Д. В. Политов¹

¹Институт общей генетики им. Н.И. Вавилова Российской академии наук, Москва, 119991 Россия

²Государственный природный биосферный заповедник “Даурский”,
Забайкальский край, Нижний Цасучей, 674495 Россия

³Институт природных ресурсов, экологии и криологии Сибирского отделения
Российской академии наук, Чита, 672014 Россия

⁴Федеральный научный центр биоразнообразия наземной биоты Восточной Азии Дальневосточного отделения
Российской академии наук, Владивосток, 690022 Россия

⁵Питомник редких видов журавлей Окского государственного природного биосферного заповедника,
Рязанская область, Брыкин Бор, 391072 Россия

⁶Муравьевский парк устойчивого природопользования, Амурская область, Муравьевка, 676964 Россия
*e-mail: mudrik@vigg.ru

Поступила в редакцию 29.11.2021 г.

После доработки 16.12.2021 г.

Принята к публикации 28.12.2021 г.

Представлены первые данные о генетической структуре даурского журавля *Antigone vipio* — редкого мигрирующего вида птиц Северо-Восточной Азии. С использованием семи полиморфных микросателлитных локусов и секвенирования полной последовательности контрольного региона мтДНК (1132 пн) установлена генетическая гомогенность пространственно разобщенных западной и восточной популяций, использующих разные пролетные пути. Обнаруженные высокие уровни наблюдаемой ($H_O = 0.696 \pm 0.033$) и ожидаемой ($H_E = 0.707 \pm 0.037$) гетерозиготности и гаплотипического разнообразия ($Hd = 0.973$) даурского журавля сопоставимы с этими показателями у широкоареальных видов журавлей с большой численностью. Отсутствие генетической дифференциации по микросателлитным локусам ($F_{ST} = 0.013$, $P = 0.369$) и низкий уровень генетических различий по контрольному региону ($F_{ST} = 0.041$, $P = 0.05$), невыраженность внутривидовой пространственной структурированности даурского журавля по гаплотипам и индивидуальным многолокусным генотипам могут быть обусловлены отсутствием репродуктивной изоляции между особями из разных популяций и изменениями миграционных маршрутов неполовозрелыми птицами.

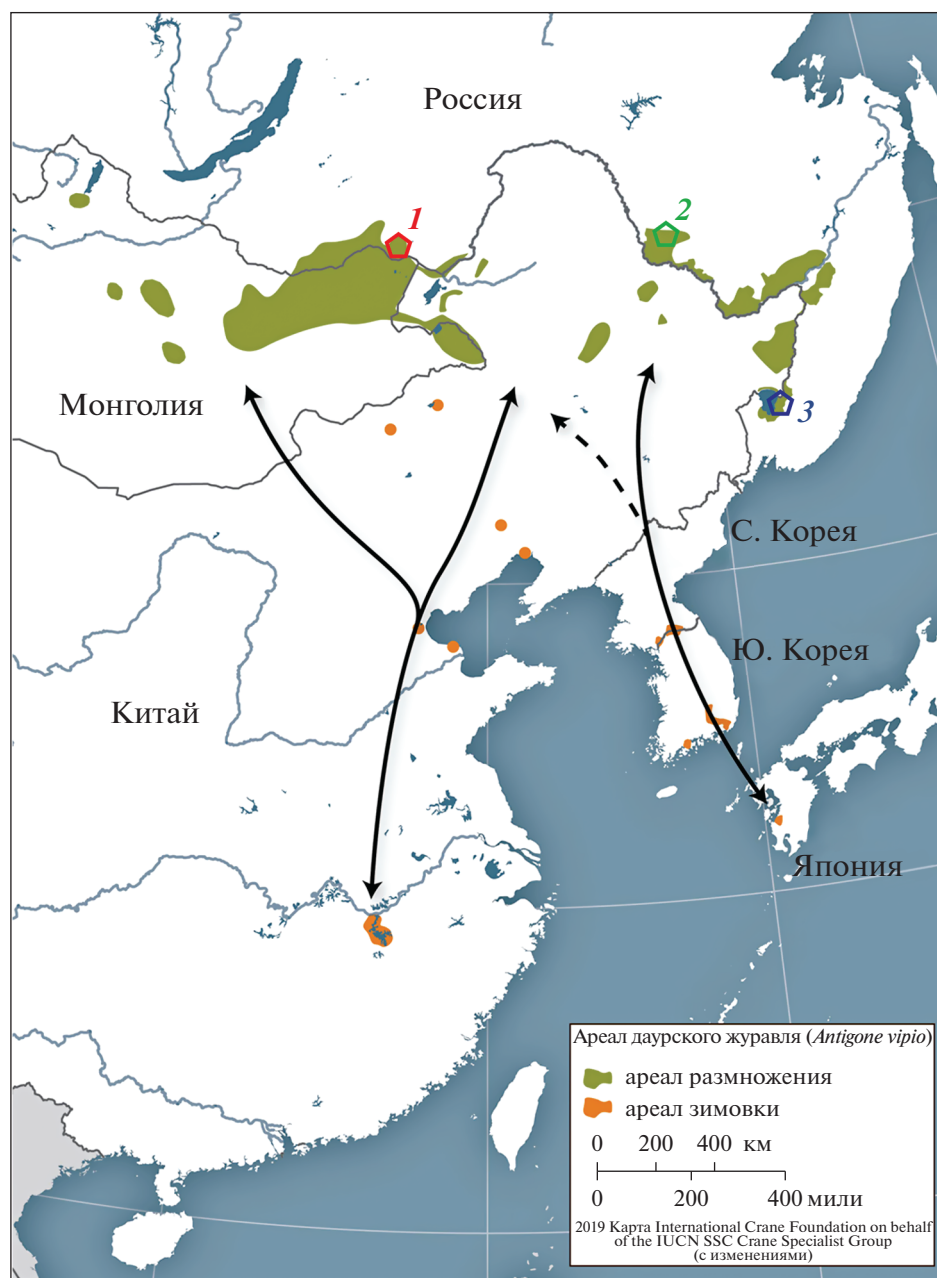
Ключевые слова: Gruidae, генетическая изменчивость, генетическая дифференциация, микросателлитные локусы, контрольный регион, Россия.

DOI: 10.31857/S001667582205006X

Даурский журавль *Antigone vipio* Pallas, 1881 — редкий в мировом масштабе вид птиц, занесенный в категорию уязвимых Красного списка Международного союза охраны природы [1]. Гнездовая часть его ареала приурочена к водно-болотным биотомам степной и лесостепной зон в бассейне Амура на территории России, Монголии и Китая [2, 3]. В видовой структуре даурского журавля выделяют западную и восточную популяции, использующие разные места гнездования и зимовки и соответственно разные пролетные пути. Птицы западной популяции гнездятся в России (на юго-востоке Забайкальского края) и Монголии и ча-

стично на сопредельных территориях Китая, а зимуют в Китае на озере Поянг. Птицы из восточной популяции гнездятся на Дальнем Востоке России (на юге Амурской области, Еврейской АО, Хабаровского края и в Приморье) и в Северо-Восточном Китае, а зимуют в Японии и демилитаризованной зоне Корейского полуострова [3] (рис. 1).

Глобальная численность даурского журавля оценивается в 7000–7800 особей [3]. На долю западной популяции приходится 500–1000 птиц, она сократилась в 4 раза за последние 20 лет; тогда как в восточной популяции насчитывают 6200–6500 особей и ее численность продолжает увеличи-



Mirande CM, Harris JT, editors. 2019. Crane Conservation Strategy. Baraboo, Wisconsin, USA: International Crane Foundation.

Рис. 1. Ареал даурского журавля [3] и места происхождения изучаемых птиц: 1 — западная популяция; 2 — восточная популяция (север); 3 — восточная популяция (юг).

ваться [3, 4]. Такие изменения могут объясняться как снижением уровня воспроизводства западной популяции в связи с многолетней засухой, так и вероятным оттоком даурских журавлей в восточную часть ареала и оттуда на восточные зимовки, ставшие более привлекательными благодаря практикуемой там искусственной подкормке. Тренды внутригнездовых ареалов популяций на территории России в последние 20–25 лет также разнонаправлены: местообитания и численность западной популяции значительно сократились, а восточной — суще-

ственно увеличились. Общая современная численность даурского журавля в России составляет около 610 территориальных пар (90 — в западной популяции, 520 — в восточной), а с учетом негнездящихся птиц — около 2200 особей [5].

Географическая разобщенность двух популяций *A. vipio* может способствовать их генетической дифференциации, так же как снижение численности западной и рост восточной группировки могут отражаться на их генетическом разнообразии. Никогда ранее популяционно-генетические ра-

боты по изучению видовой структуры даурского журавля не проводились ни в одной из стран, где он обитает. Наше исследование представляет первые данные о генетической структуре этого вида с территории России.

Цель работы — анализ генетической изменчивости и дифференциации западной и восточной популяций даурского журавля в России по данным ядерных микросателлитных локусов и секвенирования контрольного региона митохондриальной ДНК.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Биологический материал

В качестве биологического материала использовали индивидуальные образцы от 51 даурского журавля из мест гнездования западной (20 особей) и восточной (31 особь) популяций (рис. 1). В западной популяции образцы (растущие покровные перья из оперения груди) были получены от птенцов 1–1.5-месячного возраста во время их мечения кольцами и передатчиками в Ононском, Агинском и Борзинском районах Забайкальского края (разрешения Росприроднадзора № 50 от 30.06.2015, № 44 от 27.04.2016 и № 7 от 07.02.2019), а также от взрослых птиц, происходящих из природы юго-востока Забайкалья и содержащихся в Питомнике редких видов журавлей Окского заповедника (кровь, взятая во время плановых диспансеризаций). Также использовали линные перья с гнездовых участков даурского журавля в Забайкалье. В восточной популяции источником для выделения ДНК служили линные перья и подскорлуповые оболочки (аллантаисы) с гнездовых участков *A. vipio* в Тамбовском районе Амурской области, конфискат добытых браконьерами особей из Спасского района Приморского края (мышечные ткани) и полученная во время плановых диспансеризаций кровь птиц природного происхождения (Архаринский район Амурской области), содержащихся на Станции редких видов журавлей Хинганского заповедника и в Питомнике редких видов журавлей Окского заповедника.

Выделение ДНК

Экстракцию ДНК из линных перьев проводили с помощью набора для выделения ДНК innuPREP Forensic Kit (Analytik Jena, Германия), из растущих перьев и крови — с применением набора D1Atom™ DNAprep100 Kit (ООО “Лаборатория Изоген”, Россия) по протоколам производителей. Полученную геномную ДНК разводили до концентрации 50–100 нг/мкл (Qubit 2.0, Thermo Fisher Scientific, США) и использовали для последующей амплификации микросателлитных фрагментов ядерной ДНК и контрольного региона митохондриальной ДНК (мтДНК) методом ПЦР.

Микросателлитный анализ

Поскольку специфические ядерные микросателлитные локусы для даурского журавля не разработаны, мы провели тестирование более чем 20 пар праймеров для микросателлитов, охарактеризованных у других видов журавлей. В результате мы отобрали семь локусов, подходящих для наших целей и полиморфных у *A. vipio*: *Gram22*, *Gram30* [6], *Gra12*, *Gra38*, *Gra39* [7] и *Gj4066*, *Gj2298* [8] (табл. 1). ПЦР проводили с помощью набора реагентов GenPak PCR Core (ООО “Лаборатория Изоген”) согласно рекомендациям производителя по режимам отжига праймеров из первоисточников [6–8] на приборе Dyad Peltier Thermal Cycler (BioRad, США). Для определения длин амплифицированных фрагментов проводили вертикальный электрофорез в 6%-ном полиакриламидном геле в трис-ЭДТА-боратной буферной системе с использованием камер модели VE-20 (ООО “Компания Хеликон”, Россия). Окрашенные бромистым этидием ПЦР-продукты на геле визуализировали УФ-светом в системе гель-регистрации Kodak Edas 290 (США). Размеры полученных фрагментов ДНК (аллелей микросателлитных локусов) определяли с помощью программы GelAnalyzer 19.1 [9].

Секвенирование контрольного региона мтДНК

Амплификацию всего контрольного региона размером 1132 пн осуществляли с использованием прямого LC16575 (5'-ACA AAA GAA ACC CCC AAA CTC A-3') и обратного HC01342 (5'-AAG AAT TCT GCG GAT ACT TGC ATG T-3') [10] праймеров по следующему протоколу: первичная денатурация 3 мин при 94°C, затем 29 циклов амплификации, включающих денатурацию при 94°C — 45 с, отжиг праймеров при 58°C — 1 мин и элонгацию при 72°C — 1 мин, и финальная элонгация 10 мин при 72°C. Так же, как и в случае микросателлитных локусов, ПЦР контрольного региона проводили с помощью реагентов GenPak PCR Core. Фрагменты амплификации проверяли на электрофорезе в 1.5%-ном агарозном геле и секвенировали в прямом и обратном направлениях на генетическом анализаторе ABI 3130 (Applied Biosystems, США) в ЗАО Евроген (Москва, Россия). Нуклеотидные последовательности идентифицированных гаплотипов были депонированы в Генбанк под номерами MN929113–MN929130.

Статистический анализ

Расчеты параметров внутривидового разнообразия, соответствия распределения генотипов микросателлитных локусов согласно равновесию Харди–Вайнберга, *F*-статистик межпопуляционной генетической дифференциации, потока генов (N_m) и анализ молекулярной дисперсии (AMOVA) проводили с помощью надстройки для

Таблица 1. Характеристика микросателлитных локусов у даурского журавля

Локус	Мотив	A	Аллели	H_O	H_E	Равновесие Харди–Вайнберга
<i>Gram22</i>	(AAAC) ₉	6	160, 164, 168, 172, 176, 180	0.627	0.753	ns
<i>Gram30</i>	(AAGG) ₇	10	158, 162, 166, 170, 174, 178, 182, 186, 190, 194	0.745	0.796	ns
<i>Gpa12</i>	(GATA) ₁₁	8	202, 210, 214, 218, 222, 226, 230, 234	0.843	0.841	ns
<i>Gpa38</i>	(CTAT) ₁₃	5	186, 190, 194, 198, 202	0.706	0.736	ns
<i>Gpa39</i>	(GA) ₂ (GATA) ₁₃	7	100, 108, 112, 116, 120, 124, 128	0.804	0.741	ns
<i>Gj4066</i>	(ATAG) ₉	5	141, 145, 149, 153, 157	0.608	0.736	*(0.026)
<i>Gj2298</i>	(CTG) ₁₃	2	142, 145	0.510	0.398	*(0.046)

Примечание. A – число аллелей; H_O – наблюдаемая гетерозиготность; H_E – ожидаемая гетерозиготность; ns – недостоверное отклонение от равновесия Харди–Вайнберга; * – достоверность при $P < 0.05$.

электронной таблицы MS Excel–GenAlEx 6.5 [11]. Для выявления популяционной структуры использовали алгоритм байесовской кластеризации в программе STRUCTURE 2.3.4 [12]. Оценку вероятного числа генетических кластеров K по методу Эванно, структуризацию и визуализацию результатов осуществляли в CLUMPAK [13]. Для каждого предполагаемого значения K (от 2 до 4) проводили пять независимых повторов симуляций с 100000 итерациями и предшествующим периодом разогрева в 10000 итераций. В расчетах использовали опции популяционной привязки данных LOCPRIOR = 1, смешанную модель (admixture model) и независимые частоты аллелей между выборками. Для кластеризации индивидуальных многолокусных генотипов по методу главных компонент (Principal Component Analysis, PCA) пользовались пакетами adegenet [14] и ggplot2 [15] в RStudio 2021.09.1.372 [16] на основе R 4.1.2 [17]. Выравнивание, редактирование и сборку сиквентов после прямого и обратного прочтений проводили относительно друг друга и единственного референса из Генбанка (FJ769852) по алгоритму MAFFT [18] в программе Geneious 9.1.8 [19]. Гаплотипическое и нуклеотидное разнообразие, попарные сравнения нуклеотидных различий, тесты селективной нейтральности Таджимы, Фу и Ли, число мигрантов на поколение (N_m) и коэффициент генетической дифференциации F_{ST} рассчитывали в программе DnaSP 6.11.01 [20]. Сеть гаплотипов была построена по TCS-алгоритму [21] в PopART 1.7 [22].

РЕЗУЛЬТАТЫ

Генетическая изменчивость и дифференциация по микросателлитным локусам

В совокупной выборке (51 особь) даурских журавлей по семи полиморфным локусам иденти-

фицировано от 2 (*Gj2298*) до 10 (*Gram30*) аллелей (табл. 1). Общее число аллелей составило 43. Пять локусов находились в равновесном состоянии генотипов согласно закону Харди–Вайнберга, а по двум наблюдались отклонения, значимые на уровне вероятности менее 0.05%, в сторону недостатка (по *Gj4066*) и избытка (по *Gj2298*) гетерозигот. Значения наблюдаемой (H_O) и ожидаемой (H_E) гетерозиготности варьировали от наименьших по локусу *Gj2298* ($H_O = 0.510$, $H_E = 0.398$) до наибольших по локусу *Gpa12* ($H_O = 0.843$, $H_E = 0.841$).

Среднее число аллелей на локус для обеих популяций составило 5.8, уровни гетерозиготности в среднем оказались высокими: $H_O = 0.696 \pm 0.033$, $H_E = 0.707 \pm 0.037$. Несмещенные оценки ожидаемой гетерозиготности (uH_E) в обеих популяциях были близкими (табл. 2). Из 43 аллелей общими для западной и восточной популяций оказались 38; уникальные аллели обнаружены только в восточной популяции (*Gram30*¹⁹⁰, *Gram30*¹⁹⁴, *Gpa12*²⁰², *Gpa39*¹⁰⁰ и *Gpa39*¹⁰⁸).

Значения коэффициента инбридинга F_{IS} указывают на небольшой избыток гетерозигот в западной популяции (2.9%) и небольшой их недостаток в восточной (1.7%), однако в целом для вида этот показатель был близок к нулю ($F_{IS} = -0.006$). Межпопуляционная генетическая дифференциация даурского журавля по микросателлитным локусам оказалась низкой и достоверно не отличалась от нуля ($F_{ST} = 0.013$, $P = 0.369$, несмещенная оценка $G_{ST} = 0.001$, $P = 0.359$) (табл. 2). По данным AMOVA 96% генетической изменчивости вида сосредоточено внутри особей и 4% – между ними. Поток генов (N_m) между западной и восточной популяциями *A. vipio* измерялся 29.09 мигрантами на поколение.

Таблица 2. Генетическое разнообразие западной и восточной популяций даурского журавля по микросателлитным локусам

Популяция	N_A	H_O	H_E	uH_E	F_{IS}	F_{ST}
Западная	5.4	0.714 ± 0.030	0.710 ± 0.044	0.728 ± 0.045	-0.029	
Восточная	6.1	0.677 ± 0.010	0.705 ± 0.064	0.716 ± 0.065	0.017	
В среднем	5.8	0.696 ± 0.033	0.707 ± 0.037	0.722 ± 0.030	-0.006	0.013 ± 0.004

Примечание. N_A — число аллелей на локус; H_O — наблюдаемая гетерозиготность; H_E — ожидаемая гетерозиготность; uH_E — невзвешенная ожидаемая гетерозиготность; F_{IS} — внутрипопуляционный коэффициент инбридинга; F_{ST} — межпопуляционный коэффициент генетической дифференциации.

Структурированность популяций по микросателлитным локусам

Результаты кластеризации байесовскими методами в программе STRUCTURE для наиболее вероятных значений числа генетических кластеров K от двух до четырех при оптимальном $K = 3$ не обнаружили различий в популяционной структуре западной и восточной популяций (рис. 2). Фактически данные байесовского анализа показали существование единой популяции вида на территории России. Такая же однородная генетическая структура даурского журавля выявлена и методом РСА. Поскольку птицы из северной и южной частей восточной популяции используют один пролетный путь, но географически разобщены (рис. 1), для кластеризации методом главных компонент мы выделили их в отдельные группы. Однако это тоже не отразилось на пространственном распределении генотипов — совокупность точек, обозначающих многолокусные индивидуальные ге-

нотипы западной, северной и южной восточной групп даурских журавлей, перекрывается на координатной плоскости PC1–PC2 (рис. 3).

Генетическое разнообразие гаплотипов контрольного региона мтДНК

В анализ были включены нуклеотидные последовательности всего контрольного региона (1132 пн) 10 и 15 особей из западной и восточной популяций даурского журавля соответственно. Среди этих 25 особей идентифицировано 18 гаплотипов (табл. 3). Только один из них (h6) был общим, а остальные встречались либо в одной, либо в другой популяции. Всего к западной популяции относилось восемь гаплотипов, а к восточной — 11.

Обе популяции характеризовались высоким гаплотипическим и низким нуклеотидным разнообразием. Средние значения этих показателей составили соответственно $Hd = 0.973 \pm 0.018$ и

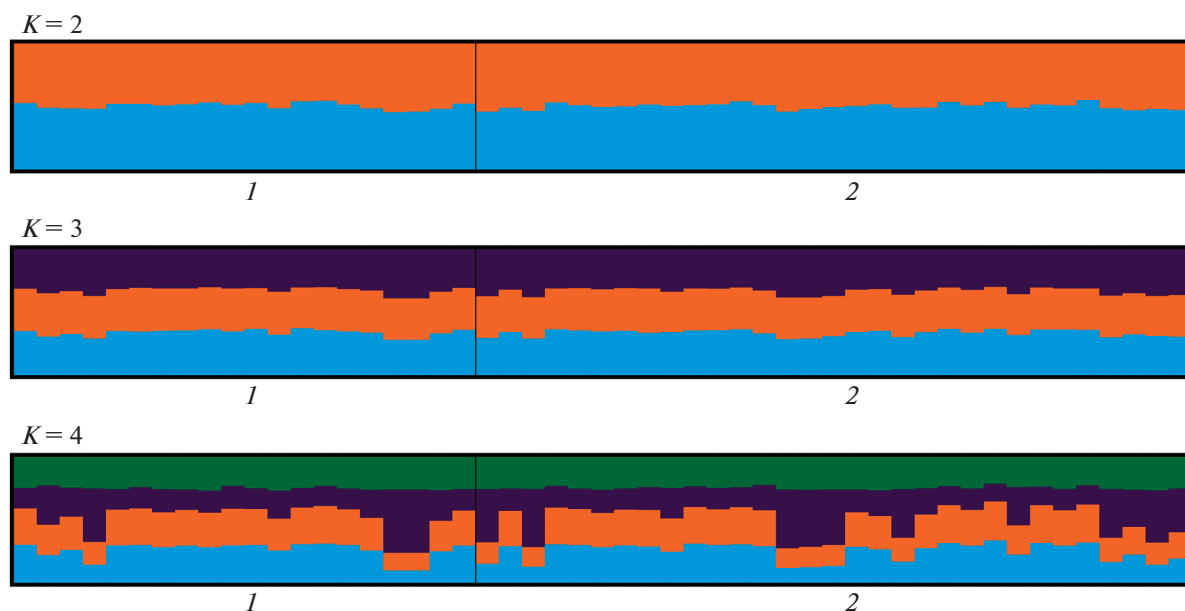


Рис. 2. Результаты кластеризации индивидуальных гаплотипов западной (1) и восточной (2) популяций даурского журавля по микросателлитным локусам в программе STRUCTURE для наиболее вероятных значений генетических кластеров от $K = 2$ до $K = 4$ при оптимальном $K = 3$.

