\_

\_

# Том 38, номер 5, 2021

-

# обзоры

Перспективы и препятствия для клинического применения ингибиторов эффлюксных помп <i>Mycobacterium tuberculosis</i>	
И. Г. Фелькер, Е. И. Гордеева, Н. В. Ставицкая, В. А. Першина, Я. Р. Батыршина	317
***	
Особенности распределения трансмембранного белка ТМЕМ-119 в микроглиоцитах коры головного мозга человека при формировании амилоидных бляшек	
В. В. Гусельникова, Е. А. Федорова, А. Е. Сафрай, А. А. Рукавишникова, Д. Э. Коржевский	340
Флуоресцентные исследования структурно-динамических параметров мембран митохондрий печени крыс при гипотермии различной длительности	
Р. А. Халилов, С. И. Хизриева, А. М. Джафарова, В. Р. Абдуллаев	351
Морфологическая характеристика ядрышка и гетерохроматиновых агрегатов таницитов головного мозга крысы	
Д. А. Суфиева, И. М. Плешакова, Д. Э. Коржевский	363
Нейродегенерация альцгеймеровского типа. Возможная коррекция ухудшения памяти при внутривенном введении препарата экзосом	
Р. А. Полтавцева, Н. В. Бобкова, Д. Ю. Жданова, Е. В. Свирщевская, Г. Т. Сухих	374
PI828 подавляет Ca <sup>2+</sup> -сигнализацию, инициируемую аминергическими агонистами, по механизму, независимому от ингибирования PI3-киназы	
Е. А. Дымова, О. А. Рогачевская, Е. А. Воронова, П. Д. Котова	388

# КРАТКИЕ СООБЩЕНИЯ

Оценка селективности взаимодействия фосфолипазы А2 с мембранами	
из РОРС/РОРС с помощью построения карт взаимодействия	
А. С. Алексеева, П. Е. Волынский, И. А. Болдырев	393

\_

-

Vol. 38, No. 5, 2021

# **REVIEWS**

Prospects and Obstacles for Clinical Use of the Inhibitors of <i>Mycohacterium tuberculosis</i> Efflux Pumps	
I. G. Felker, E. I. Gordeeva, N. V. Stavitskaya, V. A. Pershina, Ya. R. Batyrshina	317
***	
Distribution of Transmembrane Protein 119 (TMEM-119) in Microgliocytes of Human Cerebral Cortex with Amyloid Plaques	
V. V. Guselnikova, E. A. Fedorova, A. E. Safray, A. A. Rukavishnikova, D. E. Korzhevskii	340
Fluorescent Studies of the Structural and Dynamic Parameters of the Mitochondrial Membranes from the Liver of Rats at Hypothermia of Various Duration	
R. A. Khalilov, S. I. Khizrieva, A. M. Dzhafarova, V. R. Abdullaev	351
Structural Characteristic of Nucleolus and Heterochromatin Aggregates of Rat Brain Tanycytes	
D. A. Sufieva, I. M. Pleshakova, D. E. Korzhevskii	363
Alzheimer's Type Neurodegeneration. Possible Correction of Memory Impairment with Intravenous Injection of Exosomes	
R. A. Poltavtseva, N. V. Bobkova, D. Yu. Zhdanova, E. V. Svirshchevskaya, G. T. Sukhikh	374
PI828 Impairs Ca <sup>2+</sup> Signaling Mediated by Aminergic Agonists in a PI3-kinase Independent Manner	
E. A. Dymova, O. A. Rogachevskaja, E. A. Voronova, P. D. Kotova	388
SHORT COMMUNICATIONS	
Estimation of the Phospholipase A2 Selectivity on POPC/POPG Membranes Using the Interaction Map	
A. S. Alekseeva, P. E. Volynsky, I. A. Boldyrev	393

———— ОБЗОРЫ ——

УДК 579.61

# ПЕРСПЕКТИВЫ И ПРЕПЯТСТВИЯ ДЛЯ КЛИНИЧЕСКОГО ПРИМЕНЕНИЯ ИНГИБИТОРОВ ЭФФЛЮКСНЫХ ПОМП *МУСОВАСТЕRIUM TUBERCULOSIS*

© 2021 г. И. Г. Фелькер<sup>*a*, \*</sup>, Е. И. Гордеева<sup>*a*</sup>, Н. В. Ставицкая<sup>*a*</sup>, В. А. Першина<sup>*a*</sup>, Я. Р. Батыршина<sup>*a*</sup>

<sup>а</sup>Новосибирский научно-исследовательский институт туберкулеза Минздрава России, Новосибирск, 630040 Россия \*e-mail: felkeririna.nniit@gmail.com Поступила в редакцию 04.03.2021 г. После доработки 22.04.2021 г. Принята к публикации 22.04.2021 г.

Одним из механизмов формирования лекарственной устойчивости бактерий является экспорт лекарственных соединений эффлюксными помпами (ЭП) различных семейств. Интерес к изучению механизмов регуляции работы эффлюксных помп *M. tuberculosis* (МБТ), а в частности ингибирования, продиктован стремительным распространением лекарственно устойчивых штаммов, особенно у пациентов с иммунодефицитными состояниями. В обзоре подробно представлены все основные классы ЭП прокариотических клеток, особый раздел отведен описанию строения и механизмам ингибирования ЭП МБТ. Обобщены имеющиеся в литературе данные о генах, кодирующих ЭП МБТ, экспортируемых субстратах, а также об известных ингибиторах. Проведенный анализ позволяет сделать вывод о том, что использование ингибиторов ЭП МБТ в качестве терапевтических средств сопряжено с множеством сложных, в настоящее время не решенных вопросов, однако это никоим образом не должно влиять на понимание важности тех преимуществ, которые дает современной медицине использование данных соединений.

Ключевые слова: эффлюксные помпы, *M. tuberculosis*, ингибиторы эффлюксных помп DOI: 10.31857/S0233475521050054

# введение

В современной литературе, посвященной исследованиям устойчивости бактерий к антибиотикам, большое внимание уделяется эффлюксным помпам (ЭП), как одному из основных механизмов формирования лекарственной резистентности. Интерес к их изучению продиктован стремительным распространением резистентных штаммов возбудителей инфекционных заболеваний у человека, особенно микроорганизмов с множественной лекарственной устойчивостью (МЛУ).

В настоящем обзоре представлены данные о существующей системе ЭП у бактерий в целом и у *Mycobacterium tuberculosis* (МБТ) в частности, обобщена информация об известных ингибиторах ЭП (ИЭП) и о перспективах их использования в клинической практике.

При подготовке настоящего обзора были использованы данные 224 литературных источников, из которых 223 представлены публикациями на английском, испанском и китайском языках и только 1 на русском, что может свидетельствовать о недостаточной освещенности проблемы эффлюксных помп в русскоязычной литературе. Также для анализа использовались международные базы данных белков-транспортеров: Transporter Classification Database, Uniprot, Mycobrowser, String.

## СТРОЕНИЕ, ВИДЫ И ФУНКЦИИ ЭФФЛЮКСНЫХ ПОМП БАКТЕРИЙ

ЭП представляют собой комплексы белковых молекул, встроенных в клеточную стенку и способных транспортировать молекулы субстрата различных размеров (в том числе токсичные вещества, ксенобиотики, антибиотики большинства известных классов) из внутриклеточного пространства во внешнюю среду [1, 2]. Впервые описание ЭП в научной литературе появилось в 1990-х годах, к настоящему времени у прокариот описано пять основных семейств [3], хотя данный биохимический механизм формирования резистентности бактерий продолжает активно изучаться [1, 4–8].



Рис. 1. Семейства эффлюксных помп прокариотических клеток на примере грамположительных бактерий. Р – фосфат, ABC – ЭП семейства ATP-binding cassette, AcrA – периплазматический вспомогательный белок, AcrB – транспортный белок внутренней мембраны, MATE – ЭП семейства Multidrug and toxic compound extrusion, MFS – суперсемейство ЭП Major facilitator superfamily, NBD – нуклеотид-связывающий домен, RND – ЭП типа "Resistance-nodulation-cell division", SMR – семейство ЭП Small Multidrug Resistance, TMD – гидрофобный трансмембранный домен, TolC – белковый канал внешней мембраны.

Поскольку ЭП осуществляют транспорт субстрата против градиента концентрации, он является энергозависимым. В соответствии с типом энергообеспечения все помпы разделяются на две категории: получающие энергию путем активного гидролиза АТР (семейство ABC) и использующие энергию протон-движущей силы (семейства MFS, SMR, МАТЕ и RND) [7].

Следует отметить, что ЭП грамотрицательных бактерий имеют более сложное строение, поскольку молекулы белков транспортной системы располагаются как во внешней, так и в цитоплазматической мембране и связаны между собой периплазматическим пространством, формируя трехкомпонентную структуру [7, 9]. ЭП могут быть как субстрат-специфичными транспортерами, экспортирующими только один вид/класс антибиотиков, так и транспортерами для широкого спектра субстратов.

# Семейства эффлюксных помп прокариотических клеток

Семейство ЭП АТР-binding cassette (ABC). Трансмембранные белки данного семейства относятся к первично-активным транспортерам, использующим гидролиз АТР для осуществления переноса субстрата через мембрану против электрохимического градиента [10]. Впервые роль данного семейства транспортеров в формировании МЛУ была описана еще в 1986 году для клеток опухолевых тканей [11, 12]. В настоящее время хорошо изучена роль транспортеров этого семейства в формировании МЛУ как у грамположительных, так и грамотрицательных бактерий [13]. Структурно помпа представлена четырьмя белковыми субъединицами: две из них являются гидрофобными мембранными доменами, которые, как предполагают, формируют канал в цитоплазматической мембране; другие две субъединицы – цитоплазматические нуклеотид-связывающие домены, отвечают за энергообеспечение активного транспорта веществ путем связывания и гидролиза АТР (рис. 1) [14, 15]. У большинства бактерий данные четыре домена представлены независимыми полипептидами, кодируемыми генами одного оперона или генами, расположенными в одном и том же хромосомном регионе. Транспортеры семейства АВС могут осуществлять как экспорт, так и импорт веществ, однако способность импортировать вещества описана только для прокариотических клеток [15]. В литературе отмечена роль этого семейства в осуществлении импорта широкого спектра физиологически важных субстратов, среди которых питательные вещества, от небольших по размеру молекул углеводородов, аминокислот и пептидов до металлов, сидерофоров и витамина B12 [14, 16]. ABC-белки способны экспортировать различные соединения, такие как липиды, холестерин, стероидные гормоны, цитокины, хемокины, простагландины, ионы тяжелых металлов, пептиды, ксенобиотики и химиопрепараты [17]. Активный экспорт токсичных соединений ЭП семейства АВС играет важную роль в формировании вирулентности микроорганизмов [18].

ЭП Major Facilitator superfamily (MFS). Трансмембранные белки суперсемейства MFS – самый большой класс вторично-активных транспортеров, широко представленный во всех живых клетках. Это суперсемейство включает более 70 различных подсемейств, каждое из которых связано с транспортом субстрата определенного типа [19]. В настоящее время описано более 15000 генов, кодирующих трансмембранные белки этого семейства [20], в прокариотических клетках к данному семейству относится около 25% всех транспортных пептидов [21]. В человеческом геноме описаны гены, кодирующие, по меньшей мере, 110 транспортных белков MFS [22]. Несмотря на ограниченное сходство последовательностей, различную субстратную специфичность и механизмы связывания, структурно представители ланного суперсемейства высоко консервативны. Помпа представлена двумя доменами, каждый из которых состоит из шести трансмембранных спиралей. Домены связаны между собой длинной цитоплазматической петлей или двумя трансмембранными спиралями в плоскости мембраны (рис. 1) [23-27]. Они состоят из 400-600 аминокислотных остатков, которые складываются в 12-14, иногда в 24 трансмембранных α-спирали [20, 28]. ЭП MFS необходимы бактериальной клетке как для экспорта, так и для импорта веществ. Первоначально считалось, что основная функция помп этого семейства – импорт олигосахаридов, но дальнейшие исследования показали их способность экспортировать лекарственные вещества, метаболиты, аминокислоты и оксианионы. Транспортеры MFS, участвующие в формировании МЛУ, широко распространены среди микроорганизмов и обычно функционируют как однокомпонентные помпы, способные переносить низкомолекулярные соединения. У грамотрицательных бактерий MFS-транспортеры представлены трехкомпонентным комплексом [19, 29, 30], кодирующие гены которого расположены в одном опероне. В частности, за геном, кодирующим белок внешней мембраны, следуют гены, кодирующие периплазматический адаптер и внутренний мембранный транспортер. Чаще всего регуляторный ген, активатор или репрессор, находится рядом и транскрибируется независимо от генов, кодирующих саму ЭП.

Белки семейства MFS демонстрируют три кинетически различных механизма осуществления транспорта субстратов: унипортеры — транспортируют только один тип субстрата и активируются исключительно за счет его трансмембранного градиента; симпортеры — перемещают два или более субстратов в одном направлении одновременно, используя электрохимический градиент одного из них в качестве движущей силы; антипортеры — транспортируют два или более субстратов через мембрану, но в противоположных направлениях [20, 31—35]. Таким образом, транспортеры данного семейства для осуществления

БИОЛОГИЧЕСКИЕ МЕМБРАНЫ том 38 № 5 2021

экспорта могут использовать как трансмембранный ионный градиент, так и электрохимический протонный градиент.

Семейство ЭП Small Multidrug Resistance (SMR). ЭП этого семейства наименее изучены, ряд исследователей полагает, что это семейство эволюционно более молодое и сформировалось у бактерий в связи с началом активного использования антибактериальных препаратов [36, 37]. Структурно помпа представлена небольшим пептидом, состоящим из 100–200 аминокислот, уложенных в α-спираль с короткими гидрофильными петлями (рис. 1) [37].

Аминокислотный состав белков, формирующих помпы типа SMR, включает в себя глутамат, серин, триптофан и тирозин. Предполагается, что именно глутамат участвует в связывании протонов катионных субстратов при экспорте лекарственного вещества. В отличие от белковтранспортеров других семейств, SMR-пептиды осуществляют транспорт только липофильных субстратов, в первую очередь четвертичных аммониевых соединений, а также различных антибиотиков [38, 39], антисептиков и детергентов [36]. Подобно белкам суперсемейства MFS, транспортеры SMR для экспорта лекарственных соединений используют электрохимический протонный градиент [31].

ЭП семейства Multidrug and toxic compound extrusion (MATE). Помпы семейства МАТЕ способны транспортировать по электрохимическому градиенту метаболиты и ксенобиотики в катионной форме. Интересным представляется способность этих ЭП переносить молекулы лекарственных препаратов разных типов, формируя лекарственную устойчивость бактерий к структурно разнообразным антибиотикам и химическим соединениям. Показано, что мутации в генах, отвечающих за работу помпы, ассоциированы с появлением резистентности к аминогликозидам, цетилпиридиния хлориду и сульфамидным препаратам [37, 40]. Известно, что у некоторых штаммов грамотрицательных бактерий ЭП МАТЕ играют важную роль в формировании устойчивости к препаратам группы хинолонов [41, 42].

ЭП семейства Resistance-nodulation-cell division (RND). ЭП данного семейства представлены трехкомпонентной структурой, состоящей из транспортного белка внутренней мембраны (AcrB), периплазматического вспомогательного белка (AcrA) и белкового канала внешней мембраны (TolC) (рис. 1) [43]. Организация оперонов, кодирующих трехкомпонентные транспортеры RND, противоположна организации оперонов, кодирующих трехкомпонентные помпы семейства MFS: ген, кодирующий транспортер, всегда расположен в проксимальном к промотору положении, за ним следует ген, кодирующий периплазматический белок, а затем, если он присутствует, ген, кодирующий компонент внешней мембраны [44].

Трансмембранные белки этого семейства лучше всего описаны для грамотрицательных бактерий [45, 46], однако известны представители данного семейства и у микобактерий [47, 48]. Эффлюксные помпы семейства RND, так же как и белки семейств MFS, MATE и SMR, являются антипортерами, осуществляющими экспорт лекарственных соединений за счет использования электрохимического протонного градиента [49]. Среди всех семейств экспортеров RND обладают самой широкой субстратной специфичностью [50, 51]. Эти помпы способны экспортировать как гидрофильные, так и гидрофобные вещества, например, антибиотики, антисептики, токсичные красители, анионные, катионные, цвиттер-ионные и нейтральные соединения [9, 50, 52]. Интересно, что несмотря на широкую субстратную специфичность, помпы семейства RND не способны экспортировать питательные вещества или нетоксичные метаболиты, такие как глюкоза или аминокислоты [53]. Также имеются данные о том, что RND-экспортеры играют важную роль в осуществлении *Ouorum sensing* – способности микроорганизмов взаимодействовать за счет секреции сигнальных молекул [54, 55].

#### Виды эффлюксных помп у M. tuberculosis

Согласно информации международных баз данных транспортных белков [56], геном *M. tuber-culosis* референсного штамма H37Rv кодирует 267 различных трансмембранных белков и ионных каналов, из которых 129 — это ATP-зависимые транспортеры семейства ABC, 31 — помпы суперсемейства MFS, 14 — транспортеры семейства RND, и по одному трансмембранному каналу для семейств SMR и MATE [17, 57].

В ряде исследований было показано, что в клинических изолятах экспрессия генов, кодирующих ЭП, в несколько раз выше, чем в референсных штаммах, что объясняется экспозицией противотуберкулезных препаратов [47, 58].

Подавляющее большинство ЭП МБТ относится к семейству ABC [59], около 2.5% генома микобактерий отвечают за синтез и активность этих трансмембранных белков. Все ЭП данного семейства можно разделить на кодируемые одним, двумя или тремя генами (табл. 1).

В сравнении с другими микроорганизмами для микобактерий характерно относительно небольшое количество помп-импортеров (за исключением импортеров фосфатов), что косвенно характеризует способность микобактерий сохранять жизнеспособность и полноценно функционировать в среде с низким содержанием питательных веществ. Интересно, что среди помп данного семейства были идентифицированы системы, отвечающие за экспорт факторов, необходимых для прикрепления микобактерий к клеткам хозяина [14, 59]. Также некоторые представители данного семейства играют немаловажную роль в регуляции активности роста микобактерий путем взаимодействия универсального стресс-белка Rv2623 с ЭП Rv1747, отвечающего за экспорт липоолигосахаридов, в частности обладающих иммуномодулирующим действием фосфатидил-миоинозитол маннозидов [60-63]. Публикации 2021 года свидетельствуют о том, что трансмембранные белки данного семейства также содержат эпитопы цитотоксических Т-лимфоцитов, что в будушем может быть использовано при создании новой вакцины [64].

В табл. 1 представлены известные в настоящее время наиболее клинически значимые трансмембранные экспортеры всех семейств, играющие важную роль в формировании МЛУ МБТ.

Семейство помп "Major Facilitator superfamily" (MFS). В современной литературе для *M. tubercu*losis H37Rv описан и классифицирован 31 трансмембранный белок семейства MFS, все они сгруппированы в 9 подсемейств (Transporter Classification Database). Транспортеры данного семейства являются вторыми по численности и составляют около четверти всех трансмембранных белков микобактериальной клетки. Транспортеры каждого из подсемейств способны переносить как катионные, так и анионные молекулы (табл. 1). Известно, что белки различных помп подсемейств MFS могут функционировать как унипортеры, симпортеры и антипортеры, что обуславливает их высокую субстратную специфичность. В то же время основную роль в экспорте лекарственных веществ транспортерами MFS отводят системе сопряженного обмена с ионами Н<sup>+</sup> и/или Na<sup>+</sup>, при этом одновалентные катионные молекулы субстрата экспортируются из клетки в обмен на протоны [65-67]. Также имеются данные о значительном повышении уровня экспрессии мРНК помпы Rv1250 микобактерий на фоне противотуберкулезной терапии [68]. В последние годы появились публикации о том, что некоторые транспортеры данного семейства содержат эпитопы, однако, в отличие от белков семейства АВС, они взаимодействуют как с Т-, так и с В-лимфоцитами [69], что позволяет рассматривать их в качестве потенциальных антигенов для создания поливалентной вакшины.

**Resistance-nodulation-cell division (RND).** Геном *М. tuberculosis* содержит 14 генов, кодирующих MmpL (микобактериальный мембранный белок большой) и пять вспомогательных белков MmpS (микобактериальный мембранный белок малый) (табл. 1). ЭП MmpL отвечают за транспорт липидов, в основном миколовых кислот, необходимых

Семейство	Название гена	Номер Rv	Экспортируемый субстрат	Ссылка
	I		ATP-binding cassette	
Семейство АВС-типа, кодируемое одним геном	bacA	Rv1819c	RIF, INH, BL, CHL, TET, VAN, MAC, NOV, AGs, AP	[83-89]
	_	Rv0194	BL, CHL, STR, TET, VAN, MAC, NOV, EMB, EtBr	[83, 89, 90]
	pstB	Rv0933	FQS, INH, RIF, EMB	[84, 91–96]
	_	Rv 1473	MAC	[57, 84]
	_	Rv2477c	MAC, FQs	[84, 89, 97]
Семейство АВС-типа,	_	Rv1218c- Rv1217	BL, NOV, BP, PD, PR, BSP, PA, INH, RIF	[84, 98–100]
кодируемое двумя генами	_	Rv1668c- Rv1667c	MAC, Z	[101, 102]
	_	Rv1687c- Rv1686c	MAC	[14, 103]
Семейство АВС-типа, кодируемое тремя генами	_	Rv1458c- Rv1457- Rv1456c	RIF, INH, STR, EMB	[14, 103]
	_	Rv2688c- Rv2687c- Rv2686c	FQs	[83, 89, 104]
	drrA- drrB- drrC	Rv2936 Rv2937 Rv2938	TET, EMB, MAC, AGs, CHL, RIF EtBr, NOR, PUR, BCECF, DAU DOX	[83, 105–107]
	•		Major Facilitator Superfamily	
MFS	_	Rv0191	RIF	[84, 100, 108]
	emrB	Rv0783	Многие лекарственные препараты	[84, 88, 89, 96, 100, 109, 110]
	_	Rv0842	RIF	[82, 106]
	_	Rv0849	BL, INH, RIF	[82, 100, 111]
	_	Rv1250	INH	[82, 90, 106]
	_	Rv1258c	TET, FQs, RIF, CFZ, INH, EMB, ERY, EtBr, SPE, Z	[82, 86, 93, 100, 112–115]
	P55	Rv1410c	TET, AGs, RIF, INH, CFZ	[82, 86, 106, 110, 114, 116–119]
	_	Rv1634	INH, FQs, SKI	[82, 88, 106, 120]
	_	Rv1877	RIF, EtBr, ACR, ERY, KAN, TET	[82, 88, 121–123]
	Stp	Rv2333c	SPE, TET, RIF	[77, 82, 91]
	_	Rv2459	INH, EMB, RIF, EtBr	[82, 84, 88, 106, 114, 124–126]
	efpA	Rv2846c	INH, RIF, EtBr, ACR, ERY, FQs	[82, 84, 106, 114, 121, 125–128]
	_	Rv2994	STR, RIF	[82, 84, 122]
	_	Rv3728	RIF	[82, 84, 126]

Таблица 1. Наиболее значимые при формировании МЛУ трансмембранные белки *M. tuberculosis* 

Семейство	Название гена	Номер Rv	Экспортируемый субстрат	Ссылка
		Re	esistance-nodulation-cell division	
RND	mmpL3	Rv0206c	SQ109, BM212, AU, IA	[77, 82, 104, 129]
	mmpS4- mmpL4-	Rv0451c- Rv0450c	CMB, MB, RIF	[82, 130, 131]
	mmpS5- mmpL5	Rv0677c- Rv0676c-	AZ, BDQ, CFZ, TET	[78, 82, 124, 132]
	mmpL7	Rv2942	INH	[72, 80, 82, 114, 127, 133]
	mmpL8	Rv3823c	SQ109	[77, 82, 134]
	mmpL9	Rv2339	SQ109	[77, 82]
		Multidrug	and toxic compound extrusion (MATE)	
dinF	-	Rv2836c	AGs, Phleo, CRC	[42, 82]
		Sn	nall Multidrug Resistance (SMR)	
Mmr	_	Rv3065	ACR, EtBr, INH, MAC, FQs, TPP, PY	[38, 82, 100, 114, 127, 135]

## Таблица 1. Окончание

Примечание. ACR – акрифлавин, AGs – аминогликозиды, AP – антимикробные пептиды, AZ – азолы, BCECF – 2,7-бис-(2-карбоксиэтил)-5(6)-карбоксифлуоресцеин, BDQ – бедаквилин, BL – β-лактамы, BP – байрилпиперазин, BSP – бизанилинопиримидины, CFZ – клофазимин, CHL – хлорамфеникол, CMB – карбоксимикобактин, CPC – цетилпиридиниум хлорид, DAU – даунорубицин, DOX – доксорубицин, EMB – этамбутол, ERY – эритромицин, EtBr – этидиумбромид, FQs – фторхинолоны, IA – индоламины, INH – изониазид, KAN – канамицин, MAC – макролиды, MB – микобактин, NOR– норфлоксацин, NOV– новобицин, PA – пиразолоны, PD – пиридины, Phleo – флеомицин, PR – пирролы, PUR – пуромицин, PY – пиронин Y, RIF – рифампицин, SKI – имидазолин SKI-356313, SPE – спектиномицин, STR – стрептомицин, TET – тетрациклин, TPP – тетрафенилфосфоний, VAN – ванкомицин.

для построения уникальной клеточной стенки микобактерий и играющих ключевую роль в патогенезе туберкулеза, а также за транспорт гема [53, 70-74]. Экспрессия белков MmpL у M. tuberculosis контролируется сложной регуляторной сетью, которая включает регуляторы транскрипции TetR (Rv1816 и Rv3249c) и MarR (Rv0678) [53, 75, 76]. Из всех транспортеров семейства RND, описанных у *M. tuberculosis*, MmpL3 (Rv0206c) особенно важен с точки зрения выживания, поскольку именно он обеспечивает экспорт мономиколовых соединений [72]. Более того, MmpL3 рассматривается в качестве новой терапевтической мишени для таких антибактериальных препаратов как пиррольные производные BM212, SQ109, индолкарбоксамиды, тетрагидропиразоло-пиримидин-3-карбоксамид и адамантилмочевина [77]. Другими чрезвычайно важными для M. tuberculosis транспортерами лекарственных препаратов являются MmpS5-MmpL5, сверхэкспрессия которых ассоциирована с устойчивостью к азолам [78], бедаквилину и перекрестной устойчивостью к клофазимину [79], и MmpL7, отвечающий за экспорт изониазида [80]. Остальные трансмембранные белки данного класса участвуют в формировании вирулентности, обеспечении внутриклеточного выживания, а также вносят непосредственный

вклад в диалог между иммунной системой организма хозяина и микобактерией [62].

Семейство помп "Multidrug and toxic compound extrusion" (MATE). DinF (Rv2836c) является единственным транспортером семейства МАТЕ, представленном на мембране *M. tuberculosis* (табл. 1). Гомолог данной помпы присутствует у *M. smegmatis* (Mmp), но отсутствует в геноме *M. leprae* [81]. С суперэкспрессией гена Rv2836c связывают устойчивость *M. tuberculosis* к сульфамидным препаратам, аминогликозидам, флеомицину и цетилпиридин хлориду [81, 82].

Small Multidrug Resistance (small MDR, SMR). Геном *M. tuberculosis* содержит только один ген, кодирующий помпу семейства SMR – *mmr* (Rv3065). *Mmr* контролируется TetR-подобным репрессором транскрипции Rv3066 [83], расположенным сразу после гена *mmr*. Было доказано, что сверхэкспрессия *Mmr* снижает чувствительность *M. smegmatis* и *M. tuberculosis* к интеркалирующим красителям, соединениям четвертичного аммония и нескольким классам антибактериальных препаратов – изониазиду, макролидам, фторхинолонам, а также к этидию бромида (табл. 1) [84].

## МЕХАНИЗМЫ ИНГИБИРОВАНИЯ ЭФФЛЮКСНЫХ ПОМП

#### Общая информация

Поскольку экспорт антибиотиков из бактериальной клетки является основным механизмом, способствующим формированию лекарственной устойчивости патогенных микроорганизмов, ингибирование ЭП, ведущее к накоплению антибактериальных препаратов (АБП) внутри возбудителя, может стать важным потенцирующим компонентом антибактериальной терапии.

Механизмы ингибирования ЭП можно подразделить на две большие группы:

– непрямые механизмы ингибирования, влияющие на энергозависимые химические процессы, необходимые для экспорта веществ ЭП;

 – ингибирование путем прямого связывания с трансмембранными белками.

В первом случае ингибитор воздействует на энергозависимые процессы, обеспечивающие выброс веществ из бактериальной клетки (протонный градиент, гидролиз АТР). При этом прямого взаимодействия ингибитора с помпой нет. Поскольку для большинства помп экспорт веществ происходит за счет протонного градиента, этот механизм ингибирования считается универсальным.

Во втором случае ингибитор связывается с трансмембранными белками помпы, снижая их способность к взаимодействию с субстратом. Различают два вида связывания: конкурентное и неконкурентное [136].

#### Соединения, ингибирующие ЭП

Снижение активности или полное ингибирование трансмембранных транспортеров может быть достигнуто следующими способами:

• подавление экспрессии кодирующих генов;

 изменение строения антибиотика, приводящее к нарушению распознавания его как субстрата ЭП;

• ингибирование сборки трансмембранных пептидов в единую функционирующую систему;

 снижение активности насоса путем блокирования центра связывания;

• коллапс энергетического механизма, обеспечивающего работу помпы.