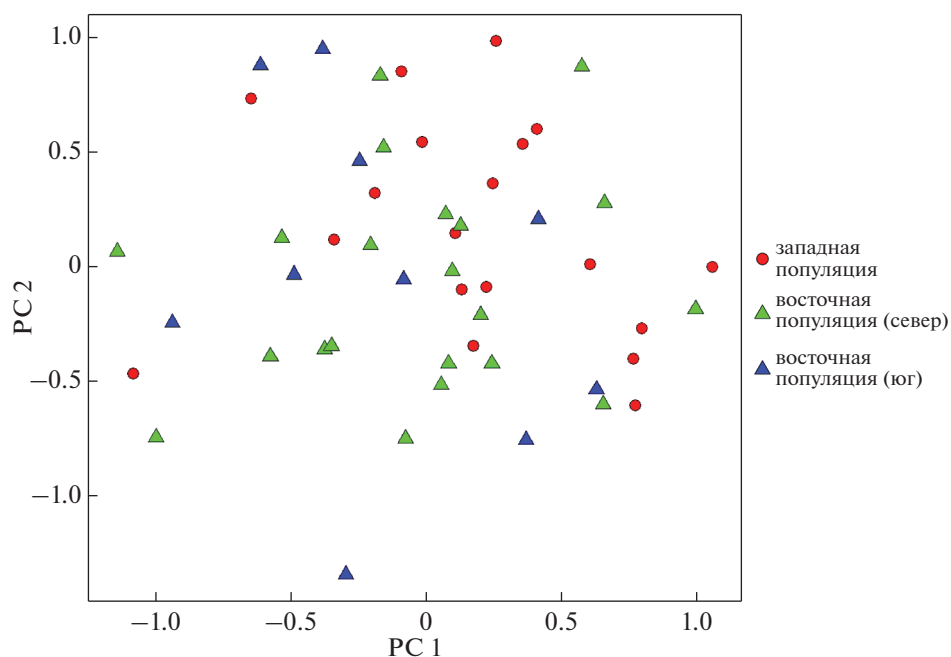


Рис. 3. Распределение индивидуальных многолокусных генотипов даурского журавля по микросателлитным локусам из западной популяции и севера и юга восточной популяции в пространстве главных компонент (PCA).

$\pi = 0.00662 \pm 0.00064$ (табл. 4), что указывает на высокое сходство гаплотипов даурского журавля. Среднее число нуклеотидных замен в гаплотипах (k) равнялось 7.487. Распределение нуклеотидных различий при попарных сравнениях гаплотипов соответствовало модели популяционной экспансии (рис. 4), однако тесты отклонения от селективной нейтральности Таджимы ($D = -0.81269$) и Фу и Ли ($F = -0.8890$) не были достоверно значимыми. Уровень генетической дифференциации восточной и западной популяций по контрольному региону превышал таковой по микросателлитным локусам и достоверно отличался от нуля ($F_{ST} = 0.041$, $P = 0.05$), а число мигрантов на поколение по мтДНК, соответственно, было ниже: $N_m = 5.83$. По данным AMOVA 97.4% генетической изменчивости даурских журавлей сконцентрировано внутри особей и 2.6% — между ними.

Сеть гаплотипов, рассчитанная по TCS-алгоритму, демонстрирует кольцевую структуру из западных и восточных вариантов без формирования каких-либо географических кластеров (рис. 5). Северо-восточный гаплотип h4 — единственный из всех обнаруженных образовывал узел, связанный как с другими восточными северными, так и с восточными южными и с западными вариантами.

ОБСУЖДЕНИЕ

Полученные нами данные о генетической структуре двух популяций даурского журавля, использующих разные места гнездования и зимовки

и соответственно разные пролетные пути, указывают на однородность генофонда этого редкого вида птиц. Обе популяции — как сокращающаяся западная, так и находящаяся в фазе роста восточная — характеризуются высоким уровнем генетического разнообразия по ядерным микросателлитным локусам и контрольному региону мтДНК, сопоставимым с таковым у широкоареальных видов журавлей с большой численностью — канадского *Antigone canadensis* [23], серого *Grus grus* [24], красавки *Anthropoides virgo* [25, 26], но превышающим данный показатель у гораздо более редких американского *Grus americana* [6, 27] и японского *G. japonensis* [28] журавлей.

Низкая генетическая дифференциация, отсутствие четко выраженной популяционной структуры и достаточно интенсивный поток генов между западной и восточной группировками даурского журавля указывают на отсутствие репродуктивной изоляции между популяциями, использующими разные пролетные пути. Применение дистанционных методов слежения позволило выявить случай изменения мест зимовки самкой даурского журавля из западной группировки: свою первую зиму она провела в традиционном месте на озере Поянг в Китае (2016 г.), а последующие (2017–2020 гг.) — на местах зимовки восточной популяции в Корее и Японии, однако свое место гнездования в Юго-Восточном Забайкалье из года в год она не меняла (<https://savingcranes.org/the-journey-of-white-naped-crane-borzya>). Брачную пару эта самка сформировала на местах зимовки во-

Таблица 3. Распределение 18 гаплотипов контрольного региона в популяциях даурского журавля

Гаплотип	Номер в Генбанке	Популяция		Всего особей
		западная	восточная	
h1	MN929113	1		1
h2	MN929114	2		2
h3	MN929115	2		2
h4	MN929116		1	1
h5	MN929117		1	1
h6	MN929118	1	2	3
h7	MN929119		1	1
h8	MN929120		2	2
h9	MN929121		1	1
h10	MN929122		1	1
h11	MN929123	1		1
h12	MN929124	1		1
h13	MN929125		1	1
h14	MN929126		2	2
h15	MN929127		1	1
h16	MN929128	1		1
h17	MN929129	1		1
h18	MN929130		2	2
		10	15	25

Таблица 4. Показатели изменчивости контрольного региона и тесты на селективную нейтральность в популяциях даурского журавля

Популяция	<i>Hd</i>	π	<i>k</i>	<i>D</i>	<i>F</i>
Западная	0.956 ± 0.059	0.00635 ± 0.00065	7.178	−0.36410 ns	−0.46458 ns
Восточная	0.962 ± 0.034	0.00655 ± 0.000659	7.410	−0.30614 ns	−0.00950 ns
В среднем	0.973 ± 0.018	0.00662 ± 0.00064	7.487	−0.81269 ns	−0.8890 ns

Примечание. *Hd* — разнообразие гаплотипов; π — нуклеотидное разнообразие; *k* — среднее число нуклеотидных различий; тесты на селективную нейтральность Таджимы (*D*) и Фу и Ли (*F*); ns — недостоверные значения.

сточной популяции, следовательно ее партнер, вероятно принадлежавший к восточной популяции, изменил место гнездования. Известны и другие достоверные случаи смены даурскими журавлями мест зимовки и путей миграции. Скорее всего, изменения маршрутов больше присущи неполовозрелым особям в ходе их первой самостоятельной, не связанной с родителями, миграции. Таким образом, объединение птиц на общих зимовках с представителями другого миграционного потока может привести к кардинальной смене места гнездования.

На состояние западной популяции, обитающей в аридных условиях, огромное влияние оказывают климатические циклы продолжительностью около 30 лет с чередованием влажных и засушливых периодов, в процессе которых условия

обитания птиц могут радикально меняться от благоприятных до крайне неблагоприятных [29–33]. Это вызывает масштабные перемещения особей и изменение пространственной структуры населения как внутри западной популяции даурского журавля, так, вероятно, и внутри вида в целом [31]. Стремительное падение численности западной группировки в 2000–2017 гг. произошло в неблагоприятный засушливый период, когда подавляющая часть ее местообитаний высохла, что позволяет предположить перемещение части западных даурских журавлей на места гнездования восточной популяции, где условия обитания в то время были относительно благоприятны, а численность довольно быстро росла [5, 31]. Подобные перемещения особей, безусловно, спо-

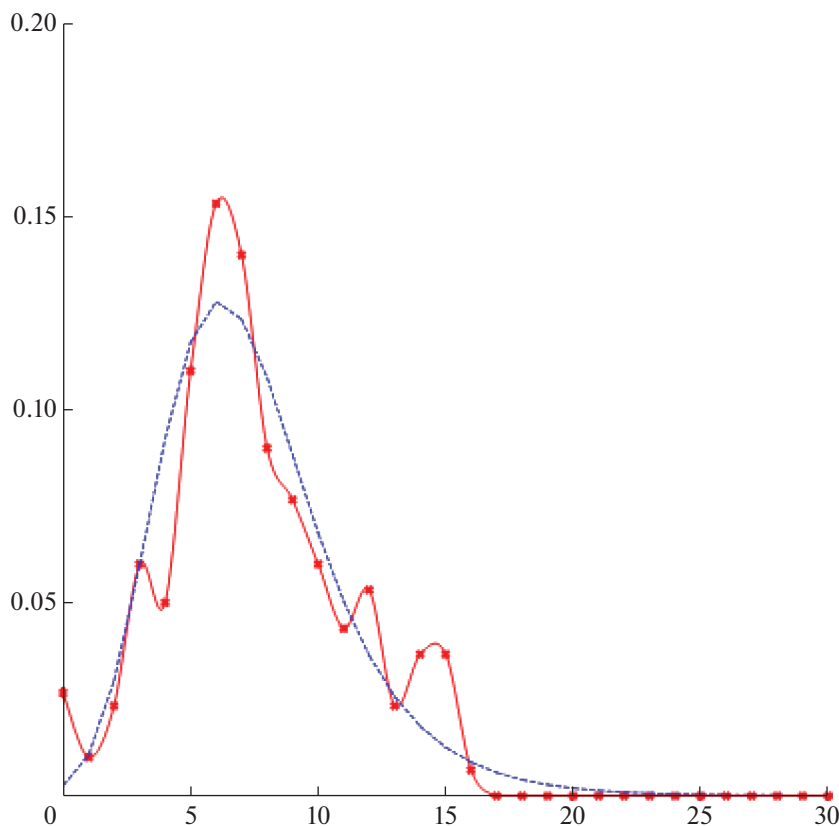


Рис. 4. График распределения нуклеотидных различий гаплотипов контрольного региона даурского журавля согласно модели недавнего увеличения численности вида. По оси абсцисс приводится число нуклеотидных замен при попарном сравнении гаплотипов, по оси ординат — частота. Пунктирная линия соответствует ожидаемому распределению, сплошная — наблюдаемому.

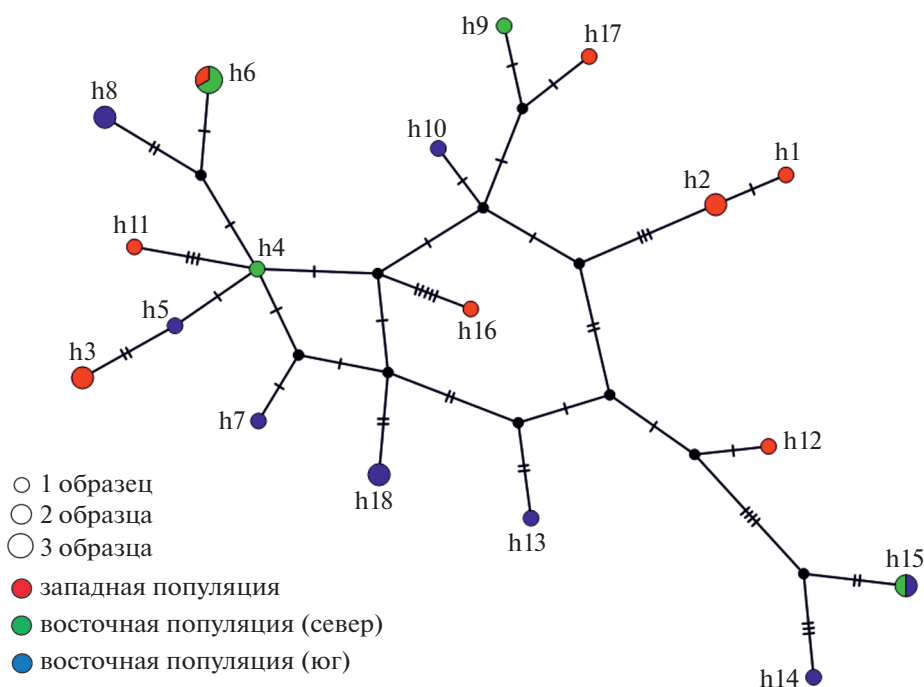


Рис. 5. Сеть гаплотипов контрольного региона мтДНК даурского журавля, построенная по TCS-алгоритму [21]. Размер кружков пропорционален числу особей, засечки на соединяющих линиях соответствуют числу мутационных событий между гаплотипами, сектора диаграмм представляют частоты гаплотипов в популяциях.

собствуют гомогенизации генетической структуры вида.

Слабые или средние генетические различия показаны и для других мигрирующих видов журавлей — как широко распространенных, так и редких. Так, по микросателлитным локусам значение F_{ST} между популяциями западного подвида серого журавля составляет 0.012 [34], а между выборками западного и восточного подвидов 0.011 [24]. Такая же низкая (0.3–1.1%) генетическая дифференциация между подвидами серого журавля и по контрольному региону мтДНК [35]. У красавки — вида с большим, но фрагментированным в России ареалом — различия в генетической структуре по микросателлитным локусам ($F_{ST} = 0.052$ [25]) выше, чем у более многочисленного и распространенного серого журавля и как показано в настоящей работе редкого даурского журавля, населяющего более компактную территорию. По контрольному региону уровень генетической дифференциации красавки на всем ареале ($F_{ST} = 0.075$ [26]) также превышает таковой у даурского журавля. Генетические различия между зимующими популяциями черного журавля *G. monacha* [36], а также между континентальной мигрирующей и оседлой островной популяциями японского журавля [10], судя по распределению гаплотипов контрольного региона в медианных сетях и филогенетических деревьях, практически отсутствуют.

Полученный нами график распределения парных различий нуклеотидов, свидетельствующий об увеличении численности вида в недавнем прошлом, не подкрепляется достоверными тестами на селективную нейтральность. Однако эти тесты очень чувствительны к размеру выборок, которые у нас недостаточно велики. При этом в TCS-сети гаплотипов контрольного региона отсутствуют звездобразные структуры, характерные для популяций, прошедших через “бутылочное горлышко”, что также свидетельствует в пользу преждевременности выводов о популяционной экспансии даурского журавля в прошлом.

В целом высокие показатели генетической изменчивости даурского журавля по изученным молекулярно-генетическим маркерам указывают на стабильное состояние его генофонда на разных пролетных путях, однако в связи с сокращением численности западной популяции и в целях поддержания восточной охранная мера для этого редкого вида журавлей актуальны и необходимы.

Авторы благодарят Е.Ю. Гаврикову и Н.В. Кузнецову за биологический материал от даурских журавлей, содержащихся на Станции реинтродукции редких видов журавлей Хинганского государственного природного заповедника.

Работа выполнена при финансовой поддержке гранта РФФИ № 17-04-01287, в рамках Государ-

ственного задания 0112-2019-0001, а также с частичной поддержкой Комплексной международной научно-производственной программы Евроазиатской региональной ассоциации зоопарков и аквариумов “Сохранение журавлей Евразии” (2012–2019 и 2021 гг.).

Все применимые международные, национальные и/или институциональные принципы ухода и использования животных были соблюдены.

Авторы заявляют, что у них нет конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. BirdLife International. 2018. *Antigone vipio*. The IUCN Red List of threatened species 2018: e.T22692073A131927305. <https://doi.org/10.2305/IUCN.UK.2018-2.RLTS.T22692073A131927305.en>
2. Meine C.D., Archibald G.W. The Cranes: Status Survey and Conservation Action Plan. IUCN, Gland, Switzerland, and Cambridge, UK, 1996. 282 p.
3. Mirande C.M., Harris J.T. (eds) // Crane conservation strategy. Baraboo, Wisconsin, USA: Intern. Crane Foundation, 2019. 454 p.
4. Арчибальд Д. Статус журавлей мира в 2021 г. // Журавли Евразии (распространение, биология). 2021. Вып. 6. С. 31–67.
5. Горошко О.А., Сурмач С.Г. Даурский журавль // Красная книга Российской Федерации. Животные. 2-е изд. М.: ФГБУ ВНИИ “Экология”. 2021. С. 684–686.
6. Jones K.L., Henkel J.R., Howard J.J. et al. Isolation and characterization of 14 polymorphic microsatellite DNA loci for the endangered Whooping crane (*Grus americana*) and their applicability to other crane species // Conserv. Gen. Res. 2010. V. 2. № 1. P. 251–254. <https://doi.org/10.1007/s12686-010-9196-3>
7. Meares K., Dawson D., Horsburgh G.J. et al. Characterisation of 14 blue crane *Grus paradisea* (Gruidae, AVES) microsatellite loci for use in detecting illegal trade // Conserv. Genet. 2008. V. 9. P. 1363–1367. <https://doi.org/10.1007/s10592-007-9490-0>
8. Zou H.F., Dong H.Y., Kong W.Y. et al. Characterization of 18 polymorphic microsatellite loci in the red-crowned crane (*Grus japonensis*), an endangered bird // Anim. Sci. J. 2010. V. 81. № 4. P. 519–522. <https://doi.org/10.1111/j.1740-0929.2010.00779.x>
9. GelAnalyzer 19.1 (www.gelanalyzer.com) by Istvan Lazar Jr., PhD and Istvan Lazar Sr., PhD, CSc.
10. Hasegawa O., Takada S., Yoshida M.C., Abe S. Variation of mitochondrial control region sequences in three crane species, the red-crowned crane *Grus japonensis*, the common crane *G. grus* and the hooded crane *G. monacha* // Zool. Sci. 1999. V. 16. P. 685–692.
11. Peakall R., Smouse P.E. GenAlEx 6.5: genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research — an update // Bioinformatics. 2012. V. 28.

- № 19. P. 2537–2539.
<https://doi.org/10.1093/bioinformatics/bts460>
12. Pritchard J.K., Matthew S., Peter D. Inference of population structure using multilocus genotype data: Linked loci and correlated allele frequencies // *Genetics*. 2000. V. 164. № 4. P. 1567–1587.
<https://doi.org/10.3410/f.1015548.197423>
 13. Kopelman N.M., Mayzel J., Jakobsson M. et al. Clumpak: A program for identifying clustering modes and packaging population structure inferences across K // *Mol. Ecol. Res.* 2015. V. 15. № 5. P. 1179–1191.
<https://doi.org/10.1111/1755-0998.12387>
 14. Jombart. T. adegenet: a R package for the multivariate analysis of genetic markers // *Bioinformatics*. 2008. V. 24. P. 1403–1405.
<https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btn129>
 15. Wickham H. ggplot2: Elegant Graphics for Data Analysis. N.Y.: Springer-Verlag, 2016.
 16. RStudio Team. RStudio: Integrated Development Environment for R. RStudio, PBC, Boston, MA, 2021. <http://www.rstudio.com> <http://www.rstudio.com>
 17. R Core Team. R: A Language and Environment for Statistical Computing. R Foundation for Statistical Computing. Austria: Vienna, 2021. <https://www.R-project.org>
 18. Katoh K., Misawa K., Kuma K., Miyata T. MAFFT: A novel method for rapid multiple sequence alignment based on fast Fourier transform // *Nucl. Acids Res.* 2002. V. 30. № 14. P. 3059–3066.
<https://doi.org/10.1093/nar/gkf436>
 19. Kearse M., Moir R., Wilson A. et al. Geneious Basic: An integrated and extendable desktop software platform for the organization and analysis of sequence data // *Bioinformatics*. 2012. V. 28. № 12. P. 1647–1649.
<https://doi.org/10.1093/bioinformatics/bts199>
 20. Librado P., Rozas J. DnaSP v5: A software for comprehensive analysis of DNA polymorphism data // *Bioinformatics*. 2009. V. 25. № 11. P. 1451–1452.
<https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btp187>
 21. Clement M., Snell Q., Walke P. et al. TCS: estimating gene genealogies // *Proc. 16th Int. Parallel Distrib. Process Symp.* 2002. V. 2. P. 184.
 22. Leigh J.W., Bryant D. PopART: Full-feature software for haplotype network construction // *Methods Ecol. Evol.* 2015. V. 6. № 9. P. 1110–1116.
<https://doi.org/10.1111/2041-210X.12410>
 23. Rhymer J.M., Fain M.G., Austin J.E. et al. Mitochondrial phylogeography, subspecific taxonomy, and conservation genetics of sandhill cranes (*Grus canadensis*; Aves: Gruidae) // *Conserv. Gen.* 2001. V. 2. P. 203–218.
 24. Мудрик Е.А., Кашенцева Т.А., Редчук П.С., Политов Д.В. Данные по микросателлитной изменчивости подтверждают низкую генетическую дифференциацию западного и восточного подвидов серого журавля (*Grus grus* L.) // *Мол. биология*. 2015. Т. 49. № 2. С. 297–304.
<https://doi.org/10.7868/S002689841502010X>
 25. Mudrik E.A., Ilyashenko E.I., Goroshko O.A. et al. The Demoiselle crane (*Anthropoides virgo*) population genetic structure in Russia // *Vavilov J. Genetics and Breeding*. 2018. V. 22. № 5. P. 586–592.
<https://doi.org/10.18699/VJ18.398>
 26. Mudrik E.A., Ilyashenko E.I., Ilyashenko V.Y. et al. Genetic diversity and differentiation of the widespread migratory Demoiselle Crane, *Grus virgo*, on the northern edge of the species' distribution // *J. Ornithol.* 2022. V. 163. № 1. P. 291–299.
<https://doi.org/10.1007/s10336-021-01919-4>
 27. Glenn T.C., Wolfgang S., Braun M.J. Effects of a population bottleneck on whooping crane mitochondrial DNA variation // *Conserv. Biol.* 1999. V. 13. № 5. P. 1097–1107.
 28. Sugimoto T., Hasegawa O., Azuma N. et al. Genetic structure of the endangered red-crowned cranes in Hokkaido, Japan and conservation implications // *Conserv. Genet.* 2015. V. 16. P. 1395–1401.
<https://doi.org/10.1007/s10592-015-0748-7>
 29. Горошко О.А., Цэвээнмядаг Н. Данные о влиянии засух на популяцию даурских журавлей // *Наземные позвоночные Даурии: Сб. науч. трудов Гос. природного биосферного заповедника "Даурский"*. Вып. 3. Чита: Поиск, 2003. С. 121–130.
 30. Горошко О.А. Даурский журавль // *Красная книга Забайкальского края. Животные*. Новосибирск: Новосиб. изд. дом, 2012. С. 120–122.
 31. Горошко О.А. Динамика популяций и качества местообитаний птиц в Даурии в условиях многолетних климатических циклов // *Ареалы, миграции и другие перемещения диких животных*. Владивосток: ООО "Рея", 2014. С. 74–80.
 32. Горошко О.А. Динамика и современное состояние популяций журавлей в Даурии (Забайкалье, Монголия) // *Журавли Евразии: биология, охрана, управление*. 2015. Вып. 5. С. 116–134.
 33. Горошко О.А. Результаты учетов журавлей в Юго-Восточном Забайкалье, Россия, в 2016–2020 гг. // *Журавли Евразии (распространение, биология)*. 2021. Вып. 6. С. 82–105.
 34. Haase M., Holtje H., Blahy B. et al. Shallow genetic population structure in an expanding migratory bird with high breeding site fidelity, the Western Eurasian Crane *Grus grus grus* // *J. Ornithol.* 2019. V. 160. P. 965–972.
<https://doi.org/10.1007/s10336-019-01688-1>
 35. Haase M., Ilyashenko V. A glimpse on mitochondrial differentiation among four currently recognized subspecies of the common crane *Grus grus* // *Ardeola*. 2012. V. 59. № 1. P. 131–136.
<https://doi.org/10.13157/arla.59.1.2012.131>
 36. Zhang L., Zhou L., Dai Y. Genetic structure of wintering Hooded Cranes (*Grus monacha*) based on mitochondrial DNA D-loop sequences // *Chinese Birds*. 2012. V. 3. № 2. P. 71–81.
<https://doi.org/10.5122/cbirds.2012.0012>

Gene Pool Heterogeneity of Western and Eastern Populations of the White-Naped Crane *Antigone vipio* in Different Flyways

E. A. Mudrik^{a, *}, O. A. Goroshko^{b, c}, S. G. Surmach^d, T. A. Kashentseva^e,
A. V. Nechaeva^a, S. M. Smirenski^f, and D. V. Politov^a

^aVavilov Institute of General Genetics Russian Academy of Sciences, Moscow, 119991 Russia

^bDaursky State Nature Biosphere Reserve, Nizhny Tsasuchey, 674495 Russia

^cInstitute of Nature Resources, Ecology and Cryology Russian Academy of Sciences, Chita, 672014 Russia

^dFederal Scientific Center of Biodiversity of the East Asia Terrestrial Biota, Far Eastern Branch, Russian Academy of Sciences, Vladivostok, 690022 Russia

^eOka Crane Breeding Center, Oka State Nature Biosphere Reserve, Brykin Bor, 391072 Russia

^fMuraviovka Park for Sustainable Land Use, Muraviovka, 676964 Russia

*e-mail: mudrik@vigg.ru

The article presents the first data on the genetic structure of the White-naped crane *Antigone vipio*, a rare migratory bird species of northeastern Asia. On the base of seven polymorphic microsatellite loci analysis and complete control region sequencing (1132 bp), the genetic homogeneity of spatially separated western and eastern populations using different flyways was established. The found high levels of observed ($H_O = 0.696 \pm \pm 0.033$) and expected ($H_E = 0.707 \pm 0.037$) heterozygosity and haplotype diversity ($H_d = 0.973$) of the White-naped crane are comparable to these parameters in wide-range crane species with a large number. No genetic differentiation by microsatellite loci ($F_{ST} = 0.013$, $P = 0.369$) low level of genetic differences by the control region ($F_{ST} = 0.041$, $P = 0.05$), lack of intraspecific spatial structuring of the White-naped crane by haplotypes and individual multi-locus genotypes may be due to the absence of reproductive isolation between individuals from different populations and changes in the migration routes of immature birds.

Keywords: Gruidae, genetic variation, genetic differentiation, microsatellite loci, control region, Russia.

МЕТИЛИРОВАНИЕ ГЕНА *MART* ПРИ НЕЙРОДЕГЕНЕРАТИВНЫХ ЗАБОЛЕВАНИЯХ ИЗ ГРУППЫ СИНУКЛЕИНОПАТИЙ

© 2022 г. Е. В. Яковенко¹, *, Н. Ю. Абрамычева¹, Е. Ю. Федотова¹, С. Н. Иллариошкин¹

¹Научный центр неврологии, Москва, 125367 Россия

*e-mail: helenaabracham@gmail.com

Поступила в редакцию 21.10.2021 г.

После доработки 09.12.2021 г.

Принята к публикации 27.12.2021 г.

К группе синуклеинопатий — нейродегенеративных заболеваний, связанных с накоплением в структурах центральной нервной системы патологических белковых агрегатов белка альфа-синуклеина — относятся такие заболевания как болезнь Паркинсона (БП) и мультисистемная атрофия (МСА). Точные причины развития этих заболеваний на настоящий момент еще не определены, при этом установлено взаимодействие генетических и средовых факторов. Полиморфные варианты гена *MART*, а также нарушение эпигенетических механизмов, в частности, метилирования транскрипционно значимых областей генов, являются факторами риска развития синуклеинопатий. В работе изучено влияние уровня метилирования гена *MART* на развитие БП и МСА, проведено клинико-эпигенетическое сопоставление данных. Определено гиперметилирование в трех CpG-сайтах промоторной области гена *MART* в группе МСА при сравнении с контролем. Также определена статистически значимая разница между гаплотипами *MART* в уровне метилирования четырех CpG-сайтов промотора в группе МСА, при этом протективный гаплотип *H2* имел более низкие уровни метилирования. Определено влияние возраста и противопаркинсонической терапии агонистами дофаминовых рецепторов на уровень метилирования гена *MART*. Наши данные сравнительного анализа метилирования при синуклеинопатиях свидетельствуют скорее о возможной протективной роли гипометилирования *MART*, на что указывают преимущественно гипометилированный статус CpG-сайтов в контрольной группе, гипометилирование протективного *H2*-гаплотипа *MART* и повышение уровня гиперметилирования с возрастом.

Ключевые слова: болезнь Паркинсона, мультисистемная атрофия, эпигенетика, метилирование ДНК, ген *MART*.

DOI: 10.31857/S0016675822050113

Синуклеинопатии представляют собой одну из групп церебральных протеинопатий — нейродегенеративных заболеваний, характеризующихся накоплением в нейронах и глиальных клетках патологических белковых агрегатов [1]. При синуклеинопатиях таким патологическим субстратом являются агрегаты короткого синаптического белка альфа-синуклеина, принимающего аномальную конформацию, в структурах центральной и периферической нервной системы [2]. Различия в типах клеток и областях нервной системы, где локализуются агрегаты, обуславливают клинические проявления синуклеинопатий и манифестацию их различных нозологических форм, среди которых наиболее распространены являются болезнь Паркинсона (БП) и мультисистемная атрофия (МСА).

Согласно эпидемиологическим исследованиям последних лет БП является глобальным бременем для здравоохранения и общества в целом, поражая 1–2% населения старше 65 лет и 4–5%

людей старше 85 лет [3, 4]. Около 10% случаев заболевания затрагивает более молодую возрастную группу до 50 лет [5, 6]. Проявляется БП как моторными симптомами (гипокинезия, тремор, ригидность, постуральная неустойчивость), так и широким рядом немоторных нарушений [7]. Главным патоморфологическим признаком этого заболевания являются агрегаты белка альфа-синуклеина в цитоплазме нейронов — тельца Леви, которые определяются в комбинации с потерей дофаминергических нейронов компактной части черной субстанции среднего мозга [8].

БП — комплексная патология, которая вызывается сочетанием генетических и средовых факторов, причем на долю спорадической формы приходится около 90%, а на долю наследственных форм — около 10% всех случаев заболевания. На данный момент известны 23 гена (*SNCA*, *PARK2*, *LRRK2*, *PINK1*, *DJ-1*, *GBA* и др.), мутации в которых вызывают развитие наследственных форм

БП [9]. Также известно множество полиморфных вариантов в различных генах (включая *SNCA* и *MAPT*), ассоциированных с БП и установленных по результатам полногеномных ассоциативных исследований — GWAS (genome wide association study) [10–12].

МСА — прогрессирующее нейродегенеративное заболевание, характеризующееся вегетативной недостаточностью в комбинации с моторными нарушениями, преимущественно паркинсонического типа и/или мозжечкового типа [13]. При МСА агрегаты альфа-синуклеина встречаются главным образом в виде олигодендроглиальных цитоплазматических включений и, в меньшей степени, нейрональных цитоплазматических включений, что приводит к дегенерации клеток различных областей мозга [14]. МСА считается спорадическим заболеванием, при этом, по данным последних GWAS-исследований, обнаружено несколько локусов, ассоциированных с риском развития МСА — в их числе гены *SNCA*, *MAPT* и *COQ2* [15].

Поиск факторов предрасположенности к развитию синуклеинопатий ведется в различных направлениях, в том числе и в области эпигенетики. Эпигенетические изменения относятся к устойчивым и наследуемым изменениям в экспрессии генов, происходящих без нарушения последовательности ДНК [16, 17]. К основным эпигенетическим механизмам относят метилирование ДНК, модификации гистонов и контроль активности генов с помощью некодирующих РНК [18]. Эпигенетические изменения, влияющие на развитие БП, активно изучаются в течение последнего десятилетия и сконцентрированы на метилировании ДНК — процессе присоединения метильной группы к цитозину, состоящему в тандеме с гуанином (СрG-динуклеотид, или СрG-сайт). Считается, что высокий уровень метилирования СрG-сайтов в промоторных и регуляторных областях приводит к нарушению связывания с ДНК-полимеразами и транскрипционными факторами и, соответственно, к снижению транскрипции генов, а низкий — наоборот — к повышению транскрипции [19].

Учитывая подтвержденную во многих исследованиях тесную взаимосвязь между уровнем экспрессии альфа-синуклеина и риском развития БП [20–23], метилирование альфа-синуклеина стало наиболее изучаемым аспектом при оценке роли эпигенетических механизмов у пациентов с БП. Известно, что в гене альфа-синуклеина (*SNCA*) существуют СрG-островки (области с высокой концентрацией СрG-динуклеотидов), находящиеся в промоторной области и в интроне 1, причем по данным ряда проведенных исследований СрG-сайты этой области *SNCA* гипометилированы в группе пациентов с БП, что приводит к по-

вышению синтеза мРНК *SNCA* и накоплению альфа-синуклеина в клетках [24–29].

Помимо гена *SNCA* многие другие гены также показали значимую роль в формировании предрасположенности к развитию БП и других синуклеинопатий. Ген *MAPT*, который кодирует тау-белок, ассоциированный с микротрубочками цитоскелета нейронов, согласно ряду GWAS-исследований является фактором риска развития как БП, так и МСА [30, 31]. Обнаружено, что гаплотип *H1* гена *MAPT* повышает риск развития БП, в то время как гаплотип *H2* является протективным фактором в отношении этого заболевания [32]. Исследований, посвященных изучению влияния метилирования гена *MAPT* на развитие БП и МСА, на настоящий момент крайне мало. В гене *MAPT* расположено несколько СрG-островков, причем самый большой из них, содержащий 302 СрG-сайта, располагается в промоторном регионе [33].

Целью нашего исследования стало изучение влияния уровня метилирования гена *MAPT* на развитие БП и МСА, проведение клинико-эпигенетических сопоставлений, а также изучение корреляций между гаплотипами *MAPT* и уровнем метилирования.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Пациенты

В исследование включены 61 пациент с диагнозом “болезнь Паркинсона”, поставленным по критериям Международного общества расстройств движений (32 мужчины, 29 женщин, средний возраст 60.4 лет, медиана 63 [53; 69] лет). В группу МСА вошли 22 пациента с паркинсоническим фенотипом данного заболевания, поставленным по критериям S. Gilman с соавт. [34]: 7 мужчин, 15 женщин, средний возраст 61.0 лет, медиана 59.5 [54.5; 69] лет. В группу контроля включены 43 неврологически здоровых добровольца: 16 мужчин, 27 женщин, средний возраст — 58.0 [53; 62.5] лет. Группы были сопоставимы по поло-возрастным характеристикам.

Всем пациентам с БП проводился подробный сбор анамнеза, общеклинический и неврологический осмотр, уточнялись возраст дебюта и длительность заболевания, семейный анамнез, определялись стадия заболевания по Hoehn-Yahr, форма заболевания (дрожательная/акинетико-ригидная/смешанная), а также проводилось тестирование пациентов по Унифицированной шкале оценки болезни Паркинсона Международного общества расстройств движений (MDS-UPDRS), Монреальской шкале оценки когнитивных функций (MOCA), Госпитальной шкале тревоги и депрессии (HADS).

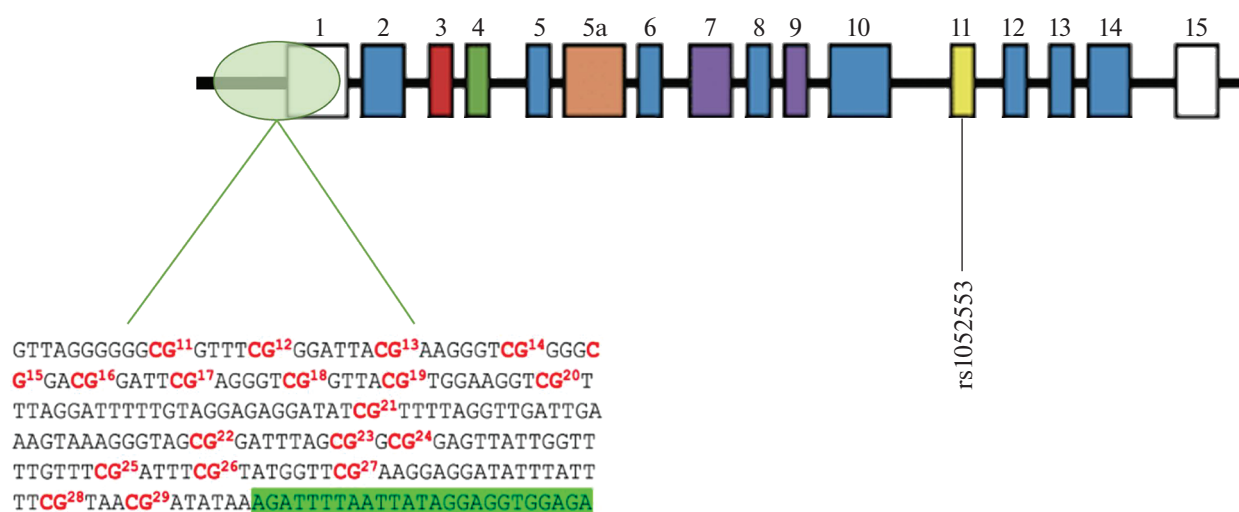


Рис. 1. Локализация исследуемой промоторной области с экзоном 1, и варианта rs1052553 в экзоне 11 гена *MAPT* (синие элементы — облигатно транскрируемые экзоны, красный, зеленый, желтый — экзоны с альтернативным сплайсингом в тканях головного мозга и других тканях, фиолетовые — экзоны, не транскрируемые в головном мозге, белые — не транскрируемые области). Зеленый овал — промоторная область гена *MAPT*. Буквенная последовательность — изучаемые CpG-сайты гена *MAPT* (обратный праймер отмечен зеленым цветом).

Средний возраст дебюта заболевания в группе БП составлял 55 лет [48; 64] лет. Длительность заболевания составляла в среднем 4 [3; 7] года. В группе преобладали пациенты со смешанной (дрожательно-ригидной) формой БП — 49 (80.3%) больных, акинетико-ригидную форму определили у 11 (18.0%) пациентов, дрожательная форма была у одного пациента (1.6%). В состав основной группы БП вошли 13 пациентов (21.3%) с положительным семейным анамнезом по данному заболеванию.

Пациенты были подразделены на следующие стадии по функциональной шкале Hoehn-Yahr: 1-я стадия — 12 человек (19.9%), 2-я стадия — 18 человек (29.5%), 2.5-я стадия — 1 человек (1.6%), 3-я стадия — 28 человек (46.0%), 4-я стадия — 2 человека (3.3%). Средний суммарный балл по шкале UPDRS в периоде выключения был равен 55 [35; 78.75] баллов.

Противопаркинсоническую терапию получал 41 пациент (67.2%). При этом препараты леводопы принимал 31 (50.8%) пациент, средняя суточная доза составила 600 [300; 737.25] мг. Терапию агонистами дофаминовых рецепторов (прамипексол, ропинирол, пирибедил) получали 30 пациентов (49.2%), при этом средняя эквивалентная доза составила 200 [150; 300] мг. Амантадины получали 20 пациентов (32.79%), со средней эк-

вивалентной дозой 300 [150; 300] мг. Также рассчитывалась суммарная эквивалентная доза в подгруппе пациентов ($n = 41$), получающих терапию, которая составила 600 [300; 950] мг. При расчете в общей группе пациентов ($n = 61$) суммарная эквивалентная доза принимаемых препаратов составила 300 [0; 800] мг.

В группе МСА средний возраст начала болезни составил 55 [52.25; 64] года, длительность заболевания — 3.5 [2; 5] года.

Методы исследования

В гене *MAPT* уровень метилирования определялся в промоторной области (CpG 11–29, нумерация CpG-сайтов от начала исследуемого CpG-островка, охватывающего также нетранскрируемый 1-й экзон) (рис. 1). Нумерация экзонов проведена согласно референсному транскрипту NM_001123066.4. Расположение исследованной области относительно референсного генома (GRCh38): chr17: 45894045 (CpG-11) — chr17: 45894235 (CpG-29). CpG-сайты с 1-го по 10-й в экзоне 1 были полностью метилированы в обеих исследованных группах, поэтому в дальнейшем они не включались в анализ.

Подобранные праймеры для исследования уровня метилирования экзона 1 гена *MAPT*:

- прямой праймер 5'→3' TGTТААГГАААГГАТТТАТТТТГГТТ,
- обратный праймер 5'→3' СТТТСТСАССТССТАТААТТАААТСТ.

Таблица 1. Уровни метилирования (%) CpG-сайтов в промоторной области гена *MART* у пациентов с МСА, отличающиеся от контроля

Номер CpG-гена	МСА	Контроль	$p(U)$
12	29 [26; 31]	22.5 [17.25; 27.75]	0.000232
14	21 [18.25; 24.75]	17 [13.5; 20]	0.000477
20	17 [13; 20]	9 [0; 13.5]	0.001033

Паттерн метилирования определялся с помощью метода прямого секвенирования амплифицированных участков ДНК после выделения геномной ДНК из лейкоцитов периферической крови и ее бисульфитной конверсии набором EZ DNA Methylation Kit (Zymo Research, США). Амплификацию фрагментов ДНК для последующего секвенса проводили в 10 мкл реакционной среды: 50 mM KCl, 50 mM Трис-НСl (pH 8.8), 2.5 mM MgCl₂, 250 мкМ dNTP, 1 ед. Таq ДНК-полимеразы с ингибирующими активностью фермента анти-телами (“Синтол”, Москва), по 1 мкМ прямого и обратного праймеров, образец ДНК ~20 нг.

Визуализация осуществлялась с помощью программного обеспечения Sequencing Analysis Software (v5.2 Applied Biosystems). Степень метилирования рассчитывали путем анализа первичных результатов секвенирования по Сэнгеру. Процент метилирования для каждого конкретного CpG-сайта для каждого ДНК-образца рассчитывали по отношению высоты синего пика С

(пик электрофореграммы, местоположение которого соответствует анализируемому CpG-сайту и указывающий на наличие метилированного цитозина) относительно суммарной высоты пиков С + Т данного положения (метилированный синий и неметилированный красный цитозин).

Гаплотип гена *MART* определялся с помощью сцепленного полиморфного варианта rs1052553 (A>G) (где нуклеотид А соответствует гаплотипу *H1*, а нуклеотид G — гаплотипу *H2*) в экзоне 11 (рис. 1). Амплификацию фрагментов двухцепочечной ДНК для последующего секвенса проводили в 10 мкл специально подобранной реакционной среды: 50 mM KCl, 50 mM Трис-НСl (pH 8.8), 2.5 mM MgCl₂, 250 мкМ dNTP, 1 ед. Таq ДНК-полимеразы с ингибирующими активностью фермента анти-телами (“Синтол”, Москва), по 1 мкМ прямого и обратного праймера, образец ДНК ~20 нг.

Подобранные праймеры для экзона 11 гена *MART*:

- прямой праймер 5'→3' AAGACTGTGGAGCCGAGTTG,
- обратный праймер 5'→3' TGCCCTGACTATGAGAGCCT.

Статистический анализ проводился на программе Statistica 13 (Tibco Russia). В работе использовались: *U*-критерий Манна–Уитни для оценки различий между двумя независимыми выборками, ANCOVA, метод ранговой корреляции Спирмена и множественная линейная регрессия. Статистический уровень значимости принимался равным 0.05. Также проводилась поправка на множественную проверку гипотез по методу Бонферрони, для 19 CpG-сайтов, p составило 0.0026.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Метилирование *MART* у пациентов с БП и МСА

При сравнении групп БП и контроля не было обнаружено статистически значимых различий в уровнях метилирования изучаемых сайтов в гене *MART*.

При сравнении групп МСА и контроля были обнаружены статистически значимые различия в уровнях метилирования ряда CpG-сайтов, представленных в табл. 1. Уровень метилирования *MART* в группе БП, МСА и в контрольной

группе отражен на рис. 2. Как видно из рисунка, уровень метилирования при БП занимает промежуточное положение между пациентами с МСА и контрольной группой.

При сравнении уровня метилирования гена *MART* в группах БП и МСА статистически значимой разницы в исследуемых CpG выявить не удалось.

Взаимосвязь метилирования *MART* и гаплотипов *H1* и *H2*

Процент встречаемости аллелей и диплотипов *H1/H2* гена *MART* по группам приведен в табл. 2.

Поочередное сравнение контрольной группы с группой БП и с группой МСА по распределению аллелей и генотипов отличий не выявило. Учитывая низкую частоту встречаемости диплотипов *H1/H2* и *H2/H2*, анализ подгрупп диплотипов и их связи с метилированием не проводился.

Исследован уровень метилирования у пациентов с БП, МСА и в контрольной группе в зависимости от гаплотипа *MART* (*H1* или *H2*).

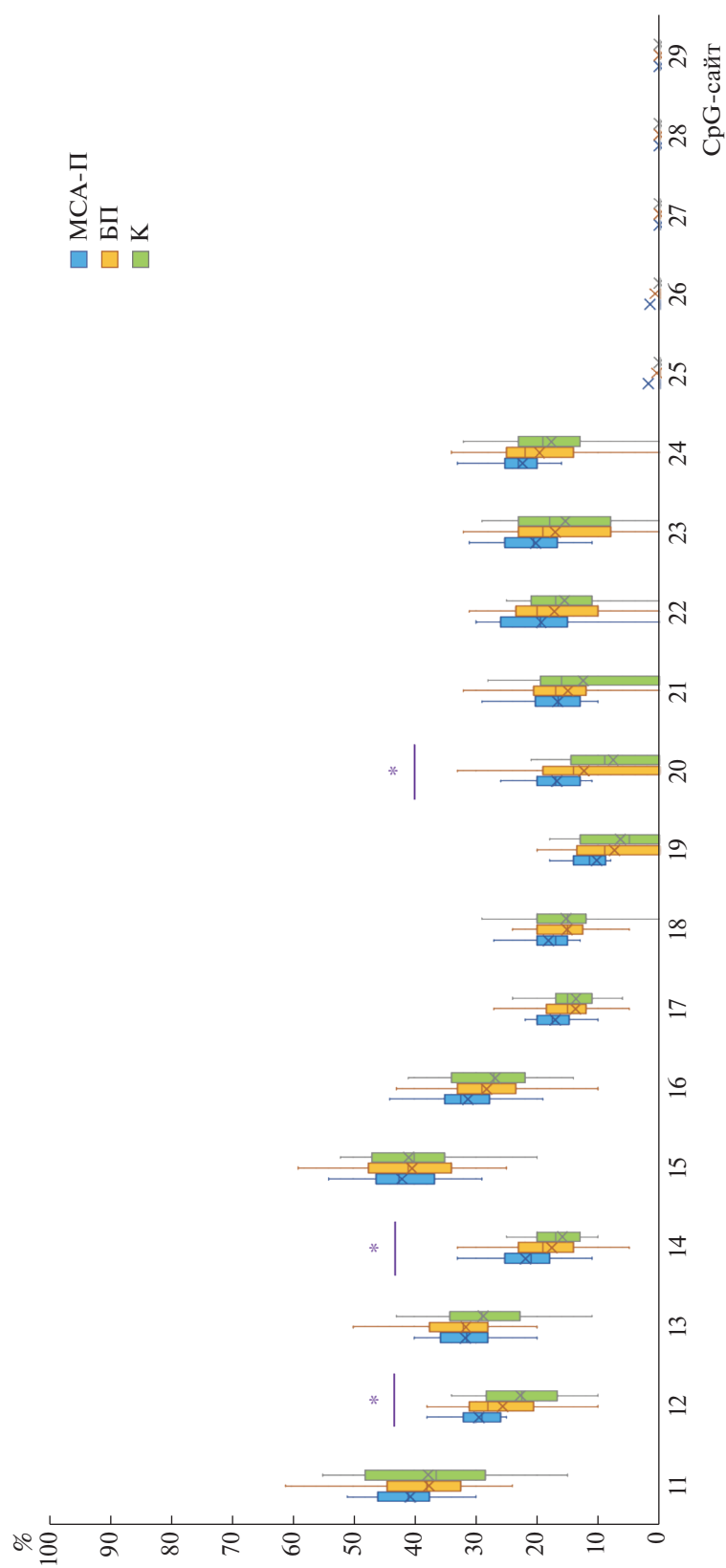


Рис. 2. Метилирование CpG-сайтов промоторной области гена *MART*. * – статистически значимые различия между контрольной группой и пациентами с МСА. По оси абсцисс – номера CpG-сайтов, по оси ординат – процент метилирования. BP – болезнь Паркинсона, МСА-П – мультисистемная атрофия – паркинсонический фенотип, К – группа контроля.