Реализация первых трех механизмов в настоящее время описана только в теории, нам не удалось найти практических подтверждений и примеров.

Поиск и изучение химических соединений, обладающих способностью ингибировать ЭП бактерий, начался еще 20 лет назад, когда был открыт пептидомиметик MC-207,110 (фенилаланил-аргинил-β-нафтиламид (РаβN)), потенцирующий эффекты левофлоксацина и эритромицина в отношении *P. aeruginosa*, сверхэкспрессирующих помпу MexAB-OprM19 [115]. Однако с тех пор ни один ИЭП так и не был внедрен в клиническую практику. Это обусловлено чрезвычайно высокими требованиями, предъявляемыми к ИЭП [7, 137]. Молекула не должна обладать антибактериальной активностью. Наличие данной активности в конечном итоге приведет к селекции мутантных штаммов, что серьезно снизит эффективность молекулы в качестве ИЭП. Соединение должно быть селективным и не взаимодействовать с какими-либо помпами клеток организмахозяина. Поскольку ЭП распространены повсеместно и их основные функциональные аспекты. как правило, одинаковы для всех форм жизни, избирательное подавление экспорта из бактериальной клетки является сложной задачей.

Одним из самых известных ИЭП, влияющих на энергетическое обеспечение процесса экспорта АБП, является карбонил цианид м-хлорфенилгидразон (СССР). Это ионофор, уменьшающий величину протон-движущей силы [138], что инактивирует не только ЭП, но и метаболические процессы клетки в целом. Есть данные о синергии СССР с тетрациклинами и карбапенемами [139, 140], однако высокая токсичность вещества ограничивает его использование только лабораторными экспериментами.

Другим, более перспективным в отношении клинического использования ИЭП, влияющим на мембранный потенциал бактериальной клетки, является синтетическая молекула IITR08027. Группой ученых из Индии было доказано его потенцирующее действие при использовании совместно с ципрофлоксацином [138]. Поскольку данная молекула не имеет собственной антибактериальной активности и проявляет низкую токсичность по отношению к клеткам животных, исследователи считают IITR08027 перспективным для клинического использования.

Альтернативный механизм потенцирования действия АБП реализован через прямое связывание ингибитора с трансмембранными белками помпы, что приводит к снижению их способности взаимодействовать с субстратом. Однако в бактериальной популяции довольно быстро появляются мутантные штаммы с модифицированными сайтами связывания, что делает использование ИЭП малоэффективным.

К ИЭП, реализующим свою активность через связывание с помпой, относится уже упомянутое выше соединение РАβN (MC-207,110) — синтетический ИЭП, инактивирующий помпы семейства RND. Показано, что данная молекула способна потенцировать эффект левофлоксацина, эритромицина и хлорамфеникола и в меньшей степени тетрациклина и карбенициллина [137].

Верапамил - небольшая синтетическая молекула, блокатор кальциевых каналов, широко применяемый в кардиологии, одновременно является одним из самых изученных ИЭП. Механизм действия верапамила реализован через его конкурентное связывание с активным сайтом трансмембранных белков семейства МАТЕ, что приводит к ингибированию экспорта ряда противотуберкулезных препаратов у *M. tuberculosis* [141, 142]. Было установлено, что верапамил по-разному взаимодействует с двумя типами транспортеров семейства MATE, DinF и NorM, однако общий эффект ингибирования активности помпы одинаковый [143]. Более подробно о данном ИЭП будет написано далее в разделе, посвященном M. tuberculosis.

Другое соединение данной подгруппы ИЭП – 1-(1-нафтилметил)-пиперазин (NMP). Этот ингибитор потенцирует действие оксациллина, рифампицина, хлорамфеникола и кларитромицина и, в меньшей степени, фторхинолонов, азитромицина, клиндамицина, нитрофуранов и доксициклина [144]. NMP вызывает конформационные изменения в транспортере АсгВ, что ведет к неконкурентному ингибированию связывания [145]. Однако данная молекула также обладает собственной антибактериальной активностью в концентрации, в четыре раза превышающей ту, которая используется в качестве ИЭП, что позволяет предположить существование вторичной мишени.

Известно множество соединений, обладающих способностью ингибировать трансмембранные помпы, однако механизм действия большинства из них неизвестен, и их трудно отнести к тому или иному классу. Вследствие этого в литературе чаще можно встретить классификацию, базирующуюся на происхождении соединений: растительное, синтетическое и бактериальное.

**ИЭП растительного происхождения.** Химические соединения растительного происхождения включают широкий спектр адъювантов, повышающих эффективность антибактериальных препаратов в несколько раз [146]. Основные подклассы растительных ИЭП представлены ниже.

Алкалоиды. Резерпин, соединение, извлекаемое из корней *Rauwolfia serpentina*, ингибирующее ЭП суперсемейства MFS и RND [147]. Резерпин усиливает антимикробную активность антибиотиков за счет непосредственного взаимодействия с аминокислотными остатками белка-переносчика Bmr, который опосредует экспорт тетрациклина. Кроме того, было доказано, что резерпин полностью нивелирует NorA-опосредованную устойчивость *S. aureus* к норфлоксацину [147] и повышает чувствительность к тетрациклину [148]. Исследование Viveiros и соавторов показало, что резерпин повышает чувствительность *M. tuberculosis* к изониазиду в 100 раз, что свидетельствует о наличии у микобактерии системы (систем) эффлюкса, чувствительной к резерпину [149]. Однако в клинической практике резерпин пока не нашел применения в качестве ИЭП в связи с нежелательными нефротоксическими эффектами [150].

Пиперин, соединение, получаемое из Piper nigrum — алкалоид, ингибирующий человеческий Р-гликопротеин трансмембранных белков суперсемейства АВС через цитохром Р450-опосредованный путь. В литературе описана способность пиперина и его производного, пиперидина, ингибировать ЭП ряда патогенных микроорганизмов, включая S. aureus и Mycobacteria spp. [151]. Исследование, проведенное на S. aureus, показало, что пиперин усиливает накопление нипрофлоксанина, ингибируя NorA-опосредованный экспорт. Также сообщалось, что у *M. tuberculosis* H37Rv и некоторых клинических изолятов пиперин усиливает активность рифампицина, ингибируя транспортер Rv1258c (суперсемейство MFS) [152]. Другой потенциально полезный эффект использования пиперина связан с тем, что он способствует пролиферации Т- и В-клеток, усиливая Th1-ответ и повышая активность макрофагов. Также пиперин индуцирует дифференцировку Т-клеток CD4/CD8, повышает секрецию интерферонагамма и интерлейкина-2 у мышей, инфицированных МБТ. Это позволяет предположить, что пиперин может повышать эффективность противотуберкулезной терапии как за счет ингибирования ЭП МБТ, так и за счет иммуномодулирующего эффекта [153].

**Флавоноиды.** Байкалеин, выделенный из листьев тимьяна (*Thymus vulgaris*) 5,6,7-тригидрофлавон, обладающий слабой антибактериальной активностью, повышает чувствительность метицилин-резистентных штаммов *S. aureus* к ципрофлоксацину и  $\beta$ -лактамным антибиотикам, включая оксациллин, цефметазол тетрациклина и ампициллин [154, 155].

Имеются данные о том, что 5'-метоксигиднокарпин, флаволигнан, получаемый из Berberis fremontii, а также ряд изофлавонов, выделяемых из Lupinus argenteus, повышают эффективность норфлоксацина и берберина, путем ингибирования протонной помпы NorA у S. aureus и M. smegmatis. Однако вследствие токсичности данных соединений, перспективы их клинического применения весьма сомнительны [156, 157].

Полифенолы. Способность ингибировать ЭП была описана для группы фенольных метаболитов — катехин галлатов. Имеются данные о том, что эти полифенолы являются слабыми ингибиторами NorA-опосредованного экспорта. Интересно, что эти соединения обладают различными эффектами в зависимости от их концентрации. В низких концентрациях они усиливают экспорт субстратов, а в высокой – ингибируют [158]. В связи с этим было высказано предположение, что молекулы ИЭП имеют два разных сайта связывания с разной степенью сродства. При низких концентрациях катехины занимают сайты связывания с высокой аффинностью, что приводит к увеличению экспорта субстрата. Ингибирующая активность катехинов наблюдается только при высоких концентрациях. Также было доказано, что эпигаллокатехина галлат повышает эффективность тетрациклина, эритромицина и ципрофлоксацина в отношении грамположительных стафилококков, сверхэкспрессирующих TetK, и грамотрицательных Campylobacter spp. Однако изза токсичности этих соединений дальнейшие исследования in vivo и доклинические испытания не проводились [159].

Фенольные дитерпены. Представителями данного класса соединений являются карнозная кислота и карнозол, выделенные из розмарина (*Rosmarinus officinalis*). Они повышают эффективность тетрациклина и эритромицина в отношении макролид-резистентного штамма *S. aureus*, сверхэкспрессирующего транспортеры суперсемейства ABC (MsrA) и эффлюксные помпы TetK [160]. Также есть данные о том, что гераниол (монотерпеноидный спирт), выделенный из *Helichrysum italicum*, модулирует лекарственную устойчивость у нескольких видов грамотрицательных бактерий путем ингибирования трансмембранной помпы AcrAB-TolC [161].

#### Основные подклассы ИЭП синтетического происхождения

Пептидомиметики. Дипептид-амидное соединение PAβN, уже упомянутое выше, было одним из первых синтетических ИЭП. В ряде исследований было показано, что данное соединение усиливает активность многих антибиотиков, включая фторхинолоны, макролиды и хлорамфеникол, в отношении грамотрицательных бактерий за счет ингибирования RND-опосредованного экспорта [137, 162]. В связи с высокой токсичностью соединения, клинического применения данная молекула не нашла, и был предпринят ряд попыток синтезировать менее токсичное, более стабильное производное; однако ни один из активных аналогов не смог значительно улучшить характеристики исходной молекулы. Таким образом, PABN и его производные в настоящее время используются только в лабораторных условиях [163].

**Производные хинолина.** Производные хинолина, такие как пиридохинолоны, могут восстанавливать активность норфлоксацина в отношении штаммов *E. aerogenes*, сверхэкспрессирующих

БИОЛОГИЧЕСКИЕ МЕМБРАНЫ том 38 № 5 2021

трансмембранные белки AcrAB-TolC посредством конкурентного связывания с активным центром помпы семейства RND [164]. Сообщалось, что некоторые другие синтетические аналоги, такие как 4-замещенный тиоалкил-, алкиламино- и алкокси-хинолон, усиливают активность тетрациклинов, норфлоксацина и хлорамфеникола в клинических изолятах *К. pneumoniae* и *E. aerogenes* [165]. Ряд производных, синтезированных путем модификации флавонового каркаса, являются мощными ингибиторами NorA-зависимого экспорта у *S. aureus* [166].

Арилпиперидины и производные арилпиперазина. Арилпиперидин и его производные, восстанавливают чувствительность к линезолиду и увеличивают его внутриклеточную концентрацию у *E. coli* [167]. Другие аналоги – фенилпиперидины, являющиеся селективными ингибиторами обратного захвата серотонина, подавляют экспорт лекарственных веществ у штаммов *S. aureus* и частично ингибируют активность транспортеров AcrAB-TolC y *E. coli* [168].

Одно из наиболее известных соединений данной группы, NMP, восстанавливает чувствительность штаммов *E. coli*, сверхэкспрессирующей AcrAB и AcrEF, к левофлоксацину и этидию бромида за счет ингибирования RND-опосредованного экспорта. Однако вследствие способности арилпиперазинов ингибировать обратный захват серотонина, данные соединения могут быть токсичными для клеток млекопитающих [144].

Производные пиридопиримидина и пиранопиридина. Соединения D2 и D13-9001, являющиеся специфическими ингибиторами эффлюксной помпы MexAB штаммов *P. aeruginosa*, проявляют свою активность как в условиях *in vitro*, так и *in vivo* [163, 169]. Другое соединение — MBX2319, синтетический пиразолопиридин, потенцирует активность ципрофлоксацина, левофлоксацина и пиперациллина до восьми раз на штаммах *E. coli* AB115729. Кроме того, MBX2319 также приводил к увеличению внутриклеточного накопления красителя Hoechst в *E. coli* как дикого типа, так и со сверхэкспрессией AcrAB-TolC [145].

В литературе описано множество синтетических и полусинтетических соединений, обладающих способностью ингибировать эффлюксные помпы. Sharma и соавторы в своей обзорной статье [7] отмечают, что таких соединений известно более сотни.

**ИЭП бактериального происхождения.** Хотя данный подкласс соединений довольно небольшой, однако мы считаем, что необходимо о нем упомянуть в связи с перспективностью его изучения. В настоящее время имеются данные о нескольких соединениях, бактериального происхождения, обладающих свойствами ИЭП: соединения EA-371α и EA-371d, полученные путем

ферментации экстракта культуры *Streptomyces* spp., являются специфическими ингибиторами Mex-AB-OprM-опосредованного эффлюкса у *P. Aeruginosa*, грибковые метаболиты энниатины и боверицины ингибируют транспортеры семейства ABC, мильбемицины были повторно открыты как мощные ингибиторы CDRI-помпы *C. Albicans*, потенцируя, таким образом, действие флуконазола [170]. Структурно новые молекулы открывают возможности синтезировать более эффективные, биодоступные и менее токсичные производные.

#### ИЭП для M. tuberculosis

Для *М. tuberculosis* описаны ИЭП, реализующие свою работу через оба основных механизма ингибирования: путем воздействия на энергообеспечение работы помпы и путем прямого связывания с трансмембранными пептидами. При этом помпы суперсемейства ABC ингибируются преимущественно путем воздействия на энергозависимые процессы, а помпы семейств MFS, MATE и RND путем связывания с субстратом. Известны ИЭП МБТ как синтетического, так и растительного происхождения. Все основные соединения, обладающие способностью ингибировать трансмембранные помпы МБТ, их мишени и основные эффекты представлены в таблице 2.

Верапамил является наиболее изученным ИЭП МБТ. Эксперименты с клиническими штаммами, устойчивыми к изониазиду и рифампицину показали, что комбинированное использование данных противотуберкулезных препаратов (ПТП) с верапамилом приводит к снижению минимальной ингибирующей концентрации (МИК) обоих препаратов, что ведет к реверсии лекарственной устойчивости возбудителя [106, 114, 171, 172].

Аналогичным образом показано, что при совместном применении верапамил снижает МИК левофлоксацина (в 2–8 раз), бедаквилина (в 8– 16 раз), моксифлоксацина и клофаземина в клинических изолятах МБТ, устойчивых к данным препаратам, тогда как в чувствительных культурах никакого эффекта не наблюдается [79, 141, 142, 173]. Также показано, что верапамил способствует накоплению ПТП внутри МБТ и по своему эффекту он превосходит такие более токсичные соединения как СССР, резерпин и хлорпромазин [174].

Кроме того, исследования на животных моделях показали, что верапамил ускоряет элиминацию МБТ из инфицированных макрофагов, ингибирует рост и резистентность внутриклеточно расположенных МБТ, позволяет снизить дозировку препарата и сократить продолжительность химиотерапии [171, 173, 175]. Так же использование верапамила в комбинированной химиотерапии было ассоциировано со снижением частоты рецидивов [175]. Полученные данные позволяют предположить, что верапамил может стать эффективным дополнением противотуберкулезной терапии.

Ионофоры представляют собой жирорастворимые комплексы, осуществляющие транспорт ионов через клеточную мембрану [176] путем активного переноса или посредством формирования канала. Поскольку трансмембранные градиенты концентраций ионов необходимы для поддержания мембранного потенциала, ионофоры играют важную физиологическую роль [177]. К числу ионофоров, обладающих потенциальной противотуберкулезной активностью, относятся СССР, 2,4-динитрофенол (DNP) и валиномицин.

Изучение активности СССР в качестве ИЭП МБТ начались еще 20 лет назад, Silva и соавторы стали первыми, кто описал эффективность СССР в комбинациях со стрептомицином и тетрациклином за счет ингибирования MFS-опосредованного экспорта [117]. Позднее ряд исследователей доказали его эффективность с точки зрения преодоления лекарственной устойчивости к изониазиду, рифампицину, этамбутолу, офлоксацину и клофазимину на различных штаммах микобактерий [106, 112, 125, 142, 178]. Кроме того, было доказано, что СССР ингибирует не только MFS-опосредованный экспорт, но и блокирует работу помп семейств ABC и RND [78, 105, 174]. DNP, как и СССР, активен в отношении эффлюксных помп семейств MFS и ABC и снижает МИК хинолоновых препаратов для резистентных клинических изолятов МБТ [142]. Несмотря на высокую активность данных соединений в качестве ИЭП, клиническое использование их не представляется возможным в связи с токсичностью в отношении клеток животных.

Валиномицин является высокоселективным переносчиком калия [179, 180]. Различными авторами было доказано, что он активен в отношении эффлюксной помпы P55, что ведет к внутриклеточному накоплению изониазида и пиразинамида [133, 181], а также повышает чувствительность МБТ к рифампицину и новобиоцину [118, 179].

Производные фенотиазина давно используются в психиатрической практике, однако с точки зрения антибактериальной активности в отношении МБТ хорошо изучены только два препарата хлорпромазин и тиоридазин. Впервые ингибирующее действие хлорпромазина на МБТ было описано Crowle и соавторами еще в 1992 году. Было показано, что ингибирующая активность хлорпромазина в отношении МБТ, расположенных внутри макрофагов выше, чем в отношении внеклеточных бактерий [182]. Это наблюдение было подтверждено другими исследователями, описавшими схожую активность тиоридазина [183]. При

	Ингибиторы ЭП	Ингибируемые ЭП	Основной эффект	Ссылка
		Ингибиторы синтетического пр	оисхождения	
Bepa	памил верапамил	<ul> <li>ABC: DrrAB, PstB</li> <li>Rv2686c-2687c-2688c</li> <li>MFS: lfrA, Rv1634, Rv1258c,</li> <li>Rv1877, Rv2846c</li> <li>RND: Rv1145, Rv1146,</li> <li>Rv0678</li> <li>SMR: Rv3065 (mmr)</li> </ul>	<ul> <li>Снижает МИК ПТП</li> <li>Снижает необходимую дозу ПТП</li> <li>Синергический эффект с ПТП</li> <li>Способствует накоплению ПТП в МБТ</li> <li>Способствует элиминации МБТ из макрофагов</li> <li>Подавляет рост и устойчивость МБТ</li> <li>Сокращает продолжительность терапии</li> </ul>	[79, 106, 114, 141, 142, 171–175, 200, 201]
Ионофоры	Карбонил-цианид- <i>м</i> -хлор- фенилгидразон (СССР)	<ul> <li>ABC: Rv2936-Rv2937</li> <li>(DrrAB), Rv0933 (PstB), Rv2686c-2687c-2688c</li> <li>MFS: lfrA, Rv2459 (jefA), Rv1410c(P55), Rv1634, Rv1258c, Rv1410c, Rv1877, Rv2846c</li> <li>RND: Rv1145, Rv1146, Rv0676c- Rv0677c(MmpS5-MmpL5)</li> <li>SMR: Rv3065(mmr)</li> </ul>	<ul> <li>Снижает МИК ПТП</li> <li>Уменьшает дозировку АБП</li> <li>Синергический</li> <li>эффект с ПТП</li> </ul>	[78, 84, 105, 106, 112, 117, 118, 142, 174, 177]
И	Валиномицин	MFS: Rv1410c (P55)	<ul> <li>Способствует накоплению ПТП в МБТ</li> <li>Повышает чувствительность МБТ к ПТП</li> </ul>	[118, 133, 179–181]
	2,4-динитрофенол (DNP)	ABC: Rv2936-Rv2937 (DrrAB), Rv2686c-2687c-2688c, Rv0933(PstB) MFS: lfrA, Rv1634, Rv1258c	– Снижает МИК ПТП	[117, 118, 142]
Фенотиазины	Хлорпромазин	<b>RND:</b> Rv1145, Rv1146 <b>MFS:</b> Rv1877, Rv2846c <b>SMR:</b> Rv3065 (mmr) <b>RND:</b> Rv3160c-Rv3161c	<ul> <li>Бактерицидная активность в отношении лекарственно чувствительных/ устойчивых МБТ</li> <li>Синергический эффект с ПТП</li> <li>Повышает чувствительность МБТ к ПТП</li> </ul>	[114, 182–188, 202]
	поридазин	<b>KIND. NV5100C-NV5101C</b>	- проявляет оактерицидную активность в отношении лекарственно-чувствительных/ устойчивых МБТ	182–188, 202]

Таблица 2. Ингибиторы эффлюксных помп M. tuberculosis

Ингибиторы ЭП	Ингибируемые ЭП	Основной эффект	Ссылка
Капурамицин и его аналоги	Транслоказа I (фосфор- N-ацетилмурамил- пентапептид-транслоказа)	<ul> <li>Бактерицидная активность в отношении МЛУ и не МЛУ штаммов МБТ</li> <li>Снижает бактериальную нагрузку</li> <li>Синергический эффект с ПТП</li> </ul>	[190—195, 203]
Genz-10850 (GEQ-соединение)	<b>RND:</b> Rv2942 (MmpL7)	Ингибирует рост МБТ	[196]
Рhe-Arg-β- нафтиламид	CmlA (cmlR1) FloR (cmlR2)	<ul> <li>– Снижает МИК ПТП</li> <li>– Ингибирует резистентность штаммов МБТ к ПТП</li> </ul>	[198, 199]
MC-207110 MC-02595 MC-04124 BU-005	RND-тип левофлоксацин- специфические эффлюксные помпы		
Спектинамиды	<b>MFS:</b> Rv1258c	<ul> <li>Синергический</li> <li>эффект с ПТП</li> <li>Снижает</li> <li>бактериальную нагрузку</li> <li>Бактерицидное действие</li> <li>на МБТ при острой</li> <li>туберкулезной инфекции</li> </ul>	[197, 200]
SILA-421	mdr-1	<ul> <li>Синергический</li> <li>эффект с ПТП</li> <li>Стимулирует бактерицидную активность макрофагов</li> <li>в отношении МБТ</li> <li>Подавляет резистентность МБТ к ПТП</li> </ul>	[189–191]
Тимкодар	ABC: DrrAB, PstB Rv2686c-2687c-2688c MFS: lfrA, Rv1634, Rv1258c Р-гликопротеин и/или МЛУ- ассоциированный белок	<ul> <li>Синергический</li> <li>эффект с ПТП</li> <li>Подавляет рост МБТ</li> <li>Снижает</li> <li>бактериальную нагрузку</li> </ul>	[142, 204]
	Ингибиторы растительного пр	оисхождения	
Резерпин	ABC: Rv2936-Rv2937- Rv2938 (DrrABC) Rv0933 (PstB) Rv2686c-Rv2687c-Rv2688c RND: Rv0678, Rv1145, Rv1146 Rv2942 (mmpL7) MFS: Rv1410c(P55), Rv1877 Rv2846c SMR: Rv3065 (mmr)	<ul> <li>Снижает МИК ПТП</li> <li>Снижает/устраняет устойчивость МБТ к ПТП</li> <li>Повышает концентрацию ПТП в МБТ</li> </ul>	[79, 80, 146, 148, 149, 174, 189–191, 195, 204, 205]

Таблица 2. Продолжение

Ингибиторы ЭП	Ингибируемые ЭП	Основной эффект	Ссылка
Пиперин	<b>MFS:</b> Rv1258c	– Снижает МИК ПТП	[152, 173,
		– Снижает	205-207]
		бактериальную нагрузку	
		– Стимулирует	
		клеточный иммунитет	
Берберин	NorA, RamR	– Ингибирует резистентность	[156, 208,
		МЛУ штаммов МБТ	209]
Кверцетин	<b>SMR:</b> Rv3065(mmr),	– Подавляет рост МБТ	[208,
	изоцитратлиаза		210-212]
Тетрандрин	MFS: Rv2459(jefA), Rv3728	– Синергический	[213, 214]
	<b>SMR:</b> Rv3065 (mmr)	эффект с ПТП	
		– Снижает МИК ПТП	
Фарнезол	Не определены	<ul> <li>Синергический</li> </ul>	[215]
		эффект с ПТП	
		– Повышает накопление ПТП	
		внутри бактериальной клетки	
Фенилпропаноиды	<b>RND:</b> Rv1145, Rv1146	– Снижает МИК ПТП	[174,
		– Повышает накопление ПТП	216-218]
	MFS: Rv1877, Rv2846c	внутри бактериальной клетки	
	<b>SMR:</b> Rv3065 (mmr)		
Compound 1	MurE-лигаза, NorA	– Подавляет рост МБТ	[219]

Таблица 2. Окончание

этом эффективность оценивалась при концентрации препаратов более чем 1 мг/л, что не может быть достигнуто в клинической практике, однако, было доказано, что фенотиазины способны накапливаться в макрофагах, что позволяет получить необходимую концентрацию без каких-либо токсических эффектов на клеточные процессы *in vitro* [184, 185]. Дальнейшие исследования показали, что хлорпромазин также является синергистом многих противотуберкулезных препаратов, включая изониазид, рифампицин, рифабутин, стрептомицин, пиразинамид и потенцирует эффект этих препаратов в отношении расположенных внутриклеточно МБТ даже при наличии МЛУ [114, 183, 186]. Таким образом, фенотиазины (хлорпромазин и тиоридазин) имеют значительный потенциал для использования в комбинированной химиотерапии туберкулеза. В то же время их антипсихотические побочные эффекты и возможность сочетания с противотуберкулезными препаратами требуют дополнительных исследований [187, 188].

Запатентованный более 10 лет назад дисилоксан SILA-421 инициирует трансформацию макрофагов, инфицированных штаммом МБТ H37Rv с МЛУ, с появлением бактерицидной активности последних [189]. Эксперименты *in vitro* продемонстрировали, что данное соединение обладает собственной антимикробной активностью, зависящей от концентрации и времени воздействия, а механизм действия SILA-421 сходен с действием тиоридазина. Было доказано, что SILA-421 усиливает бактерицидную активность макрофагов в отношении МБТ, ингибируя Mdr-1-опосредованный экспорт, а также является синергистом изониазида и рифампицина, подавляя развитие устойчивости МБТ [190, 191].

Остальные ИЭП синтетического происхождения, представленные в таблице 2, в настоящее время активно изучаются, каждый из них обладает потенциалом в отношении МБТ, однако доказательная база и знания о механизмах их действия пока недостаточны, чтобы перейти к клиническим экспериментам [192–200].

**ИЭП растительного происхождения**, эффективные в отношении МБТ, представлены весьма широким спектром соединений. Резерпин и пиперин уже были описаны выше, и мы не станем на них останавливаться. Прямых доказательств активности берберина в отношении МБТ в современной литературе найти не удалось, однако с высокой долей вероятности можно предполагать ее наличие, поскольку доказано, что берберин ингибирует NorA- и RamR-опосредованный экспорт у МЛУ штаммов *S. aureus*. Аналогичные ЭП присутствуют на мембране МБТ, что позволяет считать берберин перспективным соединением, требующим дальнейшего изучения [156, 208, 209].

Кверцетин относится к флавоноидам и присутствует во многих овощах, фруктах и листьях, используется в качестве биологически активной добавки, обладающей антиоксидантными свойствами. Последние исследования показали, что кверцетин способен связываться с ЭП микобактерий (Mmr) и *E. coli* (EmrE), и молекулярное взаимодействие между ним и трансмембранными белками оказалось более стабильным, чем с верапамилом, резерпином и хлорпромазином [210]. Другими авторами было доказано, что кверцетин блокирует глиоксилатный шунт МБТ H37Rv путем ингибирования изоцитратлиазы [211, 212].

Ряд других растительных ИЭП, таких как тетрандрин, фарнезол и фенилпропаноиды представлены в таблице 2 [213–219].

## РЕЗУЛЬТАТЫ ЭКСПЕРИМЕНТОВ С ИЭП *IN VIVO*

Имеющиеся данные об активности всех вышеперечисленных соединений в качестве ИЭП в основном базируются на результатах экспериментов in vitro, в то время как данные об эффективности ИЭП *in vivo* немногочисленны. Зачастую авторам не удается зарегистрировать повышения эффективности противотуберкулезных препаратов при добавлении в схему лечения ИЭП на экспериментальных моделях у животных. Так авторы. изучавшие активность соединения SILA-421 в качестве компонента комплексной терапии, включающей изониазид, рифампицин и пиразинамид, констатировали отсутствие повышения терапевтической эффективности химиотерапии при моделировании туберкулезного процесса у мышей [190]. Группа исследователей, изучающих потенциал использования спектинамидов в комплексной противотуберкулезной терапии смогла доказать эффективность одного из представителей данного класса (соединение 1599) при моделировании острой туберкулезной инфекции у мышей. В то же время, в модели с хронической туберкулезной инфекцией повышение бактерицидной активности противотуберкулезных препаратов зарегистрировано не было [200].

Тем не менее, группа ученых из Китая и США в совместном исследовании показала, что верапамил повышает биодоступность бедаквилина и его антибактериальную активность в отношении M. tuberculosis в экспериментальной модели туберкулеза у мышей. Однако сами авторы отмечают, что достигнутый эффект вероятнее всего был связан именно с повышением биодостопности бедаквилина после перорального приема, а не с его воздействием на бактериальные ЭП [220]. Группа других исследователей смогла доказать потенцирование бактерицидной активности бедаквилина в сочетании с верапамилом в эксперименте на мышах, они также установили, что комбинированная терапия ассоциирована с меньшим числом лекарственно-устойчивых штаммов и более ранней бактерицидной активностью бедаквилина [221].

## ПЕРСПЕКТИВЫ И ПРЕПЯТСТВИЯ КЛИНИЧЕСКОГО ИСПОЛЬЗОВАНИЯ ИЭП

В эпоху стремительного распространения множественной лекарственной устойчивости *M. tuberculosis* фармацевтическая индустрия катастрофически не успевает восполнять растущую потребность в новых противотуберкулезных препаратах. В тот же день, когда вновь созданное соединение появляется на рынке, начинается селекция лекарственно-устойчивых штаммов, и эту гонку человечеству никогда не выиграть. Использование ИЭП дает шанс использовать давно известные АБП, восстанавливая восприимчивость патогенов к ним [222]. Эта стратегия позволит экономить время, усилия и финансы, а клиницистам – использовать уже хорошо изученные АБП.

Одним из преимуществ ИЭП является чрезвычайно низкая частота генерации устойчивых штаммов. Таким образом, комбинация антибиотика и ИЭП эффективна не только для борьбы с уже устойчивыми бактериями, но также предотвращает дальнейшее развитие резистентности.

Однако необходимо отметить и препятствия, связанные с внедрением ИЭП в широкую клиническую практику, как научные, так административные и экономические.

Соединения растительного происхождения имеют сложную и громоздкую структуру, что затрудняет их синтез и масштабное производство, а синтетические молекулы зачастую характеризуются токсичностью, плохой растворимостью или низким уровнем проникновения в клетки. Терапия с использованием ИЭП является комбинированной, что ставит еще один вопрос о совместимости ИЭП и партнера-антибиотика. Для успешной терапевтической комбинации необходимо одновременное достижение высоких концентраций обоих препаратов в тканях органов-мишеней, но при этом не должно происходить потенцирования токсических эффектов [223]. Одним из примеров является совместное использования верапамила и кларитромицина, ведущее к развитию почечной недостаточности, гипотонии и возможному летальному исходу в связи с тем, что мишенью кларитромицина является цитохром, который отвечает за метаболизм верапамила. Совместное использование обоих препаратов может привести к накоплению верапамила в чрезвычайно токсичных концентрациях [224]. Другим примером может быть возможное потенцирование кардиотоксических эффектов при совместном использовании верапамила и бедаквилина, поскольку оба эти соединения ведут к удлинению интервала QT.

Однако основная проблема самих ИЭП, как терапевтических агентов, заключается в их мишенях. ЭП являются олним из механизмов формирования лекарственной устойчивости, но далеко не всегда это единственный механизм. Помимо эффлюкс-опосредованной резистентности существует ряд других путей, реализуемых, например, посредством возникновения точечных мутаций или формирования обходного метаболического пути [225]. Также необходимо учитывать тот факт, что потенцирование эффекта одного АБП в присутствии ИЭП не означает, что такой же эффект будет достигнут и для других АБП, даже если они экспортируются той же самой ЭП, они могут иметь разные сайты связывания [137]. Это значительно сужает спектр применения ИЭП. делая его специфичным для ограниченного числа соединений. При этом комбинированная терапия АБП + ИЭП становится индивидуализированной, что ставит под сомнение ее эффективность на популяционном уровне.

Другой проблемой, стоящей на пути широкого внедрения ИЭП в клиническую практику, является отсутствие достаточного количества доклинических и клинических данных, формирующих доказательную базу. Доступных в настоящее время публикаций об использовании ИЭП на моделях у животных очень мало, а данных об использовании у пациентов практически нет. Необходима огромная дополнительная работа, которая позволит вывести исследования ИЭП на новую ступень.

Хотя использование ИЭП в качестве терапевтических средств сопряжено с множеством сложных, в настоящее время не решенных вопросов, это никоим образом не должно влиять на понимание важности тех преимуществ, которые они имеют.

Конфликт интересов. Авторы декларируют отсутствие явных и потенциальных конфликтов интересов, связанных с публикацией настоящей статьи.

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

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- 1. Marquez B. 2005. Bacterial efflux systems and efflux pumps inhibitors. *Biochimie*. **87**, 1137–1147.
- Blair J.M., Webber M.A., Baylay A.J., Ogbolu D.O., Piddock L.J. 2015. Molecular mechanisms of antibiotic resistance. *Nat. Rev. Microbiol.* 13 (1), 42–51.
- 3. Blair J.M., Richmond G.E., Piddock L.J. 2014. Multidrug efflux pumps in Gram-negative bacteria and their role in antibiotic resistance. *Future Microbiol.* **9** (10), 1165–1177.

- Biswas S., Raoult D., Rolain J.-M. 2008. A bioinformatic approach to understanding antibiotic resistance in intracellular bacteria through whole genome analysis. Int. J. Antimicrob. Agents. 32, 207–220.
- 5. Li X.Z., Nikaido H. 2009. Efflux mediated resistance in bacteria. *Drugs.* **69** (12), 1555–1623.
- 6. Schindler B.D., Kaatz G.W. 2016. Multidrug efflux pumps of Gram-positive bacteria. *Drug. Resist. Updat.* 27, 1–13.
- 7. Sharma A., Gupta V.K., Pathania R. 2019. Efflux pump inhibitors for bacterial pathogens: From bench to bedside. *Indian J. Med. Res.* **149** (2), 129–145.
- 8. Сидоренко С.В., Тишков В.И. 2004. Молекулярные основы резистентности к антибиотикам. *Усп. биол. химии.* **44**, 263–306.
- Yamaguchi A., Nakashima R., Sakurai K. 2015. Structural basis of RND-type multidrug exporters. *Front. Microbiol.* 6, 1–19.
- Venter H., Shilling R.A., Velamakanni S., Balakrishnan L., Van Veen H.W. 2003. An ABC transporter with a secondary-active multidrug translocator domain. *Nature*. 426 (6968), 866-870.
- Chen C.J., Chin J.E., Ueda K., Clark D.P., Pastan I., Gottesman M.M., Roninson I.B. 1986. Internal duplication and homology with bacterial transport proteins in the mdr1 (P-glycoprotein) gene from multidrugresistant human cells. *Cell.* 47 (3), 381–389.
- Gerlach J.H., Kartner N., Bell D.R., Ling V. 1986. Multidrug resistance. *Cancer. Surv.* 5 (1), 25–46.
- Lubelski J., Konings W.N., Driessen A.J. 2007. Distribution and physiology of ABC-type transporters contributing to multidrug resistance in bacteria. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 71 (3), 463–476.
- Braibant M., Gilot P., Content J. 2000. The ATP binding cassette (ABC) transport systems of *Mycobacterium tuberculosis. FEMS Microbiol. Rev.* 24 (4), 449–467.
- 15. Davidson A.L., Chen J. 2004. ATP-binding cassette transporters in bacteria. *Annu. Rev. Biochem.* **73**, 241–268.
- Bloise E., Ortiga-Carvalho T.M., Reis F.M., Lye S.J., Gibb W., Matthews S.G. 2016. ATP-binding cassette transporters in reproduction: A new frontier. *Hum. Reprod. Update.* 22 (2), 164–181.
- Rees D.C., Johnson E., Lewinson O. 2009. ABC transporters: The power to change. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 10 (3), 218–227.
- Zhihong X., Aiping Z., Yufeng Y. 2014. ATP-binding cassette transporters and transmembrane transport in *Mycobacterium tuberculosis* – a review. *Wei. Sheng. Wu. Xue. Bao.* 54 (6), 608–615. https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25272808/
- Reddy V.S., Shlykov M.A., Castillo R., Sun E.I., Saier Jr.M.H. 2012. The major facilitator superfamily (MFS) revisited. *FEBS J.* 279 (11), 2022–2035.
- Law C.J., Maloney P.C., Wang D.N. 2008. Ins and outs of major facilitator superfamily antiporters. *Annu. Rev. Microbiol.* 62, 289–305.
- Saier M.H. Jr., Beatty J.T., Goffeau A., Harley K.T., Heijne W.H., Huang S.C., Jack D.L., Jahn P.S., Lew K., Liu J., Pao S.S., Paulsen I.T., Tseng T.T., Virk P.S. 1999. The major facilitator superfamily. *J. Mol. Microbiol. Biotechnol.* 1, 257–279.
- 22. Brown S., Chang J.L., Sadee W., Babbitt P.C. 2003. A semiautomated approach to gene discovery through

expressed sequence tag data mining: discovery of new human transporter genes. J. AAPS Pharm. Sci. 5, 1–18.

- Abramson J., Smirnova I., Kasho V., Verner G., Kaback H.R., Iwata S. 2003. Structure and mechanism of the lactose permease of *Escherichia coli. Science.* 301 (5633), 610–615.
- Kumar H., Kasho V., Smirnova I., Finer-Moore J.S., Kaback R.H., Stroud R.M. 2014. Structure of sugarbound Lac Y. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 111 (5), 1784–1788.
- 25. Wisedchaisri G., Park M.S., Iadanza M., Zheng H., Gonen T. 2014. Proton-coupled sugar transport in the prototypical major facilitator superfamily protein XylE. *Nat. Commun.* **5** (1), 1–11.
- 26. Sun J., Bankston J.R., Payandeh J., Hinds T.R., Zagotta W.N., Zheng N. 2014. Crystal structure of the plant dual-affinity nitrate transporter NRT1.1. *J. Nature.* **507**, 73–77.
- Deng D., Xu C., Sun P., Wu J., Yan C., Hu M., Yan N. 2014. Crystal structure of the human glucose transporter GLUT1. *Nature*. 510, 121–125.
- 28. Henderson P.J.F. 1993. The 12-transmembrane helix transporters. *Curr. Opin. Cell Biol.* **5** (4), 708–721.
- Neuberger A., Du D., Luisi B.F. 2018. Structure and mechanism of bacterial tripartite efflux pumps. *Res. Microbiol.* 169 (7–8), 401–413.
- Hinchliffe P., Symmons M.F., Hughes C., Koronakis V. 2013. Structure and operation of bacterial tripartite pumps. *Annu. Rev. Microbiol.* 67, 221–242.
- Paulsen I.T., Brown M.H., Skurray R.A. 1996. Proton-dependent multidrug efflux systems. *Microbiol. Rev.* 60, 575–608.
- Zhang X.C., Zhao Y., Heng J., Jiang D. 2015. Energy coupling mechanisms of MFS transporters. *Protein Sci.* 24 (10), 1560–1579.
- Levy S.B. 2002. Active efflux, a common mechanism for biocide and antibiotic resistance. *J. Appl. Microbiol.* 31, 65–71.
- Kumar S., Lekshmi M., Parvathi A., Ojha M., Wenzel N., Varela M.F. 2020. Functional and structural roles of the major facilitator superfamily bacterial multidrug efflux pumps. Microorganisms. *Microorganisms*. 8 (2), 266.
- 35. Kumar S., He G., Kakarla P., Shrestha U., Ranjana K.C., Ranaweera I., Willmon T.M., Barr S.R., Hernandez A.J., Varela M.F. 2016. Bacterial multidrug efflux pumps of the major facilitator superfamily as targets for modulation. *Infect. Disord. Drug. Targets.* 16 (1), 28–43.
- Jack D.L., Storms M.L., Tchieu J.H., Paulsen I.T., Saier M.H. 2000. A broad-specificity multidrug efflux pump requiring a pair of homologous SMR-type proteins. J. Bacteriology. 182 (8), 2311–2313.
- 37. Paulsen I.T., Skurray R.A., Tam R., Saier M.H. Turner Jr.R.J., Weiner J.H., Goldberg E.B., Grinius L.L. 1996. The SMR family: A novel family of multidrug efflux proteins involved with the efflux of lipophilic drugs. *Mol. Microbiol.* **19**, 1167–1175.
- Bay D.C., Rommens K.L., Turner R.J. 2008. Small multidrug resistance proteins: A multidrug transporter family that continues to grow. *Biochim. Biophys. Acta.* 1778 (9), 1814–1838.
- He G.X., Zhang C., Crow R.R., Thorpe C., Chen H., Kumar S., Tsuchiya T., Varela M.F. 2011. SugE, a new member of the SMR family of transporters, contrib-

utes to antimicrobial resistance in *Enterobacter cloacae. Antimicrob. Agents Chemother.* **55** (8), 3954–3957.

- Motohashi H., Inui K. 2013. Multidrug and toxin extrusion family SLC47: Physiological, pharmacokinetic and toxicokinetic importance of MATE1 and MATE2-K. *Mol. Aspects Med.* 34 (2–3), 661–668.
- 41. Kuroda T., Tsuchiya T. 2009. Multidrug efflux transporters in the MATE family. *Biochim. Biophys. Acta.* 1794 (5), 763–768.
- 42. Mishra M.N., Daniels L. 2013. Characterization of the MSMEG\_2631 gene (mmp) encoding a multidrug and toxic compound extrusion (MATE) family protein in *Mycobacterium smegmatis* and exploration of its polyspecific nature using biolog phenotype microarray. *J. Bacteriol.* **195** (7), 1610–1621.
- 43. Koronakis V., Eswaran J., Hughes C. 2004. Structure and function of TolC: The bacterial exit duct for proteins and drugs. *Annu. Rev. Biochem.* **73**, 467–489.
- 44. Alvarez-Ortega C., Olivares J., Martínez J.L. 2013. RND multidrug efflux pumps: What are they good for? *Front. Microbiol.* 4, 7. https://doi.org/10.3389/fmicb.2013.00007
- 45. Blair J.M.A., Piddock L.J.V. 2016. How to measure export via bacterial multidrug resistance efflux pumps. *mBio.* 7 (4), e00840-16. https://doi.org/10.1128/mBio.00840-16
- Guérin F., Lallement C., Isnard C., Dhalluin A., Cattoir V., Giard J.C. 2016. Landscape of resistance-nodulation- cell division (rnd)-type efflux pumps in *Enterobacter cloacae* complex. *Antimicrob. Agents Chemother.* 60 (4), 2373–2382.
- 47. Calgin M.K., Sahin F., Turegun B., Gerceker D., Atasever M., Koksal D., Kiyan M. 2013. Expression analysis of efflux pump genes among drug-susceptible and multidrug-resistant *Mycobacterium tuberculosis* clinical isolates and reference strains. *Diagnost. Microbiol. Infect. Dis.* **76** (3), 291–297.
- Ren Q., Chen K., Paulsen I.T. 2007. Transport DB: A comprehensive database resource for cytoplasmic membrane transport systems and outer membrane channels. *Nucleic Acids Res.* 35 (1), 274–279.
- 49. Thanassi D.G., Cheng L.W., Nikaido H. 1997. Active efflux of bile salts by *Escherichia coli. J. Bacteriol.* **179**, 2512–2518.
- 50. Elkins C.A., Nikaido H. 2002. Substrate specificity of the RND-type multidrug efflux pumps AcrB and AcrD of *Escherichia coli* is determined predominantly by two large periplasmic loops. *J. Bacteriol.* **184** (23), 6490–6498.
- 51. Tseng T.T., Gratwick K.S., Kollman J., Park D., Nies D.H., Goffeau A., Saier M.H. Jr. 1999. The RND permease superfamily: an ancient, ubiquitous and diverse family that includes human disease and development proteins. *J. Mol. Microbiol. Biotechnol.* **1** (1), 107–125.
- 52. Masuda N., Sakagawa E., Ohya S., Gotoh N., Tsujimoto H., Nishino T. 2000. Substrate specificities of MexAB-OprM, MexCD-OprJ, and MexXY-OprM efflux pumps in *Pseudomonas aeruginosa. Antimicrob. Agents Chemother.* **44**, 3322–3327.
- Melly G., Purdy G.E. 2019. MmpL Proteins in physiology and pathogenesis of *M. tuberculosis. Microorganisms*. 7 (3), 70. https://doi.org/10.3390/microorganisms7030070

- Hodgkinson J.T., Gross J., Baker Y.R., Spring D.R., Welch M. 2016. A new *Pseudomonas* quinolone signal (PQS) binding partner: MexG. J. Chem. Sci. 7, 2553– 2562.
- 55. Minagawa S., Inami H., Kato T., Sawada S., Yasuki T., Miyairi S., Horikawa M., Okuda J., Gotoh N. 2012. RND-type efflux pump system MexAB-OprM of *Pseudomonas aeruginosa* selects bacterial languages, 3-oxo-acyl-homoserine lactones, for sell-to-cell communication. *BMC Microbiol.* **12**, 70. https://doi.org/10.1186/1471-2180-12-70
- 56. Elbourne L.D., Tetu S., Hassan K., Paulsen I. 2017. Transport DB 2.0: A database for exploring membrane transporters in sequenced genomes from all domains of life. *Nucleic Acids Res.* 45, 320–324.
- 57. Duan W., Li X., Ge Y., Yu Z., Li P., Li J., Qin L., Xie J. 2019. *Mycobacterium tuberculosis* Rv1473 is a novel macrolides ABC efflux pump regulated by WhiB7. *Future Microbiol.* 14 (1), 47–59.
- Silva P.E.A., Von Groll A., Martin A., Palomino J.C. 2011. Efflux as a mechanism for drug resistance in *Mycobacterium tuberculosis. FEMS Immunol. Med. Microbiol.* 63 (1), 1–9.
- 59. Lingjun Z., Wang J., Wang L., Qin C. 2020. The correlation of drug resistance and virulence in *Mycobacterium tuberculosis*. *Biosaf. Health.* **2** (1), 18–24.
- Soni D.K., Dubey S.K., Bhatnagar R. 2020. ATP-binding cassette (ABC) import systems of *Mycobacterium tuberculosis*: Target for drug and vaccine development. *Emerg. Microbes Infect.* 9(1), 207–220.
- Cassio Barreto de Oliveira M., Balan A. 2020 The ATP-Binding Cassette (ABC) transport systems in *Mycobacterium tuberculosis*: structure, function, and possible targets for therapeutics. *Biology (Basel)*. 9 (12), 443. https://doi.org/10.3390/biology9120443
- 62. Jackson M., Stevens C. M., Zhang L., Zgurskaya H. I., Niederweis M. 2021. Transporters involved in the biogenesis and functionalization of the mycobacterial cell envelope chemical. *Chem Rev.* **121** (9), 5124–5157.
- 63. Glass L.N., Swapna G., Chavadi S.S., Tufariello J.M., Mi K., Drumm J.E., Chan J. 2017. *Mycobacterium tuberculosis* universal stress protein Rv2623 interacts with the putative ATP binding cassette (ABC) transporter Rv1747 to regulate mycobacterial growth. *PLoS Pathog.* 13 (7), e1006515.
  https://dxi.org/10.1271/journal.most.100(515
  - https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1006515
- 64. Lin Y., Dong Y., Gao Y., Shi R., Li Y., Zhou X., Liu W., Li G., Qi Y., Wu Y. 2021. Identification of CTL epitopes on efflux pumps of the atp-binding cassette and the major facilitator superfamily of *Mycobacterium tuberculosis. J. Immunol. Res.* **2021**, 8899674. https://doi.org/10.1155/2021/8899674
- 65. Van Veen H.W., Konings W.N. 1997. Multidrug transporters from bacteria to man: Similarities in structure and function. *Semin. Cancer Biol.* **8**, 183–191.
- 66. Bapna A., Federici L., Venter H., Velamakanni S., Luisi B., Fan T.-P., van Veen H.W. 2007. Two proton translocation pathways in a secondary active multidrug transporter. *J. Mol. Microbiol. Biotechnol.* **12**, 197–209.
- 67. Mazurkiewicz P., Poelarends G.J., Driessen A.J., Konings W.N. 2004. Facilitated drug influx by an energy-uncoupled secondary multidrug transporter. *J. Biol. Chem.* **279**, 103–108.
- 68. Umar F., Hatta M., Husain D.R., Natzir R., Dwiyanti R., Junita A.R., Primaguna M.R. 2019. The effect of anti-

tuberculosis drugs therapy on mRNA efflux pump gene expression of Rv1250 in *Mycobacterium tuberculosis* collected from tuberculosis patients. *J. New Microbes New Infect.* **32**, 100609. https://doi.org/10.1016/j.nmni.2019.100609

- Li J., Bai X., Liang Y., Zhang J., Yang Y., Zhao W., Wu X. 2015. Prediction of epitopes of Rv1410c Mycobacterium tuberculosis protein using DNA Star software. Xi. Bao. Yu. Fen. Zi. Mian. Yi. Xue. Za. Zhi. 31 (4), 474–477.
- Cox J.S., Chen B., McNeil M., Jacobs W.R.Jr. 1999. Complex lipid determines tissue-specific replication of *Mycobacterium tuberculosis* in mice. Nature. 402, 79–83.
- Converse S.E., Mougous J., Leavell M., Leavy J., Bertozzi C., Cox J. 2003. MmpL8 is required for sulfolipid-1 biosynthesis and *Mycobacterium tuberculosis* virulence. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 100, 6121–6126.
- Domenech P., Reed M., Barry C. 2005. Contribution of the *Mycobacterium tuberculosis* MmpL protein family to virulence and drug resistance. *Infect. Immun.* 73, 3492–3501.
- Grzegorzewicz A.E., Pham H., Gundi V., Scherman M., North E., Hess T. Jones V. Gruppo V., Born S.E.M., Korduláková J., Chavadi S.S., Morisseau Ch., Lenaerts A.J., Lee E.R., McNeil M.R., Jackson M. 2012. Inhibition of mycolic acid transport across the *Mycobacterium tuberculosis* plasma membrane. *Nat. Chem. Biol.* 8, 334–341.
- 74. Rodríguez J.E., Ramírez A., Salas L., Helguera-Repetto C., Gonzalez-y-Merchand J., Soto C., Hernández-Pando R. 2013. Transcription of genes involved in sulfolipid and polyacyltrehalose biosynthesis of *Mycobacterium tuberculosis* in experimental latent tuberculosis infection. *PLoS One.* 8 (3), e58378. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0058378
- Radhakrishnan A., Kumar N., Wright C.C., Chou T.H. Bolla J.R., Tringides M.L., Reddy Bolla J., Hsiang-Ting L., Kanagalaghatta R., Rajashankar Ch.-Ch., Purdy G.E., Yu E.W. 2014. Crystal structure of the transcriptional regulator Rv0678 of *Mycobacterium tuberculosis. J. Biol. Chem.* 289 (23), 16526–16540.
- Delmar J., Chou T., Wright C., Licon M., Doh J., Radhakrishnan A., Kumar N., Hsiang-Ting L., Reddy Bolla J., Kanagalaghatta R., Rajashankar Ch.-Ch., Purdy G.E., Yu E.W. 2015. Structural basis for the regulation of the MmpL transporters of *Mycobacterium tuberculosis. J. Biol. Chem.* 290 (47), 28559–28574.
- 77. Li W., Upadhyay A., Fontes F., North E., Wang Y., Crans D. Grzegorzewicz A.E., Jones V., Franzblau S.G., Lee R.E., Crick D.C., Jackson M. 2014. Novel insights into the mechanism of inhibition of MmpL3, a target of multiple pharmacophores in *Mycobacterium tuberculosis*. *Antimicrob. Agent. Chemother.* 58 (11), 6413–6423.
- Milano A., Pasca M., Provvedi R., Lucarelli A., Manina G., Ribeiro A., Manganellic R., Riccardia G. 2009. Azole resistance in *Mycobacterium tuberculosis* is mediated by the MmpS5-MmpL5 efflux system. *Tuberculosis (Edinb)*. 89 (1), 84–90.
- 79. Andries K., Villellas C., Coeck N., Thys K., Gevers T., Vranckx L., Lounis N., Bouke C. de J., Koul A. 2014. Acquired resistance of *Mycobacterium tuberculosis* to bedaquiline. *PLoS One.* 9 (7), e102135. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0102135
- 80. Pasca M.R., Guglierame P., De Rossi E., Zara F., Riccardi G. 2005. mmpL7 gene of *Mycobacterium tubercu*-

losis is responsible for isoniazid efflux in Mycobacterium smegmatis. Antimicrob. Agents Chemother. **49** (11), 4775–4777.

- 81. Machado D., Lecorche E., Mougari F., Cambau E., Viveiros M. 2018. Insights on *Mycobacterium leprae* efflux pumps and their implications in drug resistance and virulence. *Front. Microbiol.* **9**, 3072.
- Kapopoulou A., Lew J., Cole S. 2011. The Myco-Browser portal: A comprehensive and manually annotated resource for mycobacterial genomes. *Tuberculosis (Edinb).* 91 (1), 8–13.
- Bolla J.R., Do S., Long F., Dai L., Su C., Lei H., Chen X., Gerkey J.E., Murphy D.C., Kanagalaghatta R., Zhang Q., Yu E.W. 2012. Structural and functional analysis of the transcriptional regulator Rv3066 of *Mycobacterium tuberculosis*. *Nucleic Acids Res.* 40 (18), 9340–9355.
- 84. Gupta A.K., Vishwa M.K., Devendra S.C., Rahul S., Mradula S., Krishnamurthy V., Vishnu D.S. 2010. Microarray analysis of efflux pump genes in multidrug-resistant *Mycobacterium tuberculosis* during stress induced by common anti-tuberculous. *Microb. Drug Resist.* 16 (1), 21–28.
- Rempel S., Gati C., Nijland M., Thangaratnarajah C., Karyolaimos A., de Gier J.W., Guskov A., Slotboom D.J. 2020. A mycobacterial ABC transporter mediates the uptake of hydrophilic compounds. *Nature*. 580, 409–412.
- 86. Jiang X., Zhang W., Zhang Y., Gao F., Lu C., Zhang X., Wang H. 2008. Assessment of efflux pump gene expression in a clinical isolate *Mycobacterium tuberculosis* by real-time reverse transcription PCR. *Microb. Drug Resist.* 14 (1), 7–11.
- 87. Narang A., Garima K., Porwal S., Bhandekar A., Shrivastava K., Giri A., Sharma N.K., Bose M., Varma-Basil M. 2019. Potential impact of efflux pump genes in mediating rifampicin resistance in clinical isolates of *Mycobacterium tuberculosis* from India. *PLoS One.* 14 (9), e0223163. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0223163
- De Rossi E., Arrigo P., Bellinzoni M., da Silva P., Martin C., Ainsa J., Guglierame P., Riccardi G. 2002. The multidrug transporters belonging to major facilitator superfamily in *Mycobacterium tuberculosis*. *Mol. Med.* 8 (11), 714–724.
- Danilchanka O., Mailaender C., Niederweis M. 2008. Identification of a novel multidrug efflux pump of *Mycobacterium tuberculosis. Antimicrob. Agents Chemother.* 52 (7), 2503–2511.
- 90. Garima K., Pathak R., Tandon R., Rathor N., Sinha R., Bose M., Varma-Basil M. 2015. Differential expression of efflux pump genes of *Mycobacterium tuberculosis* in response to varied subinhibitory concentrations of antituberculosis agents. *Tuberculosis (Edinb)*. **95** (2), 155–161.
- 91. Ramón-García S., Martín C., De Rossi E., Aínsa J.A. 2007. Contribution of the Rv2333c efflux pump (the Stp protein) from *Mycobacterium tuberculosis* to intrinsic antibiotic resistance in *Mycobacterium bovis BCG*. *J. Antimicrob. Chemother.* **59** (3), 544–547.
- 92. Khosravi A.D., Sirous M., Absalan Z., Tabandeh M.R., Savari M. 2019. Comparison of drrA and drrB efflux pump genes expression in drug-susceptible and-resistant *Mycobacterium tuberculosis* strains isolated from

tuberculosis patients in Iran. Infect. Drug. Resist. 12, 3437–3444.

- 93. Gupta A.K., Chauhan D., Srivastava K., Das R., Batra S., Mittal M., Goswami P., Singhal N., Sharma V.D., Venkatesan K., Hasnain S.E., Katoch V.M. 2006. Estimation of efflux mediated multi-drug resistance and its correlation with expression levels of two major efflux pumps and mycobacterium. *J. Commun. Dis.* 38 (3), 246–254.
- 94. Srivastava S., Musuka S., Sherman C., Meek C., Leff R., Gumbo T. 2010. Efflux-pump-derived multiple drug resistance to ethambutol monotherapy in *Mycobacterium tuberculosis* and the pharmacokinetics and pharmacodynamics of ethambutol. J. Infect. Dis. 201 (8), 1225–1231.
- 95. Brandis G., Hughes D. 2013. Genetic characterization of compensatory evolution in strains carrying rpoB Ser531Leu, the rifampicin resistance mutation most frequently found in clinical isolates. *J. Antimicrob. Chemother.* **68** (11), 2493–2497.
- Lu J., Liu M., Wang Y., Pang Y., Zhao Z. 2014. Mechanisms of fluoroquinolone monoresistance in *Mycobacterium tuberculosis*. *FEMS Microbiol. Lett.* 353 (1), 40–48.
- Daniel J., Abraham L., Martin A., Pablo X., Reyes S. 2018. Rv2477c is an antibiotic-sensitive manganesedependent ABC-F ATPase in *Mycobacterium tuberculosis. Biochem. Biophys. Res. Commun.* 495 (1), 35–40.
- Balganesh M., Kuruppath S., Marcel N., Sharma S., Nair A., Sharma U. 2010. Rv1218c, an ABC transporter of *Mycobacterium tuberculosis* with implications in drug discovery. J. Antimicrob. Agents. Chemother. 54, 5167–5172.
- 99. Dinesh N., Sharma S., Balganesh M. 2013. Involvement of efflux pumps in the resistance to peptidoglycan synthesis inhibitors in *Mycobacterium tuberculosis*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **57**, 1941–1943.
- 100. Balganesh M., Dinesh N., Sharma S., Kuruppath S., Nair A.V., Sharma U. 2012. Efflux pumps of *Mycobacterium tuberculosis* play a significant role in antituberculosis activity of potential drug candidates. *Antimicrob. Agents Chemother.* 56, 2643–2651.
- 101. Sahin F., Kiyan M. 2017. The Roles of efflux systems in extensively drug-resistant *Mycobacterium Tuberculosis. Turkish J. Mol. Biol. Biotech.* 2, 71–81.
- 102. Zhang Y., Zhang J., Cui P., Zhang Y., Zhang W. 2017. Identification of novel efflux proteins Rv0191, Rv3756c, Rv3008, and Rv1667c involved in pyrazinamide resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. Antimicrob. Agents Chemother. 61 (8), e00940-17. https://doi.org/10.1128/AAC.00940-17
- 103. Gomez C.A., Andreu N., Ferrer-Navarro M., Yero D., Gibert I. 2016. Triclosan-induced genes Rv1686c-Rv1687c and Rv3161c are not involved in triclosan resistance in *Mycobacterium tuberculosis. Sci. Rep.* 6, 26221. https://doi.org/10.1038/srep26221
- 104. Pang Y., Lu J., Wang Y., Song Y., Wang S., Zhao Y. 2013. Study of the rifampin monoresistance mechanism in *Mycobacterium tuberculosis*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 57 (2), 893–900.
- 105. Pasca M.R., Guglierame P., Arcesi F., Bellinzoni M., De Rossi E., Riccardi G. 2004. Rv2686c-Rv2687c-Rv2688c, an ABC fluoroquinolone efflux pump in Mycobacterium tuberculosis. Antimicrob. Agents Chemother. 48 (3), 3175–3178.