Таблица 2. Распределение аллельных вариантов *H1* и *H2* по группам

Группа	Гаплотип		Генотип		
	<i>H1</i>	<i>H2</i>	<i>H1/H1</i>	<i>H1/H2</i>	<i>H2/H2</i>
БП	67 (88%)	9 (12%)	32 (84%)	3 (8%)	3 (8%)
МСА	38 (82.6%)	8 (17.4%)	16 (69.5%)	6 (26%)	1 (4.5%)
Контроль	36 (90%)	4 (10%)	17 (85%)	2 (10%)	1 (5%)

Таблица 3. Метилирование сайтов (%) промоторной области гена *MAPT* в зависимости от носительства аллелей *H1* и *H2* у пациентов с МСА

Номер <i>CpG</i> -гена	Гаплотип		$p(U)$
	<i>H1</i>	<i>H2</i>	
12	30 [27.5; 33]	26 [25; 26.25]	0.001605
13	33 [29; 38]	23.5 [22.25; 29]	0.000773
14	24 [19; 26]	17 [16; 18]	0.000350
16	32.5 [28; 35]	25.5 [22; 28.75]	0.002465

При сравнении метилирования у пациентов с БП, являющихся носителями разных гаплотипов, был обнаружен один дифференциально метилированный *CpG*-сайт – *CpG*-15: в группе пациентов с аллелем *H1* – метилирование составило 40 [34; 45]%, в группе с аллелем *H2* – 34 [30; 34]% ($p(U) = 0.001819$), т.е. носители *H1* имели более высокий уровень метилирования.

В группе пациентов с МСА также выявлены значимые различия в метилировании гена *MAPT* при носительстве гаплотипов *H1* и *H2*. Результаты приведены в табл. 3. Во всех четырех дифференциально метилированных сайтах носительство гаплотипа *H1* было ассоциировано с более высоким уровнем метилирования.

В контрольной группе различий между носителями гаплотипов выявлено не было.

Анализ метилирования MAPT в зависимости от демографических и клинических характеристик

Различий в метилировании *MAPT* между мужчинами и женщинами выявлено не было.

Изучена взаимосвязь между уровнем метилирования *MAPT* и возрастом пациентов на момент исследования. В группе БП были выявлены прямые корреляции указанных показателей в трех *CpG*-сайтах: *CpG*-19 ($r = 0.52$ – средняя корреляция, $p = 0.000001$); *CpG*-22 ($r = 0.47$ – слабая корреляция, $p = 0.00013$); *CpG*-23 ($r = 0.4$ – слабая корреляция, $p = 0.00173$). Таким образом, с возрастом наблюдалось гиперметилирование исследованных сайтов. При этом в группе пациентов с

МСА и в контрольной группе подобных корреляций обнаружить не удалось.

Корреляций между возрастом начала заболеваний (с поправкой на возраст на момент обследования) и уровнем метилирования в *MAPT* в работе не обнаружено.

При изучении корреляций уровня метилирования *MAPT* с длительностью заболевания в группе БП выявлена слабая обратная корреляция по сайту *CpG*-15 ($r = -0.38$, $p = 0.00259$). В группе МСА корреляций с длительностью заболевания не выявлено.

При исследовании уровня метилирования пациентов с БП в зависимости формы заболевания (акинетико-ригидная/дрожательная/смешанная) и семейного анамнеза (отягощен/не отягощен) статистически значимых различий выявлено не было. При оценке корреляций между уровнем метилирования и стадией заболевания по шкале Hoehn-Yahr, суммой баллов по шкале UPDRS и ее подразделам, а также суммой баллов по шкалам HADS и MOCA (с поправкой на возраст) значимых корреляций выявлено не было.

Согласно полученным данным, терапия леводопой или амантадинами не влияла на профиль метилирования *MAPT*. В то же время обнаружена разница между группами пациентов с БП, принимающими и непринимающими агонисты дофаминовых рецепторов. При поправке на возраст (которая была сделана с учетом того, что агонисты дофаминовых рецепторов обычно назначаются более молодым пациентам) выявлены различия по следующим сайтам *MAPT*: *CpG*-22 (без

терапии — 22 [19; 26]%, с терапией — 11 [8; 20.25]%, $p = 0.000178$) и CpG-23 (без терапии — 21 [18; 25]%, с терапией — 10.5 [6; 21.25]%, $p = 0.001689$), то есть назначение агонистов снижает уровень метилирования.

Корреляций между уровнем метилирования и дозой леводопы, дозой агонистов дофаминовых рецепторов (с поправкой на сумму баллов по шкале МОСА и возраст), эквивалентной дозой всех препаратов не выявлено.

ОБСУЖДЕНИЕ

В настоящей работе нами был исследован ген *MART*, роль которого в риске развития нейродегенеративных заболеваний из группы синуклеинопатий и таупатий была установлена в предыдущих работах. CpG-островки промоторной области с экзоном 1 был выбран в связи с тем, что именно этот участок гена *MART* определяет его экспрессию.

Нами при анализе эпигенетических модификаций *MART* определено гиперметилирование в трех промоторных CpG-сайтах в группе МСА при сравнении с контролем. При этом различий между пациентами с БП и контрольной группой, а также между группами БП и МСА выявлено не было.

Одно из небольшого числа исследований по метилированию промотора *MART* при БП, проведенное К. Coupland с соавт. [35], показало разницу между БП и контролем: у пациентов с БП ген *MART* был гиперметилирован в мозжечке (регионе, обычно не вовлеченном в патологический процесс при БП) и гипометилирован в скорлупе (регионе, в котором наиболее выражены патологические изменения при БП). Авторы предположили, что гиперметилирование промотора *MART* может выполнять протективную функцию, понижая экспрессию *MART*. Такое предположение частично подтверждается и данными исследования, проведенного при болезни Альцгеймера: у пациентов определялось гипометилирование CpG-островка промоторной области гена *MART*. При этом предполагается, что гипометилирование *MART* у пациентов с болезнью Альцгеймера ассоциировано с повышенной экспрессией тау-протеина и его патологической агрегацией, что наблюдается в мозге при данном заболевании [36].

Наши данные сравнительного анализа метилирования при синуклеинопатиях свидетельствуют скорее о возможной протективной роли гипометилирования *MART*. На это указывают преимущественно гипометилированный статус CpG-сайтов в контрольной группе, гипометилирование протективного *H2*-гаплотипа *MART* и повышение уровня

гиперметилирования с возрастом (возраст — один из основных факторов риска развития синуклеинопатий). Возможно, что характер метилирования *MART* достаточно специфичен для разных видов нейродегенеративной патологии [37].

Ассоциация между БП и вариантами в гене *MART* активно изучается в различных популяциях, и наиболее значимыми считаются полиморфизмы, связанные с гаплотипом *MART* (*H1* или *H2*). Известно, что гаплотип *H1* и некоторые SNP в гене *MART* повышают риск развития БП, а гаплотип *H2*, напротив, имеет протективные свойства. Такая зависимость позволила предположить, что эпигенетические модификации *MART* могут влиять на развитие БП. В настоящей работе определялась зависимость уровня метилирования CpG-сайтов гена *MART* от гаплотипа — *H1* или *H2*. Следует отметить, что гаплотип *H2* достаточно редко встречается в российской популяции, поэтому носительство генотипов *H1/H2* и, тем более, *H2/H2*, было слабо представлено среди нашей выборки пациентов и лиц контрольной группы. Тем не менее, нами была определена статистически значимая разница между гаплотипами в уровне метилирования четырех CpG-сайтов промоторной области гена *MART* в группе МСА, при этом протективный гаплотип *H2* имел более низкие уровни метилирования.

К. Coupland с соавт. в группе пациентов с БП показали более высокий уровень метилирования CpG-сайтов в гене *MART* у носителей гаплотипа *H1* в сравнении с гаплотипом *H2* [35]. Группой Y. Li с соавт. проведено исследование метилирования гена *MART* при таупатиях и выявлено повышение уровня метилирования в клетках крови и в регионах головного мозга при гаплотипе *H1* в сравнении с гаплотипом *H2* [38]. Данные работы согласуются с нашими результатами.

В настоящей работе проводился анализ связи метилирования с возрастом пациентов на момент исследования, который продемонстрировал прямые корреляции с метилированием 3 CpG-сайтов промотора *MART* в группе БП — по мере старения уровень метилирования повышался. При этом метилирование не было связано с возрастом начала заболевания при поправке на возраст. Статистически значимых различий в уровне метилирования CpG-сайтов между женщинами и мужчинами в группах БП, МСА и контроля обнаружено не было. Полученные результаты не согласуются с работой [35], в которой было выявлено, что у женщин уровень метилирования был значимо выше, а возраст начала заболевания прямо коррелировал с метилированием *MART*.

В представленном исследовании были изучены корреляции между уровнями метилирования и различными клиническими проявлениями при БП и МСА. Нам не удалось выявить корреляций уровня метилирования ни с формой заболевания, ни с тяжестью моторных или немоторных клинических проявлений.

Также мы не обнаружили связи между дозой леводопы, эквивалентной дозой всех принимаемых противопаркинсонических препаратов, наличием терапии леводопой и амантадинами и профилем метилирования гена *MAPT*. В то же время нами обнаружено различие в профиле метилирования между пациентами, принимающими и не принимающими агонисты дофаминовых рецепторов: пациенты без терапии этой группой препаратов имели значимо более высокий уровень метилирования в трех промоторных CpG-сайтах гена *MAPT*. Эти данные показывают, что терапия агонистами дофаминовых рецепторов может приводить к гипометилированию, что в свою очередь говорит о возможном модифицирующем воздействии дофаминовых агонистов на течение нейродегенеративного процесса посредством эпигенетических механизмов.

Выявленные изменения в паттернах метилирования *MAPT* у пациентов с БП и МСА могут рассматриваться в качестве звеньев молекулярного патогенеза синуклеинопатий. Оценка уровня метилирования также может стать частью комплекса биомаркеров, которые исследуются в клинике для уточнения диагноза и прогноза болезни; согласно полученным нами данным, оценка метилирования *MAPT* может играть такую биомаркерную роль в первую очередь для МСА. Полученные данные свидетельствуют о возможном модифицирующем влиянии противопаркинсонической терапии на профиль метилирования и, следовательно, на течение заболевания, что требует дальнейших исследований.

Исследование проведено без спонсорской поддержки.

Все процедуры, выполненные в исследовании с участием людей, соответствуют этическим стандартам институционального и/или национального комитета по исследовательской этике и Хельсинкской декларации 1964 г. и ее последующим изменениям или сопоставимым нормам этики.

От каждого из включенных в исследование участников было получено информированное добровольное согласие.

Авторы заявляют, что у них нет конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Kovacs G.G. Molecular pathological classification of neurodegenerative diseases: Turning towards precision medicine // *Int. J. Mol. Sci.* 2016. V. 17. № 2. 189. P. 1–33. <https://doi.org/10.3390/ijms17020189>
2. McCann H., Stevens C.H., Cartwright H., Halliday G.M. α -Synucleinopathy phenotypes // *Parkinsonism Relat. Disord.* 2014. V. 20. Suppl 1. P. 62–67. [https://doi.org/10.1016/S1353-8020\(13\)70017-8](https://doi.org/10.1016/S1353-8020(13)70017-8)
3. Bertram L., Tanzi R.E. The genetic epidemiology of neurodegenerative disease // *J. Clin. Invest.* 2005. V. 115. № 6. P. 1449–1457. <https://doi.org/10.1172/JCI24761>
4. Hirsch L., Jette N., Frolkis A. et al. The incidence of Parkinson's disease: a systematic review and meta-analysis // *Neuroepidemiology.* 2016. V. 46. № 4. P. 292–300. <https://doi.org/10.1159/000445751>
5. Karimi-Moghadam A., Charsouei S., Bell B., Jabalameli M.R. Parkinson disease from mendelian forms to genetic susceptibility: New molecular insights into the neurodegeneration process // *Cell. Mol. Neurobiol.* 2018. V. 38. № 6. P. 1153–1178. <https://doi.org/10.1007/s10571-018-0587-4>
6. Schrag A., Ben-Shlomo Y., Quinn N.P. Cross sectional prevalence survey of idiopathic Parkinson's disease and Parkinsonism in London // *BMJ.* 2000. V. 321. № 7252. P. 21–22. <https://doi.org/10.1136/bmj.321.7252.21>
7. Jankovic J. Parkinson's disease: Clinical features and diagnosis // *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry.* 2008. V. 79. № 4. P. 368–376. <https://doi.org/10.1136/jnnp.2007.131045>
8. Dickson D.W. Parkinson's disease and parkinsonism: neuropathology // *Cold Spring Harb. Perspect. Med.* 2012. V. 2. № 8. P. a009258. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a009258>
9. Jankovic J., Tan E.K. Parkinson's disease: etiopathogenesis and treatment // *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry.* 2020. V. 91. № 8. P. 795–808. <https://doi.org/10.1136/jnnp-2019-322338>
10. Simón-Sánchez J., Schulte C., Bras J.M. et al. Genome-wide association study reveals genetic risk underlying Parkinson's disease // *Nat. Genet.* 2009. V. 41. № 12. P. 1308–1312. <https://doi.org/10.1038/ng.487>
11. Nalls M.A., Pankratz N., Lill C.M. et al. Large-scale meta-analysis of genome-wide association data identifies six new risk loci for Parkinson's disease // *Nat. Genet.* 2014. V. 46. № 9. P. 989–993. <https://doi.org/10.1038/ng.3043>
12. Chang D., Nalls M.A., Hallgrímsdóttir I.B. et al. A meta-analysis of genome-wide association studies identifies 17 new Parkinson's disease risk loci // *Nat. Genet.* 2017. V. 49. № 10. P. 1511–1516. <https://doi.org/10.1038/ng.3955>
13. Ozawa T., Paviour D., Quinn N.P. et al. The spectrum of pathological involvement of the striatonigral and olivo-

- pontocerebellar systems in multiple system atrophy: Clinicopathological correlations // *Brain J. Neurol.* 2004. V. 127. Pt. 12. P. 2657–2671.
<https://doi.org/10.1093/brain/awh303>
14. Yoshida M. Multiple system atrophy: alpha-synuclein and neuronal degeneration // *Neuropathology.* 2007. V. 27. № 5. P. 484–493.
<https://doi.org/10.1111/j.1440-1789.2007.00841.x>
 15. Sailer A., Scholz S.W., Nalls M.A. et al. A genome-wide association study in multiple system atrophy // *Neurology.* 2016. V. 87. № 15. P. 1591–1598.
<https://doi.org/10.1212/WNL.0000000000003221>
 16. Portela A., Esteller M. Epigenetic modifications and human disease // *Nat. Biotechnol.* 2010. V. 28. № 10. P. 1057–1068.
<https://doi.org/10.1038/nbt.1685>
 17. Waddington C.H. The epigenotype. 1942 // *Int. J. Epidemiol.* 2012. V. 41. № 1. P. 10–13.
<https://doi.org/10.1093/ije/dyr184>
 18. Marques S., Oliveira C., Pereira C., Outeiro T. Epigenetics in neurodegeneration: A new layer of complexity // *Prog. Neuropsychopharmacol. Biol. Psychiatry.* 2011. V. 35. № 2. P. 348–355.
<https://doi.org/10.1016/j.pnpbp.2010.08.008>
 19. Wüllner U., Kaut O., deBoni L. et al. DNA methylation in Parkinson's disease // *J. Neurochem.* 2016. V. 139. Suppl 1. P. 108–120.
<https://doi.org/10.1111/jnc.13646>
 20. Chartier-Harlin M.C., Kachergus J., Roumier C. et al. Alpha-synuclein locus duplication as a cause of familial Parkinson's disease // *Lancet.* 2004. V. 364. № 9440. P. 1167–1169.
[https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(04\)17103-1](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(04)17103-1)
 21. Miller D.W., Hague S.M., Clarimon J. et al. Alpha-synuclein in blood and brain from familial Parkinson disease with SNCA locus triplication // *Neurology.* 2004. V. 62. № 10. P. 1835–1838.
<https://doi.org/10.1212/01.wnl.0000127517.33208.f4>
 22. Nemani V.M., Lu W., Berge V. et al. Increased expression of alpha-synuclein reduces neurotransmitter release by inhibiting synaptic vesicle recluster after endocytosis // *Neuron.* 2010. V. 65. № 1. P. 66–79.
<https://doi.org/10.1016/j.neuron.2009.12.023>
 23. Scott D.A., Tabarean I., Tang Y. et al. A pathologic cascade leading to synaptic dysfunction in alpha-synuclein-induced neurodegeneration // *J. Neurosci.* 2010. V. 30. № 24. P. 8083–8095.
<https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.1091-10.2010>
 24. Jowaed A., Schmitt I., Kaut O., Wüllner U. Methylation regulates alpha-synuclein expression and is decreased in Parkinson's disease patients' brains // *J. Neurosci.* 2010. V. 30. № 18. P. 6355–6359.
<https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.6119-09.2010>
 25. Matsumoto L., Takuma H., Tamaoka A. et al. CpG demethylation enhances alpha-synuclein expression and affects the pathogenesis of Parkinson's disease // *PLoS One.* 2010. V. 5. № 11. P. e15522.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0015522>
 26. Ai S.X., Xu Q., Hu Y.C. et al. Hypomethylation of SNCA in blood of patients with sporadic Parkinson's disease // *J. Neurol. Sci.* 2014. V. 337. № 1–2. P. 123–128.
<https://doi.org/10.1016/j.jns.2013.11.033>
 27. Tan Y.Y., Wu L., Zhao Z.B. et al. Methylation of alpha-synuclein and leucine-rich repeat kinase 2 in leukocyte DNA of Parkinson's disease patients // *Parkinsonism Relat. Disord.* 2014. V. 20. № 3. P. 308–313.
<https://doi.org/10.1016/j.parkreldis.2013.12.002>
 28. Pihlström L., Berge V., Rengmark A., Toft M. Parkinson's disease correlates with promoter methylation in the alpha-synuclein gene // *Mov. Disord.* 2015. V. 30. № 4. P. 577–580.
<https://doi.org/10.1002/mds.26073>
 29. Schmitt I., Kaut O., Khazneh H. et al. L-dopa increases alpha-synuclein DNA methylation in Parkinson's disease patients *in vivo* and *in vitro* // *Mov. Disord.* 2015. V. 30. № 13. P. 1794–1801.
<https://doi.org/10.1002/mds.26319>
 30. Kwok J.B., Teber E.T., Loy C. et al. Tau haplotypes regulate transcription and are associated with Parkinson's disease // *Ann. Neurol.* 2004. V. 55. № 3. P. 329–334.
<https://doi.org/10.1002/ana.1082614991810>
 31. Vilarino-Güell C., Soto-Ortolaza A.I., Rajput A. et al. *MAPT H1* haplotype is a risk factor for essential tremor and multiple system atrophy // *Neurology.* 2011. V. 76. № 7. P. 670–672.
<https://doi.org/10.1212/WNL.0b013e31820c30c1>
 32. Ezquerra M., Pastor P., Gaig C. et al. Different *MAPT* haplotypes are associated with Parkinson's disease and progressive supranuclear palsy // *Neurobiol. Aging.* 2011. V. 32. № 3. P. e11–6.
<https://doi.org/10.1016/j.neurobiolaging.2009.09.011>
 33. Caillet-Boudin M.L., Buée L., Sergeant N., Lefebvre B. Regulation of human *MAPT* gene expression // *Mol. Neurodegener.* 2015. V. 10. P. 1–14.
<https://doi.org/10.1186/s13024-015-0025-8>
 34. Gilman S., Wenning G.K., Low P.A. et al. Second consensus statement on the diagnosis of multiple system atrophy // *Neurology.* 2008. V. 71. № 9. P. 670–676.
<https://doi.org/10.1212/01.wnl.0000324625.00404.15>
 35. Coupland K.G., Mellick G.D., Silburn P.A. et al. DNA methylation of the *MAPT* gene in Parkinson's disease cohorts and modulation by vitamin E *in vitro* // *Mov. Disord.* 2014. V. 29. P. 1606–1614.
<https://doi.org/10.1002/mds.25784>
 36. Iwata A., Nagata K., Hatsuta H. et al. Altered CpG methylation in sporadic Alzheimer's disease is associated with APP and MAPT dysregulation // *Hum. Mol. Genet.* 2014. V. 23. № 3. P. 648–656.
<https://doi.org/10.1093/hmg/ddt451>
 37. Hoffmann A., Sportelli V., Ziller M., Spengler D. Driver or passenger: Epigenomes in Alzheimer's disease // *Epigenomes.* 2017. V. 1. № 1. P. 1–18.
<https://doi.org/10.3390/epigenomes1010005>
 38. Li Y., Chen J.A., Sears R.L. et al. An epigenetic signature in peripheral blood associated with the haplotype on 17q21.31, a risk factor for neurodegenerative tauopathy // *PLoS Genet.* 2014. V. 10. № 3. P. e1004211.

Methylation of *MAPT* Gene in Neurodegenerative Synucleinopathies

E. V. Iakovenko^{a, *}, N. Yu. Abramychева^a, E. Yu. Fedotova^a, and S. N. Illarioshkin^a

^a*Research Center of Neurology, Moscow, 125367 Russia*

^{*}*e-mail: helenaabracham@gmail.com*

Synucleinopathies are neurodegenerative disorders, characterized by the accumulation of pathological aggregates of alpha-synuclein protein in central nervous system cells. Parkinson's disease (PD) and multiple system atrophy (MSA) are the most common variants of synucleinopathies. The exact causes of these disorders are still unknown, but it is well established that both genetic and environmental factors are involved. Both polymorphisms in *MAPT* gene and dysregulation of epigenetic mechanisms, particularly, methylation of transcription regulation regions of genes, are risk factors of synucleinopathy development. We examined the influence of methylation level of *MAPT* gene on the development of PD and MSA and performed clinical and epigenetical comparison. We identified hypermethylation of 3 CpG-sites in promotor region of *MAPT* gene in group of MSA patients in comparison with controls. We also identified significant differences in methylation level of 4 CpG-sites in promotor region between *MAPT* haplotypes in MSA group, and protective *H2*-haplotype was hypomethylated. The modifying role of age and antiparkinsonian therapy with dopamine agonists on methylation level of *MAPT* gene was established. Our data in analysis of methylation in group of synucleinopathies show potential protective role of *MAPT* hypomethylation, as we found predominantly hypomethylated status of CpG-sites in control group, hypomethylation of protective *H2*-allele of *MAPT* gene and age-dependent increase of hypermethylation.