- 106. Li G., Zhang J., Guo Q., Wei J., Jiang Y., Zhao X., Zhao L., Liu Z., Lu J., Wan K. 2015. Study of efflux pump gene expression in rifampicin-monoresistant *Mycobacterium tuberculosis* clinical isolates. *J. Antibiot.* (*Tokyo*). 68 (7), 431–435.
- 107. Ghajavand H., Kargarpour K.M., Khanipour S., Shahin P.D., Masoumi M., Jamnani F.R., Fateh A., Yaseri M., Siadat S. D., Vaziri F. 2019. Scrutinizing the drug resistance mechanism of multi- and extensivelydrug resistant *Mycobacterium tuberculosis:* mutations versus efflux pumps. *Antimicrob. Resist. Infect. Control.* 8, 70.

https://doi.org/10.1186/s13756-019-0516-4

- 108. Li X., Li P., Ruan C., Xie L.X., Gu Y., Li J., Yi Q., Lv X., Xie J. 2019. *Mycobacterium tuberculosis* Rv0191 is an efflux pump of major facilitator superfamily transporter regulated by Rv1353c. *Arch. Biochem. Biophys.* **30**, 59–66.
- 109. Khanna A., Raj V.S., Tarai B., Sood R., Kumar P.P., Dilip J.U., Sharma P., Rattan A., Kulvinder S.S., Singh H. 2010. Emergence and molecular characterization of extensively drug-resistant *Mycobacterium tuberculosis* clinical isolates from the Delhi Region in India. *Antimicrob. Agents Chemother.* 54 (11), 4789– 4793.
- 110. Pang Y., Lu J., Wang Y., Song Y., Wang S. Zhao Y. 2013. Study of the rifampin monoresistance mechanism in *Mycobacterium tuberculosis*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 57 (2), 893–900.
- 111. Ioerger T.R., Koo S., No E.G., Chen X., Larsen M.H., Jacobs W.R., Jr., Pillay M., Sturm A.W., Sacchettini J.S. 2009. Genome analysis of multi- and extensivelydrug-resistant tuberculosis from kwazulu-natal South Africa. *PLoS One.* **4** (11), e7778. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0007778
- 112. Ramón-García S., Martín C., Aínsa J.A., de Rossi E. 2006. Characterization of tetracycline resistance mediated by the efflux pump Tap from *Mycobacterium fortuitum. J. Antimicrob. Chemother.* 57 (2), 252–259.
- 113. Ramón-García S., Mick V., Dainese E., Martin C., Thompson C., De Rossi E., Manganelli R., Aínsa J.A. 2012. Functional and genetic characterization of the Tap efflux pump in *Mycobacterium bovis BCG. Antimicrob. Agents Chemother.* **56** (4), 2074–2083.
- 114. Machado D., Couto I., Perdigao J., Rodrigues L., Portugal I., Baptista P., Veigas B., Amaral L., Viveiros M. 2012. Contribution of efflux to the emergence of isoniazid and multidrug resistance in *Mycobacterium tuberculosis. PLoS One.* 7 (4), e34538. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0034538
- 115. Liu J., Shi W., Zhang S., Hao X., Maslov D.A., Shur K.V., Bekker O.B., Danilenko V.N., Zhang Y. 2019. Mutations in efflux pump Rv1258c (Tap) cause resistance to pyrazinamide, isoniazid, and streptomycin in *M. tuberculosis. Front. Microbiol.* **10**, 216. https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.00216
- 116. Machado D., Coelho T., Perdigão J., Pereira C., Couto I., Portugal I., Maschmann R. De A., Ramos D.F., von Groll A., Rossetti M.L.R., Silva P.A., Viveiros M. 2017. Interplay between mutations and efflux in drug resistant clinical isolates of *Mycobacterium tuberculosis. Front. Microbiol.* **8**, 711. https://doi.org/10.2280/farich.2017.00711

https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.00711

117. Silva P.E. A., Bigi F., de la Paz Santangelo M., Romano M.I., Martin C., Cataldi A., Ainsa J.A. 2001.

БИОЛОГИЧЕСКИЕ МЕМБРАНЫ том 38 № 5 2021

Characterization of P55, a multidrug efflux pump in *Mycobacterium bovis* and *Mycobacterium tuberculosis*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **45** (3), 800–804.

- 118. Ramón-García S., Martín C., Thompson C.J., Aínsa J.A. 2009. Role of the *Mycobacterium tuberculo*sis P55 efflux pump in intrinsic drug resistance, oxidative stress responses, and growth. *Antimicrob. Agents Chemother.* 53 (9), 3675-82. https://doi.org/10.1128/AAC.00550-09
- 119. Bianco M.V., Blanco F.C., Imperiale B., Forrellad M.A., Rocha R.V., Klepp L.I., Cataldi A.A., Morcillo N., Bigi F. 2011b. Role of P27–P55 operon from *Mycobacterium tuberculosis* in the resistance to toxic compounds. *BMC Infect. Dis.* **11**, 195. https://doi.org/10.1186/1471-2334-11-195
- 120. Harris K.K., Fay A., Yan G.H., Kunwar P., Socci N.D., Pottabathini N., Juventhala R.R., Djaballah H., Glickman M.S. 2014. Novel imidazoline antimicrobial scaffold that inhibits DNA replication with activity against mycobacteria and drug resistant Gram-positive cocci. ACS Chem. Biol. 9 (11), 2572–2583.
- 121. Li X.Z., Zhang L., Nikaido H. 2004. Efflux pumpmediated intrinsic drug resistance in *Mycobacterium smegmatis*. *Antimicrob*. *Agents* Chemother. **48** (7), 2415–2423.
- 122. Louw G.E., Warren R., van Pittius N., Leon R., Jimenez A., Hernandez-Pando R., Ch. R.E. McEvoy, Grobbelaar M., Murray M., van Helden P.D., Victor T.C. 2011. Rifampicin reduces susceptibility to ofloxacin in rifampicin-resistant *Mycobacterium tuberculosis* through efflux. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 184 (2), 269–276.
- 123. Kanji A., Hasan R., Ali A., Zaver A., Zhang Y., Imtiaz K., Shi W., Clark T.G., McNerney R., Phelan J., Rao S., Shafiq S., Hasan Z. 2017. Single nucleotide polymorphisms in efflux pumps genes in extensively drug resistant *Mycobacterium tuberculosis* isolates from Pakistan. *Tuberculosis (Edinb)*. 107, 20–30.
- 124. Black P.A., Warren R.M., Louw G.E., van Helden P.D., Victor T.C., Kana B.D. 2014. Energy metabolism and drug efflux in *Mycobacterium tuberculosis. Antimicrob. Agents Chemother.* **58** (5), 249–2503.
- 125. Gupta A.K., Reddy V.P., Lavania M., Chauhan D., Venkatesan K., Sharma V., Tyagi A., Katoch V. 2010. JefA (Rv2459), a drug efflux gene in *Mycobacterium tuberculosis* confers resistance to isoniazid and ethambutol. *Indian. Med. Res.* 132, 176–188.
- 126. Gupta A.K., Katoch V.M., Chauhan D.S., Sharma R., Singh M., Venkatesan K., Sharma V.D. 2010. Microarray analysis of efflux pump genes in multidrug-resistant *Mycobacterium tuberculosis* during stress induced by common anti-tuberculous drugs. *Microb. Drug Resist.* 16 (1), 21–28.
- 127. Machado D., Coelho T., Perdigão J., Pereira C., Couto I., Portugal I., Maschmann R. De A., Ramos D.F., von Groll A., Rossetti M.L.R., Silva P.A., Viveiros M. 2017. Interplay between mutations and efflux in drug resistant clinical isolates of *Mycobacterium tuberculosis. Front. Microbiol.* **8**, 711. https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.00711
- 128. Doran J.L., Pang Y., Mdluli K., Moran A., Victor T., Stokes R., Mahenthiralingam E., Kreiswirth B.N., Butt J.L., Baron G.S., Treit J.D., Kerr V.J., van Helden P.D., Roberts M. C., Nano F.E. 1997. *Mycobacterium tuberculosis* efpA encodes an efflux protein of the

QacA transporter family. *Clin. Diagn. Lab. Immunol.* **4**, 23–32.

- 129. La Rosa V., Poce G., Canseco J.O., Buroni S., Pasca M.R., Biava M. Ravikiran M.R., Porretta G.C., Alfonso S., Battilocchio C., Babak J., Sorrentino F., Ioerger T.R., Sacchettini J.C., Manetti F., Botta M., De Logu A., Rubin E.J., de Rossi E. 2012. MmpL3 is the cellular target of the antitubercular pyrrole derivative BM212. Antimicrob. Agents Chemother. 56 (1), 324–331.
- De Knegt G. J., Bruning O., Marian T., de Jong M., van Belkum A., Endtz H.P., BreitbIrma T. M., Bakker-Woudenberga A.J.M., de Steenwinkela J.E.M. 2013. Rifampicin-induced transcriptome response in rifampicin-resistant *Mycobacterium tuberculosis*. *Tuberculosis (Edinb).* 93 (1), 96–101.
- 131. Wells R.M., Jones C., Xi Z., Speer A., Danilchanka O., Doornbos K., Sun P., Fangming W., Changlin T., Niederweis M. 2013. Discovery of a siderophore export system essential for virulence of *Mycobacterium tuberculosis. PLoS Pathog.* 9 (1), e1003120.
- 132. Hartkoorn R.C., Uplekar S., Cole S. 2014. Crossresistance between clofazimine and bedaquiline through upregulation of MmpL5 in *Mycobacterium tuberculosis. Antimicrob. Agents Chemother.* 58 (5), 2979–2981.
- 133. Choudhuri B.S., Sen S., Chakrabarti P. 1999. Isoniazid accumulation in *Mycobacterium smegmatis* is modulated by proton motive force-driven and ATP-dependent extrusion systems. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **256**, 682–684.
- 134. Domenech P., Reed M., Dowd C., Manca C., Kaplan G., Barry C. 2004. The role of MmpL8 in sulfatide biogenesis and virulence of *Mycobacterium tuberculosis. Biol. Chem.* **279**, 21257–21265.
- Rodrigues L., Villellas C., Bailo R., Viveiros M., Ainsa J. 2013. Role of the Mmr efflux pump in drug resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 57 (2), 751–757.
- 136. Bhardwaj A.K., Mohanty P. 2012. Bacterial efflux pumps involved in multidrug resistance and their inhibitors: rejuvinating the antimicrobial chemotherapy. *Recent. Pat. Antiinfect. Drug Discov.* **7** (1), 73–89.
- 137. Lomovskaya O., Warren M.S., Lee A., Galazzo J., Fronko R., Lee M., Blais J., Cho D., Chamberland S., Renau T., Leger R., Hecker S., Watkins W., Hoshino K., Ishida H., Lee V.J. 2001. Identification and characterization of inhibitors of multidrug resistance efflux pumps in *Pseudomonas aeruginosa:* Novel agents for combination therapy. *Antimicrob. Agents Chemother.* **45** (1), 105–116.
- Bhattacharyya T., Sharma A., Akhter J., Pathania R. 2017. The small molecule IITR08027 restores the antibacterial activity of fluoroquinolones against multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* by efflux inhibition. *Int. J. Antimicrob. Agents.* 50 (2), 219 –226.
- Anoushiravani M., Falsafi T., Niknam V. 2009. Proton motive force-dependent efflux of tetracycline in clinical isolates of *Helicobacter pylori*. J. Med. Microbiol. 58 (10), 1309–1313.
- 140. Osei S.J., Amoako D.G. 2017. Carbonyl cyanide mchlorophenylhydrazine (CCCP) reverses resistance to colistin, but not to carbapenems and tigecycline in multidrug-resistant *Enterobacteriaceae*. *Front Micro*-

biol. 8, 228.

https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.00228

- 141. Gupta S., Cohen K.A., Winglee K., Maiga M., Diarra B., Bishai W.R. 2014. Efflux inhibition with verapamil potentiates bedaquiline in *Mycobacterium tuberculosis*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **58** (1), 574–576.
- 142. Singh M., Jadaun G.P., Srivastava K., Chauhan V., Mishra R., Gupta K., Nair S., Chauhan D.S., Sharma V.D., Venkatesan K., Katoch V.M. 2011. Effect of efflux pump inhibitors on drug susceptibility of ofloxacin resistant *Mycobacterium tuberculosis* isolates. *Indian. J. Med. Res.* **133** (5), 535–540.
- 143. Radchenko M., Symersky J., Nie R., Lu M. 2015. Structural basis for the blockade of MATE multidrug efflux pumps. *Nat. Commun.* 6, 7995. https://doi.org/10.1038/ncomms8995
- 144. Bohnert J.A., Kern W.V. 2005. Selected arylpiperazines are capable of reversing multidrug resistance in *Escherichia coli* overexpressing RND efflux pumps. *Antimicrob. Agents Chemother.* **49** (2), 849–852.
- 145. Vargiu A.V., Ruggerone P., Opperman T.J., Nguyen S.T., Nikaido H. 2014. Molecular mechanism of MBX2319 inhibition of *Escherichia coli* AcrB multidrug efflux pump and comparison with other inhibitors. *Antimicrob. Agents Chemother.* **58** (10), 6224–6234.
- 146. Stavri M., Piddock L.J., Gibbons S. 2007. Bacterial efflux pump inhibitors from natural sources. J. Antimicrob. Chemother. 59 (6), 1247–1260.
- 147. Gibbons S., Oluwatuyi M., Kaatz G.W. 2003. A novel inhibitor of multidrug efflux pumps in *Staphylococcus aureus*. J. Antimicrob. Chemother. **51** (1), 13–17.
- 148. Gibbons S., Udo E.E. 2000. The effect of reserpine, a modulator of multidrug efflux pumps, on the in vitro activity of tetracycline against clinical isolates of methicillin resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) possessing the tet(K) determinant. *Phytother. Res.* **14** (2), 139–140.
- 149. Viveiros M., Portugal I., Bettencourt R., Victor T.C., Jordaan A.M., Leandro C., Ordway D., Amaral L. 2002. Isoniazid-induced transient high-level resistance in *Mycobacterium tuberculosis. Antimicrob. Agents Chemother.* 46 (9), 2804–2810.
- 150. Pfeifer H.J., Greenblatt D.K., Koch-Wester J. 1976. Clinical toxicity of reserpine in hospitalized patients: A report from the Boston collaborative drug surveillance program. *Am. J. Med. Sci.* **271** (3), 269–276.
- 151. Kumar A., Khan I.A., Koul S., Koul J.L., Taneja S.C., Ali I., Sharma S., Kumar Z.M.M., Sangwan P.L., Gupta P., Thota N., Ghulam N.Q. 2008. Novel structural analogues of piperine as inhibitors of the NorA efflux pump of *Staphylococcus aureus*. J. Antimicrob. Chemother. 61 (6), 1270–1276.
- 152. Sharma S., Kumar M., Sharma S., Nargotra A., Koul S., Khan I.A. 2010. Piperine as an inhibitor of Rv1258c, a putative multidrug efflux pump of *Mycobacterium tuberculosis. J. Antimicrob. Chemother.* 65 (8), 1694–1701.
- 153. Sharma S., Kalia N.P., Suden P., Chauhan P.S., Kumar M., Ram A.B., Khajuriab A., Banib S., AliKhana I. 2014. Protective efficacy of piperine against *Mycobacterium tuberculosis. Tuberculosis (Edinb).* 94, 389–396.
- 154. Chan B.C., Ip M., Lau C.B., Lui S.L, Jolivalt C., Ganem-Elbaz C., Litaudong N.M.E., Gongh R.H., Raymond H., Seeh K.P., Leungad P.C. 2011. Synergistic effects of baicalein with ciprofloxacin against NorA over-expressed methicillin-resistant *Staphylo*-

*coccus aureus* (MRSA) and inhibition of MRSA pyruvate kinase. *J. Ethnopharmacol.* **137**, 767–773.

- 155. Fujita M., Shiota S., Kuroda T., Hatano T., Yoshida T., Mizushima T., Tomofusa T. 2005. Remarkable synergies between baicalein and tetracycline, and baicalein and beta-lactams against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Microbiol. Immunol.* **49** (4), 391–396.
- 156. Stermitz F.R., Lorenz P., Tawara J.N., Zenewicz L.A., Lewis K. 2000. Synergy in a medicinal plant: Antimicrobial action of berberine potentiated by 5'-methoxyhydnocarpin, a multidrug pump inhibitor. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **97**, 1433–1437.
- 157. Morel C., Stermitz F.R., Tegos G., Lewis K. 2003. Isoflavones as potentiators of antibacterial activity. *J. Agric. Food Chem.* **51** (19), 5677–5679.
- 158. Gibbons S., Moser E., Kaatz G.W. 2004. Catechin gallates inhibit multidrug resistance (MDR) in *Staphylococcus aureus*. *Planta Med.* **70** (12), 1240–1242.
- 159. Sudano Roccaro A., Blanco A.R., Giuliano F., Rusciano D., Enea V. 2004. Epigallocatechin-gallate enhances the activity of tetracycline in staphylococci by inhibiting its efflux from bacterial cells. *Antimicrob. Agents Chemother.* **48** (6), 1968–1973.
- 160. Oluwatuyi M., Kaatz G.W., Gibbons S. 2004. Antibacterial and resistance modifying activity of *Rosmarinus officinalis. Phytochemistry.* **65** (24), 3249–3254.
- 161. Lorenzi V., Muselli A., Bernardini A.F., Berti L., Pagès J.M., Amaral L., Bolla J.-M. 2009. Geraniol restores antibiotic activities against multidrug-resistant isolates from Gram-negative species. *Antimicrob. Agents Chemother.* 53 (5), 2209–2211.
- 162. Vargiu A.V., Nikaido H. 2012. Multidrug binding properties of the AcrB efflux pump characterized by molecular dynamics simulations. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **109**, 20637–20642.
- 163. Opperman T.J., Nguyen S.T. 2015. Recent advances toward a molecular mechanism of efflux pump inhibition. *Front. Microbiol.* 6, 421. https://doi.org/10.3389/fmicb.2015.00421
- 164. Chevalier J., Atifi S., Eyraud A., Mahamoud A., Barbe J., Pagès J.M. 2001. New pyridoquinoline derivatives as potential inhibitors of the fluoroquinolone efflux pump in resistant *Enterobacter aerogenes* strains. J. Med. Chem. 44 (23), 4023–4026.
- 165. Pradel E., Pagès J.M. 2002. The AcrAB-tolC efflux pump contributes to multidrug resistance in the noso-comial pathogen *Enterobacter aerogenes*. *Antimicrob Agents Chemother*. **46** (8), 2640–2643.
- 166. Sabatini S., Gosetto F., Manfroni G., Tabarrini O., Kaatz G.W., Patel D., Cecchetti V. 2011. Evolution from a natural flavones nucleus to obtain 2-(4-propoxyphenyl) quinoline derivatives as potent inhibitors of the *S. aureus* NorA efflux pump. *J. Med. Chem.* 54 (16), 5722–5736.
- 167. Thorarensen A., Presley-Bodnar A.L., Marotti K.R., Boyle T.P., Heckaman C.L., Bohanon M.J., Tomichc P.K., Zurenkob G.E., Sweeneyb M.T., Betty H.Y. 2001. 3-arylpiperidines as potentiators of existing antibacterial agents. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 11 (14), 1903–1906.
- 168. Kaatz G.W., Moudgal V.V., Seo S.M., Hansen J.B., Kristiansen J.E. 2003. Phenylpiperidine selective serotonin reuptake inhibitors interfere with multidrug efflux pump activity in *Staphylococcus aureus*. *Int. J. Antimicrob. Agents.* 22 (3), 254–261.

- Mahmood H.Y., Jamshidi S., Sutton J.M., Rahman K.M. 2016. Current advances in developing inhibitors of bacterial multidrug efflux pumps. *Curr. Med. Chem.* 23 (10), 1062–1081.
- 170. Lee M.D., Galazzo J.L., Staley A.L., Lee J.C., Warren M.S., Fuernkranz H., Chamberland S., Lomovskaya O., Miller G.H. 2001. Microbial fermentation-derived inhibitors of efflux-pump-mediated drug resistance. *Farmaco.* 56 (1–2), 81–85.
- 171. Gupta S., Tyagi S., Almeida D.V., Maiga M.C., Ammerman N.C., Bishai W.R. 2013. Acceleration of tuberculosis treatment by adjunctive therapy with verapamil as an efflux inhibitor. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* **188** (5), 600–607.
- 172. Singh K., Kumar M., Pavadai E., Naran K., Warner D.F., Ruminski P.G., Chibale K. 2014. Synthesis of new verapamil analogues and their evaluation in combination with rifampicin against *Mycobacterium tuberculosis* and molecular docking studies in the binding site of efflux protein Rv1258c. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 24 (14), 2985–2990.
- 173. Adams K.N., Szumowski J.D., Ramakrishnan L. 2014. Verapamil and Its metabolite norverapamil, inhibit macrophage-induced, bacterial efflux pump-mediated tolerance to multiple anti-tubercular drugs. *J. Infect. Dis.* **210** (3), 456–466.
- 174. Roy S.K., Pahwa S., Nandanwar H., Jachak S.M. 2012. Phenylpropanoids of Alpinia galanga as efflux pump inhibitors in *Mycobacterium smegmatis* mc2 155. *Fitoterapia*. 83 (7), 1248–1255.
- 175. Adams K.N., Takaki K., Connolly L.E., Wiedenhoft H., Winglee K., Humbert O., Edelstein P.H., Cosma C.L., Ramakrishnan L. 2011. Drug tolerance in replicating mycobacteria mediated by a macrophage-induced efflux mechanism. *Cell.* **145** (1), 39–53.
- Bakker E., Bühlmann P., Pretsch E. 1997. Carrierbased ion-selective electrodes and bulk optodes.
   General characteristics. *Chem. Rev.* 97 (8), 3083– 3132.
- 177. Bühlmann P., Pretsch E., Bakker E. 1998. Carrierbased ion-selective electrodes and bulk optodes.2. Ionophores for potentiometric and optical sensors. *Chem. Rev.* 98 (4), 1593–1688.
- 178. Li G., Zhang J., Guo Q., Jiang Y., Wei J., Zhao L.L., Zhao X., Lu J., Wan K. 2015. Efflux pump gene expression in multidrug-resistant *Mycobacterium tuberculosis* clinical isolates. *PLoS One.* **10** (2), e0119013.
- 179. Rose L., Jenkins A.T. 2007. The effect of the ionophore valinomycin on biomimetic solid supported lipid DPPTE/EPC membranes. *Bioelectrochemistry*. 70 (2), 387–393.
- Thompson M., Krull U.J. 1982. The electroanalytical response of the bilayer lipid membrane to valinomycin: membrane cholesterol content. *Anal. Chim. Acta.* 141, 33–47.
- 181. Zhang Y., Scorpio A., Nikaido H., Sun Z. 1999. Role of acid pH and deficient efflux of pyrazinoic acid in unique susceptibility of *Mycobacterium tuberculosis* to pyrazinamide. *J. Bacteriol.* **181** (7), 2044–2049.
- Crowle A.J., Douvas G.S., May M.H. 1992. Chlorpromazine: a drug potentially useful for treating mycobacterial infections. *Chemotherapy.* 38 (6), 410–419.
- 183. Amaral L., Kristiansen J.E., Abebe L.S., Millett W. 1996. Inhibition of the respiration of multi-drug resistant clinical isolates of *Mycobacterium tuberculosis* by

thioridazine: Potential use for initial therapy of freshly diagnosed tuberculosis. *J. Antimicrob. Chemother.* **38** (6), 1049–1053.

- 184. Bettencourt M.V., Bosne-David S., Amaral L. 2000. Comparative in vitro activity of phenothiazines against multidrug-resistant *Mycobacterium tuberculosis*. Int. J. Antimicrob. Agents. 16 (1), 69–71.
- 185. Ordway D., Viveiros M., Leandro C., Bettencourt R., Almeida J., Martins M., Jette E. K., Molnar J., Amaral L. 2003. Clinical concentrations of thioridazine kill intracellular multidrug-resistant *Mycobacterium tuberculosis. Antimicrob. Agents Chemother.* **47** (3), 917–922.
- 186. Martins M., Schelz Z., Martins A., Molnar J., Hajös G., Riedl Z., Viveirosa M.I., Aki-Senerd Y.E., Amaral L. 2007. In vitro and ex vivo activity of thioridazine derivatives against *Mycobacterium tuberculosis*. *Int. J. Antimicrob. Agents.* **29** (3), 338–340.
- 187. Amaral L., Martins M., Viveiros M., Molnar J., Kristiansen J.E. 2008. Promising therapy of XDR-TB/MDR-TB with thioridazine an inhibitor of bacterial efflux pumps. *Curr. Drug. Targets.* 9 (9), 816–819.
- 188. Dutta N.K., Karakousis P.C. 2014. Thioridazine for treatment of tuberculosis: promises and pitfalls. *Tuberculosis (Edinb)*. **94** (6), 708–711.
- 189. Martins M., Viveiros M., Ramos J., Couto I., Molnar J., Boeree M., Amaral L. 2009. SILA 421, an inhibitor of efflux pumps of cancer cells, enhances the killing of intracellular extensively drug-resistant tuberculosis (XDR-TB). *Int. J. Antimicrob. Agents.* 33 (5), 479–482.
- 190. De Knegt G.J., Bakker-Woudenberg I.A., van Soolingen D., Aarnoutse R., Boeree M.J., de Steenwinkel J.E. 2015. SILA-421 activity in vitro against rifampicin-susceptible and rifampicin-resistant *Mycobacterium tuberculosis*, and in vivo in a murine tuberculosis model. *Int. J. Antimicrob. Agents.* 46 (1), 66–72.
- 191. Simons S.O., Kristiansen J.E., Hajos G., van der Laan T., Molnár J., Boeree M.J., Ingen M., Jakko J., van Christensen J. B., Viveiros M., Riedl Z., Amaral L.S. 2013. Activity of the efflux pump inhibitor SILA 421 against drug-resistant tuberculosis. *Int. J. Antimicrob. Agents.* **41** (5), 488–489.
- 192. Bogatcheva E., Dubuisson T., Protopopova M., Einck L., Nacy C.A., Reddy V.M. 2011. Chemical modification of capuramycins to enhance antibacterial activity. *J. Antimicrob. Chemother.* 66 (3), 578–587.
- 193. Reddy V.M., Einck L., Nacy C.A. 2008. In vitro antimycobacterial activities of capuramycin analogues. *Antimicrob. Agents Chemother.* **52** (2), 719–721.
- 194. Siricilla S., Mitachi K., Wan B., Franzblau S.G., Kurosu M. 2015. Discovery of a capuramycin analog that kills nonreplicating *Mycobacterium tuberculosis* and its synergistic effects with translocase I inhibitors. *J. Antibiot. (Tokyo).* **68** (4), 271–278.
- 195. Wang Y., Siricilla S., Aleiwi B.A., Kurosu M. 2013. Improved synthesis of capuramycin and its analogues. *Chemistry.* **19** (41), 3847–3858.
- 196. Chollet A., Mori G., Menendez C., Rodriguez F., Fabing I., Pasca M.R., Madackif J., Kordulákováf J., Constantgh P., Quémardgh A., Bernardes-Génissoncd V., Baltasab C.L.M. 2015. Design, synthesis and evaluation of new GEQ derivatives as inhibitors of InhA enzyme and *Mycobacterium tuberculosis* growth. *Eur. J. Med. Chem* 101, 218–235.
- 197. Lee R.E., Hurdle J.G., Liu J., Bruhn D.F., Matt T., Scherman M.S., Vaddady P.K., Zhong Z., Qi J.,

Akbergenov R., Das S., Madhura D.B., Rathi C., Trivedi A., Villellas C., Lee R.B., Rakesh S.L.W., Sun D., McNeil M.R., Ainsa A.J., Boshoff H.I., Gonzalez-Juarrero M., Meibohm B., Böttger E.C., Lenaerts A.J. 2014. Spectinamides: a new class of semisynthetic antituberculosis agents that overcome native drug efflux. *Nat. Med.* **20** (2), 152–158.

- Okandeji B.O., Greenwald D.M., Wroten J., Sello J.K. 2011. Synthesis and evaluation of inhibitors of bacterial drug efflux pumps of the major facilitator superfamily. *Bioorg. Med. Chem.* 19 (24), 7679–7689.
- 199. Vecchione J.J., Alexander B., Sello J.K. 2009. Two distinct major facilitator superfamily drug efflux pumps mediate chloramphenicol resistance in *Streptomyces coelicolor. Antimicrob. Agents Chemother.* **53** (11), 4673–4677.
- 200. Bruhn D.F., Scherman M.S., Liu J., Scherbakov D., Meibohm B., Böttger E.C., Lenaerts A.J., Lee R.E. 2015. In vitro and in vivo evaluation of synergism between anti-tubercular spectinamides and non-classical tuberculosis antibiotics. *Sci. Rep.* 5, 13985. https://doi.org/10.1038/srep13985
- 201. Rayasam G.V., Balganesh T.S. 2015. Exploring the potential of adjunct therapy in tuberculosis. *Trends. Pharmacol. Sci.* **36** (8), 506–513.
- 202. Amaral L., Martins M., Viveiros M. 2007. Enhanced killing of intracellular multidrug-resistant *Mycobacterium tuberculosis* by compounds that affect the activity of efflux pumps. J. Antimicrob. Chemother. **59** (6), 1237–1246.
- Muramatsu Y., Miyakoshi S., Ogawa Y., Ohnuki T., Ishii M.M., Arai M., Takatsu T., Inukai M. 2003. Studies on novel bacterial translocase I inhibitors, A-500359s. II. Deaminocaprolactam derivatives of capuramycin: A-500359 E, F, H; M-1 and M-2. J. Antibiot. (Tokyo). 56 (3), 253–258.
- 204. Grossman T.H., Shoen C.M., Jones S.M., Jones P.L., Cynamon M.H., Locher C.P. 2015. The efflux pump inhibitor timcodar improves the potency of antimycobacterial agents. *Antimicrob. Agents Chemother.* 59 (3), 1534–1541.
- 205. Pule C.M., Sampson S.L., Warren R.M., Black P.A., van Helden P.D., Victor T.C., Louw G. E. 2016. Efflux pump inhibitors: targeting mycobacterial efflux systems to enhance TB therapy. *J. Antimicrob. Chemother.* **71** (1), 17–26.
- 206. Bhardwaj R.K., Glaeser H., Becquemont L., Klotz U., Gupta S.K., Fromm M.F. 2002. Piperine, a major constituent of black pepper, inhibits human P-glycoprotein and CYP3A4. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **302** (2), 43–73.
- 207. Jin J., Zhang J., Guo N., Feng H., Li L., Liang J., Kai S., Wu X., Wang X., Liu M., Deng X., Lu Y. 2011. The plant alkaloid piperine as a potential inhibitor of ethidium bromide efflux in *Mycobacterium smegmatis*. *J. Med. Microbiol.* **60** (2), 223–229.
- 208. Thai K.M., Ngo T.D., Phan T.V., Tran T.D., Nguyen N.V., Nguyen T.H., Minh-Tri L., Ngoc-Vinh N., Thien-Hai N. 2015. Virtual screening for novel *Staphylococcus aureus* NorA efflux pump inhibitors from natural products. *Med. Chem.* **11** (2), 135–155.
- 209. Yamasaki S., Nikaido E., Nakashima R., Sakurai K., Fujiwara D., Fujii I., Kunihiko N. 2013. The crystal structure of multidrug-resistance regulator RamR with

multiple drugs. *Nat. Commun.* **4**, 2078. https://doi.org/10.1038/ncomms3078

- 210. Suriyanarayanan B., Sarojini Santhosh R. 2015. Docking analysis insights quercetin can be a non-antibiotic adjuvant by inhibiting Mmr drug efflux pump in *Mycobacterium sp.* and its homologue EmrE in *Escherichia coli. J. Biomol. Struct. Dyn.* **33** (8), 1819–1834.
- 211. Dey D., Ray R., Hazra B. 2015. Antimicrobial activity of pomegranate fruit constituents against drug-resistant *Mycobacterium tuberculosis* and β-lactamase producing *Klebsiella pneumoniae*. *Pharm. Biol.* 53 (10), 1474–1480.
- 212. Shukla H., Kumar V., Singh A.K., Rastogi S., Khan S.R., Siddiqi M.I., Manju Y. K. Md., Sohail A. 2015. Isocitrate lyase of *Mycobacterium tuberculosis* is inhibited by quercetin through binding at N-terminus. *Int. J. Biol. Macromol.* **78**, 137–141.
- 213. Sutter M.C., Wang Y.X. 1993. Recent cardiovascular drugs from Chinese medicinal plants. *Cardiovasc Res.* 27 (11), 1891–1901.
- 214. Zhang Z., Yan J., Xu K., Ji Z., Li L. 2015. Tetrandrine reverses drug resistance in isoniazid and ethambutol dual drug-resistant *Mycobacterium tuberculosis* clinical isolates. *BMC Infect. Dis.***15**, 153. https://doi.org/10.1186/s12879-015-0905-0
- 215. Jin J., Zhang J.Y., Guo N., Sheng H., Li L., Liang J.C., Wang X.-L., Yang L., Liu M.-Y., Xiu-Ping W., Lu Y. 2010. Farnesol, a potential efflux pump inhibitor in *Myco-bacterium smegmatis*. *Molecules*. **15** (11), 7750–7762.
- 216. Chen S., Huang H.Y., Cheng M.J., Wu C.C., Ishikawa T., Peng C.F., Hsun-Shou Ch., Chyi-Jia W., Ling W., Chenaf Sh. 2013. Neolignans and phenylpropanoids from the roots of *Piper taiwanense* and their antiplatelet and antitubercular activities. *Phytochemistry*. **93**, 203–209.
- 217. Chinsembu K.C. 2016. Tuberculosis and nature's pharmacy of putative anti-tuberculosis agents. *Acta. Trop.* **153**, 46–56.
- 218. Chen S., Cheng M.J., Wu C.C., Peng C.F., Huang H.Y., Chang H.S., Wang C.-J., Ih.-Sh. Chen. 2014. Three new phenylpropanoids from the roots of *Piper taiwan*ense and their inhibitory activities on platelet aggrega-

tion and *Mycobacterium tuberculosis*. Chem. Biodivers. **11** (5), 792–799.

- 219. Shiu W.K., Malkinson J.P., Rahman M.M., Curry J., Stapleton P., Gunaratnam M., Neidlea S., Mushtaqc S., Warnerc M., Dimitrios L., Basavannacharyae C., Bhaktae S., Schindlerf B.D., Seof S.M., Colemanf D., Kaatzfg G.W., Gibbonsa S. 2013. A new plant-derived antibacterial is an inhibitor of efflux pumps in *Staphy-lococcus aureus*. *Int. J. Antimicrob. Agents.* **42** (6), 513– 518.
- 220. Xu J., Tasneen R., Peloquin C.A., Almeida D.V., Li S.-Y., Barnes-Boyle K., Lu Y., Nuermberger E. 2017. Verapamil increases the bioavailability and efficacy of bedaquiline but not clofazimine in a murine model of tuberculosis. *Antimicrob. Agents Chemother.* 62 (1), e01692-17. https://doi.org/10.1128/AAC.01692-17
- 221. Gupta S., Tyagi S., Bishai W.R. 2015. Verapamil increases the bactericidal activity of bedaquiline against *Mycobacterium tuberculosis* in a mouse model. *Antimicrob. Agents Chemother.* **59** (1), 673–676.
- 222. Kardan-Yamchi J., Kazemian H., Haeili M., Harati A.A., Amini S., Feizabadi M.M. 2018. Expression analysis of 10 efflux pump genes in multidrug-resistant and extensively drug-resistant *Mycobacterium tuberculosis* clinical isolates. *J. Glob. Antimicrob. Resist.* 17, 201– 208.
- Lomovskaya O., Bostian K.A. 2006. Practical applications and feasibility of efflux pump inhibitors in the clinic A vision for applied use. *Biochem. Pharmacol.* **71** (7), 910–918.
- 224. Gandhi S., Fleet J.L., Bailey D.G., McArthur E., Wald R., Rehman F. 2013. Calcium-channel blockerclarithromycin drug interactions and acute kidney injury. *JAMA*. **310** (23), 2544–2553.
- 225. Nakajima A., Sugimoto Y., Yoneyama H., Nakae T. 2002. High-level fluoroquinolone resistance in *Pseudomonas aeruginosa* due to interplay of the MexABoprM efflux pump and the DNA gyrase mutation. *Microbiol. Immunol.* **46** (6), 391–395.

# Prospects and Obstacles for Clinical Use of the Inhibitors of *Mycobacterium tuberculosis* Efflux Pumps

# I. G. Felker<sup>1, \*</sup>, E. I. Gordeeva<sup>1</sup>, N. V. Stavitskaya<sup>1</sup>, V. A. Pershina<sup>1</sup>, Ya. R. Batyrshina<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Federal State Budgetary Institution "Novosibirsk Tuberculosis Research Institute" of the Ministry of Health of the Russian Federation, Novosibirsk, 630040 Russia \*e-mail: felkeririna.nniit@gmail.com

One of the mechanisms for the development of drug resistance in bacteria is the export of medicinal compounds by various efflux pumps (EP). The study of the mechanisms of regulation and inhibition of EP in *Mycobacterium tuberculosis* (MTB) is caused by the rapid spread of drug-resistant strains, especially in immunocompromised patients. This review details main EP families in prokaryotic cells; a special section is devoted to the description of the EP structure and mechanisms of the EP inhibition in MTB. The published data on genes encoding EPs in MTB, substrates exported by EPs, and known inhibitors of EPs are summarized. The analysis shows that, although the use of EP inhibitors as therapeutic agents is associated with many complex, currently unresolved problems, nevertheless, these compounds remain important and useful in modern medicine.

Keywords: efflux pumps, M. tuberculosis, efflux pump inhibitors

УДК 616.8-091.943

# ОСОБЕННОСТИ РАСПРЕДЕЛЕНИЯ ТРАНСМЕМБРАННОГО БЕЛКА ТМЕМ-119 В МИКРОГЛИОЦИТАХ КОРЫ ГОЛОВНОГО МОЗГА ЧЕЛОВЕКА ПРИ ФОРМИРОВАНИИ АМИЛОИДНЫХ БЛЯШЕК

© 2021 г. В. В. Гусельникова<sup>*a*, \*</sup>, Е. А. Федорова<sup>*a*</sup>, А. Е. Сафрай<sup>*b*</sup>, А. А. Рукавишникова<sup>*b*</sup>, Д. Э. Коржевский<sup>*a*</sup>

<sup>а</sup>Институт экспериментальной медицины, Санкт-Петербург, 197376 Россия <sup>b</sup>Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет имени академика И.П. Павлова Министерства здравоохранения Российской Федерации, Санкт-Петербург, 197022 Россия \*e-mail: Guselnicova. Valeriia@yandex.ru Поступила в редакцию 28.01.2021 г. После доработки 25.03.2021 г. Принята к публикации 26.03.2021 г.

Трансмембранный белок 119 (ТМЕМ-119) — охарактеризованный сравнительно недавно белок плазматической мембраны микроглиальных клеток с неизвестными функциями. Целью работы стало изучение особенностей распределения ТМЕМ-119 в микроглиоцитах коры головного мозга человека при развитии патологии альцгеймеровского типа. Материалом для исследования служили образцы коры головного мозга людей (мужчин и женщин) в возрасте от 85 до 98 лет (n = 7) с наличием амилоидных бляшек. С применением методов световой и конфокальной лазерной микроскопии показано, что в условиях формирования амилоидных бляшек популяция микроглиоцитов характеризуется морфологической гетерогенностью при иммуноокрашивании на ТМЕМ-119. Большинство клеток имеет выраженную дискретность распределения ТМЕМ-119 в отростках, что придает последним характерный вид "бусин на нитке". Часть микроглиоцитов коры вне амилоидных бляшек имеет признаки активации, такие как увеличение тела и утолщение отростков, которые утрачивают дискретность распределения ТМЕМ-119, но приобретают нитевидные выросты – филоподии. В области амилоидных бляшек выявляются преимущественно отростки микроглиоцитов, которые плотно оплетают бляшку, частично заходя в нее и формируя интенсивно окрашенные утолщения в области центрального кора. Проявлением фагоцитарной активности микроглии является наличие "фагоцитарных мешочков", обнаруженных на концах отростков клеток с помощью конфокальной лазерной микроскопии и метода трехмерной реконструкции. При иммунофлуоресцентном выявлении ТМЕМ-119 эти структуры выглядят как булавовидные расширения, часто содержащие неокрашенную область в центре. С применением функции сверхвысокого разрешения Airyscan показано, что TMEM-119 присутствует в мембране тела и отростков микроглиоцитов в виде дискретных микроструктур. С использованием двойной иммунофлуоресцентной реакции на ТМЕМ-119 и GFAP (маркерный белок астроглии) отмечено, что во всех исследованных образцах коры головного мозга присутствует астроглиальная реакция. Она выражается в накоплении GFAP в астроцитах, ассоциированных с амилоидными бляшками, и утолщении их отростков, что свидетельствует в пользу нейровоспалительной активации. Обнаруженная пространственная ассоциация реактивных астроцитов и активированных микроглиоцитов может быть морфологическим свидетельством сложного функционального взаимодействия этих клеток и их взаимного влияния, вносящего вклад в развитие нейровоспаления.

Ключевые слова: TMEM-119, микроглия, кора головного мозга человека, амилоидные бляшки, болезнь Альцгеймера

DOI: 10.31857/S0233475521040058

## введение

Микроглиальные клетки (или микроглия) – это особая популяция клеток центральной нервной системы (ЦНС), которые выполняют в ЦНС множество функций, связанных с поддержанием гомеостаза, развитием иммунного ответа и локального воспалительного процесса [1]. В настоящее время очевидна важная роль микроглии в регуляции состояния и работы нервной системы в норме и при патологии, в том числе при развитии нейродегенеративных заболеваний [2]. Результаты многочисленных исследований свидетельствуют о ключевой роли микроглии в патогенезе болезни Альцгеймера — хронического прогрессирующего нейродегенеративного заболевания, характерным гистопатологическим признаком которого является накопление в тканях головного мозга амилоидных (сенильных) бляшек. Сходные патоморфологические изменения могут наблюдаться в головном мозге человека при нормальном старении [3]. Формирование амилоидных бляшек как в ходе старения, так и при развитии болезни Альцгеймера сопровождается активацией микроглии, функции которой в этом случае остаются предметом дискуссий [4].

Одной из существенных проблем, возникающих при исследовании микроглии в условиях развития нейродегенерации, является правильная идентификация микроглиоцитов и корректная оценка их функционального статуса. Наиболее широко используемым иммуногистохимическим маркером микроглии сегодня остается кальций-связывающий белок Iba-1 (Iionized calcium-binding adapter molecule 1) [5, 6]. Hegocratком этого маркера является то, что, помимо микроглии, Iba-1 присутствует также в тканевых макрофагах мозга – менингеальных макрофагах. периваскулярных макрофагах и макрофагах сосудистого сплетения, которые отличаются от микроглии происхождением и функциями [7]. При развитии патологии мозга и повреждении гематоэнцефалического барьера макрофаги мигрируют в очаг воспаления и способны привлекать в него циркулирующие моноциты, которые впоследствии дифференцируются в новые макрофаги, также экспрессирующие Iba-1. Это сильно затрудняет исследование микроглии в условиях развития патологии мозга, так как с помощью иммуногистохимического окрашивания на Iba-1 различить между собой клетки активированной (амебоидной) микроглии и моноциты/макрофаги не представляется возможным.

В 2016 г. был предложен новый высокоспецифичный микроглиальный маркер – ТМЕМ-119 (transmembrane protein 119), представляющий собой трансмембранный белок с неизвестными функциями [8, 9]. В отличие от Iba-1, ТМЕМ-119 входит в состав плазматической мембраны исключительно микроглиальных клеток и не синтезируется макрофагами или другими типами иммунных клеток, а также отсутствует в нервных клетках, астроцитах и олигодендроцитах. Это делает ТМЕМ-119 удобным и надежным маркером для исследования микроглии в норме и при патологии [8, 9]. Целью представленной работы стало изучение особенностей распределения трансмембранного белка ТМЕМ-119 в микроглиоцитах коры головного мозга человека при развитии патологии альцгеймеровского типа.

#### МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Материалом для исследования служили образцы коры головного мозга людей (мужчин и женшин) в возрасте от 85 до 98 лет (n = 7) с наличием амилоидных бляшек. Патоморфологическая диагностика болезни Альцгеймера в соответствии с рекомендациями Национального института старения и Альцгеймеровской ассоциации [10] не проводилась. Образцы были получены в результате аутопсии, зафиксированы в 10% забуференном формалине и залиты в парафин по стандартной методике. Парафиновые блоки получены из архива Отдела общей и частной морфологии ФГБНУ "ИЭМ". На проведение исследования имеется разрешение локального этического комитета ФГБНУ "ИЭМ" (№ 3/18 от 22.11.2018 г). Иммуногистохимическое выявление ТМЕМ-119 проводили с использованием кроличьих поликлональных антител против этого белка (Abcam, Великобритания). Для светооптического исследования препараты инкубировали в растворе первичных антител (разведение 1 : 1000) в течение 60 ч при температуре 27°С, после чего применяли вторичные антитела против иммуноглобулинов кролика, конъюгированные с пероксидазой хрена (из набора Reveal Polyvalent HPR DAB Detection System, SpringBioscience, США). Визуализацию продукта реакции осуществляли с помощью 3,3-диаминобензидина (DAB). Часть срезов подкрашивали альциановым синим (BioVitrum, Pocсия) в течение 20 мин при комнатной температуре.

Для постановки иммунофлуоресцентной монореакции на ТМЕМ-119 после инкубации с первичными антителами (разведение 1 : 1000) и вторичными антителами, конъюгированными с пероксидазой хрена (из набора Reveal Polyvalent HPR DAB Detection System, SpringBioscience, разведение производителя), применяли антитела против пероксидазы хрена, конъюгированные с флуорохромом Су3 (разведение 1 : 100, Jackson ImmunoResearch, США). Ядра клеток подкрашивали ядерным флуоресцентным красителем SYTOX Green (разведение 1 : 100, Invitrogen, США).

Для одновременного выявления микроглии и амилоидных бляшек ставили двойную иммунофлуоресцентную реакцию с использованием смеси (1 : 1) кроличьих поликлональных антител против TMEM-119 (разведение 1 : 500, Abcam) и мышиных моноклональных (клон DE2B4) антител против бета-амилоидного пептида (разведение 1 : 100, Abcam). Для одновременного выявления микроглии и астроцитов применяли смесь (1 : 1) кроличьих поликлональных антител против TMEM-119 (разведение 1 : 500, Abcam) и мышиных моноклональных (клон GA5) антител против глиального фибриллярного кислого белка (GFAP), являющегося маркером астроглии (разведение 1 : 100, Biocare Medical, США). В качестве вторичных реагентов использовали смесь (1 : 1) антител против иммуноглобулинов кролика, конъюгированных с пероксидазой хрена (из набора Reveal Polyvalent HPR DAB Detection System, SpringBioscience, разведение производителя), и биотинилированных антител против иммуноглобулинов мыши (разведение 1 : 100, Jackson ImmunoResearch). Для визуализации реакций на срезы наносили смесь (1 : 1) антител против пероксидазы хрена, конъюгированных с флуорохромом Су3 (разведение 1 : 50, Jackson ImmunoResearch), и стрептавидина, конъюгированного с флуорохромом Су2 (разведение 1 : 50, Jackson ImmunoResearch).

Анализ и фотографирование полученных препаратов проводили с использованием светового микроскопа Leica DM750 (Leica Microsystems, Германия) и конфокального лазерного микроскопа LSM800 с системой сверхвысокого разрешения Airyscan (Zeiss, Германия), а также компьютерных программ LAS EZ (Leica Microsystems) и ZEN2012 (Zeiss). Для возбуждения флуоресценции Cy2 и SYTOX Green применяли диодный лазер с длиной волны 488 нм, для Cy3 – диодный лазер с длиной волны 561 нм.

# РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

При анализе полученных препаратов в проходящем свете было отмечено, что постановка иммунопероксидазной реакции на ТМЕМ-119 позволяет селективно выявлять отростчатые клетки с морфологическими признаками микроглиоцитов (рис. 1). Было показало, что популяция микроглиоцитов в коре головного мозга человека при развитии патологии альцгеймеровского типа характеризуется морфологической гетерогенностью при иммуноокрашивании на ТМЕМ-119. Для большинства выявленных клеток характерна выраженная дискретность распределения ТМЕМ-119 в отростках (рис. 1а), которая отчетливо видна даже на малом увеличении микроскопа (×10). Отростки таких микроглиоцитов имеют вид "бусин на нитке" – они состоят из округлых темноокрашенных скоплений разного размера, соединенных более светлыми и тонкими участками (рис. 1*a*). Тела микроглиоцитов, попавшие в плоскость среза, характеризуются равномерной интенсивной окраской при реакции на ТМЕМ-119. Иногда в центральной области тела клетки просматривается светлая зона — это место локализации ядра (рис. 1*a*, стрелка). На некоторых участках среза визуализируются только отростки микроглиоцитов. При этом не вполне понятно, от каких микроглиальных клеток они отходят, так как тела клеток не попадают в плоскость среза.

Ранее было показано, что при иммуноокрашивании на TMEM-119 микроглия с аналогичной морфологией преобладает в коре головного мозга

людей без неврологических заболеваний [9]. Это позволяет сделать вывод, что описанная морфология соответствует рамифицированной (покояшейся) микроглии. Косвенно это подтверждается тем, что в участках коры, содержащих такой морфологический тип микроглии, нами не было обнаружено скоплений амилоида. Открытым остается вопрос о том, с чем связаны наблюдаемые особенности распределения продукта иммуногистохимической реакции на ТМЕМ-119 в микроглиоцитах. Однородное окрашивание тела клеток, вероятно, обусловлено равномерным распределением и высокой плотностью молекул ТМЕМ-119 в этой локализации. Морфологическая картина "бусин на нитке", характерная для отростков этих клеток, может быть следствием концентрирования ТМЕМ-119 в определенных участках мембраны отростков микроглиальных клеток. Возможно, ТМЕМ-119 является одним из белков, ассоциированных с липидными рафтами, как это показано для некоторых других белков мембраны микроглиоцитов [11]. Вероятно, характер распределения ТМЕМ-119 в мембране тел и отростков микроглиальных клеток определяется функциями этого белка, которые в настоящее время остаются неизвестными.

При дальнейшем анализе полученных препаратов было отмечено, что часть выявленных микроглиоцитов коры по морфологическим характеристикам отличается от описанных выше (рис.  $1\delta$ ). Размеры этих клеток визуально больше, тело увеличено, отростки длинные, утолщенные и умеренно ветвящиеся. На их поверхности присутствуют многочисленные нитевидные выросты филоподии, которые придают отросткам характерный "мохнатый" вид (рис. 16). И тела, и отростки выявленных микроглиоцитов характеризуются высокоинтенсивной окраской при постановке иммуногистохимической реакции на ТМЕМ-119. Причем окраска отростков выглядит сплошной – дискретность распределения ТМЕМ-119 ("бусины на нитке") в данном случае не просматривается. Клетки с такой морфологией были выявлены в разных участках коры как поодиночке, так и в виде небольших скоплений (рис. 1б).

Утолщение отростков и увеличение размеров тела клетки являются известными признаками активации микроглии [5]. Филоподии, описанные ранее при проведении электронно-микроскопических исследований, необходимы микроглиоцитам для прикрепления к субстрату и последующей миграции, что также характерно для активированной микроглии [12–14]. Эти данные позволяют заключить, что выявленные нами микроглиальные клетки находятся в активированном состоянии. Классическим проявлением активации считается формирование амебоидной микроглиоциты



**Рис. 1.** Микроглия коры головного мозга человека при патологии альцгеймеровского типа (световая микроскопия). Иммуногистохимическая реакция на ТМЕМ-119 с подкраской альциановым синим. Покоящаяся микроглия (*a*) и микроглия с признаками активации (б) в участках коры, не содержащих амилоидных скоплений. *в*, *е* – Микроглия в области амилоидной бляшки. Стрелка указывает на тело микроглиоцита. Масштабный отрезок равен 50 мкм.

не могут быть отнесены к такому типу клеток, так как имеют длинные ветвящиеся отростки. Возможно, они являются одной из переходных форм микроглии. Это согласуется с литературными данными, согласно которым активация и инактивация микроглии сопровождаются формированием разнообразных переходных форм микроглиальных клеток, имеющих по одному или по два утолщенных и в разной степени разветвленных отростка [6]. Такие микроглиоциты принято считать клетками с разной степенью активации. При этом связь между определенной морфологией и функциональной активностью микроглии остается не до конца изученной, поэтому судить о степени активации микроглии только по морфологическим признакам не представляется возможным [6].

Важно отметить, что скопления микроглиоцитов с признаками активации были выявлены в тех участках коры, где отсутствовали сформированные амилоидные бляшки (рис.  $1\delta$ ). Это указывает на то, что активация микроглии в данном случае

БИОЛОГИЧЕСКИЕ МЕМБРАНЫ том 38 № 5 2021

происходит не напрямую (через непосредственный контакт клеток с фибриллами амилоида), а опосредованно (например, через сигнальные молекулы, синтезируемые другими клетками глии, или вследствие потери контактов микроглиоцитов с нейронами из-за гибели последних).

Подкраска альциановым синим, использованная нами после постановки иммуногистохимической реакции на ТМЕМ-119, дает возможность идентифицировать скопления амилоида в коре. В данном случае они приобретают синее окрашивание за счет взаимодействия молекул красителя с полианионами кислых гликозамингликанов, которые вовлечены в процесс агрегации бетаамилоида в нерастворимые фибриллы [15]. При изучении участков коры, содержащих амилоидные бляшки, было отмечено, что для одних скоплений характерно наличие интенсивно окрашенной центральной области (кора) и волокнистого ореола, расположенного вокруг нее (рис. 1в). Другие скопления сформированы только волокнистыми структурами (без выраженной центральной области) (рис. 1*г*). Наблюдаемые морфологические различия связаны, вероятно, с различиями в плотности упаковки бета-амилоидных фибрилл, которая определяет разницу в количестве и плотности ассоциированных с этими фибриллами гликозамингликанов.

При анализе взаимного расположения микроглии и скоплений амилоида в коре головного мозга было отмечено, что в области амилоидных бляшек присутствуют крупные ТМЕМ-119-иммунопозитивные структуры (рис. 16, 1г). В большинстве случаев эти структуры выглядят как сильно утолщенные и укороченные отростки микроглиальных клеток, тянущиеся в направлении амилоидной бляшки и окружающие ее по периферии. В центральной области бляшки отростки микроглиоцитов формируют крупные расширения, темноокрашенные в черно-коричневый цвет. Эти расширения заходят в область центрального кора, окружая его (рис. 1в). Интересным наблюдением стало то, что на препаратах, подкрашенных альциановым синим, те части отростков микроглиоцитов, которые непосредственно заходят в область центрального кора бляшки, выглядят значительно более темноокрашенными по сравнению с аналогичными участками на препаратах без подкраски альциановым синим. Это может объясняться тем, что краситель альциановый синий содержит в своем составе ионы меди, а медь, в свою очередь, является известным усилителем хромогена DAB, использованного в данном исследовании для визуализации продукта иммуногистохимической реакции. Добавление металла повышает осаждение продукта реакции DAB и придает осадку более темный цвет [16]. В тех случаях, когда у бляшки отсутствует выраженный центральный кор, продукт иммуногистохимической реакции выглядит более рассредоточенным - отростки микроглии оплетают волокнистый компонент бляшки наподобие клубка с формированием небольших варикозностей (рис. 1г).

Важно отметить, что при анализе препаратов различить тела клеток микроглии, отростки которых окружают амилоидные бляшки, удается лишь в единичных случаях. Иногда создается впечатление, что тело клетки присутствует на периферии бляшки, но имеет амебоидную форму (рис. 1e, стрелка), вследствие чего оно плохо различимо среди многочисленных плотно расположенных утолщенных отростков микроглии. В большинстве таких случаев выявить удается тело лишь одной клетки, в то время как иммунопозитивные отростки микроглиоцитов оплетают бляшку со всех сторон. Определить, от каких клеток эти отростки тянутся, не представляется возможным (рис. 1e, 1e).

Постановка иммунофлуоресцентной реакции на ТМЕМ-119 и последующий анализ препаратов методом конфокальной лазерной микроскопии позволили более детально изучить особенности распределения этого белка в микроглиальных клетках. Как и в случае светооптического исследования, было отмечено присутствие в коре головного мозга человека двух морфологически различных типов микроглиальных клеток. Для большинства обнаруженных микроглиоцитов была характерна дискретность распределения ТМЕМ-119 в отростках (рис. 2а, стрелка), что придавало им вид "бусин на нитке", описанный при использовании светового микроскопа. Другие микроглиоциты характеризовались относительно равномерным распределением ТМЕМ-119 в теле и отростках (рис. 26).