Keywords: Parkinson's disease, multiple system atrophy, epigenetics, DNA methylation, *MAPT* gene.

МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ ПРИЧИН НЕСИНДРОМАЛЬНОЙ НЕЙРОСЕНСОРНОЙ ТУГОУХОСТИ У БОЛЬНЫХ ИЗ ГРУЗИИ

© 2022 г. А. А. Степанова¹, *, О. Р. Исмагилова¹, Н. М. Галеева¹, Т. Г. Маркова²,
Г. А. Таварткиладзе², О. Квливидзе^{3, 4}, А. В. Поляков¹

¹Медико-генетический научный центр им. академика Н.П. Бочкова, Москва, 115478 Россия

²Российский научно-клинический центр аудиологии и слухопротезирования ФМБА России, Москва, 117513 Россия

³Грузинский фонд генетических и редких заболеваний, Тбилиси, 0162 Грузия

⁴Университет “Нью Вижен”, Школа Медицины, Тбилиси, 0159 Грузия

*e-mail: cany@yandex.ru

Поступила в редакцию 02.11.2021 г.

После доработки 13.12.2021 г.

Принята к публикации 28.12.2021 г.

Патогенные варианты в гене *GJB2* — наиболее частая причина несиндромальной нейросенсорной тугоухости. В работе проведено исследование больных нейросенсорной тугоухостью из Грузии. Определен вклад *GJB2*-тугоухости среди больных со снижением слуха. Спектр мутаций в гене *GJB2* у грузинских больных представлен патогенными вариантами: с.35delG, с.358_360delGAG, с.–23+1G>A и с.551G>C. Популяционная частота носительства *GJB2*-тугоухости составила 2.6%. У грузинских больных не выявлено наиболее частых для российских больных патогенных вариантов в генах: *STRC* (с.2171_2174delTTTG), *USH2A* (с.11864G>A), *SLC26A4* (с.1001G>T) и с.107A>C (р.His36Pro), *CLIC5* (с.1121G>A). Молекулярно-генетический диагноз установлен для 30.8% больных.

Ключевые слова: тугоухость, *GJB2*, *GJB2*-тугоухость, Грузия.

DOI: 10.31857/S0016675822050101

Нейросенсорная тугоухость — чрезвычайно распространенное заболевание и встречается у 1 из 500–1000 новорожденных [1]. Ранняя диагностика и своевременное лечение важны для приобретения слуха, речи и языковых навыков, тем самым способствуя полноценному когнитивному развитию ребенка [2].

Более половины врожденной тугоухости является наследственной, из них около 70% — несиндромальная, 80% которой составляют ауто-сомно-рецессивные формы (DFNB) [3]. Также для несиндромальной тугоухости характерны и другие типы наследования: ауто-сомно-доминантный тип (DFNA) — 15–20%, X-сцепленный (DFN) — 1–2%, вызванный мутациями в митохондриальной ДНК — менее 1% [3, 4]. Остальные 30% генетически обусловленной тугоухости являются синдромальными, существует около 400 синдромов, сопровождающихся потерей слуха или недостаточностью слуховых функций [5].

Мутации в гене коннексина 26 (*GJB2* (gap junction b2), NM_004004.6) составляют около половины случаев наследственной несиндромальной глухоты в западных странах. Белок коннексин 26

представляет собой субъединицу щелевых соединений, которые образуют сеть межклеточных взаимодействий между клетками во внутреннем ухе млекопитающих. Щелевые соединения, образующие каналы между соседними клетками, обеспечивают прямой межклеточный обмен различными соединениями с молекулярной массой до 1000 Да, т.е. метаболитами, ионами, вторичными мессенджерами, водой, а также электрическими импульсами [6].

Шесть субъединиц коннексина образуют полуканал (коннексон) в плазматической мембране, который состыковывается с другим полуканалом в плазматической мембране соседней клетки, чтобы собрать полный канал щелевого соединения (рис. 1). Субъединица коннексина состоит из четырех трансмембранных доменов, двух внеклеточных петель, одной цитоплазматической петли и цитоплазматических N-, C-концевых областей. Во внеклеточных петлях высококонсервативен порядок трех остатков цистеина, за счет чего противоположные цистеины в обеих петлях образуют дисульфидные мостики, стабили-

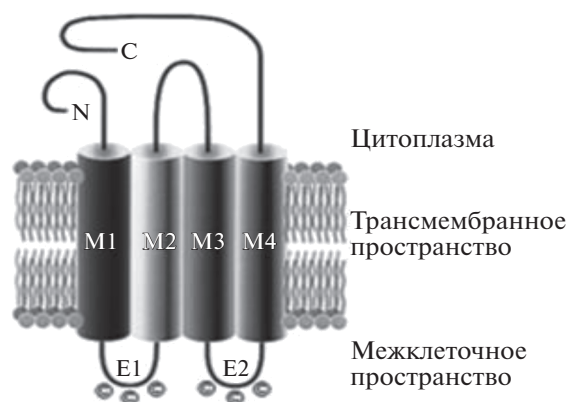


Рис. 1. Модель белка коннексина, цит. по [7].

лизирующие петли во время стыковки двух коннексонов (рис. 1) [7].

Ген *GJB2* картирован на 13 хромосоме в районе q12.11, содержит два экзона, только второй из которых является кодирующим, кодирует белок содержащий 226 аминокислотных остатков, с расчетной молекулярной массой около 26 кДа [8]. На сегодняшний день в гене *GJB2* описано более 350 патогенных вариантов. Мутация с.35delG является наиболее частой во многих популяциях мира: в Северной и Южной Европе ее доля составляет 70%, с частотой носительства от 1.3 до 2.8% [9, 10], на территории Российской Федерации (РФ) — 81%, с частотой носительства 5% [11], в Белоруссии — 84% [12], с частотой носительства 6.2% [13]. В то же время в ряде популяций мажорными являются другие варианты, например среди евреев — вариант с.167delT с долей 40% [14] и с частотой носительства 4% среди евреев-ашкенази [15], в популяциях Восточной Азии — с.235delC и p.Val37Ile, в Индии — p.Trp24* [16] и др. Таким образом, генетическое консультирование по поводу глухоты должно учитывать различия между пациентами из разных географических регионов.

Ранее были изучены спектры мутаций гена *GJB2* в различных регионах бывшего Советского Союза таких как центральная Россия [11], Республика Беларусь [12], республика Саха [17], Армения [18] и др.

Цель настоящего исследования — изучение спектра мутаций в гене *GJB2* у больных врожденной тугоухостью из Грузии и поиск у них частых для российской популяции мутаций в других генах.

Хотя секвенирование следующего поколения (NGS) становится все более доступным для установления точной генетической причины тугоухости, поиск мутаций в гене *GJB2* традиционными методами по-прежнему является основным этапом перед переходом к NGS.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Для анализа были получены образцы крови от 39 неродственных пробандов из Грузии в возрасте от 5 до 18 лет с направляющим диагнозом “нейросенсорная несиндромальная тугоухость IV степени, пограничная с глухотой, состояние после кохлеарной имплантации”. Тяжелое нарушение слуха выявлено с рождения или в ранний доречевой период. Большинство детей перенесли операцию кохлеарной имплантации до трех лет. В качестве контрольной выборки использовали образцы ДНК от 117 неродственных индивидов, грузинцев по национальности из различных районов Грузии, не страдающих “нейросенсорной несиндромальной тугоухостью”.

Выделение геномной ДНК из лейкоцитов периферической крови выполняли с помощью набора реактивов Wizard® Genomic DNA Purification Kit (Promega, США) по протоколу производителя. У всех больных проводился поиск частых мутаций гена *GJB2* и поиск наиболее частых мутаций в генах *STRC*, *USH2A*, *SLC26A4*, *CLIC5*, являющийся рутинной диагностикой для пациентов с “нейросенсорной несиндромальной тугоухостью” в России, в лаборатории ДНК-диагностики ФГБНУ “МГНЦ им. акад. Н.П. Бочкова”.

Методом аллель-специфичной мультиплексной лигазной реакции (MLPA) проводили поиск девяти частых мутаций гена *GJB2*: (с.35delG, с.–23+1G>A (IVS1+1G>A), с.313_326del14, с.235delC, с.358_360delGAG (p.Glu120del), с.101T>C (p.Met34Thr), с.167delT, 101kdel (GJB2-D13S175) (NC_000013.10: g.20757021_20858394del) и 309kdel (GJB6-D13S1830) (NC_000013.10: g.20797177_21105945) (рис. 2) и наиболее частых мутаций в генах: *STRC* (с.2171_2174delTTTG), *USH2A* (с.11864G>A (p.Trp3955*)), *SLC26A4* (с.1001G>T (p.Gly334Val) и с.107A>C (p.His36Pro)), *CLIC5* (с.1121G>A (p.Trp374*)) (рис. 3). Методика осуществляется в двух реакциях. Мультиплексная лигазная реакция для детекции частых вариантов в генах *GJB2*, *STRC*, *USH2A*, *SLC26A4*, *CLIC5* проводилась в два этапа.

Лигирование проводили на программируемом термоциклере MC2 производства фирмы “ДНК-технология” (Россия) с использованием ДНК-лигазы Pfu (“Stratagene”), в 5 мкл реакционной смеси, содержащей однократный реакционный буфер (20 mM Tris-HCl (pH 7.5), 20 mM KCl, 10 mM MgCl₂, 0.1% Igepal, 0.01 mM rATP, 1 mM DTT), специфичные пробы, 0.04 единицы активности термофильной ДНК-лигазы, 0.1–1 мкг геномной ДНК, 20–30 мкл минерального масла, в следующем режиме: первоначальная денатурация при 95°C — 5 мин, затем лигирование при 59–64°C — 1 ч.

Полимеразная цепная реакция (ПЦР) всех исследуемых фрагментов проведена на программируемом термоциклере MC2 производства фирмы

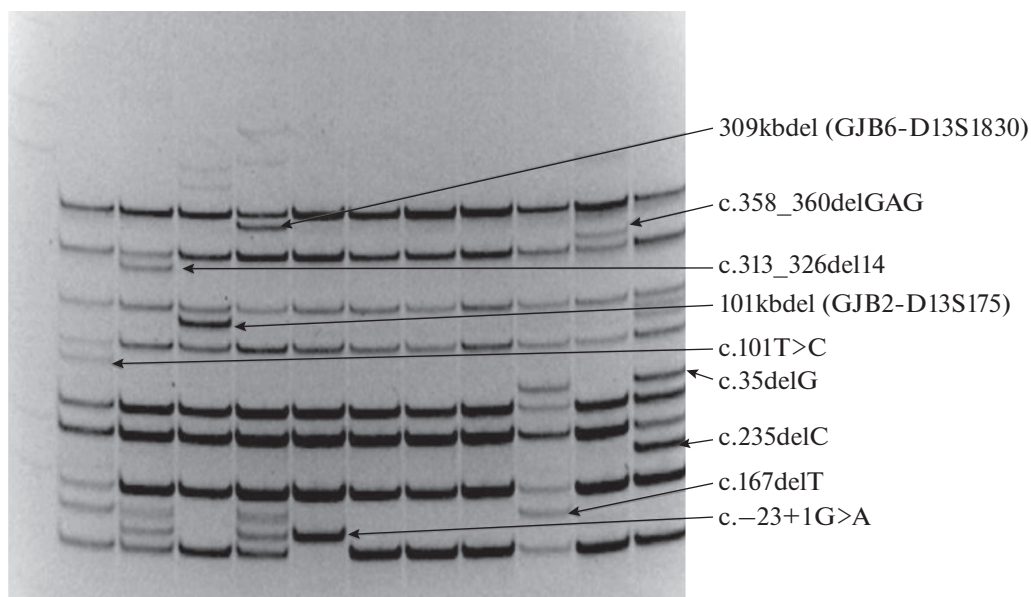


Рис. 2. Система регистрации наиболее частых мутаций в гене *GJB2* методом MLPA-анализа в одной пробирке.

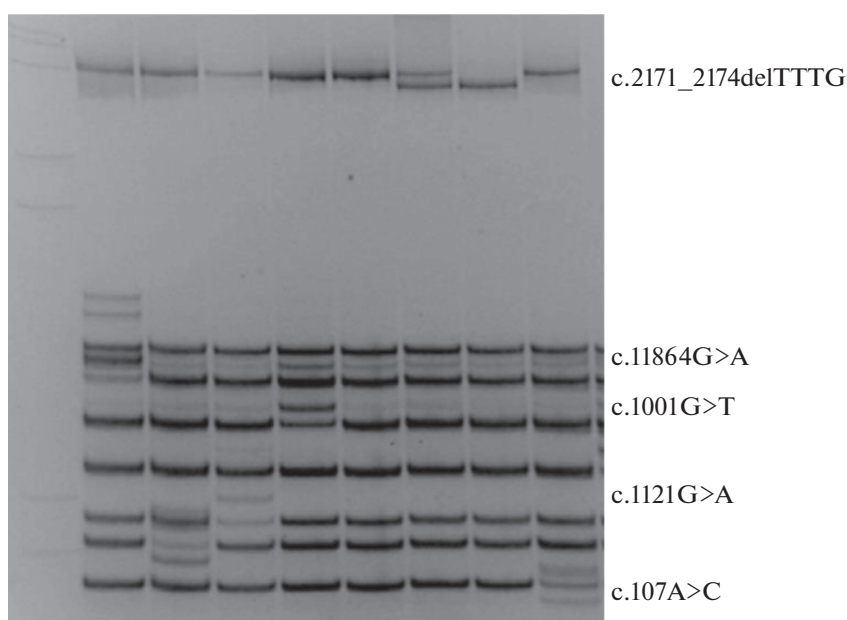


Рис. 3. Система регистрации наиболее частых мутаций в генах, вызывающих не CX26-тугоухость, методом MLPA-анализа в одной пробирке.

“ДНК-технология” (Россия) с использованием ДНК-полимеразы Biotaq (“БиоМастер”), в 20 мкл реакционной смеси, содержащей однократный реакционный буфер (67 мМ Tris-HCl, 16.6 мМ $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 0.01% Twin-20), 0.25 мкМ каждого олигопраймера, 250 мкМ каждого дезоксинуклеозидтрифосфата, 1.5 единицы термофильной ДНК-полимеразы, 20–30 мкл минерального масла. Режим ПЦР: первоначальная денатурация при

95°C – 5 мин, затем 32 цикла смены температур: 94°C – 2 с, температура отжига праймеров 66°C – 2 с, элонгация цепи 72°C – 2 с; заключительная элонгация 72°C – 7 мин. Для проведения ПЦР используется режим точной регуляции.

Электрофорез ПАА-геля длиной 20 см, толщиной 1 мм проводили при комнатной температуре, напряженности 5 В/см с использованием в качестве электрофорезного буфера 1× TBE в течение

Таблица 1. Частые варианты в гене *GJB2*

Вариант	Количество хромосом
c.35delG	11
c.358_360delGAG	9
c.-23+1G>A	5
c.101T>C	1

трех часов. После электрофореза гель окрашивали в растворе бромистого этидия (0.5 мкг/мл в $1 \times$ TBE) и визуализировали с помощью системы GelDoc фирмы BIO-RAD (США) в проходящем УФ-свете при длине волны 312 нм.

Больным, у которых был выявлен один патогенный вариант или не было выявлено ни одного патогенного варианта из девяти частых патогенных вариантов в гене *GJB2*, исследовали кодирующую последовательность гена *GJB2* методом прямого автоматического секвенирования. Для секвенирования по Сенгеру использовали фрагменты ДНК, полученные в ходе ПЦР, с применением набора реактивов ABI Dye Terminator, version 1 (Applied Biosystems) с последующим анализом на приборе 3130 ABI genetic analyzer (Applied Biosystems, США). Полученные хроматограммы анализировали с помощью программы Chromas version 2 (Technelysium). Праймеры для амплификации были выбраны из фланкирующих кодирующий экзон гена *GJB2* нуклеотидных последовательностей.

Название обнаруженных изменений в гене *GJB2* присваивалось в соответствии с международной номенклатурой HGVS (<http://www.hgvs.org/mutnomen/>), использовалась референсная последовательность кДНК, представленная на портале NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucscore>): NM_004004.6.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Поиск причины заболевания проводился по следующей схеме:

1. Поиск частых патогенных вариантов в гене *GJB2* c.35delG, c.-23+1G>A (IVS1+1G>A), c.313_326del14, c.235delC, c.358_360delGAG (p.Glu120del), c.101T>C (p.Met34Thr), c.167delT, 101kdel(GJB2-D13S175) (NC_000013.10: g.20757021_20858394del) и 309kdel (GJB6-D13S1830) (NC_000013.10: g.20797177_21105945) (рис. 2).

2. Поиск патогенных вариантов методом прямого автоматического секвенирования по Сенгеру кодирующей последовательности гена *GJB2* проводился больным, у которых был выявлен один патогенный вариант или не было выявлено ни одного патогенного варианта.

3. Поиск частых патогенных вариантов в генах *STRC* (c.2171_2174delTTTG), *USH2A* (c.11864G>A (p.Trp3955*)), *SLC26A4* (c.1001G>T (p.Gly334Val) и c.107A>C (p.His36Pro)), *CLIC5* (c.1121G>A (p.Trp374*)) (рис. 3) проводился больным, у которых не было выявлено патогенных вариантов в гене *GJB2* на обеих хромосомах.

Данный алгоритм является эффективным для постановки диагноза российским больным не-синдромальной тугоухостью и уже на первом этапе позволяет выявлять до 97% патогенных вариантов у больных, заболевание которых связано с нарушениями в гене *GJB2* [11].

Среди 117 неродственных слышащих грузин проводился поиск девяти наиболее частых патогенных вариантов в гене *GJB2* для установления популяционной частоты носительства *GJB2*-тугоухости.

Поиск частых для российской популяции патогенных вариантов в гене GJB2

В ходе исследования частые патогенные варианты гена *GJB2* были выявлены у 15 пробандов. У 11 пробандов патогенные варианты присутствовали на обеих хромосомах, у четырех — только на одной. Всего было выявлено четыре варианта. Мутация c.35delG была обнаружена на 11 хромосомах, c.358_360delGAG — на девяти хромосомах, c.-23+1G>A — на пяти хромосомах, c.101T>C — на одной хромосоме (табл. 1).

Варианты c.35delG и c.358_360delGAG встретились в гомозиготном состоянии, каждый у двух пробандов. У четырех пробандов эти же варианты встретились в компаунд-гетерозиготном состоянии. У троих пробандов варианты c.35delG и c.-23+1G>A были выявлены в компаунд-гетерозиготном состоянии. У четверых пробандов были выявлены варианты только на одной хромосоме: у двоих — вариант c.-23+1G>A, у одного — c.358_360delGAG, и у одного — c.101T>C. Нами не проводилось дополнительное исследование с целью установления цис-, транс-положения выявленных вариантов, однако в литературе нет упоминаний о цис-положении данных вариантов, поэтому мы считали, что варианты располагаются на разных хромосомах. Таким образом, после первого этапа исследования молекулярно-генетический диагноз установлен 11 пробандам.

Секвенирование кодирующей последовательности гена GJB2

На следующем этапе мы провели секвенирование кодирующей последовательности гена *GJB2* 28 пробандам с неустановленной на молекулярном уровне причиной заболевания. Нами был выявлен один патогенный вариант — c.551G>C в гомозиготном состоянии у одного больного. Та-

ким образом, молекулярный диагноз установлен еще одному больному.

Поиск частых на территории РФ патогенных вариантов в генах STRC, USH2A, SLC26A4, CLIC5

У 27 пробандов был проведен поиск частых патогенных вариантов в генах *STRC*, *USH2A*, *SLC26A4*, *CLIC5* методом аллель-специфичного лигирования. Ни у одного больного не было выявлено вариантов: с.2171_2174delTTTG в гене *STRC*, с.11864G>A (p.Trp3955*) в гене *USH2A*, с.1001G>T (p.Gly334Val) и с.107A>C (p.His36Pro) в гене *SLC26A4* и с.1121G>A (p.Trp374*) в гене *CLIC5*.

Определение популяционной частоты носительства девяти мутаций в гене GJB2

Проведено исследование 117 образцов ДНК выборки этнических грузин с целью определения популяционной частоты носительства девяти мутаций в гене *GJB2*. В популяционной выборке были выявлены патогенные варианты: с.35delG — на двух хромосомах и с.358_360delGAG — на одной хромосоме. Таким образом, выявлено три гетерозиготных носителя мутаций в гене *GJB2*. Частота носительства частых мутаций в гене *GJB2* в Грузии составила один на 39 человек (2.6% (0.53–7.49% при 95% ДИ)).

ОБСУЖДЕНИЕ

Выявление генетической природы тугоухости необходимо для генетического консультирования, а также тактики реабилитации больных. Нами была установлена причина нейросенсорной тугоухости у 12 пробандов. У четверых пробандов варианты с.35delG и с.358_360delGAG встретились в компаунд-гетерозиготном состоянии, у троих больных в компаунд-гетерозиготном состоянии выявлены варианты с.35delG и с.–23+1G>A, варианты с.35delG и с.358_360delGAG в гомозиготном состоянии встретились каждый у двух больных и у одного больного в гомозиготном состоянии был выявлен вариант с.551G>C. У четверых больных мутация в гене *GJB2* выявлено только на одной хромосоме (табл. 2). Таким образом, у 11 из 12 больных молекулярно-генетическая причина заболевания была установлена на первом этапе исследования, что говорит о высокой эффективности использования системы регистрации частых у российских больных мутаций в гене *GJB2* и для грузинских больных нейросенсорной тугоухостью.

Согласно публикации Е. Блинец с соавт. [11], исследование всей кодирующей последовательности гена *GJB2* в сочетании с поиском патогенного варианта с.–23+1G>A, а также поиском крупной делеции 309kdel (GJB6-D13S1830)

Таблица 2. Генотипы больных

Генотип	Количество
с.[35delG];[358_360delGAG]	4
с.35delG(;)-23+1G>A	3
с.[35delG];[35delG]	2
с.[358_360delGAG];[358_360delGAG]	2
с.[551G>C];[551G>C]	1
с.[358_360delGAG];[=]	1
с.[–23+1G>A];[=]	2
с.[101T>C];[=]	1

(NC_000013.10: g.20797177_21105945) позволяет выявлять 100% мутаций у российских пациентов. Также в систему регистрации наиболее частых мутаций в гене *GJB2* включена еще одна крупная делеция, которую невозможно выявить в гетерозиготном состоянии, исследуя кодирующую последовательность гена *GJB2* методом секвенирования по Сенгеру — 101kdel (GJB2-D13S175) (NC_000013.10: g.20757021_20858394del), являющаяся частой у ингушских больных [19].

Используя данную стратегию в исследуемой выборке, мы выявили, что у 12 из 39 (30.8%) больных нейросенсорной тугоухостью из Грузии заболевание связано с биаллельными повреждениями в гене *GJB2*. Также нами обнаружено, что у четверых больных (10%) патогенный вариант выявлен только на одной хромосоме. Установленная нами частота гетерозиготного носительства частых мутаций в гене *GJB2* у грузин — 2.6%.

Частота гетерозигот по мутации в гене *GJB2* в группе больных с неустановленным молекулярным диагнозом составила 14.8% (4 из 27 больных). Так как между установленной частотой популяционного носительства (2.6%) и полученной среди грузинских больных (14.8%) имеется достоверное отличие ($p < 0.05$), полученные результаты нельзя объяснить случайным гетерозиготным носительством больных мутаций в гене *GJB2*. Таким образом, как минимум у троих из этих четверых больных должен существовать второй патогенный в гене *GJB2* за пределами изученной нами кодирующей области гена (в регуляторных элементах, промоторе или нетранскибируемых областях гена). Также есть работы, доказывающие дигенное *GJB2/GJB3* наследование тугоухости [20, 21]. Возможно секвенирование кодирующей последовательности гена *GJB3* внесет ясность в причину тугоухости у этих больных.