В отростках некоторых клеток было отмечено присутствие выраженных расширений, содержащих ТМЕМ-119 (рис. 2а, головка стрелки). Эти структуры присутствовали преимущественно на концах отростков микроглиоцитов и характеризовались округлой или булавовидной формой. ТМЕМ-119 в этих расширениях часто был распределен по периферии, а в центральной области не выявлялся. Сходные структуры были описаны Sierra и соавт. [17] в исследовании, посвященном изучению роли микроглии в процессах нейрогенеза в гиппокампе мыши. Авторы указывают на то, что при активации некоторые микроглиальные клетки формируют т.н. "фагоцитарные мешочки" (phagocytic pouch), которые на представленных Sierra и соавт. трехмерных реконструкциях выглядят аналогично структурам, обнаруженным нами в мозге человека. Согласно Sierra и соавт., такие "мешочки" являются особой модификацией отростков микроглии и предназначены для осуществления этими клетками фагоцитоза [17]. "Мешочки" представляют собой расширения на концах отростков микроглиоцитов, которые вплотную примыкают к апоптотическому тельцу с целью его последующего фагоцитирования [18]. Результаты проведенных иммуноэлектронномикроскопических исследований показали, что "мешочки" формируются в результате скопления в этих участках отростков цитоплазмы и органелл (преимущественно, аппарата Гольджи и лизосом). Органеллы занимают центральную область расширения, в результате чего она оказывается неокрашенной при постановке иммуногистохимической реакции на Iba-1. Продукт реакции в ланном случае сконцентрирован на периферии "мешочка" [18]. Аналогичные данные были получены нами при постановке иммуногистохимической реакции на ТМЕМ-119. "Фагоцитарные мешочки" в отростках микроглиоцитов коры головного мозга человека при развитии патологии альцгеймеровского типа описаны впервые. Их образование, вероятно, связано с необходимо-



**Рис. 2.** Микроглия коры головного мозга человека при патологии альцгеймеровского типа (конфокальная микроскопия). Иммунофлуоресцентная реакция на TMEM-119 (красная флуоресценция) с подкраской ядерным флуоресцентным красителем SYTOX Green (зеленая флуоресценция). Трехмерная реконструкция серии оптических срезов. Стрелка указывает на участок отростка микроглиоцита с выраженным дискретным распределением TMEM-119, головка стрелки – на фагоцитарный мешочек. Размер ячеек масштабной сетки составляет 20 × 20 мкм (*a*) и 10 × 10 мкм (*б*).

стью очистки нервной ткани от остатков нервных клеток, массово гибнущих при развитии процесса нейродегенерации, ассоциированного с накоплением в тканях мозга амилоида.

С применением системы сверхвысокого разрешения Airyscan было показано, что TMEM-119 присутствует в мембране тела и отростков микроглиоцитов в виде дискретных микроструктур. Выявленные агрегаты белка имеют размеры менее 1 мкм и относительно равномерно распределены в мембране микроглиоцитов (рис. 3, красная флуоресценция).

На препаратах, полученных после постановки двойной иммунофлуоресцентной реакции на ТМЕМ-119 и бета-амилоид, были проанализированы морфологические особенности микроглиоцитов, окружающих амилоидные бляшки (рис. 4). В телах и отростках микроглиоцитов, ассоциированных с амилоидными бляшками, ТМЕМ-119 распределен относительно равномерно и с высокой плотностью. Отростки этих клеток утолщены и умеренно ветвятся. Морфологическая картина "бусин на нитке" в данном случае не просматривается. На полученных трехмерных реконструкциях хорошо прослеживаются ветвление и пространственная ориентация отростков микроглиоцитов (рис. 4, красная флуоресценция). Как и при проведении светооптического исследования, в большинстве случаев вблизи амилоидной бляшки (рис. 4, зеленая флуоресценция) удается визуализировать тело только одной микроглиальной клетки. От него отходят отростки, которые оплетают бляшку по периферии и дают ответвления как в глубь бляшки, так и в противоположную сторону (в окружающий нейропиль) (рис. 4, красная флуоресценция).

В большинстве случаев с амилоидной бляшкой ассоциирован лишь один микроглиоцит, тело которого локализовано вблизи бляшки, а отходящие от него отростки ветвятся и охватывают бляшку со всех сторон, проходя между амилоидными фибриллами к центральному кору и давая ответвления в окружающую ткань. Вероятно, именно это создает впечатление отростков, тянущихся к бляшке с разных сторон, наблюдаемое при светооптическом исследовании. И именно этим объясняется тот факт, что на светооптическом уровне бляшка выглядит окруженной только отростками (но не телами) микроглиоцитов.

Функциональное значение ассоциации микроглии с амилоидными бляшками остается предметом дискуссий. Ранее было показано, что появление в тканях мозга скоплений бета-амилоида индуцирует активацию микроглиальных клеток, что запускает процесс нейровоспаления. В ходе развития патологии активированная микроглия может приобретать разные фенотипы – провоспалительный (М1) или противовоспалительный (М2). Считается, что М2 микроглия выполняет нейропротекторную функцию – она способна поглощать и утилизировать растворимые формы бета-амилоида, фагоцитировать нерастворимые фибриллярные отложения, уплотнять протофибриллярные формы бета-амилоида в центральный



**Рис. 3.** Распределение ТМЕМ-119 в мембране тела микроглиоцита. Иммунофлуоресцентная реакция на ТМЕМ-119 с подкраской ядерным флуоресцентным красителем SYTOX Green. Агрегаты ТМЕМ-119 – красная флуоресценция, ядро микроглиоцита – зеленая флуоресценция. Конфокальная лазерная микроскопия с использованием системы сверхвысокого разрешения Airyscan. Одиночный оптический срез. Масштабный отрезок равен 2 мкм.



**Рис. 4.** Микроглиоцит вблизи амилоидной бляшки в коре головного мозга человека. Двойная иммунофлуоресцентная реакция на TMEM-119 (красная флуоресценция) и бета-амилоид (зеленая флуоресценция). Конфокальная лазерная микроскопия. Трехмерная реконструкция серии оптических срезов. Масштабный отрезок равен 10 мкм.



**Рис. 5.** Микроглия и астроциты в области амилоидной бляшки при патологии альцгеймеровского типа. Двойная иммунофлуоресцентная реакция на TMEM-119 (красная флуоресценция) и GFAP (зеленая флуоресценция). Стрелка указывает на микроглиоцит с разветвленной морфологией, головка стрелки – на микроглиоцит с амебоидной морфологией. Конфокальная лазерная микроскопия. Одиночный оптический срез. Масштабный отрезок равен 20 мкм.

кор бляшки, уменьшая таким образом количество олигомерного бета-амилоида, который оказывает наибольшее токсическое возлействие на нейроны [19, 20]. За счет этого микроглия ограничивает нейротоксичность амилоидных отложений и уменьшает аксональную дистрофию в соседнем нейропиле. Возрастное увеличение количества и размеров амилоидных бляшек, а также воздействие провоспалительных цитокинов, таких как IFN- $\gamma$ , IL-1 $\beta$  и TNF- $\alpha$ , переводят микроглию в провоспалительное состояние (М1 фенотип). М1 микроглия синтезирует оксид азота и провоспалительные цитокины (TNF-α, IL-1β, IL-12), которые потенциально токсичны для нейронов [19–21]. Согласно современным представлениям, поляризация микроглии при развитии нейродегенеративных заболеваний представляет собой сложный динамичный процесс, сопровождающийся постоянной сменой фенотипов микроглии в зависимости от стадии и тяжести течения заболевания. Вероятно, существует целый ряд промежуточных (между M1 и M2) состояний активации микроглии, каждое из которых характеризуется экспрессией разных маркеров, секрецией разных молекул и выполнением разных функций [21–23]. Возможно, именно этим объясняется тот факт, что ТМЕМ-119-иммунопозитивная микроглия в головном мозге людей с болезнью Альцгеймера стабильно не экспрессирует маркеры поляризации, строго специфичные для М1 или M2 фенотипа [9].

Процесс нейровоспаления связан с активацией еще одной популяции глиальных клеток – астроцитов. После постановки двойной иммунофлуоресцентной реакции на TMEM-119 и GFAP, являющийся маркерным белком астроглии, нами было отмечено присутствие в коре головного мозга как нормальных (неактивированных) астроцитов, так и клеток с признаками реактивной активации (рис. 5, зеленая флуоресценция). Реактивные астроциты характеризуются гипертрофией тел и отростков и высокоинтенсивной реакцией на GFAP. Они формируют выраженные скопления, состоящие из тел астроцитарных клеток, локализованных по периферии, и их отростков, образующих центральную область скопления (рис. 5, зеленая флуоресценция). Согласно литературным данным, такие астроцитарные скопления формируются в коре головного мозга вокруг амилоидных бляшек [23–25].

В проведенных нами исследованиях скопления реактивных астроцитов были обнаружены во всех изученных образцах коры. В ряде случаев нами было отмечено присутствие в центральной области таких скоплений (т.е. в предполагаемом месте локализации амилоидной бляшки) микроглиоцита с морфологическими признаками активации (рис. 5, красная флуоресценция, головка стрелки). Такая микроглиальная клетка характеризуется амебоидной формой тела и отсутствием ветвящихся отростков, а также высокоинтенсивной реакцией на ТМЕМ-119. В цитоплазме микроглиоцита присутствуют обширные "пустоты" – области, лишенные ТМЕМ-119, формирование которых может быть следствием фагоцитарной активности этой клетки. На периферии скопления присутствуют микроглиоциты с разветвленной морфологией (рис. 5, красная флуоресценция, стрелка), находящиеся в пространственной взаимосвязи с отростками астроглиальных клеток, окружающих амилоидную бляшку.

Как и в случае с микроглией, пространственная ассоциация реактивных астроцитов с амилоидными бляшками имеет двойственную роль. С одной стороны, показано, что активированные астроциты могут участвовать в деградации и удалении бета-амилоида. С другой стороны, многочисленные экспериментальные данные свидетельствуют о том, что при определенных условиях (под влиянием TGF-1 $\beta$ , IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ ) астроциты сами способны продуцировать бетаамилоид, внося тем самым существенный вклад в общее количество амилоида в мозге. Наконец, имеются свидетельства того, что реактивные астроциты, окружающие амилоидные бляшки, утрачивают свои нейротрофические функции и приобретают нейротоксические свойства за счет синтеза ряда цитокинов (IL-1, IL-6, TNF-α и др.), продукция которых усиливает нейродегенерацию [24, 25].

Наблюдаемая пространственная ассоциация реактивных астроцитов и активированных микроглиоцитов является морфологическим свидетельством сложного функционального взаимодействия этих клеток и их взаимного влияния, вносящего вклад в развитие нейровоспаления [23].

Таким образом, в ходе проведенного исследования нами впервые были изучены особенности распределения трансмембранного белка TMEM-119 в микроглиоцитах коры головного мозга человека при патологии альцгеймеровского типа и описаны морфофункциональные характеристики этих клеток при использовании иммуноокрашивания на TMEM-119. Было показано, что популяция микроглиоцитов характеризуется гетерогенностью в отношении распределения TMEM-119 в телах и отростках клеток, что может быть связано со степенью активации микроглии, а также с функциями TMEM-119 в норме и при патологии.

Часть представленных изображений получена с помощью оборудования Центра коллективного пользования научным оборудованием "Микробиом человека" при Федеральном государственном бюджетном научном учреждении "Институт экспериментальной медицины".

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Источники финансирования. Работа В.В. Гусельниковой поддержана грантом Президента Российской Федерации для поддержки молодых российских ученых — кандидатов наук (MK-560.2020.7).

Соответствие принципам этики. Работа выполнена в соответствии с этическими нормами (заключение локального этического комитета ФГБНУ "ИЭМ" № 3/18 от 22.11.2018 г.).

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Villani A., Peri F. Microglia: Picky brain eaters. *Dev. Cell.* 2019. 48 (1), 3–4. https://doi.org/10.1016/j.devcel.2018.12.013
- Chowen J.A., Garcia-Segura L.M. 2020. Microglia, neurodegeneration and loss of neuroendocrine control. *Prog Neurobiol.* 184, 101720. https://doi.org/10.1016/j.pneurobio.2019.101720
- Kumar A., Singh A., Ekavali E. 2015. A review on Alzheimer's disease pathophysiology and its management: An update. *Pharmacol. Rep.* 67 (2), 195–203. https://doi.org/10.1016/j.pharep.2014.09.004
- 4. Hemonnot A.-L., Hua J., Ulmann L., Hirbec H. Microglia in Alzheimer disease: Well-known targets and new opportunities. 2019. *Front. Aging Neurosci.* **11**, 233. https://doi.org/10.3389/fnagi.2019.00233
- Alekseeva O.S., Kirik O.V., Gilerovich E.G., Korzhevskii D.E. Microglia of the brain: Origin, structure, functions. 2019. J. Evol. Biochem. Phys. 55, 257–268. https://doi.org/10.1134/S002209301904001X
- 6. Kolos E., Korzhevsky D. Spinal cord microglia in health and disease. 2020. *Acta Naturae*. **12** (1), 4–17.
- Bennett M.L., Bennett F.C. 2020. The influence of environment and origin on brain resident macrophages and implications for therapy. *Nature Neuroscience*. 23, 157–166.
   https://doi.org/10.1028/s41502.010.0545\_6
  - https://doi.org/10.1038/s41593-019-0545-6
- Bennett M., Bennett F., Liddelow S., Ajami B., Zamanian J., Fernhoff N., Mulinyawe S., Bohlen C., Adil A., Tucker A., Weissman I., Chang E., Li G., Grant G., Gephart M., Barres B. 2016. New tools for studying microglia in the mouse and human CNS. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **113**, E1738–E1746. https://doi.org/10.1073/pnas.1525528113
- 9. Satoh J., Kino Y., Asahina N., Takitani M., Miyoshi J., Ishida T., Saito Y. 2016. TMEM119 marks a subset of mi-

croglia in the human brain. *Neuropathology*. **36**, 39–49. https://doi.org/10.1111/neup.12235

- Montine T.J., Phelps C. H., Beach T.G., Bigio E.H., Cairns N.J., Dickson D.W., Duyckaerts C., Frosch M.P., Masliah E., Mirra S.S., Nelson P.T., Schneider J.A., Thal D., Trojanowski J.Q., Vinters H.V., Hyman B.T. 2012. National institute on aging—Alzheimer's association guidelines for the neuropathologic assessment of Alzheimer's disease: A practical approach. *Acta Neuropathologica*. **123**, 1–11. https://doi.org/10.1007/s00401-011-0910-3
- Miller Y., Navia-Pelaez J., Corr M., Yaksh T. 2020. Lipid rafts in glial cells: Role in neuroinflammation and pain processing. *J. Lipid Res.* 61 (5), 655–666. https://doi.org/10.1194/jlr.TR119000468
- 12. Sturrock R.R. Microglia in the prenatal mouse neostriatum and spinal cord. 1981. J. Anat. 133 (Pt4), 499– 512.
- Tseng C.Y., Ling E.A., Wong W.C. Scanning electron microscopy of amoeboid microglial cells in the transient cavum septum pellucidum in pre- and postnatal rats. 1983. *J. Anat.* 136 (Pt2), 251–163.
- 14. Ghosh P., Ghosh A. Morphological and behavioural variation in CNS innate defence cell microglia is development and age sensitive. 2016. *Neuroimmunology and Neuroinflammation*. 2 (3), 38–47. https://doi.org/10.20517/2347-8659.2015.32
- Snow A.D., Willmer J.P., Kisilevsky R. 1987. Sulfated glycosaminoglycans in Alzheimer's disease. *Hum Pathol.* 18 (5), 506–510. https://doi.org/10.1016/s0046-8177(87)80036-9
- Kumar G.L., Rudbeck L. 2009. *Education guide: Immunohistochemical staining methods: Pathology*. Dako North America, 160 p.
- Sierra A., Encinas J., Deudero J., Chancey J., Enikolopov G., Overstreet-Wadiche L., Tsirka S., Maletic-Savatic M. Microglia shape adult hippocampal neurogenesis through apoptosis-coupled phagocytosis. 2010.

*Cell Stem Cell.* **7** (4), 483–495. https://doi.org/10.1016/j.stem.2010.08.014

 Liaury K., Miyaoka T., Tsumori T., Furuya M., Wake R., Ieda M., Tsuchie K., Taki M., Ishihara K., Tanra A.J., Horiguchi J. Morphological features of microglial cells in the hippocampal dentate gyrus of Gunn rat: A possible schizophrenia animal model. *J Neuroinflammation*. 9, 56.

https://doi.org/10.1186/1742-2094-9-56

- Condello C., Yuan P., Schain A., Grutzendler J. 2015. Microglia constitute a barrier that prevents neurotoxic protofibrillar Aβ42 hotspots around plaques. J. Nat. Commun. 6, 6176. https://doi.org/10.1038/ncomms7176
- Hansen D., Hanson J., Sheng M. 2018. Microglia in Alzheimer's disease. J. Cell Biol. 217 (2), 459–472. https://doi.org/10.1083/jcb.201709069
- Tang Y., Le W. 2016. Differential roles of M1 and M2 microglia in neurodegenerative diseases. *Mol. Neurobiol.* 53 (2), 1181–1194. https://doi.org/10.1007/s12035-014-9070-5
- 22. Yao K., Zu H.-B. 2020. Microglial polarization: Novel therapeutic mechanism against Alzheimer's disease. *Inflammopharmacology.* 28 (1), 95–110. https://doi.org/10.1007/s10787-019-00613-5
- Kwon H.S., Koh S.H. Neuroinflammation in neurodegenerative disorders: The roles of microglia and astrocytes. 2020. *Transl. Neurodegener.* 9, 42. https://doi.org/10.1186/s40035-020-00221-2
- 24. González-Reyes E.R., Nava-Mesa M.O., Vargas-Sánchez K., Ariza-Salamanca D., Mora-Muñoz L. 2017. Involvement of astrocytes in Alzheimer's disease from a neuroinflammatory and oxidative stress perspective. *Front. Mol. Neurosci.* **10**, 427. https://doi.org/10.3389/fnmol.2017.00427
- Perez-Nievas G.B., Serrano-Pozo A. 2018. Deciphering the astrocyte reaction in Alzheimer's disease. *Front. Aging Neurosci.* 10, 114. https://doi.org/10.3389/fnagi.2018.00114

# Distribution of Transmembrane Protein 119 (TMEM-119) in Microgliocytes of Human Cerebral Cortex with Amyloid Plaques

V. V. Guselnikova<sup>1, \*</sup>, E. A. Fedorova<sup>1</sup>, A. E. Safray<sup>2</sup>, A. A. Rukavishnikova<sup>2</sup>, D. E. Korzhevskii<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Institute of Experimental Medicine, St. Petersburg, 197376 Russia <sup>2</sup>Pavlov First St.-Petersburg State Medical University, St. Petersburg, 197022 Russia \*e-mail: Guselnicova.Valeriia@yandex.ru

Transmembrane protein 119 (TMEM-119) is a newly characterized plasma membrane protein of microglial cells with unknown functions. Here, we analyzed distribution of TMEM-119 in microgliocytes of the human cerebral cortex with amyloid plaques. Samples of cerebral cortex were obtained from autopsied brains of men and women aged 85 to 98 years (n = 7). Using light microscopy and confocal laser microscopy, we demonstrate that TMEM-119-immunostained microglial cells are morphologically heterogeneous. Most microgliocytes have a discrete distribution of TMEM-119 in the processes, so the latter look like beads on a string. Some of the microgliocytes of the cortex outside the amyloid plaques have signs of activation, such as an enlargement of the body and thickening of processes, which lose the discrete distribution of TMEM-119, but acquire filamentous outgrowths – filopodia. In the areas of amyloid plaques, the processes of microgliocytes are mainly detected. They tightly braid the plaque, partially enter it and form intensely stained thickenings. The phagocytic activity of microglia is manifested in the formation of "phagocytic pouches" at the ends of

## ГУСЕЛЬНИКОВА и др.

cell processes, as is detected by confocal laser microscopy and three-dimensional reconstruction. Immunofluorescence microscopy reveals these structures as clavate thickenings, often containing TMEM-119-immunonegative area in the center. Using Airyscan super-resolution microscopy, we found that TMEM-119 is present in the microglial plasma membrane as discrete microstructures. Using double TMEM-119/GFAP immunofluorescence staining, we detected amyloid plaque-associated reactive astrocytes in all cases. Reactive astrocytes showed a number of features that indicate neuroinflammation, including hypertrophy of astrocytic processes and GFAP upregulation. Reactive astrocytes were identified in spatial association with activated microgliocytes in amyloid plaques. These observations illustrate functional interactions of these cells and their joint contribution to neuroinflammation.

Keywords: TMEM-119, microglia, human cerebral cortex, amyloid plaques, Alzheimer's disease
УДК 577.336

# ФЛУОРЕСЦЕНТНЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ СТРУКТУРНО-ДИНАМИЧЕСКИХ ПАРАМЕТРОВ МЕМБРАН МИТОХОНДРИЙ ПЕЧЕНИ КРЫС ПРИ ГИПОТЕРМИИ РАЗЛИЧНОЙ ДЛИТЕЛЬНОСТИ

© 2021 г. Р. А. Халилов<sup>а</sup>, С. И. Хизриева<sup>а</sup>, А. М. Джафарова<sup>а, \*</sup>, В. Р. Абдуллаев<sup>а</sup>

<sup>а</sup>Дагестанский государственный университет, г. Махачкала, 367000 Россия \*e-mail: albina19764@mail.ru Поступила в редакцию 14.12.2020 г. После доработки 27.03.2021 г. Принята к публикации 29.03.2021 г.

В последние годы гипотермию различной глубины и длительности все чаше используют в медицинской практике для защиты органов и тканей от повреждений, вызванных гипоксией, ишемией и реперфузией. Однако начальные этапы гипотермии индуцируют окислительный стресс, в развитии которого ключевая роль принадлежит митохондриям. Целью данной работы является исследование эффектов гипотермии различной длительности на структурно-динамические параметры митохондрий, которые определялись с помощью флуоресцентных зондов – пирена и 1-анилинонафталин-8-сульфоната (АНС). Обнаружено, что кратковременная гипотермия и ее пролонгирование увеличивают коэффициент эксимеризации пирена в аннулярных и общих липидах митохондриальных мембран, что указывает на снижении их микровязкости. При пролонгированной гипотермии увеличивается коэффициент полярности микроокружения пирена в общих липидах, в то время как в аннулярных данный показатель не претерпевает каких-либо изменений. Исследование кинетики связывания флуоресцентного зонда АНС с митохондриями печени крыс демонстрирует нелинейный характер зависимости интенсивности флуоресценции зонда от его концентрации. Это указывает на наличие в мембранах митохондрий как минимум двух гетерогенных участков связывания. Кратковременная гипотермия и ее пролонгирование снижают интенсивность флуоресценции АНС при всех исследованных концентрациях зонда. Это снижение обусловлено изменениями кинетических параметров связывания зонда с различными участками мембранных белков: для участков 1-го типа — снижением числа мест связывания зонда ( $N_1$ ), а для участков 2-го типа — повышением константы диссоциации зонда (*Kd*<sub>2</sub>). Таким образом, гипотермия индуцирует ряд существенных изменений в физическом состоянии липидной матрицы митохондриальных мембран, а также в структурной организации и локализации мембранных белков. Выраженность некоторых из этих изменений зависит от длительности воздействия низкотемпературного фактора.

**Ключевые слова:** крысы, гипотермия, митохондрии, мембрана, флуоресценция, АНС, пирен **DOI:** 10.31857/S023347552104006X

### введение

В последние годы гипотермические состояния нашли широкое применение в медицинской практике. Многочисленные исследования демонстрируют эффективность использования гипотермии при операциях на сердце и мозге [1, 2], инсульте, инфаркте, неонатальной гипоксии [3, 4], травмах [5, 6]. Оказалось, что гипотермия способствует защите различных органов и тканей от последствий их гипоксических, ишемических и реперфузионных повреждений. Протекторный эффект гипотермии обусловлен снижением температуры тела, в результате которого снижаются скорости метаболических процессов и уменьшаются потребности тканей в кислороде и глюкозе [7]. В терапевтических целях чаще всего используют умеренную гипотермию [8]. Однако следует учесть, что сама по себе гипотермия является экстремальным состоянием для гомойотермного организма [5] и может привести к развитию ряда патологических процессов, выраженность которых может зависеть от длительности воздействия низкотемпературного фактора. В связи с этим для разработки надлежащего эффективного лечения возникает необходимость тщательного и всестороннего изучения всех изменений, которые происходят в организме на различных временных отрезках его охлаждения.

Обнаружено, что снижение температуры тела крыс до 30°C сопровождается развитием оксида-

тивного стресса с последующей интенсификацией свободнорадикальных процессов (СРП) [9, 10]. Известно, что ключевую роль в индукции СРП играют активные формы кислорода (АФК), образующиеся в электрон-транспортной цепи (ЭТЦ) митохондрий [11]. Гипотермия может оказывать влияние на функциональную активность ферментов ЭТЦ и скорость передачи электронов во внутренней мембране митохондрий. Ранее нами было обнаружено, что умеренная гипотермия приводит к существенному повышению скорости дыхания и снижению коэффициента окислительного фосфорилирования митохондрий печени крыс. При этом наряду с изменениями респираторных характеристик [12, 13] увеличиваются vровни маркеров окислительного стресса продуктов перекисного окисления липидов (ПОЛ) и окислительной модификации белков (ОМБ) [14].

Причинами интенсификации дыхания митохондриями могут быть как структурно-конформационные перестройки дыхательных белков ЭТЦ, так и изменения проницаемости митохондриальных мембран. Возможно, что определенную роль в этих процессах играют и сами АФК, которые посредством ОМБ и ПОЛ могут стать причиной модификации структурно-динамических параметров митохондрий.

Чувствительным и информативным методом для исследования изменений физико-химических параметров биологических мембран является метод флуоресцентного зондирования. Известно, что интенсивность зондовой флуоресценции может зависеть от полярности и заряда мембран, количества гидрофобных карманов и конформации белков, мембранного потенциала, фазового состояния и вязкости липидов. Широкое применение для исследований структурнодинамических характеристик мембран нашли флуоресцентные зонды — 1-анилинонафталин-8сульфонат (АНС) и пирен [15, 16]. АНС прежде всего реагирует на конформацию белков, их заряд и гидрофобные карманы, пирен – на вязкость липидной фазы [17-19]. Анионный зонд АНС позволяет исследовать поверхностные свойства мембраны, в то время как пирен – глубинные гидрофобные участки.

Целью данной работы явилось исследование эффектов умеренной гипотермии различной длительности на некоторые структурно-динамические параметры мембран митохондрий посредством оценки кинетики связывания флуоресцентных зондов – АНС и пирена.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Объект исследования. Опыты выполнены на крысах-самцах Вистар 3.5-месячного возраста с массой тела 200–220 г, полученных из питомника

филиала "Столбовая" ФГБУН НЦБМТ ФМБА России (Московская область, Чеховский район) и содержащихся в стандартных условиях вивария Дагестанского государственного университета. В контрольных и экспериментальных группах было использовано по 8 животных. В ходе исследования были соблюдены все нормы и правила выполнения экспериментальных работ с использованием лабораторных животных (Директива 2010/63/EU Совета Европейского Сообщества по защите животных, используемых в экспериментальных и других научных целях).

Моделирование гипотермических состояний. Гипотермию вызывали наружным охлаждением животных в плексигласовых камерах с рубашкой, через которую циркулировала холодная вода (15°С). Температуру тела крыс снижали равномерно в течение 30 мин до 30°С (кратковременная умеренная гипотермия), в течение 60 мин и 180 мин (пролонгированная умеренная гипотермия). В качестве контроля служили интактные крысы с нормальной температурой тела (37°С).

Выделение митохондрий. Выделение митохондрий из печени крыс проводили методом дифференциального центрифугирования в градиенте плотности сахарозы [20]. Крыс декапитировали. Быстро выделяли печень, промывали ледяной средой выделения (1°С) в течение 5 мин. Печень предварительно измельчали, пропускали через пресс и готовили 10% гомогенат в среде выделения, после чего центрифугировали при 1800 g 10 мин. Супернатант отделяли и центрифугировали при 15000 g в течение 15 мин на центрифуге MR 23i (Thermo Fisher Scientific, США). Полученный дважды отмытый осадок доводили до 2 мл и суспендировали в 0.32 М сахарозе. Суспензию митохондрий наслаивали на заранее приготовленный градиент плотности сахарозы (содержащий 3.5 мл 1.1 M, 7.5 мл 0.8 M, 7.5 мл 0.5 M и 5 мл 0.3 М сахарозы) и центрифугировали в бакетном роторе SW32 Ті при 7000 g на ультрацентрифуге Optima L-90K (Beckman Coulter, CIIIA).

Митохондрии, находящиеся в слоях 0.5-0.8 М отсасывали специальным приспособлением для отбора фракций и осаждали при 15000 *g* на центрифуге MR 23i (Thermo Fisher Scientific). Полученные митохондрии промывали в среде выделения и повторно центрифугировали при 15000 *g* в течение 15 мин. Митохондрии ресуспендировали в среде инкубации и хранили на льду.

Все растворы сахарозы, использованные для создания градиента ее плотности в пробирке, были приготовлены на буфере 10 мМ НЕРЕЅ, содержащем 1 мМ EDTA (pH 7.2) и 0.1% альбумин. Состав среды выделения: 0.25 М сахароза, 5 мМ HEPES, 0.5 мМ EDTA, 0.1% BSA (pH 7.4). Среда инкубации содержала 0.32 М сахарозу, 3 мМ HEPES, 0.25 мМ EDTA, 1 мМ MgCl<sub>2</sub>, 13 мМ KCl

(рН 7.4). Содержание белка в суспензии митохондрий определяли по методу Лоури [21].

Исследование структурно-динамических параметров мембран митохондрий с помощью флуоресцентных зондов. В работе использовали интактные митохондрии, суспендированные в среде инкубации. К 1 мл суспензии митохондрий добавляли 0.05 мл стокового раствора сукцината (до конечной концентрации 3 мМ), 0.05 мл раствора КH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (до конечной концентрации 1 мМ) и 0.02 мл раствора флуоресцентного зонда. Содержание белка в исследуемой пробе составляло 0.08 мг/мл. Измерения проводили на спектрофлуориметре HitachiF 7000 (Япония) при температуре 25°С. Оценка микровязкости мембран митохондрий производилась с помощью флуоресцентного зонда пирена. Микровязкость липидного слоя митохондриальных мембран оценивали при длине волны возбуждения  $\lambda_{\text{возб}} = 337$  нм, а микровязкость зон белок-липидных контактов при  $\lambda_{\text{возб}} = 280$  нм. Максимумы длин волн флуоресценции (λ эмисс) составляли для мономеров пирена — 394 нм, для эксимеров — 470 нм [15, 16].

Исследования концентрационной зависимости флуоресценции АНС, инкубированного с суспензией митохондрий, проводили в диапазоне концентраций 2.5–32.5 мкМ при температуре 25°С. Исследования проведены на спектрофлуориметре Hitachi F7000 при  $\lambda_{воз6} = 360$  нм и  $\lambda_{эмисс}$ в диапазоне 400–550 нм. По полученным спектрам флуоресценции АНС определяли оптимум интенсивности флуоресценции зонда ( $I_{фл}$ ). Затем строили графики зависимости оптимума интенсивности флуоресценции от концентрации зонда в пробе. Для расчета кинетических характеристик связывания зонда использовали нелинейный многомерный регрессионный анализ.

*Статистическая обработка*. Обработка данных производилась с помощью однофакторного дисперсионного анализа (ANOVA) с использованием пакета Statistica. Достоверность различия определяли с помощью критерия Фишера на уровне значимости p = 0.05.

### РЕЗУЛЬТАТЫ

Известно, что в воде АНС имеет очень низкий квантовый выход, тогда как в комплексе с белками он многократно увеличивается [16, 18]. Связывание АНС может зависеть от локализации и структуры мембранных белков, а также их заряда. Исследование концентрационной зависимости флуоресценции АНС позволит детально изучить кинетику его взаимодействия с митохондриальными мембранами печени контрольных и гипотермированных крыс: обнаружить наличие отличающихся по своей структуре участков связывания зонда, рассчитать их количество и аффинность. В связи с этим нами была исследована зависимость интенсивности флуоресценции АНС, инкубированного с митохондриями, от его концентрации в диапазоне 2.5–30 мкМ.

Из рис. 1, где приведены соответствующие спектры флуоресценции АНС, видно, что характер спектров и положение максимума флуоресценции зависят от концентрации зонда. Особое внимание привлекает тот факт, что с повышением концентрации зонда происходит смещение максимума интенсивности флуоресценции в длинноволновую область. Так, максимум интенсивности флуоресценции при концентрации АНС 2.5 мкМ соответствует длине волны испускания 458 нм, а при 32.5 мкМ – 477 нм, таким образом, смещение в длинноволновую область составляет 19 нм. Это может быть обусловлено различиями в полярности окружения связанного с белками зонда, что свидетельствует о гетерогенности сайтов связывания АНС на белковой молекуле.

На рис. 2 представлена зависимость максимума интенсивности флуоресценции АНС от его концентрации. Оказалось, что она носит нелинейный характер и представлена двумя пересекающимися в окрестностях одной точки прямыми. Из рисунка видно, что с повышением концентрации зонда интенсивность флуоресценции его линейно увеличивается, однако в области концентраций 10–12.5 мкМ происходит изменение характера концентрационной зависимости и она становится менее выраженной.

Исследование позволяет предположить наличие как минимум двух типов участков связывания зонда, имеющих различное сродство к АНС, одни из которых обеспечивают более полярное окружение зонда, а другие менее полярное. Это подтверждается наличием двух обособленных отрицательных пиков на графиках вторых производных спектров флуоресценции АНС (рисунок не приведен).

Для каждого линейного участка представленного графика зависимости, методом регрессионного многомерного нелинейного анализа, используя в опции "нелинейное оценивание" уравнение  $y = y_{max} \times [ANS]/(Kd + [ANS])$ , где y это интенсивность флуоресценции, а  $y_{max} -$ это максимальная интенсивность флуоресценции, Kd — константа диссоциации, были рассчитаны кинетические параметры связывания зонда —  $y_{max}$ и Kd;  $y_{max}$  — это величина, которая зависит от числа мест связывания зонда (N) и, таким образом, может опосредованно отражать это число [22].

Из табл. 1 видно, что константы диссоциации двух гетерогенных сайтов связывания АНС с митохондриями печени крыс в контроле существенно отличаются:  $Kd_2$  больше  $Kd_1$  в 2.24 раз. Соответственно отличается и кажущееся число центров связывания АНС ( $N_1$  и  $N_2$ ). Так, участков



**Рис. 1.** Спектры флуоресценции АНС, инкубированного с митохондриями печени контрольных крыс, при различных концентрациях зонда, мкМ: I - 2.5, 2 - 5, 3 - 7.5, 4 - 10, 5 - 12.5, 6 - 15, 7 - 17.5, 8 - 20, 9 - 22.5, 10 - 25, 11 - 27.5, 12 - 30, 13 - 32.5. Стрелками указаны длины волн эмиссии, при которых интенсивность флуоресценции АНС максимальна.

первого типа связывания  $(N_1)$  меньше таковых второго типа  $(N_2)$  на 24.43%. Данный факт, скорее всего, является следствием связывания АНС как с гидрофобными карманами белка (имеющих более высокое сродство к зонду), так и с остатками положительно заряженных аминокислот (имеющих более низкое сродство к зонду).



**Рис. 2.** Концентрационная зависимость интенсивности флуоресценции АНС в митохондриях печени контрольных крыс.

Интенсивность флуоресценции АНС и кинетика его связывания с митохондриями гипотермированных крыс претерпевает значительные изменения. Из рис. 3 видно, что при кратковременной гипотермии интенсивность флуоресценции инкубированного с митохондриями зонда значительно снижается и остается примерно на этом же уровне при гипотермии продолжительностью 60 мин. Пролонгирование гипотермии до 3 ч способствует дальнейшему снижению интенсивности флуоресценции АНС, однако это снижение по сравнению с кратковременной гипотермией не является ярко выраженным.

Анализ изменений кинетических параметров связывания АНС с митохондриями гипотермированных крыс показал, что кратковременная гипотермия приводит к снижению  $N_1$  на 18% (табл. 1). При пролонгировании гипотермических состояний до 1 и 3 ч значения  $N_1$  не претерпевают достоверных изменений относительно умеренной кратковременной гипотермии. Параметр  $Kd_1$  у гипотермированных крыс остается на уровне контрольных значений.

Из табл. 1 видно, что параметр  $N_2$  в динамике гипотермических состояний не меняется, в то время как  $Kd_2$  при кратковременной гипотермии повышается на 76%. Дальнейшее пролонгирование гипотермии до 1 и 3 ч не приводит к существенным изменениям данного параметра.

Серия экспериментов	N <sub>1</sub> , усл.ед.	N <sub>2</sub> , усл.ед.	<i>Kd</i> <sub>1</sub> , мкМ	<i>Kd</i> <sub>2</sub> , мкМ
Контроль	$827.99 \pm 28.49$	$1095.72 \pm 79.53$	$4.13\pm0.31$	$9.26\pm0.98$
Гипотермия 30°С, 30 мин	$671.59 \pm 63.70^{***}$	$1145.72 \pm 89.58$	$4.20\pm0.20$	$16.30 \pm 1.12^{**}$
Гипотермия 30°С, 1 ч	644.27 ± 55.02***	$1143.59 \pm 31.98$	$4.00\pm0.14$	$15.32 \pm 1.15^{**}$
Гипотермия 30°С, 3 ч	$649.22 \pm 49.41^{***}$	$1084.53 \pm 59.28$	$4.30\pm0.04$	$17.60 \pm 1.24^{**}$

**Таблица 1.** Кинетические параметры связывания АНС с митохондриями печени крыс в норме и при гипотермии (*M* ± *m*, *n* = 8)

\*  $p \le 0.05$ , \*\*  $p \le 0.01$ , \*\*\*  $p \le 0.001$  относительно контроля.

Степень погруженности и конфигурация мембранных белков могут определяться фазовым состоянием липидного матрикса. Для исследования эффектов гипотермии на структурно-динамические параметры митохондриальных мембран, связанные с состоянием их липидной фазы, был использован флуоресцентный зонд пирен.

Пирен — это гидрофобный зонд, флуоресценция которого очень чувствительна к микроокружению. Квантовый выход в воде пирена ничтожно мал, при этом он может диффундировать в гидрофобный слой мембраны, где интенсивность флуоресценции его возрастает [15, 19].

В липидном бислое мономеры пирена способны образовывать эксимерные формы, количество которых зависит от скорости латеральной диффузии зонда. Это в свою очередь определяется микровязкостью липидной матрицы. Таким образом, коэффициент эксимеризации пирена, представляющий собой отношение интенсивности флуоресценции эксимеров и мономеров пирена  $(F_{\Im}/F_{M})$ , является величиной обратно пропорциональной микровязкости липидов. При этом отношение  $F_{470}/F_{395}$  нм при  $\lambda_{B036} = 337$  нм отражает вязкость липидных слоев мембраны клеток, а при  $\lambda_{B036} = 280$  — микровязкость липид-белковых контактов [11, 16, 23].

Кроме этого, спектральные характеристики пирена могут быть использованы для оценки полярности его окружения. Соотношение максимумов флуоресценции пирена  $F_{372}/F_{393}$  при  $\lambda_{B036} = 337$  нм характеризует изменения полярности микроокружения его мономеров в общих липидах, а при  $\lambda_{B036} = 280$  нм – в аннулярных липидах [23].

Пирен также позволяет оценить структурные перестройки мембранных белков по изменению эффективности переноса энергии электронного возбуждения с триптофановых остатков белков на флуоресцентный зонд [15–17]. Для определе-



**Рис. 3.** Зависимость интенсивности АНС в митохондриях печени крыс от концентрации зонда при умеренной гипотермии различной длительности: контроль (1), умеренная гипотермия в течение 30 (2), 60 (3) и 180 мин (4).

БИОЛОГИЧЕСКИЕ МЕМБРАНЫ том 38 № 5 2021

Серия экспериментов	$\begin{array}{c} F_{\Im}/F_{M} \\ (\lambda_{B036} = 337) \end{array}$	$F_{370}/F_{390}$ ( $\lambda_{B030} = 337$ )	$\frac{F_{\Im}/F_{M}}{(\lambda_{B030} = 280)}$	$F_{370}/F_{390}$ ( $\lambda_{B030} = 280$ )	$(F_0 - F)/F_0, \%$
Контроль	$0.45\pm0.026$	$1.07\pm0.01$	$0.58\pm0.04$	$0.96\pm0.06$	$44.5\pm3.7$
Гипотермия 30°С, сразу	$0.56\pm0.023^*$	$1.1\pm0.009$	$0.73 \pm 0.029^*$	$0.92\pm0.008$	$46.7\pm3.5$
Гипотермия 30°С, через 1 ч	$0.54 \pm 0.033^{*}$	$1.18\pm0.04^*$	$0.71 \pm 0.008*$	$0.93\pm0.01$	$45.6 \pm 1.34$
Гипотермия 30°С, через 3 ч	$0.52\pm0.02^*$	$1.17\pm0.09^*$	$0.71 \pm 0.016*$	$0.94\pm0.001$	$41.2\pm3.72$

**Таблица 2.** Структурно-динамические параметры митохондрий печени крыс в норме и при гипотермии  $(M \pm m, n = 8)$ 

\*  $p \le 0.05$  относительно контроля.

ния степени тушения флуоресценции белков мембран митохондрий, мы измеряли интенсивность флуоресценции их при  $\lambda_{воз6} = 280$  нм и  $\lambda_{\phiлy} = 333$  нм в отсутствие пирена и после инкубации с зондом. Эффективность переноса энергии определяли по выражению:  $(F_0 - F)/F_0) \times 100$ , где  $F_0$  – интенсивность флуоресценции суспензии мембран митохондрий в отсутствие пирена, F – интенсивность флуоресценции суспензии мембран митохондрий после инкубации с пиреном (7.76 мкМ).

Особого внимания заслуживает вопрос о том, где локализуется пирен в митохондриях: во внутренней или наружной мембране. Известно, что гидрофобный зонд пирен в мембранах преимущественно накапливается в области углеводородных хвостов фосфолипидов, где может быстро перемещаться латерально. Однако было показано, что он также способен к быстрому трансмембранному перемещению [24]. Исходя из этого, пирен может распределиться не только во внешней мембране митохондрий, но и во внутренней мембране.

Известно, что наружная мембрана митохондрий состоит из билипидного слоя и пронизывающих его белков (менее 20% по весу) при соотношении липидов и белков по массе — примерно 1 : 1. Напротив, во внутренней мембране содержание белка (транспортные белки, ферменты дыхательной цепи, а также крупные ATP-синтазные комплексы) столь высоко (около 75% по весу), что в ней местами нарушается типичное для биомембран взаимное расположение липидов и белков, причем липиды не образуют бимолекулярного слоя, локализуясь на поверхности [25].

Отсюда следует то, что латеральная диффузия зонда в липидной матрице наружной мембраны менее ограничена, и измеренный нами коэффициент эксимеризации пирена в липидной матрице, скорее всего, отражает поведение зонда в наружной мембране. В то время как особая архитектоника липидов и высокое содержание белков во внутренней мембране позволяет предположить, что большая часть липидов внутренней мембраны включена в состав аннулярных липидов, а это ограничивает свободную латеральную диффузию зонда. Следовательно, здесь преимущественно регистрируется эксимеризация пирена в аннулярных липидах, нежели в общих.

В работе Ягужинского и сотр. [26]. было отмечено, что в белках внешней мембраны митохондрий (в частности, в порине) содержится минимальное количество триптофана, но он присутствует в значительном количестве в комплексах дыхательной цепи внутренней мембраны. Авторы предположили, что с помощью данного метода представляется возможным изучить свойства именно внутренней мембраны митохондрий.

Из табл. 2 видно, что значение параметра  $F_{\Im}/F_M$  ( $\lambda_{B036} = 337$  нм) сразу после снижения температуры тела возрастает на 24%. Пролонгирование гипотермии до 1 и 3 ч не вызывает дальнейших изменений  $F_{\Im}/F_M$ , не считая того, что имеется небольшая тенденция к снижению  $F_{\Im}/F_M$  относительно кратковременной гипотермии, которая не достигает уровня контрольных значений.

На фоне снижения относительной микровязкости липидного бислоя мембран митохондрий при гипотермии наблюдается увеличение параметра  $F_{9}/F_M$  ( $\lambda_{воз6} = 280$  нм), которое начинается сразу после снижения температуры тела и составляет 25%. Дальнейшее пролонгирование гипотермического состояния не сопровождается изменениями  $F_{9}/F_M$  ( $\lambda_{воз6} = 280$ ), во многих случаях этот параметр возрастает всего лишь на 22.5% относительно контроля. Таким образом, сразу же после снижения температуры тела достоверно снижается микровязкость как общих липидов митохондриальной мембраны, так и аннулярных.

Параметр ( $F_0 - F$ )/ $F_0$  пирена, характеризующий снижение эффективности переноса энергии электронного возбуждения с триптофановых остатков мембранных белков на пирен, при всех исследованных гипотермических состояниях не претерпевает достоверных изменений. Незначительное снижение эффективности переноса происходит при умеренной пролонгированной 3 ч гипотермии, но оно не является статистически достоверным. Полученные результаты показывают, что в мембранах митохондрий печени крыс при всех исследованных гипотермических состояниях параметр  $F_{370}/F_{390}$  ( $\lambda_{B036} = 280$  нм), характеризующий полярность микроокружения зонда в области аннулярных липидов, существенно не изменяется. При этом пролонгирование гипотермического состояния приводит к статистически достоверным изменениям параметра  $F_{370}/F_{390}$  ( $\lambda_{B036} = 337$  нм), указывающего на полярность микроокружения зонда в общих липидах. Так пролонгирование гипотермиие гипотермии до 1 и 3 ч приводит к повышению  $F_{370}/F_{390}$  ( $\lambda_{B036} = 337$  нм) на ~10%.

#### ОБСУЖДЕНИЕ

Особенность липидов в составе мембран — это изменение их физико-химического состояния под действием факторов внешней среды, особенно температуры. Полученные данные (микровязкость аннулярных и общих липидов, полярность микроокружения белков, тушение) указывают на изменения структурно-динамических характеристик мембран митохондрий печени крыс при гипотермии.

После понижения температуры тела повышается значение параметра  $F_{\Im}/F_M$  ( $\lambda_{B036} = 337$  нм), что указывает на повышение текучести (или соответствующее снижение микровязкости) липидного бислоя мембран митохондрий по сравнению с нормой, поскольку степень эксимеризации пирена находится в обратной зависимости от микровязкости липидной фазы [17, 23]. При гипотермии возрастает также текучесть зон белок-липидных контактов, которые представлены аннулярными липидами, составляющими микроокружение мембранных белков, что подтверждает увеличение параметра  $F_{\Im}/F_M$  ( $\lambda_{B036} = 280$  нм) по сравнению с контролем.

Обнаруженные изменения вязкости мембранных липидов при гипотермии указывают на существенные структурные перестройки в липидах мембран митохондрий. В первую очередь они могут быть связаны с изменениями жирнокислотного состава фосфолипидов, поскольку для оптимального функционирования наружной и внутренней мембраны митохондрий имеет большое значение регуляция фазовых состояний липидов мембран.

Так, по данным Шепелева [27], при снижении температуры тела до 27–28°С происходят изменения фосфолипидного спектра и содержания полиненасыщенных жирных кислот (ЖК) в липидах митохондрий миокарда белых крыс и собак. Вместе с тем повышение степени ненасыщенности липидов при умеренной гипотермии приводило к снижению их микровязкости и сдвигу фазового перехода в область низких температур. Автор предположил, что основная роль этих перестроек в липидах мембран митохондрий связана с повышением устойчивости животных к низкотемпературным воздействиям.

К сожалению, в современной литературе мы не обнаружили какую-либо новую информацию о влиянии гипотермии на липидный состав митохондриальных мембран гомойотермных животных. Имеются отдельные работы, в которых было показано, что умеренная гипотермия и ее пролонгирование изменяют ЖК-состав липидов синаптических и эритроцитарных мембран. Так, в работе Каландарова и соавт. [28], в которой был проведен анализ ЖК-состава суммарных фосфолипидов (ФЛ) синаптических мембран мозга крыс, показано, что при умеренной гипотермии достоверно снижается количество насыщенных ЖК (С16:0, С17:0) и моноеновых жирных кислот (С18:1, С20:1), при этом количество полиненасыщенных ЖК (С20:4, С22:4) существенно возрастает.

Вместе с тем в недавнем исследовании Раджабовой и соавт. [29] было обнаружено, что в ЖК суммарных ФЛ эритроцитарных мембран индекс ненасыщенности, а также отношения ПНЖК/НЖК и неНЖК/НЖК сразу после снижения температуры тела существенно не изменяются, но после пролонгированной гипотермии заметно снижаются. Таким образом, характер изменений ЖК состава ФЛ мембран различных биологических структур при гипотермии неоднозначен.

Следует также отметить, что проведенные ранее исследования структурно-динамических параметров эритроцитарных мембран с применением флуоресцентного зонда пирена, показали снижение микровязкости как общих, так и аннулярных липидов после 1.5 ч гипотермии [30]. Таким образом, результаты исследования микровязкости эритроцитарных мембран [30] и их ЖК-состава [29] хорошо коррелируют. Это позволяет нам предположить, что снижение вязкости липидов митохондриальных мембран тесно связано с повышением степени их ненасыщенности.

Механизмы, посредством которых может происходить изменение ЖК-состава митохондриальных мембран при гипотермии, могут быть разнообразны, учитывая что, митохондрии являются поставщиками ацетил-КоА — инициальной затравки синтеза ЖК, и участвуют в последовательной элонгации синтезированной в цитоплазме углеводородной цепочки ЖК. Вероятнее всего, в митохондриях при гипотермии происходит включение механизмов ремоделирования мембранных липидов путем деацилирования и реацилирования ФЛ.

Показано, что на начальных этапах развития гипотермия сопровождается стрессорной реакцией, при которой происходит активация гипоталамо-гипофизарно-надпочечниковой системы [31]. В результате включаются механизмы, направленные на увеличение липолиза. Было показано, что при гипотермии в крови увеличивается количество ненасыщенных ЖК [32], которые гипотетически могут использоваться для ремоделирования митохондриальной мембраны.

Известно, что изменение индекса ненасыщенности в мембранах пойкилотермных животных может происходить и с помощью ферментов – десатураз. Низкие температуры способны включать десатурацию ЖК, увеличивая тем самым индекс ненасыщенности клеточных мембран. В работе Гонзалеза и соавт. [32] было показано, что у адаптированных к холоду крыс, которым снижали температуру до  $30-32^{\circ}$ С в течение 20-25 дней и затем охлаждали до  $15^{\circ}$ С в течение 12 ч, также наблюдалось повышение активности различных десатураз печени. Причем, повышение активности ферментов коррелировало с увеличением содержания арахидоновой кислоты и снижением олеиновой кислоты в микросомах сердца и печени.

В нашем эксперименте исследуемые крысы не были адаптированы к холоду и не подвергались длительному и глубокому охлаждению. Однако все же можно выдвинуть предположение о том, что снижение микровязкости в митохондриях печени крыс при умеренной гипотермии также может быть связано с повышением активности десатураз и изменением ЖК-состава в сторону увеличения содержания ненасыщенных ЖК.

Известно, что процессы обновления ФЛ ускоряются после их окислительной модификации, в ходе которого окисленные ацильные цепи быстро удаляются из ФЛ мембран под действием кальций-зависимой фосфолипазы А2 [33]. Ранее нами было установлено, что кратковременная умеренная гипотермия стимулирует ПОЛ в митохондриях [14]. Гипотетически, интенсификация ПОЛ при гипотермии может привести к заметному увеличению параметра F<sub>370</sub>/F<sub>390</sub>, показывающего полярность микроокружения пирена в аннулярных или общих липидах. В соответствии с нашими экспериментальными данными, гипотермия увеличивает полярность ФЛ липидного бислоя, в то время как значительных изменений ее в области белок-липидных контактов не происходит. Это свидетельствует о том, что активация процессов ПОЛ при гипотермии не оказала существенного влияния на ЖК аннулярных фосфолипидов.

Снижение микровязкости липидного матрикса мембран митохондрий, возможно, является адаптивной реакцией, направленной на сохранение функциональной активности этих органелл. Ранее нами обнаружено, что кратковременная гипотермия и ее пролонгирование увеличивают интенсивность дыхания митохондрий печени крыс [12, 13]. Было предположено, что одной из причин увеличения уровней потребления кислорода митохондриями может быть снижение вязкости внутренней мембраны митохондрий, способствующее повышению подвижности в липидной матрице убихинона. Настоящее исследование позволило экспериментально подтвердить справедливость этого предположения. Гипотермия действительно приводит к снижению вязкости мембран и тем самым, возможно, способствует увеличению подвижности и активности участников ЭТЦ и позволяет сохранять энергетический потенциал митохондрий.

Изменения, происходящие в митохондриальных мембранах гомойотермных животных при низких температурах тела, могут затрагивать не только липидную матрицу. Проведенное нами исследование кинетических характеристик связывания флуоресцентного зонда АНС с мембранами митохондрий указывает на то, что при гипотермии происходят существенные изменения как в структуре, так и в локализации мембранных белков.

Результаты исследования свидетельствуют о гетерогенности сайтов связывания АНС с митохондриями. Каковы возможные причины такой гетерогенности?

Известно, что квантовый выход флуоресценции АНС зависит от полярности его окружения и увеличивается в гидрофобных средах. В соответствии с некоторыми литературными данными анионный зонд АНС чувствителен к поверхностному заряду митохондрий [34]. В работе Векшина [35] отмечается то, что митохондрии заряжены отрицательно и снаружи, и внутри (положительный заряд — в межмембранном пространстве). Гипотетически, АНС должен отталкиваться от интактных энергизованных отрицательно заряженных митохондрий, что позволяет вести регистрацию мембранного потенциала. Однако сам автор ясно указывает на то, что АНС и другие гидрофобные заряженные зонды плохо пропускаются внешней мембраной нативных митохондрий и остаются "заякоренными" в ее наружной липидной фазе. Поэтому изменение трансмембранного потенциала на внутренней мембране, если оно будет иметь место, не сможет заметно повлиять на зондовую флуоресценцию. Экспериментально показано, что интенсивности флуоресценции АНС в интактных и разобщенных митохондриях не имеют существенных различий, что свидетельствует о низкой чувствительности флуоресцентного зонда к поверхностному заряду митохондрий [35].

По мнению других авторов, на внешней мембране митохондрий отсутствует мембранный потенциал [36], поскольку внешняя мембрана митохондрий обладает высокой степенью проницаемости, через нее свободно проходят ионы и небольшие незаряженные молекулы за счет мембранных белков, называемых поринами. Особую роль играет митохондриальный порин — потенциал-зависимый анионный канал VDAC (voltagedependent anion channel). В зависимости от напряжения канал может быть селективен к анионам органических соединений. Следовательно, существует вероятность того, что АНС может перемещаться в межмембранное пространство через VDAC и взаимодействовать со внутренней митохондриальной мембраной, характеризующейся большим содержанием белков.

Было показано, что нафталиновое кольцо молекулы АНС может проникать в гидрофобную область мембраны и тем самым становиться менее доступным для водной среды, что увеличивает квантовый выход флуоресценции зонда [37]. Однако многие авторы предполагают, что АНС прежде всего реагирует на конформацию белков, их заряд и гидрофобные карманы [38]. Повышение интенсивности флуоресценции АНС в белках объясняется гидрофобностью сайтов связывания и ограниченной подвижностью зонда в гидрофобных карманах белка [39]. Однако, помимо гидрофобных взаимодействий с находящимися в карманах белка ароматическими радикалами аминокислот, зонд может связываться с помощью электростатических взаимодействий с периферическими аминокислотными радикалами. Эти взаимодействия формируются между отрицательно заряженной сульфоновой группой АНС и положительно заряженными аминокислотами, например, гистидином, лизином или аргинином [40].

Было обнаружено, что вклад во флуоресценцию АНС от внешних сайтов связывания гораздо меньше, чем от глубоколежащих гидрофобных сайтов [41]. Гидрофобные участки связывания создают менее полярное окружение зонду, и, возможно, имеют к АНС более высокое сродство. Поэтому они быстрее насыщаются при более низких концентрациях субстрата и характеризуются относительно низкими значениями констант диссоциации. Напротив, внешние положительно заряженные аминокислотные сайты обеспечивают более полярное окружение зонду и имеют к нему меньшее сродство.

Таким образом, кинетические особенности связывания АНС с белками достаточно хорошо описывают полученные нами экспериментальные данные, демонстрирующие нелинейный характер концентрационной зависимости флуоресценции зонда, инкубированного с митохондриями. Это позволяет утверждать, что основной вклад во флуоресценцию АНС в митохондриальных мембранах вносят белки, а не мембранный потенциал.

Результаты исследования указывают на снижение интенсивности флуоресценции АНС, инкубированного с митохондриями, гипотермированных животных. Оно может происходить либо за счет снижения абсолютного числа сайтов связывания, либо за счет снижения аффинности зонда к этим сайтам. Можно предположить, что при гипотермии количество гидрофобных карманов в белках митохондриальных мембран снижается, что приводит к падению интенсивности флуоресценции зонда. Гипотетически снижение числа гидрофобных карманов могло произойти за счет повышения степени погруженности некоторых белков в липидный матрикс. Одной из возможных причин такого явления может быть снижения вязкости бислоя. В соответствии с литературными данными микровязкость липидной матрицы оказывает влияние на интенсивность флуоресценции АНС [18].

Из приведенных выше данных по коэффициенту эксимеризации пирена в липидной фазе и в зоне липид-белковых контактов видно, что вязкость митохондриальных мембран снижается, особенно в области аннулярных липидов. Причем дальнейшее пролонгирование гипотермии не оказывает влияния на этот параметр. Такой же феномен демонстрирует и параметр  $N_1$  для AHC, в динамике пролонгирования гипотермии он не претерпевает изменений. Корреляционный анализ показал, что между коэффициентом эксимеризации пирена и N<sub>1</sub> имеется отрицательная корреляция (r = -0.9631, p < 0.05). Нельзя исключать и возможность уменьшения числа мест связывания в результате компактизации белков митохондриальных мембран и их уплотнения, что снижает доступность зонда к гидрофобным карманам. Такая компактизация может произойти, например, вследствие окисления остатков цистеина и образования дисульфидных мостиков или же остатков тирозина с образованием битирозиновых сшивок. Возможно, что компактизация имеет отношение и к процессам митохондриального слияния в клетках. Известно, что митохондриальное слияние - это один из эволюционно консервативных процессов, необходимый для эффективной работы митохондрий в условиях стресса [42].

Исследование показало, что гипотермия не влияет на  $Kd_1$ , то есть на аффинность зонда к гидрофобным сайтам и силу гидрофобных взаимодействий зонда с белком. Это свидетельствует о том, что изменения, происходящие в белках при гипотермии, не затрагивают структуру радикалов, находящихся в гидрофобных карманах белков. Скорее всего, находящиеся в углублениях белков радикалы, являются менее доступными для  $A\Phi K$ .