У всех больных с выявленным патогенным вариантом на одной хромосоме наблюдалась IV сте-

Таблица 3. Доли выявленных вариантов в гене *GJB2*

Вариант	Количество хромосом среди больных с двухаллельными мутациями	Доля среди больных с двухаллельными мутациями, %	Количество хромосом среди всех больных
c.35delG	11	45.8	11
c.358_360delGAG	8	33.3	9
c.-23+1G>A	3	12.5	5
c.551G>C	2	8.3	2
c.101T>C	0	0	1
Всего	24	100	28

пень тугоухости. У одного больного родители отметили снижение слуха в три года после перенесенного инфекционного заболевания, у остальных трех больных зарегистрирована долингвальная тугоухость. У больных с биаллельными мутациями выявлено четыре патогенных варианта: c.35delG, c.358_360delGAG, c.-23+1G>A и c.551G>C.

Наиболее частый патогенный вариант c.35delG в гене *GJB2* также оказался наиболее частым и у грузинских больных с биаллельными мутациями с долей среди патогенных вариантов *GJB2* – 45.8% (табл. 3). В европейских популяциях доля варианта c.35delG среди *GJB2*-аллелей колеблется в диапазоне от 60 до 80% [22], однако его доля значительно ниже в некоторых этнических изолятах [23], что наблюдается и в исследуемой выборке.

Вторым по частоте оказался вариант c.358_360delGAG с долей 33.3% среди пациентов с двухаллельными мутациями (табл. 3). Делеция трех нуклеотидов приводит к удалению глутаминовой кислоты в 120-ом положении белка (p.Glu120del). Среди грузинских больных вариант встретился на девяти хромосомах у семи больных, у одного из которых в компаунд-гетерозиготном состоянии с не идентифицированной мутацией. Мутация c.358_360delGAG впервые описана в 1999 г. у итальянских больных [24]. О данном варианте сообщалось как о широко распространенной мутации в популяции курдов – 9.4% [25], у турецких (9.5%) [26] и иранских больных (4%) [27]. У российских и белорусских больных мутация p.Glu120del встречается с частотой 1 и 2.5% соответственно [11, 12, 19]. Таким образом, вариант c.358_360delGAG среди грузинских больных встретился с максимальной частотой среди ранее описанных популяций.

Следующим по частоте был вариант c.-23+1G>A. Мутация встретилась на пяти хромосомах – у троих больных в компаунд-гетерозиготном состоянии с мутацией c.35delG, у двоих – с неидентифицированной мутацией на второй хромосоме (табл. 2). Аллельная частота варианта c.-23+1G>A среди больных с двухаллельными мутациями составила 12.5% (табл. 3). Мутация c.-23+1G>A впервые описана в 1999 г. [28], однако долгое время не входила в рутинную диагностику *GJB2*-тугоухости во многих лабораториях мира [29, 30]. После включения в тестирование, а также поиска данного варианта у больных с одной выявленной мутацией, оказалось, что вариант c.-23+1G>A является достаточно распространенным во многих популяциях во всем мире [29, 30]. Максимальная аллельная частота наблюдается в Якутии – 11.7% [31], у азербайджанско-турецких пациентов из Ирана частота – 4.9% [29], в иранской популяции курдов – 1.4% [23], в Европе максимальная частота зафиксирована в Чехии – 4% [30]; в России и Белоруссии частота составила 4 и 2% соответственно [11, 12].

Вариант нуклеотидной последовательности c.551G>C приводит к миссенс-замене аргинина на пролин в 184 положении белка. Вариант c.551G>C был выявлен у одного больного в гомозиготном состоянии (табл. 2). Впервые мутация c.551G>C (p.R184P) была описана в 1997 г. у больного из Австралии [32]. Вариант достаточно редкий и отсутствует во многих популяциях по результатам многих исследований [11]. Однако вариант c.551G>C встречается в популяциях, в которых значительный вклад вносят варианты c.358_360delGAG и c.-23+1G>A: у иранских курдов – 0.2% [23], у турецких – 3.2% [26] и иранских больных – 0.74% [27].

Таким образом, спектр мутаций у грузинских больных GJB2-тугоухостью схож со спектром турецких и иранских пациентов. Также все выявленные мутации зафиксированы у российских пациентов [11, 19]. У всех больных с двухаллельными мутациями в гене *GJB2* наблюдалась четвертая степень долигвалльной тугоухости. Что можно объяснить тем, что для всех выявленных мутаций характерно серьезное нарушение функции белка, что ведет к потере активности канала и, в свою очередь, к тяжелым фенотипическим проявлениям, т.е. к тяжелой степени тугоухости [15, 33].

Система для регистрации частых у российских пациентов патогенных вариантов в гене *GJB2* также эффективна и среди грузинских больных с тугоухостью и выявляет причину заболевания не менее чем у 28% больных. Добавление в систему регистрации частых для российской популяции мутаций, возможность регистрации патогенного варианта с.551G>C повысит информативность диагностики до 31%.

Часто встречающиеся в России патогенные варианты в генах *STRC*, *USH2A*, *SLC26A4*, *CLIC5* не были выявлены среди грузинских больных. Так как патогенные варианты в генах *STRC*, *USH2A*, *SLC26A4* вносят значительный вклад в причину тугоухости в различных популяциях мира [22, 34], поиск мутации во всей кодирующей последовательности этих генов, вероятно поможет определить генетическую причину у части и грузинских больных. Также возможно окажется более дешевым и эффективным для рутинной диагностики тугоухости у грузинских больных создание системы регистрации частых для турецких и иранских больных мутаций в этих генах.

Потеря слуха генетически неоднородна и как правило моногенная. В настоящее время идентифицировано 123 гена, вызывающих несиндромальную тугоухость [35], а многие гены еще предстоит идентифицировать. Мутации в *GJB2* на сегодняшний день считаются основной генетической причиной несиндромальной потери слуха во всем мире. По результатам настоящего исследования, после скрининга на частые мутации в гене *GJB2* следующим этапом для поиска причины заболевания у грузинских больных можно предложить полное экзомное или полногеномное секвенирование.

Работа выполнена в рамках Государственного задания Минобрнауки России.

Все процедуры, выполненные в исследовании с участием людей, соответствуют этическим стандартам институционального и/или национального комитета по исследовательской этике и Хель-

синкской декларации 1964 г. и ее последующим изменениям или сопоставимым нормам этики.

От каждого из включенных в исследование участников было получено информированное добровольное согласие.

Авторы заявляют, что у них нет конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Kenneson A., Van Naarden Braun K., Boyle C. GJB2 (connexin 26) variants and nonsyndromic sensorineural hearing loss: A HuGE review // *Genet. Med.* 2002. V. 4(4). № 258. P. 74. <https://doi.org/10.1097/00125817-200207000-00004>
2. Kral A., O'Donoghue G.M. Profound deafness in childhood // *N. Engl. J. Med.* 2010. V. 363. № 15. P. 1438–1450. <https://doi.org/10.1056/NEJMra0911225>
3. ACMG. Genetics evaluation guidelines for the etiologic diagnosis of congenital hearing loss. Genetic evaluation of congenital hearing loss expert panel: ACMG statement // *Genet. Med.* 2002. V. 4. P. 162–171.
4. Hone S.W., Smith R.J. Medical evaluation of pediatric hearing loss: laboratory, radiographic, and genetic testing // *Otolaryngol. Clin. North Am.* 2002. V. 35. P. 751–764.
5. Bolz H. Hereditary hearing loss and its syndromes third edition // *Eur. J. Hum. Genet.* 2016. V. 24. P. 1650. <https://doi.org/10.1038/ejhg.2016.67>
6. Kumar N.M., Gilula N.B. The gap junction communication channel // *Cell.* 1996. V. 84. № 3. P. 381–388. [https://doi.org/10.1016/s0092-8674\(00\)81282-9](https://doi.org/10.1016/s0092-8674(00)81282-9)
7. Söhl G., Willecke K. Gap junctions and the connexin protein family // *Cardiovasc. Res.* 2004. V. 62. № 2. P. 228–232. <https://doi.org/10.1016/j.cardiores.2003.11.013>
8. Lee S.W., Tomasetto C., Paul D. et al. Transcriptional downregulation of gap-junction proteins blocks junctional communication in human mammary tumor cell lines // *J. Cell Biol.* 1992. V. 118. P. 1213–1221.
9. Green G.E., Scott D.A., McDonald J.M. et al. Carrier rates in the midwestern United States for *GJB2* mutation causing inherited deafness // *JAMA.* 1999. V. 28. P. 2211–2216.
10. Sobe T., Vreugde S., Shahin H. et al. The prevalence and expression of inherited connexin 26 mutations associated with nonsyndromic hearing loss in the Israeli population // *Hum. Genet.* 2000. V. 106. P. 50–57.
11. Блинец Е.А., Галкина В.А., Матющенко Г.Н. и др. Изменения в гене коннексина 26 – GJB2 – при нарушениях слуха у российских пациентов: результаты многолетней молекулярной диагностики на следственной несиндромальной тугоухости // *Генетика.* 2012. Т. 48. № 1. С. 112–124.
12. Блинец Е.А., Марицкая Д.Н., Хоров О.Г. и др. Спектр мутаций в гене *GJB2* у белорусских пациентов с тугоухостью. Результаты пилотного генетического

- скрининга нарушения слуха у новорожденных // Генетика. 2014. Т. 50. № 2. С. 214–221.
https://doi.org/10.7868/S0016675814020039
13. Джемилева Л.У., Барашков Н.А., Посух О.Л. и др. Анализ гетерозиготного носительства мутаций 35delG, 235delC, и 167delT в гене *GJB2* в популяциях Евразии // Мед. генетика. 2009. Т. 8. № 8. С. 20–28.
 14. Morell R.J., Kim H.J., Hood L.J. et al. Mutations in the connexin 26 gene (*GJB2*) among Ashkenazi Jews with nonsyndromic recessive deafness // N. Engl. J. Med. 1998. V. 339. P. 1500–1505.
 15. Cryns K., Orzan E., Murgia A. et al. A genotype-phenotype correlation for *GJB2* (connexin 26) deafness // Med. Genet. 2004. V. 41. P. 147–154.
 16. Chan D.K., Chang K.W. *GJB2*-associated hearing loss: systematic review of worldwide prevalence, genotype, and auditory phenotype // Laryngoscope. 2014. V. 124. № 2. P. E34–E53.
https://doi.org/10.1002/lary.24332
 17. Барашков Н.А., Джемилева Л.У., Федорова С.А. и др. Мутации гена коннексина 26 (*GJB2*) у больных наследственной несиндромальной сенсоневральной тугоухостью в Республике Саха (Якутия) // Вестник оториноларингологии. 2008. № 5. С. 23–29.
 18. Близнетц Е.А., Саркисян Т.Ф., Манукян Т.А. и др. Тугоухость у армян, обусловленная мутациями в гене коннексина 26 – *GJB2* // Мед. генетика. 2012. Т. 11. № 5(119). С. 23–28.
 19. Bliznetz E.A., Lalayants M.R., Markova T.G. et al. Update of the *GJB2*/DFNB1 mutation spectrum in Russia: A founder Ingush mutation del (*GJB2*-D13S175) is the most frequent among other large deletions // J. Hum. Genet. 2017 V. 8. № 62(8). P. 789–795.
https://doi.org/10.1038/jhg.2017.42
 20. Liu X.Z., Yuan Y., Yan D. et al. Digenic inheritance of non-syndromic deafness caused by mutations at the gap junction proteins Cx26 and Cx31 // Hum. Genet. 2009. V. 125(1) P. 53–62.
https://doi.org/10.1007/s00439-008-0602-9
 21. Yu X., Lin Y., Xu J. et al. Molecular epidemiology of Chinese Han deaf patients with bi-allelic and mono-allelic *GJB2* mutations // Orphanet. J. Rare Dis. 2020. V. 28. № 15(1). P. 29.
https://doi.org/10.1186/s13023-020-1311-2
 22. Baux D., Vaché C., Blanchet C. et al. Combined genetic approaches yield a 48% diagnostic rate in a large cohort of French hearing-impaired patients // Sci. Rep. 2017. V.1 № 7(1). P. 16783.
https://doi.org/10.1038/s41598-017-16846-9
 23. Najmabadi H., Nishimura C., Kahrizi K. et al. *GJB2* mutations: passage through Iran // Am. J. Med. Genet. 2005. V. 1 № 133A(2). P. 132–137.
https://doi.org/10.1002/ajmg.a.30576
 24. Murgia A., Orzan E., Polli R. et al. Cx26 deafness: mutation analysis and clinical variability // J. Med. Genet. 1999. V. 36(11). P. 829–832.
 25. Mahdieh N., Nishimura C., Ali-Madadi K. et al. The frequency of *GJB2* mutations and the Delta (*GJB6*-D13S1830) deletion as a cause of autosomal recessive non-syndromic deafness in the Kurdish population // Clin. Genet. 2004. V. 65(6). P. 506–508.
https://doi.org/10.1111/j.1399-0004.2004.00262.x
 26. Yilmaz A., Menevse S., Bayazit Y. et al. Two novel missense mutations in the connexin 26 gene in Turkish patients with nonsyndromic hearing loss // Biochem. Genet. 2010. V. 48(3–4). P. 248–256.
https://doi.org/10.1007/s10528-009-9314-7
 27. Snoeckx R.L., Huygen P.L., Feldmann D. et al. *GJB2* mutations and degree of hearing loss: A multicenter study // Am. J. Hum. Genet. 2005. V. 77(6). P. 945–957.
https://doi.org/10.1086/497996
 28. Denoyelle F., Marlin S., Weil D. et al. Clinical features of the prevalent form of childhood deafness, DFNB1, due to a connexin-26 gene defect: Implications for genetic counselling // Lancet. 1999. V. 353(9161). P. 1298–1303.
https://doi.org/10.1016/S0140-6736(98)11071-1
 29. Bonyadi M., Fotouhi N., Esmaeili M. Prevalence of IVS1+1G>A mutation among Iranian Azeri Turkish patients with autosomal recessive non-syndromic hearing loss (ARNSHL) // Int. J. Pediatr. Otorhinolaryngol. 2011. V. 75(12). P. 1612–1615.
https://doi.org/10.1016/j.ijporl.2011.09.024
 30. Seeman P., Sakmaryová I. High prevalence of the IVS1 + 1 G to A/*GJB2* mutation among Czech hearing impaired patients with monoallelic mutation in the coding region of *GJB2* // Clin. Genet. 2006. V. 69(5). P. 410–413.
https://doi.org/10.1111/j.1399-0004.2006.00602.x
 31. Barashkov N.A., Dzhemileva L.U., Fedorova S.A. et al. Autosomal recessive deafness 1A (DFNB1A) in Yakut population isolate in Eastern Siberia: Extensive accumulation of the splice site mutation IVS1+1G>A in *GJB2* gene as a result of founder effect // J. Hum. Genet. 2011. V. 56(9). P. 631–619.
https://doi.org/10.1038/jhg.2011.72
 32. Denoyelle F., Weil D., Maw M.A. et al. Prelingual deafness: high prevalence of a 30delG mutation in the connexin 26 gene // Hum. Mol. Genet. 1997. V. 6(12). P. 2173–2177.
https://doi.org/10.1093/hmg/6.12.2173
 33. Pfenniger A., Wohlwend A., Kwak B.R. Mutations in connexin genes and disease // Eur. J. Clin. Invest. 2011. V. 41(1). P. 103–116.
https://doi.org/10.1111/j.1365-2362.2010.02378.x
 34. Marková S.P., Brožková D.Š., Laššuthová P. et al. *STRC* gene mutations, mainly large deletions, are a very important cause of early-onset hereditary hearing loss in the Czech population // Genet. Test. Mol. Biomarkers. 2018. V. 22(2). P. 127–134.
https://doi.org/10.1089/gtmb.2017.0155
 35. https://hereditaryhearingloss.org/

Molecular Genetic Study of the Causes of Non-Syndromic Sensorineural Hearing Loss in Patients from Georgia

A. A. Stepanova^{a, *}, O. A. Ismagilova^a, N. M. Galeeva^a, N. G. Markova^b,
G. A. Tavartkiladze^{b, c}, O. Kvividze^{c, d}, and A. V. Polyakov^a

^aResearch Centre for Medical Genetics, Moscow, 115478 Russia

^bNational Research Centre for Audiology and Hearing Rehabilitation, Moscow, 117513 Russia

^cGeorgian Foundation for Genetic and Rare Diseases, Tbilisi, 0162 Georgia

^d"New Vision" University, Medical School, Tbilisi, 0159 Georgia

*e-mail: cany@yandex.ru

Pathogenic variants in the *GJB2* gene are the most common reason for nonsyndromic sensorineural hearing loss. In this study, we examined Georgian patients with sensorineural hearing loss. We establish the ratio of *GJB2*-related deafness among patients with impaired hearing. The mutation spectrum of the *GJB2* gene in Georgia is represented by the following pathogenic variants: c.35delG, c.358_360delGAG, c.-23+1G>A, and c.551G>C. The estimated *GJB2*-related hearing loss carrier frequency is 2.6%. The following variants, which are common in Russian patients, were not detected in Georgian patients: *STRC* (c.2171_2174delTTTG), *USH2A* (c.11864G>A), *SLC26A4* (c.1001G>T and c.107A>C (p.His36Pro)), *CLIC5* (c.1121G>A). Molecular genetic diagnosis was established for 30.8% of patients.

Keywords: hearing loss, *GJB2*, GJB2-hearing loss, Georgia.

ПОЛИМОРФНЫЕ ВАРИАНТЫ ГЕНА НЕЙТРОФИЛЬНОГО ЦИТОЗОЛЬНОГО ФАКТОРА 2: АССОЦИИИ С ПРЕДРАСПОЛОЖЕННОСТЬЮ К САХАРНОМУ ДИАБЕТУ 2-го ТИПА И КАРДИОВАСКУЛЯРНОЙ АВТОНОМНОЙ НЕЙРОПАТИИ

© 2022 г. Ю. Э. Азарова¹, *, Е. Ю. Клёсова¹, И. И. Коломеец¹, А. В. Полоников¹

¹Курский государственный медицинский университет, Курск, 305041 Россия

*e-mail: azzzzar@yandex.ru

Поступила в редакцию 24.11.2021 г.

После доработки 08.12.2021 г.

Принята к публикации 14.12.2021 г.

В исследование было включено 3206 неродственных индивидов славянского происхождения (1579 пациентов с СД2, в том числе 535 человек с кардиоваскулярной автономной нейропатией, и 1627 здоровых добровольцев). Генотипирование SNPs выполнено на геномном времяпролетном масс-спектрометре MassARRAY Analyzer 4. Статистическую обработку полученных данных выполняли с помощью программы SNPStats. Установлена ассоциация генотипа rs17849502-G/T *NCF2* с повышенным риском развития СД2 (OR = 1.42, 95% CI = 1.08–1.87, *P* = 0.043). При стратифицированном по индексу массы тела (ИМТ) анализе частот генотипов *NCF2* обнаружено, что генотип rs17849502-G/T значимо чаще встречался только у пациентов с избыточной массой тела и ожирением (OR = 1.34, 95% CI = 1.01–1.77, *P* = 0.012). Кроме того, выявлены ассоциации генотипов rs789180-A/T (OR = 1.46, 95% CI = 1.11–1.92, *P* = 0.015) и rs10911363-G/T (OR = 0.77, 95% CI = 0.61–0.97, *P* = 0.046) с кардиоваскулярной автономной нейропатией при СД2, не зависящие от пола, возраста и ИМТ пациентов. Анализ влияния полиморфизма *NCF2* на биохимические показатели плазмы крови показал, что носители гаплотипа H5 rs796860A-rs789180T-rs17849502G-rs2274064C-rs10911363G-rs147415774C-rs2274065A-rs3754515C имели на 4.81% более высокое содержание гликированного гемоглобина (95% CI = 2.63–6.98, *P* < 0.0001) по сравнению с носителями референсного гаплотипа H1 rs796860A-rs789180A-rs17849502G-rs2274064T-rs10911363G-rs147415774C-rs2274065A-rs3754515C. Таким образом, нами впервые выявлены ассоциации rs17849502 гена *NCF2* с развитием СД2, а также ассоциации rs789180 и rs10911363 с кардиоваскулярной автономной нейропатией. Полученные данные свидетельствуют о значимом вкладе полиморфизма гена *NCF2* в патогенез СД2 и создают научный задел для дальнейших исследований по изучению генетико-биохимических нарушений системы редокс-гомеостаза при сахарном диабете 2-го типа.

Ключевые слова: сахарный диабет 2-го типа, диабетическая дистальная нейропатия, кардиоваскулярная автономная нейропатия, нейтрофильный цитозольный фактор 2, НАДФН-оксидаза, однонуклеотидный полиморфизм.

DOI: 10.31857/S0016675822050034

По данным Международной федерации диабета за 2019 г. один из 11 взрослых в возрасте от 20 до 79 лет страдает сахарным диабетом, что в планетарном масштабе составляет 463 млн человек. В Российской Федерации 8.2 млн больных, причем более 90% из них страдают сахарным диабетом 2-го типа (СД2) [1].

В ряде отечественных и зарубежных исследований показано, что окислительный стресс служит движущей силой развития как самого СД2, так и его микрососудистых и макрососудистых осложнений, включая диабетическую нейропатию, одна из форм которой – кардиоваскулярная автономная нейропатия (КАН). Последняя явля-

ется одним из прямых осложнений СД2 и обнаруживается у 11.7% пациентов с впервые выявленным диабетом [2]. Поражение сердечно-сосудистой системы при КАН связано с ухудшением качества жизни, ранней инвалидизацией и пятикратным увеличением смертности в этой категории больных [3].

Последние исследования в области редокс-биологии доказали существование так называемого порочного круга генерации активных форм кислорода (АФК), в котором избыточное образование супероксид-аниона $O_2^{\cdot -}$ и перекиси водорода H_2O_2 НАДФН-оксидазой (NOX) приводит к

нарушению функционирования митохондрий и увеличению продукции O_2^- в цепи переноса электронов [4]. Следует отметить, что целый ряд белков-мишеней инсулинового сигналинга и его регуляторов (AKT, FOXO, PTEN, PT1B, JNK, GAB1) являются редокс-чувствительными. Увеличение продукции АФК в условиях дефицита антиоксидантов приводит к изменению редокс-статуса упомянутых белков и инсулинорезистентности периферических тканей [5], а также к торможению пролиферации бета-клеток поджелудочной железы с последующим запуском их апоптоза и дедифференцировки, что лежит в основе прогрессирующей потери функционирующей массы бета-клеток и снижения секреции инсулина [6].

Нейтрофильный цитозольный фактор 2 является связанной с мембраной субъединицей НАДФН-оксидазы, необходимой для активации фермента, и кодируется геном *NCF2* [7]. В литературе описано участие цитохрома СУВА, белка-компонента мультиферментного комплекса НАДФН-оксидазы и ее изоформ NOX2 и NOX4 в патогенезе СД2 [8–11], тогда как данные о роли *NCF2* в развитии СД2 и его осложнений отсутствуют. В этой связи целью настоящего исследования стало изучение ассоциаций восьми однонуклеотидных полиморфных вариантов гена *NCF2* rs796860 (A>C), rs789180 (A>T), rs17849502 (G>T), rs2274064 (T>C), rs10911363 (G>T), rs147415774 (C>T), rs2274065 (A>C) и rs3754515 (C>A) с предрасположенностью к СД2, а также с риском развития кардиоваскулярной автономной нейропатии у пациентов с СД2.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Протокол исследования одобрен Региональным этическим комитетом при Курском государственном медицинском университете (выписка из протокола № 10 от 12.12.2016 г.). В исследование было включено 1579 пациентов с СД2 (591 мужчина и 988 женщин, средний возраст 61.3 ± 10.4 года), получавших стационарное лечение на базе эндокринологического отделения Курской городской клинической больницы скорой медицинской помощи в период с декабря 2016 по октябрь 2019 г. У 535 больных СД2 по результатам прикроватных тестов (оценка частоты сердечных сокращений (ЧСС) в покое, вариации ЧСС, реакции ЧСС и артериального давления в ответ на ортостатическую пробу, реакции диастолического АД в ответ на изометрическую нагрузку и пробы Вальсальвы [12]) была диагностирована кардиоваскулярная автономная нейропатия. 1627 условно здоровых добровольцев (601 мужчина и 1026 женщин, средний возраст 60.8 ± 6.4 года) составили группу контроля. Исследуемые группы были сопоставимы как по полу, так и по возрасту. Клинико-лабораторные показатели участников исследования

представлены в табл. 1. Критерии включения в группу больных: наличие верифицированного врачом диагноза болезни, подтвержденного клинически и лабораторно-инструментально, возраст старше 35 лет, наличие письменного информированного согласия на участие в исследовании. Критерии исключения больных из основной выборки: выраженная степень декомпенсации СД2 или кома, заболевания экзокринной части поджелудочной железы, опухоли поджелудочной железы, муковисцидоз, гемохроматоз, фиброкалькулезная панкреатопатия, эндокринопатии, генетические синдромы, сочетающиеся с СД (полный перечень приведен ранее [13, 14]), а также возраст младше 35 лет и отсутствие письменного информированного согласия на участие в проекте. Критерии включения лиц в группу контроля: возраст старше 35 лет, нормальные значения гликемии согласно ВОЗ, 1999–2013, отсутствие тяжелых хронических заболеваний, наличие письменного информированного согласия. Критерии исключения из группы контроля: возраст младше 35 лет, гипергликемии в анамнезе, наличие тяжелых хронических заболеваний, отсутствие письменного информированного согласия.

Для проведения генетических исследований у всех пациентов с СД2 и здоровых лиц на основе письменного информированного согласия проводили забор 5 мл венозной крови натощак в вакуумные пробирки Vacuette с ЭДТА в качестве антикоагулянта. Геномную ДНК выделяли колоночным методом с помощью набора QIAamp DNA Blood Mini Kit (Qiagen) на автоматической станции для экстракции белков и нуклеиновых кислот QiaCube (Qiagen), а также методом фенольно-хлороформной экстракции. Для молекулярно-генетического анализа было отобрано восемь однонуклеотидных вариантов гена *NCF2* с выраженным регуляторным потенциалом, а именно rs796860 (A>C), rs789180 (A>T), rs17849502 (G>T), rs2274064 (T>C), rs10911363 (G>T), rs147415774 (C>T), rs2274065 (A>C) и rs3754515 (C>A). Генотипирование SNPs гена *NCF2* проводили с использованием технологии iPLEX на геномном времяпролетном масс-спектрометре MassARRAY Analyzer 4 (Agena Bioscience). Дизайн мультиплекса SNPs и подбор праймеров для ПЦР и iPLEX реакций осуществляли с помощью онлайн программы MassARRAY Assay Design Suite (<https://agenacx.com>). Праймеры были синтезированы компанией Evrogen (Москва). Содержание перекиси водорода H_2O_2 и окисленного глутатиона GSSG в плазме крови участников исследования определяли флуориметрическим и колориметрическим методом с помощью наборов OxiSelect ROS/RNS Assay kit (Cell Biolabs) и OxiSelect GSH/GSSG Assay kit (Cell Biolabs) соответственно, на микропланшетном ридере Varioscan Flash (Thermo Fisher Scientific). Концентрации глюкозы, гликированного гемоглобина,

Таблица 1. Клинико-лабораторные показатели участников исследования

Параметры сравнения	Контроль, <i>n</i> = 1627	Больные СД2, <i>n</i> = 1579	<i>P</i> *
Возраст, ср, $\pm$ ст. от.	60.8 $\pm$ 6.4	61.3 $\pm$ 10.4	0.34
Мужчины, <i>n</i> (%)	601 (36.9)	591 (37.4)	0.77
Женщины, <i>n</i> (%)	1026 (63.1)	988 (62.6)	
Индекс массы тела (кг/м ²), ср. $\pm$ ст. от.	27.22 $\pm$ 3.55	31.94 $\pm$ 6.65	0.001
Курящие, <i>n</i> (%)	504 (31.0)	411 (26.0)	0.004
Стаж диабета, Ме [Q1; Q3]	—	9.0 [3.0; 15.0]	—
Кардиоваскулярная автономная нейропатия	535	—	—
Наследственная отягощенность, <i>n</i> (%)	33 (2.0)	611 (38.7)	<0.0001
HbA1C (%), Ме [Q1; Q3]	4.58 [4.11; 4.87]	9.02 [7.70; 10.80]	<0.0001
Глюкоза крови натощак, Ме [Q1; Q3]	4.71 [4.39; 4.84]	12.20 [9.70; 15.20]	<0.0001
Общий холестерин (ммоль/л), Ме [Q1; Q3]	3.06 [2.86; 3.12]	5.10 [4.27; 6.09]	<0.0001
ЛПН (ммоль/л), Ме [Q1; Q3]	1.74 [1.60; 1.79]	3.03 [2.40; 4.05]	<0.0001
ЛВП (ммоль/л), Ме [Q1; Q3]	1.47 [1.36; 1.62]	0.85 [0.74; 1.07]	<0.0001
ТАГ (ммоль/л), Ме [Q1; Q3]	1.15 [0.98; 1.23]	2.20 [1.55; 3.00]	<0.0001

Примечание. HbA1C — гликированный гемоглобин; ЛНП — липопротеины низкой плотности; ЛВП — липопротеины высокой плотности; ТАГ — триацилглицеролы; * полужирным шрифтом выделены статистически значимые *P*.

триглицеридов, общего холестерина и его подфракций (липопротеинов низкой и высокой плотности) оценивали с помощью биохимических наборов фирмы Диакон-ДС на полуавтоматическом биохимическом анализаторе Ral-15.

Влияние полиморфных вариантов генов на биохимические показатели анализировалось методом линейного регрессионного анализа с поправкой на пол, возраст и индекс массы тела. Статистическую обработку полученных данных проводили методом логистической регрессии с поправками на возраст и индекс массы тела, с помощью онлайн программы SNPStats (<https://www.snpsstats.net/>). Ассоциация считалась значимой при $P < 0.05$. Для анализа соответствия распределения частот генотипов равновесию Харди–Вайнберга и сравнения частот аллелей и генотипов между группами применяли точный тест Фишера.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Распределение частот генотипов в исследуемой популяции соответствовало равновесию Харди–Вайнберга ($P > 0.05$). Согласно данным проекта “1000 Genomes”, депонированным в Ensembl (<https://www.ensembl.org/>), частоты минорных аллелей пяти вариантов — rs796860-С, rs789180-Т, rs17849502-Т, rs2274064-С и rs10911363-Т были сопоставимы с таковыми в европейской популяции. Минорный аллель rs147415774-Т *NCF2* характеризовался крайне низкой частотой у жителей Центральной России (0.0016) и не встречался у представителей других популяций. Достаточно выраженные

межпопуляционные различия ($P < 0.0001$) в частоте альтернативного аллеля установлены и в отношении полиморфного варианта rs2274065 *NCF2*: частота аллеля С у жителей Центральной России была ниже, чем у представителей европейской, американской, африканской и восточно-азиатской популяций, однако была сопоставима с частотой аллеля rs2274065-С в южно-азиатской популяции. Частота аллеля rs3754515-А *NCF2* значительно отличалась от всех исследованных в проекте “1000 Genomes” популяций.

В табл. 2 представлены результаты анализа гаметического неравновесия по сцеплению SNPs гена *NCF2*. Лocus rs796860 находился в отрицательном LD с rs789180 ($D' = 0.9949$, $D = -0.0133$, $P < 2 \times 10^{-16}$), rs17849502 ($D' = 0.8445$, $D = -0.0044$, $P < 1.58 \times 10^{-7}$), rs2274064 ($D' = 0.9787$, $D = -0.0531$, $P < 2 \times 10^{-16}$) и с rs10911363 ($D' = 0.9759$, $D = -0.0336$, $P < 2 \times 10^{-16}$). Кроме того, SNPs rs17849502 ($D' = 0.9912$, $D = -0.0052$, $P = 8.52 \times 10^{-10}$) и rs10911363 ($D' = 0.8191$, $D = -0.0283$, $P < 2 \times 10^{-16}$) находились в отрицательном неравновесии по сцеплению с rs789180. Также rs147415774 был в отрицательном LD с rs3754515 ($D' = 0.9210$, $D = -0.0005$, $P = 0.02$). SNP rs2274064 был сцеплен с rs789180 ($D' = 0.9878$, $D = 0.0606$, $P < 2 \times 10^{-16}$), rs17849502 ($D' = 0.9888$, $D = 0.0238$, $P < 2 \times 10^{-16}$) и rs10911363 ($D' = 0.9500$, $D = 0.1501$, $P < 2 \times 10^{-16}$). Последние два SNPs были также сцеплены между собой ($D' = 0.9664$, $D = 0.0308$, $P < 2 \times 10^{-16}$).

В табл. 3 представлены результаты анализа ассоциаций изучаемых SNPs гена *NCF2* с предрасполо-

Таблица 2. Неравновесие по сцеплению между полиморфными вариантами гена *NCF2*

SNPID	rs796860	rs789180	rs17849502	rs2274064	rs10911363	rs147415774	rs2274065	rs3754515
rs796860		−0.0133	−0.0044	−0.0531	−0.0336	0.0001	−0.0029	−0.0263
		0.9949	0.8445	0.9787	0.9759	0.048	0.5478	0.6065
rs789180			−0.0052	0.0606	−0.0283	0.0001	0.0197	−0.0051
			0.9912	0.9878	0.8191	0.7432	0.4924	0.1165
rs17849502				0.0238	0.0308	0	−0.0009	−0.0034
				0.9888	0.9664	0.0108	0.4165	0.198
rs2274064					0.1501	0.0006	0.0105	−0.0618
					0.95	0.7008	0.4383	0.3481
rs10911363						0.0009	−0.0075	−0.0743
						0.792	0.5556	0.6601
rs147415774							0	−0.0005
							0.343	0.921
rs2274065								0.027
								0.957

Примечание. Показатели неравновесия по сцеплению между SNPs: верхние ячейки — D (заливка серым), нижние — D' . Представлены только статистически значимые показатели неравновесия по сцеплению ($P < 6.7 \times 10^{-6}$).

женностью к СД2. Как видно из табл. 3, генотип rs17849502-T/T *NCF2* (OR = 1.42, 95% CI = 1.08–1.87, $P = 0.043$) ассоциировался с повышенным риском развития СД2. При анализе частот гаплотипов *NCF2* (табл. 4) у больных и здоровых участников исследования, статистически значимых ассоциаций какого-либо из 13 гаплотипов *NCF2* с предрасположенностью к СД2 выявлено не было ($P > 0.05$). Тем не менее анализ эффектов изучаемых SNPs на биохимические показатели плазмы крови пациентов с СД2 установил, что носители гаплотипа H5 rs796860A-rs789180T-rs17849502G-rs2274064C-rs10911363G-rs147415774C-rs2274065A-rs3754515C имели на 4.81% более высокое содержание гликированного гемоглобина (95% CI = 2.63–6.98, $P < 0.0001$) по сравнению с носителями референсного гаплотипа H1 rs796860A-rs789180A-rs17849502G-rs2274064T-rs10911363G-rs147415774C-rs2274065A-rs3754515C (табл. 5).

Принимая во внимание, что ожирение является ведущим фактором риска СД2, нами далее был проведен стратифицированный по индексу массы тела (ИМТ) анализ частот генотипов *NCF2*, результаты которого приведены в табл. 6. Обнаружено, что генотип rs17849502-G/T значимо чаще встречался только у пациентов с избыточной массой тела и ожирением (OR = 1.34, 95% CI = 1.01–1.77, $P = 0.012$), тогда как у лиц с нормальной массой тела рискованный эффект носительства rs17849502-G/T не наблюдался ($P > 0.05$).

Нами были выявлены ассоциации генотипов rs789180-A/T (OR = 1.46, 95% CI = 1.11–1.92, $P =$

= 0.015) и rs10911363-G/T (OR = 0.77; 95% CI = 0.61–0.97, $P = 0.046$) с кардиоваскулярной автономной нейропатией при СД2, не зависящие от пола, возраста и ИМТ пациентов (табл. 7).

ОБСУЖДЕНИЕ

Цитозольный фактор нейтрофилов 2 (*NCF2*, p67^{phox}) представляет собой регуляторный белок из 526 аминокислот с молекулярной массой 67 кДа, формирующий вместе с *NCF1*, *NCF4* и малой ГТФ-азой *RAC1/RAC2* цитозольный комплекс НАДФН-оксидазы. Именно *NCF2* отвечает за трансфер электронов с НАДФН на флавиновый центр цитохрома *b* и необходим для запуска каталитической активности последнего [15, 16]. Результатом катализа является превращение молекулярного кислорода в супероксид-анион, который в свою очередь является родоначальником перекиси водорода, гидроксильного радикала, пероксинитрита и гипохлорит-аниона. В фагоцитах перечисленные АФК оказывают бактерицидный эффект, а в клетках нефагоцитарного ряда служат важными сигнальными молекулами, регулируемыми процессы роста, деления, апоптоза [17], организации цитоскелета, внутриклеточного транспорта, в том числе гранул инсулина в бета-клетках поджелудочной железы [18–20].

Мутации в гене *NCF2* связаны с развитием хронической гранулематозной болезни [21, 22] — первичного иммунодефицита, характеризующегося неспособностью фагоцитов генерировать суперок-

Таблица 3. Анализ ассоциации аллелей и генотипов полиморфных вариантов гена *NCF2* с риском развития СД2

SNP гена <i>NCF2</i>	Генотип, аллель	<i>n</i> (%)		<i>adjP</i> ¹	<i>adjOR</i> (95% CI) ²
		здоровые (<i>n</i> =1627)	больные (<i>n</i> =1579)		
rs796860 A>C	A/A	1266 (77.8)	1245 (78.8)	0.42	1.00
	C/A	340 (20.9)	310 (19.6)		0.90 (0.76–1.08)
	C/C	21 (1.3)	24 (1.5)		1.21 (0.66–2.22)
	C	0.117	0.113	0.61	0.46 (0.82–1.12)
rs789180 A>T	A/A	1256 (77.2)	1251 (79.2)	0.42	1.00
	A/T	347 (21.3)	308 (19.5)		0.89 (0.74–1.06)
	T/T	24 (1.5)	20 (1.3)		0.99 (0.53–1.87)
	T	0.121	0.110	0.16	0.90 (0.77–1.04)
rs17849502 G>T	G/G	1500 (92.2)	1424 (90.2)	0.043	1.00
	G/T	121 (7.4)	152 (9.6)		1.42 (1.08–1.87)
	T/T	6 (0.4)	3 (0.2)		0.72 (0.17–2.95)
	T	0.041	0.050	0.078	1.24 (0.98–1.56)
rs2274064 T>C	T/T	449 (27.6)	451 (28.6)	0.23	1.00
	C/T	798 (49)	794 (50.3)		1.01 (0.85–1.19)
	C/C	380 (23.4)	334 (21.1)		0.86 (0.71–1.06)
	C	0.479	0.463	0.20	0.94 (0.85–1.04)
rs10911363 G>T	G/G	810 (49.8)	781 (49.5)	0.32	1.00
	G/T	654 (40.2)	661 (41.9)		1.03 (0.88–1.19)
	T/T	163 (10)	137 (8.7)		0.84 (0.65–1.09)
	T	0.301	0.296	0.66	0.98 (0.88–1.09)
rs147415774 C>T	C/C	1621 (99.6)	1575 (99.8)	0.57	1.00
	C/T	6 (0.4)	4 (0.2)		0.69 (0.19–2.50)
	T/T	0.0	0.0		—
	T	0.002	0.001	0.56	0.69 (0.19–2.44)
rs2274065 A>C	A/A	1483 (91.2)	1440 (91.2)	0.64	1.00
	C/A	142 (8.7)	135 (8.6)		1.01 (0.78–1.30)
	C/C	2 (0.1)	4 (0.2)		2.25 (0.40–12.56)
	C	0.045	0.045	0.94	1.01 (0.80–1.28)
rs3754515 C>A	C/C	652 (40.1)	597 (37.8)	0.44	1.00
	C/A	741 (45.5)	759 (48.1)		1.11 (0.95–1.29)
	A/A	234 (14.4)	223 (14.1)		1.04 (0.84–1.30)
	A	0.372	0.382	0.41	1.04 (0.94–1.15)

¹ Уровень значимости ассоциации с риском развития СД2 с коррекцией по полу, возрасту и ИМТ.² Отношения шансов и 95%-ные доверительные интервалы ассоциаций SNPs с риском развития СД2 с коррекцией по полу, возрасту и ИМТ.

Таблица 4. Распределение и анализ ассоциаций гаплотипов *NCF2* с риском развития СД2

<i>H</i>	rs796860	rs789180	rs17849502	rs2274064	rs10911363	rs147415774	rs2274065	rs3754515	Контроль	Больные СД2	OR (95% CI) ¹	<i>P</i>	OR (95% CI) ²	<i>P</i>
<i>H1</i>	A	A	G	T	G	C	A	A	0.2253	0.2377	1.00	—	1.00	—
<i>H2</i>	A	A	G	C	T	C	A	C	0.2209	0.212	0.91 (0.79–1.06)	0.23	0.90 (0.77–1.04)	0.16
<i>H3</i>	A	A	G	T	G	C	A	C	0.1613	0.1691	0.99 (0.83–1.18)	0.91	1.02 (0.85–1.21)	0.86
<i>H4</i>	C	A	G	T	G	C	A	C	0.0985	0.0942	0.92 (0.75–1.11)	0.37	0.92 (0.75–1.12)	0.42
<i>H5</i>	A	T	G	C	G	C	A	C	0.078	0.0695	0.85 (0.68–1.05)	0.14	0.86 (0.69–1.08)	0.19
<i>H6</i>	A	A	G	C	G	C	A	A	0.0404	0.0411	0.97 (0.72–1.30)	0.84	0.99 (0.73–1.34)	0.94
<i>H7</i>	A	A	T	C	T	C	A	C	0.0285	0.0352	1.20 (0.87–1.66)	0.27	1.28 (0.92–1.78)	0.14
<i>H8</i>	A	T	G	C	G	C	C	A	0.0263	0.0242	0.87 (0.62–1.22)	0.43	0.88 (0.63–1.25)	0.48
<i>H9</i>	A	A	G	C	G	C	A	C	0.0265	0.0228	0.83 (0.57–1.21)	0.33	0.88 (0.60–1.28)	0.50
<i>H10</i>	A	A	G	C	T	C	A	A	0.0187	0.0174	0.88 (0.54–1.43)	0.60	0.96 (0.58–1.57)	0.86
<i>H11</i>	C	A	G	T	G	C	A	A	0.0177	0.013	0.77 (0.46–1.30)	0.34	0.73 (0.43–1.25)	0.25
<i>H12</i>	A	T	G	C	G	C	A	A	0.0098	0.0137	1.29 (0.69–2.43)	0.43	1.37 (0.72–2.61)	0.34
<i>H13</i>	A	A	T	C	T	C	A	A	0.0119	0.0114	0.91 (0.51–1.60)	0.73	0.82 (0.46–1.46)	0.49
Редкие	*	*	*	*	*	*	*	*	0.0091	0.0101	0.98 (0.72–1.34)	0.92	1.03 (0.75–1.42)	0.84
Общий <i>P</i>												0.83	0.67	

Примечание. Отношения шансов и 95%-ные доверительные интервалы: ¹ без поправок на ковариаты, ² с поправкой на пол, возраст и ИМТ; *H* – гаплотип. Подчеркиванием обозначены минорные аллели.

Таблица 5. Ассоциации гаплотипов гена *NCF2* с уровнем гликированного гемоглобина у больных СД2

<i>H</i>	rs796860	rs789180	rs17849502	rs2274064	rs10911363	rs147415774	rs2274065	rs3754515	Частота гаплотипа	Diff (95% CI) ¹	<i>P</i>
<i>H1</i>	A	A	G	T	G	C	A	A	0.2366	0.00	—
<i>H2</i>	A	A	G	C	T	C	A	C	0.2145	0.1 (–1.35–1.56)	0.89
<i>H3</i>	A	A	G	T	G	C	A	C	0.1699	0.22 (–1.37–1.8)	0.79
<i>H4</i>	C	A	G	T	G	C	A	C	0.0936	–0.04 (–1.91–1.82)	0.96
<i>H5</i>	A	T	G	C	G	C	A	C	0.0704	4.81 (2.63–6.98)	<0.0001
<i>H6</i>	A	A	G	C	G	C	A	A	0.0383	0.03 (–2.73–2.79)	0.99
<i>H7</i>	A	A	T	C	T	C	A	C	0.0345	–0.41 (–3.29–2.46)	0.78
<i>H8</i>	A	A	G	C	G	C	A	C	0.0249	–0.17 (–3.45–3.1)	0.92
<i>H9</i>	A	T	G	C	G	C	C	A	0.024	0.14 (–3.1–3.38)	0.93
<i>H10</i>	A	A	G	C	T	C	A	A	0.0173	0.11 (–3.82–4.05)	0.96
<i>H11</i>	A	T	G	C	G	C	A	A	0.0124	–0.55 (–5.12–4.02)	0.81
<i>H12</i>	C	A	G	T	G	C	A	A	0.0122	0.1 (–4.38–4.58)	0.97
<i>H13</i>	A	A	T	C	T	C	A	A	0.0109	0.35 (–4.51–5.21)	0.89
Редкие	*	*	*	*	*	*	*	*	0.0406	–0.19 (–3.08–2.71)	0.90

¹ Значение разности уровня HbA1c (%) при данном гаплотипе по сравнению с референсным гаплотипом *H1*; *H* – гаплотип. Подчеркиванием обозначены минорные аллели.

Таблица 6. Стратифицированный по ИМТ анализ ассоциаций генотипов полиморфных вариантов гена NCF2 с риском развития СД2

SNP гена NCF2	Генотип	Контроль, n (%)	СД2, n (%)	OR (95% CI)	P	Контроль, n (%)	СД2, n (%)	OR (95% CI)	P
ИМТ < 25 кг/м ²									
rs796860 A>C	A/A	244 (79.2)	153 (75.7)	1.00	0.14	999 (77.4)	1087 (79.3)	1.00	0.24
	C/A	60 (19.5)	49 (24.3)	1.21 (0.78–1.88)		274 (21.2)	259 (18.9)	0.87 (0.71–1.05)	
	C/C	4 (1.3)	0 (0)	0.00 (0.00–NA)		17 (1.3)	24 (1.8)	1.27 (0.67–2.40)	
rs789180 A>T	A/A	220 (76.7)	163 (80.3)	1.00	0.56	995 (77.3)	1071 (79)	1.00	0.45
	A/T	61 (21.2)	37 (18.2)	0.81 (0.51–1.29)		275 (21.4)	267 (19.7)	0.88 (0.73–1.07)	
	T/T	6 (2.1)	3 (1.5)	0.63 (0.15–2.64)		17 (1.3)	17 (1.2)	1.00 (0.51–1.99)	
rs17849502 G>T	G/G	286 (92.9)	179 (90.9)	1.00	0.20	1192 (92)	1186 (90.1)	1.00	0.012
	G/T	22 (7.1)	16 (8.1)	1.14 (0.57–2.29)		97 (7.5)	129 (9.8)	1.34 (1.01–1.77)	
	T/T	0 (0)	2 (1)	NA (0.00–NA)		6 (0.5)	1 (0.1)	0.15 (0.02–1.26)	
rs2274064 T>C	T/T	75 (25.1)	60 (30)	1.00	0.18	364 (28.1)	385 (28.3)	1.00	0.46
	C/T	154 (51.5)	105 (52.5)	0.89 (0.57–1.37)		627 (48.5)	679 (50)	1.03 (0.86–1.23)	
	C/C	70 (23.4)	35 (17.5)	0.61 (0.35–1.05)		302 (23.4)	295 (21.7)	0.91 (0.73–1.13)	
rs10911363 G>T	G/G	148 (48.4)	106 (52.5)	1.00	0.53	647 (50.1)	671 (49)	1.00	0.19
	G/T	134 (43.8)	77 (38.1)	0.81 (0.55–1.20)		508 (39.4)	579 (42.3)	1.08 (0.92–1.27)	
	T/T	24 (7.8)	19 (9.4)	1.04 (0.53–2.03)		136 (10.5)	118 (8.6)	0.84 (0.64–1.10)	
rs147415774 C>T	C/C	309 (100)	202 (99.5)	1.00	0.18	1290 (99.5)	1370 (99.8)	1.00	0.27
	C/T	0 (0)	1 (0.5)	NA (0.00–NA)		6 (0.5)	3 (0.2)	0.46 (0.11–1.88)	
	T/T	0	0	–		0	0	–	
rs2274065 A>C	A/A	264 (89.2)	185 (92)	1.00	0.35	1186 (91.6)	1235 (91.1)	1.00	0.61
	C/A	32 (10.8)	16 (8)	0.74 (0.39–1.40)		107 (8.3)	117 (8.6)	1.06 (0.81–1.40)	
	C/C	0	0	–		2 (0.2)	4 (0.3)	2.15 (0.39–11.82)	
rs3754515 C>A	C/C	121 (39.9)	80 (39.4)	1.00	0.93	521 (40.1)	514 (37.5)	1.00	0.29
	C/A	145 (47.9)	96 (47.3)	1.07 (0.72–1.59)		584 (45)	660 (48.2)	1.14 (0.97–1.35)	
	A/A	37 (12.2)	27 (13.3)	1.10 (0.61–1.98)		194 (14.9)	195 (14.2)	1.05 (0.83–1.32)	

Примечание. p – уровень значимости ассоциации с риском развития СД2 с коррекцией по полу, возрасту и ИМТ. OR (95% CI) – отношения шансов и 95%-ные доверительные интервалы ассоциаций SNPs с риском развития СД2 с коррекцией по полу, возрасту и ИМТ.

Таблица 7. Ассоциации полиморфных вариантов изучаемых гена *NCF2* с кардиоваскулярной автономной нейропатией (КАН) у больных СД2

SNP гена <i>NCF2</i>	Генотип	Больные СД2 без КАН, <i>n</i> (%)	Больные СД2 с КАН, <i>n</i> (%)	OR (95% CI)	<i>P</i>
rs796860 A>C	A/A	708 (80.7)	412 (77)	1.00	0.33
	A/C	158 (18)	110 (20.6)	1.14 (0.86–1.52)	
	C/C	11 (1.2)	13 (2.4)	1.68 (0.73–3.88)	
rs789180 A>T	A/A	704 (81.2)	402 (75.7)	1.00	0.015
	A/T	149 (17.2)	125 (23.5)	1.46 (1.11–1.92)	
	T/T	14 (1.6)	4 (0.8)	0.57 (0.18–1.80)	
rs17849502 G>T	G/G	763 (90)	461 (90.8)	1.00	0.86
	G/T	84 (9.9)	46 (9.1)	0.94 (0.64–1.39)	
	T/T	1 (0.1)	1 (0.2)	1.93 (0.12–31.72)	
rs2274064 T>C	T/T	239 (27.5)	161 (30.3)	1.00	0.46
	T/C	445 (51.2)	251 (47.3)	0.85 (0.66–1.11)	
	C/C	185 (21.3)	119 (22.4)	0.96 (0.70–1.31)	
rs10911363 G>T	G/G	407 (46.6)	285 (53.3)	1.00	0.046
	G/T	379 (43.4)	208 (38.9)	0.77 (0.61–0.97)	
	T/T	88 (10.1)	42 (7.8)	0.71 (0.47–1.07)	
rs147415774 C>T	C/C	877 (99.8)	534 (99.6)	1.00	0.92
	C/T	2 (0.2)	2 (0.4)	1.11 (0.15–8.22)	
	T/T	0	0	–	
rs2274065 A>C	A/A	802 (92.1)	470 (89.5)	1.00	0.27
	A/C	67 (7.7)	53 (10.1)	1.36 (0.92–2.01)	
	C/C	2 (0.2)	2 (0.4)	1.73 (0.24–12.53)	
rs3754515 C>A	C/C	343 (39.1)	197 (36.9)	1.00	0.40
	C/A	419 (47.8)	255 (47.8)	1.05 (0.83–1.34)	
	A/A	115 (13.1)	82 (15.4)	1.27 (0.90–1.78)	

Примечание. OR (95% CI) – отношения шансов и 95%-ные доверительные интервалы с поправкой на пол, возраст и ИМТ. *P* – уровень значимости ассоциации с поправками на пол, возраст и ИМТ.

сид. Полиморфный вариант rs17849502 по данным полногеномных исследований ассоциирован с развитием целиакии [23], ревматоидного артрита [24, 25], вариант rs17849501 – с развитием системной красной волчанки [26], SNP rs35012521 – с развитием эпилептической энцефалопатии [база данных Clinvar, <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/clinvar/RCV001258235/>]. Данные о связи SNPs *NCF2* с предрасположенностью к СД2 и его осложнениям в литературе отсутствуют. Выполненное нами исследование впервые выявило взаимосвязь полиморфизма rs17849502 в интроне гена *NCF2* с повышенным риском развития СД2 у больных с избыточной массой тела и ожирением, тем самым демонстрируя потенциальную вовлеченность гена цитозольного фактора нейтрофилов 2 в пато-

генез диабета. Нам также удалось установить влияние гаплотипа rs796860A-rs789180T-rs17849502G-rs2274064C-rs10911363G-rs147415774C-rs2274065A-rs3754515C на уровень гликированного гемоглобина у больных СД2: носительство данного гаплотипа *NCF2* было сопряжено со значимо более высоким содержанием HbA_{1c}.

Согласно экспериментальным данным GTEх портала (<https://gtexportal.org/>), присутствие минорных аллелей rs17849502-T ($P = 2.1 \times 10^{-12}$) и rs789180-T ($P = 3.2 \times 10^{-10}$) повышает аффинность факторов сплайсинга к синтезированной пре-мРНК и увеличивает число сплайсинговых изоформ *NCF2* в крови. Кроме того, аллель rs789180-T повышает экспрессию в крови гена *SMG7-AS1* ($P = 2.3 \times 10^{-5}$), ассоциированного с пороком раз-

вития межпредсердной перегородки (<https://malacards.org/>). Более эффективный процессинг мРНК NCF2 может способствовать повышению содержания этого белка и активации НАДФН-оксидазы. Гиперактивность NCF2 и NOX имеет особое значение для островков поджелудочной железы, в которой смещение редокс-баланса в прооксидантную сторону приводит к нарушению глюкозостимулированной секреции инсулина, доказательством чего является экспериментальная работа Morgan и коллег, показавших, что применение селективного ингибитора НАДФН-оксидазы подавляет секрецию инсулина бета-клетками [27]. Регуляторное влияние NOX на индуцированную пальмитатом секрецию инсулина продемонстрировано и на островках Лангерганса крыс [20]. Увеличение активности НАДФН-оксидазы и генерации АФК также описано в исследовании на крысах с сочетанием ожирения и диабета [28]. Наконец, в недавней работе Baig и соавт. [29] отмечен рост постпрандиальной экспрессии НАДФН-оксидазы в нейтрофилах, моноцитах, миоцитах и адипоцитах здоровых индивидов, имеющих больных СД2 родственников первой степени родства по сравнению с лицами с неотягощенным семейным анамнезом. Генетические факторы, взаимодействуя со средой, детерминируют и развитие осложнений СД2, в частности КАН [30]. На сегодняшний день проведен ряд работ по транскриптомному анализу больных с диабетической нейропатией, в которых установлены группы генов, связанных с ее развитием и вовлеченных в становление окислительного стресса, воспаления и дисфункции митохондрий [31–36]. Однако участие гена *NCF2* в формировании предрасположенности к КАН показано только в нашем исследовании: носительство генотипов rs789180-А/Т и rs10911363-Г/Т значимо ассоциировано с развитием этого осложнения СД2.

Таким образом, в проведенном исследовании впервые выявлены ассоциации rs17849502 гена *NCF2* с развитием СД2, а также ассоциации rs789180 и rs10911363 с кардиоваскулярной автономной нейропатией. Полученные данные свидетельствуют о значимом вкладе полиморфизма гена *NCF2* в патогенез СД2 и создают научный задел для дальнейших исследований по изучению генетико-биохимических нарушений системы редокс-гомеостаза при сахарном диабете 2-го типа.

Исследование выполнено за счет гранта Российского научного фонда (проект № 20-15-00227).

Все процедуры, выполненные в исследовании с участием людей, соответствуют этическим стандартам институционального и/или национального комитета по исследовательской этике и Хельсинкской декларации 1964 г. и ее последующим изменениям или сопоставимым нормам этики.

От каждого из включенных в исследование участников было получено информированное добровольное согласие.

Авторы заявляют, что у них нет конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Saeedi P., Petersohn I., Salpea P. et al. Global and regional diabetes prevalence estimates for 2019 and projections for 2030 and 2045: Results from the International Diabetes Federation Diabetes Atlas // *Diabetes Res. and Clin. Practice*. 2019. V. 157. P. 107843. <https://doi.org/10.1016/j.diabres.2019.107843>
2. Ziegler D., Voss A., Rathmann W. et al. Increased prevalence of cardiac autonomic dysfunction at different degrees of glucose intolerance in the general population: the KORA S4 // *Diabetologia*. 2015. V. 58. № 5. P. 1118–1128. <https://doi.org/10.1007/s00125-015-3534-7>
3. Мошхоева Л.С., Баринев А.Н. Оптимизация метода диагностики кардиальной автономной невропатии при сахарном диабете 2-го типа // *Медицинский совет*. 2021. № 10. С. 178–183. <https://doi.org/10.21518/2079-701X-2021-10-178-183>
4. Urner S., Ho F., Jha J.C. et al. NADPH oxidase inhibition: preclinical and clinical studies in diabetic complications // *Antioxidants and Redox Signaling*. 2020. V. 33. № 6. P. 415–434. <https://doi.org/10.1089/ars.2020.8047>
5. Onyango A.N. Cellular stresses and stress responses in the pathogenesis of insulin resistance // *Oxid. Med. Cell Longev*. 2018. P. 4321714. <https://doi.org/10.1155/2018/4321714>
6. Sies H., Jones D.P. Reactive oxygen species (ROS) as pleiotropic physiological signalling agents // *Nat. Rev. Mol. Cell Biol*. 2020. V. 21. P. 363–383. <https://doi.org/10.1038/s41580-020-0230-3>
7. Taylor J.P., Hubert M.T. The role of NADPH oxidases in infectious and inflammatory diseases // *Redox Biol*. 2021. P. 102159. <https://doi.org/10.1016/j.redox.2021.102159>
8. Schreiber R., Ferreira-Sae M.C., Tucunduva A.C. et al. CYBA C242T polymorphism is associated with obesity and diabetes mellitus in Brazilian hypertensive patients // *Diabetic Med*. 2012. V. 29. № 7. P. e55–e61. <https://doi.org/10.1111/j.1464-5491.2012.03594.x>
9. Osmenda G., Matusik P.T., Sliwa T. et al. Nicotinamide adenine dinucleotide phosphate (NADPH) oxidase p22phox subunit polymorphisms, systemic oxidative stress, endothelial dysfunction, and atherosclerosis in type 2 diabetes mellitus // *Polish Archiv. Intern. Med*. 2021. V. 131. № 5. P. 447–454. <https://doi.org/10.20452/pamw.15937>
10. Yuan H., Zhang X., Huang X. et al. NADPH oxidase 2-derived reactive oxygen species mediate FFAs-induced dysfunction and apoptosis of beta-cells via JNK, p38 MAPK and p53 pathways // *PLoS One*. 2010. V. 5.

- P. e15726.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0015726>
11. *Ma Y., Li W., Yin Y. et al.* AST IV inhibits H(2)O(2)-induced human umbilical vein endothelial cell apoptosis by suppressing Nox4 expression through the TGF-beta1/Smad2 pathway // *Int. J. Mol. Med.* 2015. V. 35. P. 1667–1674.
<https://doi.org/10.3892/ijmm.2015.2188>
 12. *Дедов И.И., Шестакова М.В., Майоров А.Ю. и др.* Алгоритмы специализированной медицинской помощи больным сахарным диабетом. Вып. 9 / Под ред. Дедова И.И., Шестаковой М.В., Майорова А.Ю. // *Сахарный диабет.* Т. 22. № 1S1. С. 1–144.
<https://doi.org/10.14341/DM221S1>
 13. *Азарова Ю.Э., Клёсова Е.Ю., Сакали С.Ю. и др.* Вклад полиморфизма rs11927381 гена IGF2BP2 в патогенез сахарного диабета 2 типа // *Науч. результаты биомед. исследований.* 2020. Т. 6. № 1. С. 9–19.
<https://doi.org/10.18413/2658-6533-2020-6-1-0-2>
 14. *Азарова Ю.Э., Клёсова Е.Ю., Самгина Т.А. и др.* Роль полиморфных вариантов гена СУВА в патогенезе сахарного диабета 2 типа // *Мед. генетика.* 2019. Т. 18. № 8. С. 37–48.
<https://doi.org/10.25557/2073-7998.2019.08.37-48>
 15. *Vignais P.V.* The superoxide-generating NADPH oxidase: structural aspects and activation mechanism // *CMLS.* 2002. V. 59. № 9. P. 1428–1459.
<https://doi.org/10.1007/s00018-002-8520-9>
 16. *Sahoo S., Meijles D.N., Pagano P.J.* NADPH oxidases: Key modulators in aging and age-related cardiovascular diseases? // *Clin. Sci.* 2016. V. 130. № 5. P. 317–335.
<https://doi.org/10.1042/CS20150087>
 17. *Manea A.* NADPH oxidase-derived reactive oxygen species: Involvement in vascular physiology and pathology // *Cell and Tissue Res.* 2010. V. 342. № 3. P. 325–339.
<https://doi.org/10.1007/s00441-010-1060-y>
 18. *Oliveira H.R., Verlengia R., Carvalho C.R. et al.* Pancreatic beta cells express phagocyte-like NADPH oxidase // *Diabetes.* 2003. V. 52. № 6. P. 1457–1463.
<https://doi.org/10.2337/diabetes.52.6.1457>
 19. *Uchizono Y., Takeya R., Iwase M. et al.* Expression of isoforms of NADPH oxidase components in rat pancreatic islets // *Life Sci.* 2006. V. 80. № 2. P. 133–139.
<https://doi.org/10.1016/j.lfs.2006.08.031>
 20. *Graciano M.F., Santos L.R., Curi R. et al.* NAD(P)H oxidase participates in the palmitate-induced superoxide production and insulin secretion by rat pancreatic islets // *J Cell Physiol.* 2011. V. 226. № 4. P. 1110–1117.
<https://doi.org/10.1002/jcp.22432>
 21. *de Mendez I., Garrett M.C., Adams A.G. et al.* Role of p67-phox SH3 domains in assembly of the NADPH oxidase system // *J. Biol. Chemistry.* 1994. V. 269. № 23. P. 16326–16332.
[https://doi.org/10.1016/S0021-9258\(17\)34011-5](https://doi.org/10.1016/S0021-9258(17)34011-5)
 22. *Leusen J.H., Fluiter K., Hilarius P.M. et al.* Interactions between the cytosolic components p47phox and p67phox of the human neutrophil NADPH oxidase that are not required for activation in the cell-free system // *J. Biol. Chemistry.* 1995. V. 270. № 19. P. 11216–11221.
<https://doi.org/10.1074/jbc.270.19.11216>
 23. *Ricaño-Ponce I., Gutierrez-Achury J., Costa A.F. et al.* Immunochip meta-analysis in European and Argentinian populations identifies two novel genetic loci associated with celiac disease // *Eur. J. Human Genet.* 2020. V. 28. № 3. P. 313–323.
<https://doi.org/10.1038/s41431-019-0520-4>
 24. *Gutierrez-Achury J., Zorro M.M., Ricaño-Ponce I. et al.* Functional implications of disease-specific variants in loci jointly associated with coeliac disease and rheumatoid arthritis // *Human Mol. Genet.* 2016. V. 25. № 1. P. 180–190.
<https://doi.org/10.1093/hmg/ddv455>
 25. *Acosta-Herrera M., Kerick M., González-Serna D. et al.* Genome-wide meta-analysis reveals shared new loci in systemic seropositive rheumatic diseases // *Annals Rheumatic Diseases.* 2019. V. 78. № 3. P. 311–319.
<https://doi.org/10.1136/annrheumdis-2018-214127>
 26. *Morris D.L., Sheng Y., Zhang Y. et al.* Genome-wide association meta-analysis in Chinese and European individuals identifies ten new loci associated with systemic lupus erythematosus // *Nat. Genet.* 2016. V. 48. № 8. P. 940–946.
<https://doi.org/10.1038/ng.3603>
 27. *Morgan D., Rebelato E., Abdulkader F. et al.* Association of NAD(P)H oxidase with glucose-induced insulin secretion by pancreatic beta-cells // *Endocrinology.* 2009. V. 150. № 5. P. 2197–2201.
<https://doi.org/10.1210/en.2008-1149>
 28. *Syed I., Kyathanahalli C.N., Kowluru A.* Phagocyte-like NADPH oxidase generates ROS in INS 832/13 cells and rat islets: role of protein prenylation // *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* 2011. V. 300. № 3. P. R756–R762.
<https://doi.org/10.1152/ajpregu.00786.2010>
 29. *Baig S., Shabeer M., Rizvi E.P. et al.* Heredity of type 2 diabetes confers increased susceptibility to oxidative stress and inflammation // *BMJ Open Diabetes Res. and Care.* 2020. V. 8. № 1. P. e000945.
<https://doi.org/10.1136/bmjdr-2019-000945>
 30. *Papanas N., Ziegler D.* Risk factors and comorbidities in diabetic neuropathy: an update // *Rev. Diabet. Stud.* 2015. V. 12. № 1–2. P. 48–62.
<https://doi.org/10.1900/RDS.2015.12.48>
 31. *Pande M., Hur J., Hong Y. et al.* Transcriptional profiling of diabetic neuropathy in the BKS db/db mouse: A model of type 2 diabetes // *Diabetes.* 2011. V. 60. № 7. P. 1981–1989.
<https://doi.org/10.2337/db10-1541>
 32. *Ma J., Pan P., Anyika M. et al.* Modulating molecular chaperones improves mitochondrial bioenergetics and decreases the inflammatory transcriptome in diabetic sensory neurons // *ACS Chem. Neurosci.* 2015. V. 6. № 9. P. 1637–1648.
<https://doi.org/10.1021/acschemneuro.5b00165>

33. Hur J., Dauch J.R., Hinder L.M. et al. The metabolic syndrome and microvascular complications in a murine model of type 2 diabetes // *Diabetes*. 2015. V. 64. № 9. P. 3294–3304.
<https://doi.org/10.2337/db15-0133>
34. Sas K.M., Kayampilly P., Byun J. et al. Tissue-specific metabolic reprogramming drives nutrient flux in diabetic complications // *JCI Insight*. 2016. V. 1. № 15. P. e86976.
<https://doi.org/10.1172/jci.insight.86976>
35. Hinder L.M., Park M., Rumora A.E. et al. Comparative RNA-Seq transcriptome analyses reveal distinct metabolic pathways in diabetic nerve and kidney disease // *J. Cell Mol. Med*. 2017. V. 21. № 9. P. 2140–2152.
<https://doi.org/10.1111/jcmm.13136>
36. Guo K., Eid S.A., Elzinga S.E. et al. Genome-wide profiling of DNA methylation and gene expression identifies candidate genes for human diabetic neuropathy // *Clin. Epigenet*. 2020. V. 12. № 1. P. 1–16.
<https://doi.org/10.1186/s13148-020-00913-6>

Polymorphic Variants of the Neutrophil Cytosolic Factor 2 Gene: Associations with a Predisposition to Type 2 Diabetes Mellitus and Cardiovascular Autonomicneuropathy

I. E. Azarova^a, *, E. Yu. Klyosova^a, I. I. Kolomoets^a, and A. V. Polonikov^a

^a Kursk State Medical University, Kursk, 305041 Russia

*e-mail: azzzzar@yandex.ru

The study included 3206 unrelated individuals of Slavic origin (1579 patients with T2D, including 535 patients with cardiovascular autonomicneuropathy, and 1627 healthy volunteers). SNPs genotyping was performed on a genomic time-of-flight mass spectrometer MassARRAY Analyzer 4. Statistical calculations were performed using the SNPStats program. The association of the *NCF2* genotype rs17849502-G/T (OR = 1.42, 95% CI = 1.08–1.87, $P = 0.043$) with an increased risk of developing T2D was established. The analysis of *NCF2* genotype frequencies stratified by body mass index (BMI) revealed that the rs17849502-G/T genotype frequency was significantly higher only in overweight and obese patients (OR = 1.34, 95% CI = 1.01–1.77, $P = 0.012$). In addition, genotypes rs789180-A/T (OR = 1.46; 95% CI = 1.11–1.92, $P = 0.015$) and rs10911363-G/T (OR = 0.77, 95% CI = 0.61–0.97, $P = 0.046$) were associated with autonomous cardiovascular neuropathy in T2D, regardless of gender, age and BMI of patients. Analysis of the effects of *NCF2* polymorphisms on biochemical parameters of blood plasma showed that carriers of the haplotype *H5* rs796860A-rs789180T-rs17849502G-rs2274064C-rs10911363G-rs147415774C-rs2274065A-rs3754515C had a 4.81% higher content of glycated hemoglobin (95% CI = 2.63–6.98, $P < 0.0001$) compared with carriers of the reference haplotype *H1* rs796860A-rs789180A-rs17849502G-rs2274064T-rs10911363G-rs147415774C-rs2274065A-rs3754515C. Thus, we have identified for the first time associations of rs17849502 of the *NCF2* gene with the development of T2D, as well as associations of rs789180 and rs10911363 with cardiovascular autonomic neuropathy. The data obtained indicate a significant contribution of the *NCF2* gene polymorphism to the pathogenesis of T2D and provide a scientific basis for further research on the study of genetic and biochemical disorders of redox homeostasis in type 2 diabetes mellitus.

Keywords: type 2 diabetes mellitus, diabetic distal neuropathy, cardiovascular autonomicneuropathy, neutrophil cytosolic factor 2, NADPH oxidase, single nucleotide polymorphism.