Кратковременная гипотермия и ее пролонгирование не влияют на  $N_2$ , которое отражает число положительно заряженных сайтов связывания с

отрицательно заряженной сульфоновой группировкой зонда, однако при этом резко (почти в 2 раза) увеличивается  $Kd_2$ , то есть уменьшается его аффинность к таким участкам. Такая ситуация может складываться вследствие снижения силы ионных взаимодействий зонда с радикалами положительно заряженных аминокислот.

Известно, что эти аминокислотные остатки лизина, аргинина и гистидина очень чувствительны к АФК и продуктам ПОЛ. Интенсификация СРП при кратковременной гипотермии может способствовать окислительной модификации радикалов этих аминокислотных остатков с образованием карбонильных групп. Ранее нами было показано [14], что кратковременная гипотермия увеличивает содержание карбонильных групп в митохондриальных белках. При этом пролонгирование гипотермии в течение 3 ч способствует их нормализации. В то время как в настоящем исследовании значения Kd2 для АНС при 3-часовом пролонгировании гипотермического состояния изменений не претерпевают. Достаточно слабая корреляция между интенсивностью ОМБ в митохондриальных мембранах печени крыс и кинетикой связывания АНС при гипотермии, возможно, связана с тем, что исследования содержания карбонильных групп в белках проводились на изолированных мембранах митохондрий крыс, а кинетики связывания АНС – на интактных энергизованных митохондриях. В таких митохондриях АНС, вероятнее всего, мог взаимодействовать с поверхностью наружной мембраны митохондрий. Поскольку митохондрии обладают собственной убиквитин-конъюгируюшей системой [43] можно предположить, что в течение 3 ч гипотермии модифицированные посредством окисления белки внутренней мембраны митохондрий, возможно, подвергаются более интенсивной деградации и замене, чем белки наружной мембраны. Вследствие этого нормализации значений Kd<sub>2</sub> для АНС в динамике пролонгирования гипотермии не наблюдается.

Следует отметить, что определенный вклад в снижение флуоресценции АНС при гипотермии могут внести и изменения степени погруженности нафталинового кольца зонда в липидную матрицу митохондриальной мембраны. Гипотетически это может быть обусловлено падением поверхностной гидрофобности митохондриальной мембраны вследствие накопления в ней гидрофильных продуктов ПОЛ.

Таким образом, флуоресцентное исследование структурно-динамических параметров мембран митохондрий печени крыс при гипотермии позволило выявить ряд существенных изменений в состоянии и структурной организации липидной матрицы и мембранных белков. Выраженность этих изменений зависит от длительности воздействия низкотемпературного фактора.

Полученные данные позволяют предположить, что при низких температурах тела в митохондриальных мембранах гомойотермных животных наряду с деструктивными процессами происходит развитие ряда компенсаторно-адаптивных реакций. Эти реакции связанны со снижением вязкости липидной матрицы, а также повышением конформационной подвижности мембранных белков и направлены прежде всего на сохранение функциональной активности митохондрий.

Конфликт интересов. Авторы декларируют отсутствие явных и потенциальных конфликтов интересов, связанных с публикацией настоящей статьи.

Источники финансирования. Работа выполнена при частичной финансовой поддержке Госзадания FZNZ-2020-0002 "Разработка и оптимизация технологий получения инновационных функциональных материалов".

Соответствие принципам этики. Все применимые международные, национальные и (или) институциональные принципы ухода и использования животных, нормы и правила выполнения экспериментальных работ с использованием лабораторных животных (Директива 2010/63/EU Совета Европейского Сообщества по защите животных, используемых в экспериментальных и других научных целях) были соблюдены.

### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- 1. Schaller B., Graf R. 2003. Hypothermia and stroke: The pathophysiological background. Review. *Pathophysiology*. **10**, 7–35.
- Wang H., Wang B., Normoyle K.P., Jackson K., Spitler K., Sharrock M.F., Miller C.M., Best C., Llano D., Du. R. 2014. Brain temperature and its fundamental properties: a review for clinical neuroscientists. *Front. Neurosci.* 8, 307. https://doi.org/10.3389/fnins.2014.00307
- 3. Zanelli S., Fairchild K. 2009. Physiologic and pharmacologic effects of therapeutic hypothermia for neonatal hypoxic ischemic encephalopathy. *Newborn and Infant Nursing Reviews*. 9 (1), 10–17.
- 4. Каленова И.Е., Шаринова И.А., Шевелев О.А., Бутров А.В. 2012. Опыт применения терапевтической гипотермии в лечении ишемического инсульта. *Неврология, нейропсихиатрия, психосоматика.* **2**, 41–44.
- 5. Polderman K.H. 2004. Application of therapeutic hypothermia in the ICU: Opportunities and pitfalls of a promising treatment modality. Part 1: Indications and evidence. *Intensive Care Med.* **30** (4), 556–575.
- Усенко Л.В., Царев А.В. 2009. Искусственная гипотермия в современной реаниматологии. Общая реаниматология. 5 (1), 21-23.
- 7. Alva N., Palomeque J., Carbonell T. 2013. Oxidative stress and antioxidant activity in hypothermia and re-

warming: can RONS modulate the beneficial effects of therapeutic hypothermia? *Oxid. Med. Cell. Longev.* 2013, **957054**.

https://doi.org/10.1155/2013/957054

- 8. Liu L., Yenari M.A. 2007. Therapeutic hypothermia: neuroprotective mechanisms. *Front. Biosci.* **12**, 816–825.
- Аль-Рабии М.А.М., Астаева М.Д., Кличханов Н.К. 2015. Свободнорадикальные процессы в крови крыс при умеренной гипотермии разной длительности. Естественные науки. 50 (1), 35–42.
- Эмирбеков Э.З., Кличханов Н.К. 2011. Свободнорадикальные процессы и состояние мембран при гипотермии. Ростов-на-Дону: ЮФУ. 200 с.
- 11. Гривенникова В.Г., Виноградов А.Д. 2013. Генерация активных форм кислорода митохондриями. *Успехи биол. химии.* **53**, 245–296.
- Халилов Р.А., Хизриева СИ., Джафарова А.М., Абдуллаев В.Р. 2019. Биоэнергетические характеристики митохондрий печени крыс при низких температурах тела. *Вопр. биол., мед. и фармацевт. химии.* 22 (5), 35–41.
- Халилов Р.А., Хизриева С.И., Джафарова А.М., Абдуллаев В.Р. 2020. Респираторные характеристики митохондрий печени крыс зависят от длительности умеренной гипотермии. Бюлл. эксперим. биол. и мед. 169 (1), 33–38.
- 14. Халилов Р.А., Джафарова А.М., Хизриева С.И., Абдуллаев В.Р. 2019. Интенсивность свободно-радикальных процессов в митохондриях печени крыс при умеренной гипотермии различной длительности. Цитология. 91 (7), 1–12.
- Владимиров Ю.А. Добрецов Г.Е. 1980. Флуоресцентные зонды в исследовании биологических мембран. М.: Наука, 308 с.
- Добрецов Г.Е. 1989. Флуоресцентные зонды в исследовании клеток, мембран и липопротеинов. М.: Наука, 277 с.
- Vekshin N.L. 2002. Pyrene Monomers and Excimers in Membranes. In: *Photonics of Biopolymers. Biological* and Medical Physics Series. Berlin, Heidelberg: Springer, p. 165–171.
  - https://doi.org/10.1007/978-3-662-04947-1\_16
- 18. Векшин Н.Л. 2008. Флуоресцентная спектроскопия биополимеров. Пущино: Фотон-век, 168 с.
- 19. Лакович Дж. 1986. Основы флуоресцентной спектроскопии. М.: Мир, 496 с.
- Рыбальченко В.К., Коганов М.М. 1998. Структура и функции мембран. Киев: Выща школа. 312 с.
- Lowry D.H., Rosebrough H.J., Farr A.L., Randall R.J. 1951. Protein measurement with the Folin-phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 193 (1), 265–275.
- Schönbrunn E., Eschenburg S., Luger K. 2000. Structural basis for the interaction of the fluorescence probe 8-anilino-1-naphthalenesulfonate (ANS) with the antibiotic target MurA. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 97 (12), 6345-634.
- 23. Донцов В.И. 2013. Флуоресцентные зонды в изучении внутриклеточных изменений при старении: изменения микровязкости мембран клеток. В сб.: Докл. МОИП. Секция Геронтологии. Ред. Донцов В.И. М.: МОИП, с. 73–78.

- Vekshin N.L. 1987. Use of pyrene as a luminescence indicator of the viscosity of model and biological membranes. *Nauchnye Doklady Vysshei shkoly. Biologicheskie Nauki.* 11, 59–66.
- 25. Лукьянова Л.Д. 2019. Сигнальные механизмы гипоксии. М.: РАН, 215 с.
- 26. Ягужинский Л.С., Скоробогатова Ю.А., Нестеров С.В. 2017. Функционально значимые низкотемпературные структурные перестройки в митохондриальных мембранах теплокровных животных. Биофизика. 2 (3), 518–524.
- 27. Shepelev A.P. 1977. Relationship between the depth of acute hypothermia and the composition and phase transitions of mitochondrial lipids of dog and white rat myocardium. *Biofizika*. **3**, 465–467.
- 28. Каландаров А.М., Раджабова З.И., Забелинский С.А., Фейзулаев Б.А., Кличханов Н.К., Чеботарева М.А., Кривченко А.И. 2018. Влияние гипотермии на фосфолипидный и жирнокислотныи состав синаптических мембран мозга крыс. *Журн. эволюц. биохим. и физиол.* 54 (2), 81–90.
- Раджабова З.Г., Забелинскийа С.А., Чеботарева М.А., Шуколюковаа Е.П., Кличханов Н.К., Кривченкова А.И. 2020. Влияние умеренной гипотермии на фосфолипидный и жирнокислотный состав мембран эритроцитов крыс. Биол. мембраны. 37 (2), 134–148.
- 30. Кличханов Н.К., Джафарова А.М., Аль-Рабии М.А.М. 2017. Кинетические характеристики ацетилхолинэстеразы и структурно-функциональное состояние мембран эритроцитов крыс при умеренной гипотермии. Биол. мембраны. 34 (3), 201–214.
- Маяхи М.Т.Д., Кличханов Н.К. 2012. Влияние даларгина на содержание гормонов гипофизарнонадпочечникового и гипофизарно-тиреоидного эндокринного комплексов в крови крыс при гипотермии. Вопросы общей биологии. Известия Самарского научного центра РАН. 14 (5), 273–277.
- 32. Gonzalez S., Nervi A.M., Peluffo R.O., Brenner R.R. 1983. Effect of environmental temperature changes on rat liver fatty acid desaturases. *Lipids.* **18**, 7–11.
- Van den Berg J.J., Op den Kamp J.A., Lubin B.H., Kuypers F.A. 1993. Conformational changes in oxidized phospholipids and their preferential hydrolysis by phospholipase A2: A monolayer study. *Biochemistry*. 32, 4962–4967.
- 34. Robertson E, Rottenberg H. 1983. membrane potential and surface potential in mitochondria fluorescence and binding of 1-anilinonaphthalene-sulfonate, membrane potential and surface potential in mitochondria. *J. Biol. Chemistry.* **258** (18), 11039–11048.
- Векшин Н.Л. 2013. Об измерении трансмембранного потенциала митохондрий флуоресцентными зондами. Биофизика. 58 (6), 1074–1080.
- Kühlbrandt W. 2015. Structure and function of mitochondrial membrane protein complexes. *BMC Biology*. 13 (1), 1–11.
- 37. Slavík J. 1982. Anilinonaphthalene sulfonate as a probe of membrane composition and function. *Biochim. Biophys Acta*. **694**, 1–25.

- Vekshin N.L. 2002. Photonics of Biopolymers. Biological and Medical Physics Series. Berlin: Springer. 229 p. https://doi.org/10.1007/978-3-662-04947-1.
- Collini M., D'Alfonso L., Baldini G. 2000. New insight onb-lactoglobulin bindingsites by 1-anilinonaphthalene-8-sulfonatefluorescence decay. *Protein Sci.* 9, 1968–1974.
- Hawe A., Sutter M., Jiskoot W. 2008. Extrinsic fluorescent dyes as tools for protein characterization. *Pharmac. Res.* 25 (7), 1487–1499.
- 41. Gasymov O.K., Glasgow B.J. 2007. ANS fluorescence: potential to augment the identification of the external binding sites of proteins. *Biochim. Biophys. Acta.* 1774 (3), 403–411.
- 42. Escobar-Henriques M., Anton F. 2013. Mechanistic perspective of mitochondrial fusion: Tubulation vs. fragmentation. *Biochim. Biophys. Acta.* 1833 (1), 162–175.
- 43. Adamo A.M., Pasquini L.A., Moreno M.B., Oteiza P.I., Soto E.F., Pasquini J.M. 1999. Effect of oxidant systems on the ubiquitylation of proteins in the central nervous system. *J. Neurosci. Research.* **55**, 523–531.

# Fluorescent Studies of the Structural and Dynamic Parameters of the Mitochondrial Membranes from the Liver of Rats at Hypothermia of Various Duration

R. A. Khalilov<sup>1</sup>, S. I. Khizrieva<sup>1</sup>, A. M. Dzhafarova<sup>1, \*</sup>, V. R. Abdullaev<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Dagestan State University, Makhachkala, Republic of Dagestan, 367000 Russia \*e-mail: albina19764@mail.ru

In recent years, hypothermia of varying depth and duration is increasingly used in medical practice to protect organs and tissues from damage caused by hypoxia, ischemia, and reperfusion. However, the initial stages of hypothermia induce oxidative stress, in the development of which mitochondria play a key role. The aim of this work was to study the effects of hypothermia of various durations on a number of structural and dynamic parameters of mitochondria, determined using fluorescent probes pyrene and ANS. It was found that shortterm hypothermia and its prolongation increases the coefficient of pyrene excimerization in annular and total lipids of mitochondrial membranes, which indicates a decrease in their microviscosity. With prolonged hypothermia, the polarity coefficient of the microenvironment of pyrene in total lipids increases, while in annular lipids this parameter does not change. The study of the kinetics of the binding of fluorescent probe ANS with rat liver mitochondria demonstrates a nonlinear dependence of the probe fluorescence intensity on its concentration. This indicates the presence of at least two heterogeneous binding sites in mitochondrial membranes. Short-term hypothermia and its prolongation reduce the intensity of ANS fluorescence at all probe concentrations tested. This decrease is due to changes in the kinetic parameters of the probe binding to different regions of membrane proteins: for type 1 sites, it is a decrease in the number of probe binding sites  $(N_1)$ , and for type 2 sites, an increase of the dissociation constant ( $Kd_2$ ) of the probe. Thus, hypothermia induces a number of significant changes in the physical state of the lipid matrix of mitochondrial membranes, as well as in the structural organization and localization of membrane proteins. The severity of some of these changes depends on the duration of the low-temperature exposure.

Keywords: rats, hypothermia, mitochondrial membrane, fluorescence, ANS, pyrene, microviscosity

УДК 576.31,576.315.45

# МОРФОЛОГИЧЕСКАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА ЯДРЫШКА И ГЕТЕРОХРОМАТИНОВЫХ АГРЕГАТОВ ТАНИЦИТОВ ГОЛОВНОГО МОЗГА КРЫСЫ

© 2021 г. Д. А. Суфиева<sup>а, \*</sup>, И. М. Плешакова<sup>а</sup>, Д. Э. Коржевский<sup>а</sup>

<sup>а</sup>Институт экспериментальной медицины, Санкт-Петербург, 197376 Россия

\**e-mail: dinobrione@gmail.com* Поступила в редакцию 11.03.2021 г. После доработки 05.04.2021 г. Принята к публикации 07.04.2021 г.

В данной работе изучали структурно-функциональную организацию ядрышка и конститутивного гетерохроматина в различных типах таницитов в ходе постнатального развития и при старении. С помощью иммуногистохимических методов и конфокальной лазерной микроскопии впервые было описано распределение аргентофильных белков ядрышка (нуклеолина и нуклеофосмина), а также гетерохроматиновых скоплений в таницитах на различных этапах постнатального онтогенеза. Была продемонстрирована гетерогенность как в размерах ядрышек, так и в их количестве не только в различных субпопуляциях таницитов, но и в возрастном аспекте, что может свидетельствовать о разном уровне их синтетической активности и способности к пролиферации в ходе раннего развития и старения. Распределение гетерохроматиновых агрегатов различается среди субпопуляции, в то время как β-танициты характеризуются стабильностью организации изучаемых компартментов клеточного ядра. Полученные данные существенно дополняют современное представление об организации структуры клеточного ядра таницитов в ходе нормального развития и старения, что может в последующем послужить основой для установления роли этих субъядерных структур в патологических процессах при различного рода повреждающих воздействиях.

**Ключевые слова:** танициты, ядрышко, конститутивный гетерохроматин, онтогенез, старение, нуклеолин, нуклеофосмин, H4K20me3, иммуногистохимия, конфокальная лазерная микроскопия **DOI:** 10.31857/S0233475521050078

#### **ВВЕДЕНИЕ**

Танициты, локализующиеся в области дна третьего желудочка, представляют собой особую популяцию глиальных клеток. Тела этих клеток формируют выстилку инфундибулярного углубления, а базальные отростки проникают в нервную ткань и оканчиваются на кровеносных сосудах, оплетая их своими расширенными терминалями. Отростки таницитов оплетают, в том числе, фенестрированные капилляры портальной системы гипофиза, которая локализуется в срединном возвышении. Таким образом, эти клетки задействованы в формировании ликворо-энцефалического и гематоликворного барьеров. Ранее была показана их роль в регуляции работы подлежащих ядер гипоталамуса – вентромедиального и аркуатного ядер, отвечающих за энергетический баланс организма. Кроме того, будучи производными клеток радиальной глии, танициты сохраняют не только их морфологию и ряд цитохимических характеристик, но также и способность к пролиферации и дифференцировке в нейроны и глию. Выделяют 4 типа таницитов (α1-, α2-, β1- и β2-танициты), различающихся локализацией в пределах инфундибулярного углубления, а также структурными, цитохимическими и функциональными характеристиками [1, 2]. Тем не менее, несмотря на пристальный интерес исследователей к таницитам, такая важная клеточная характеристика, как структурно-функциональная организация ядра в этих клетках, до настоящего момента остается не изученной. При исследовании организации клеточного ядра особое внимание уделяют распределению гетерохроматиновых скоплений и морфологии ядрышка, поскольку эти субъядерные структуры отражают метаболический статус клетки и чувствительны к дегенеративным изменениям.

Одним из важных маркеров, отражающих функциональное состояние клетки, является ядрышко. Поскольку основная функция этой структуры — это участие в биогенезе рибосом, то уровень белкового синтеза в клетке коррелирует с

организацией ядрышка. Кроме того, было установлено, что белки ядрышка вовлечены в контроль клеточного шикла, апоптоза и старения, а дислокация этих белков из ядрышка (так называемый "нуклеолярный стресс") может опосредовать развитие нейродегенеравтивных процессов [3-5]. Другой характеристикой, отражающей клеточную активность, является наличие гетерохроматиновых агрегатов. Гистон Н4, триметилированный по лизину 20 (H4K20me3), формирует конститутивный гетерохроматин и участвует в репрессии генов в промоторных участках [6, 7]. Также H4K20me3 важен в подавлении транскрипции повторяющейся ДНК и транспозонов [8]. Было показано, что подавление экспрессии этого гистона приводит к развитию злокачественных образований [9]. Изучение возможных изменений в организации ядрышка и гетерохроматиновых агрегатов в ходе постнатального онтогенеза и при старении, поможет получить новые сведения о функциональном состоянии таницитов в ходе нормального развития.

Цель данного исследования состояла в изучении структурно-функциональной организации ядрышка и конститутивного гетерохроматина в различных типах таницитов в ходе постнатального развития и при старении.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Материалом для исследования послужили фрагменты промежуточного мозга крыс-самцов линии Вистар пяти возрастных групп: 7, 14, 30 сутки постнатального развития (n = 3 для каждого срока), взрослые животные (4–5 мес.) (n = 6), старые животные (20-24 мес.) (n = 3). При содержании и умерщвлении животных соблюдали международные правила Хельсинской декларации о гуманном обращении с животными и "Правила проведения работ с использованием экспериментальных животных" (приказ № 755 от 12.08.1977 г. МЗ СССР). Головной мозг был фиксирован в цинк-этанол-формальдегиде [10], обезвожен и залит в парафин обычным способом. Изготавливались фронтальные срезы толщиной 5 мкм на уровне от -3.24 до -4.44 мм по отношению к брегме [11]. После стандартной процедуры депарафинирования срезы подвергали тепловому демаскированию в модифицированном цитратном буфере S1700, pH 6.1 (Dako, Дания) в течение 23 мин в пароварке. Затем были поставлены двойные иммуногистохимические реакции с использованием мышиных моноклональных антител к виментину (клон V-9, Dako) в разведении 1 : 100, кроличьих поликлональных антител к нуклеолину/белку C23 (Abcam, Великобритания) в разведении 1:200, мышиных моноклональных антител к нуклеофосмину/белку B23 (клон FC82291, Sigma-Aldrich, США) в разведении 1:100 и поликло-

нальных кроличьих антител к гистону H4K20me3 (Abcam) в разведении 1 : 500. В качестве вторичных реагентов были использованы моновалентный Fab-фрагмент антикроличьего иммуноглобулина осла, конъюгированного с флуорохромом Rhodamine Red-X (RRX) в разведении 1:50 (Jackson ImmunoReaserch, США) и моновалентный Fab-фрагмент антимышиного иммуноглобулина осла, меченые биотином в разведении 1 : 100 (Jackson ImmunoReaserch). Затем срезы обрабатывали конъюгатом стрептавидина с флуорохромом Cy2 (Jackson ImmunoResearch) в разведении 1:200. Препараты заключали в водорастворимую среду Fluorescence Mounting Medium (Dako). Анализ полученных препаратов проводили при помощи конфокального лазерного микроскопа LSM 710 (Zeiss, Германия). Обработку полученных изображений и трехмерную реконструкцию объектов проводили с помощью компьютерных программ LSM Image Browser и ZEISS ZEN lite (Zeiss). Определение диаметра ядрышек и их количества осуществляли в программах ZEISS Zen lite и Fiji [12] при исследовании не менее 10 случайно выбранных клеток каждого типа таницитов для каждого срока. В тех случаях, когда ядрышек в ядре было больше одного, средний диаметр ядрышек рассчитывали для наибольшего ядрышка. Данные представлены в виде средней ± стандартная ошибка средней. Для количества ядрышек помимо абсолютных значений также рассчитывали медиану (M<sub>e</sub>). При проведении статистического анализа использовали программу Graph Pad Prism 8. Применяли непараметрический критерий Краскела-Уоллиса с дальнейшим сравнением групп с помощью апостериорного критерия Данна. Значимым считали различия групп при p < 0.05.

### РЕЗУЛЬТАТЫ

При проведении двойной иммуногистохимической реакции на виментин (маркер таницитов и эпендимоцитов) и нуклеолин (маркер ядрышка) можно наблюдать, что в дорсальной области дна третьего желудочка выстилка образована кубовидными клетками — эпендимоцитами, которые затем замещаются отросчатыми клетками таницитами (рис. 1).

Наиболее дорсально среди таницитов расположены  $\alpha$ 1-танициты, отростки которых направлены в вентромедиальное ядро гипоталамуса (рис. 1, увеличенный фрагмент 1). У молодых и взрослых животных для этих клеток характерно присутствие от 1 до 4 ядрышек. В основном наблюдалось 1–3 ядрышка (97% случаев), и лишь в единичных клетках встречалось 4 ядрышка (3% случаев). У старых животных, как правило, число ядрышек составляло 1–2, редко 3. Более вентрально относительно  $\alpha$ 1-таницитов располагаются  $\alpha$ 2-танициты. Отростки этих клеток направ-



**Рис. 1.** Дно третьего желудочка головного мозга крысы. Взрослое животное. Двойная иммуногистохимическая реакция на виментин (*зеленый*) и нуклеолин (*красный*). Одиночный оптический срез. Масштабный отрезок равен 200 мкм. Увеличенные фрагменты: *1* – α1-танициты; *2* – α2-танициты; *3* – β1-танициты; *4* – β2-танициты. Проекция 16 (1 фрагмент), 26 (2 фрагмент), 21 (3 фрагмент) и 36 (4 фрагмент) оптических стеков. Объектив С-Аросhromat 63х/1.20 W Korr M27. Водная иммерсия. Масштабный отрезок равен 5 мкм (1 фрагмент), 10 мкм (2 и 3 фрагменты) и 20 мкм (4 фрагмент). Звездочка – полость третьего желудочка.

лены в аркуатное ядро (рис. 1, увеличенный фрагмент 2). У 7- и 14-дневных крысят число ядрышек составляло 1–3, в то время как начиная с первого месяца постнатального развития для этих клеток характерно присутствие 1–2 ядрышек, у старых животных в подавляющем большинстве случаев наблюдалось 1 ядрышко. Латеральные области срединного возвышения выстилают  $\beta$ 1-танициты, которые образуют многорядную структуру. Центральную область срединного возвышения занимают  $\beta$ 2-танициты. Именно  $\beta$ -танициты контактируют с капиллярами фенестрированного типа. Для этих типов таницитов характерно наличие 1–2 ядрышек (рис. 1, увеличенные фраг-

менты 3 и 4 соответственно). Стоит отметить, что ядрышки таницитов в подавляющем большинстве случаев локализуются на периферии ядра, часто контактируя с ядерной оболочкой.

При измерении диаметра наибольшего из ядрышек было установлено, что диаметр ядрышек изменяется с возрастом (табл. 1, рис. 2). Для всех типов таницитов характерно увеличение размеров этой субъядерной структуры в раннем постнатальном развитии (статистически достоверно для 7 и 14 суток постанатального развития при сравнении с одномесячными животными для β1-таницитов и со взрослыми и старыми животными для всех типов таницитов). Максимальный

Параметр	Boonact	Субпопуляция таницитов				
Параметр	Dospaci	α1	α2	β1	β2	
	Р7	1-4	1-3	1-3	1-2	
		$M_{\rm e} = 2$	$M_{\rm e} = 2$	$M_{\rm e} = 2$	$M_{\rm e} = 2$	
	P14	1-3	1-3	1-2	1-3	
		$M_{\rm e} = 2$	$M_{\rm e}=2$	$M_{\rm e}=2$	$M_{\rm e} = 1$	
V	P30	1-4	1-2	1-2	1-3	
Количество ядрышек		$M_{\rm e} = 2$	$M_{\rm e} = 2$	$M_{\rm e} = 1$	$M_{\rm e} = 1$	
	4—5 мес.	1-4	1-3	1-2	1-2	
		$M_{\rm e} = 2$	$M_{\rm e}=2$	$M_{\rm e} = 1$	$M_{\rm e} = 1$	
	20-23 мес.	1-3	1-2	1-2	1-2	
		$M_{\rm e} = 1$	$M_{\rm e} = 1$	$M_{\rm e} = 1$	$M_{\rm e} = 1$	
	P7	$1.492\pm0.03$	$1.473\pm0.03$	$1.479\pm0.04$	$1.360\pm0.06$	
Среднее значение	P14	$1.367\pm0.05$	$1.489\pm0.07$	$1.623\pm0.05$	$1.513\pm0.06$	
диаметра наибольшего ядрышка ±	P30	$1.528\pm0.03$	$1.516\pm0.04$	$1.991\pm0.06$	$1.612\pm0.07$	
± ошибка среднего, мкм	4-5 мес.	$1.679\pm0.04$	$2.087\pm0.05$	$2.171\pm0.05$	$2.059\pm0.07$	
	20-23 мес.	$1.611\pm0.04$	$1.948\pm0.06$	$2.068\pm0.06$	$2.202\pm0.1$	

Таблица 1. Морфофункциональные характеристики ядрышек различных популяций таницитов в ходе постнатального онтогенеза и при старении

размер ядрышка наблюдается у взрослых животных, в то время как при старении средний диаметр наибольшего ядрышка уменьшается. Кроме того, наблюдается вариабельность в диаметре ядрышка среди различных типов таинцитов в пределах одной возрастной группы. Так, у 30-дневных крысят диаметр ядрышек α1- и α2-таницитов статистически различался при сравнении с диаметром ядрышек  $\beta$ 1-таницитов (p < 0.0001 для обоих типов таницитов), а также различались размеры ядрышек  $\beta_1$  и  $\beta_2$  таницитов (p = 0.0006). У взрослых и старых крыс разница наблюдалась между размерами ядрышек α1-таницитов с другими типами таницитов ( $\alpha 2$ ,  $\beta 1$  и  $\beta 2$ ) (p < 0.0001для всех групп сравнения, за исключением α1 и α2 у старых животных, здесь p = 0.0003). У 14-дневных крысят различались ядрышки α1 и β1 таницитов (p = 0.0071). У 7-дневных крысят статистически значимой разницы между размерами ядрышек не наблюдалось. Данные по количеству ядрышек и их размеру на разных этапах постнатального онтогенеза представлены в таблице 1.

Для более подробного изучения структурнофункциональной организации ядрышка была поставлена двойная иммуногистохимическая реакция к аргентофильным белкам ядрышка — нуклеолину (белок C23) и нуклеофосмину (белок B23), которые опосредуют гистохимическую окраску ядрышка методом серебрения (метод Ag-NOR). Было установлено, что характер распределения этих двух белков в ядре отличается. Нуклеолин, как правило, распределен в форме тора, или двояковогнутого диска (рис. 4a), в то время как центральная часть ядрышка либо не окрашивается, либо окрашивается, но очень слабо, а также присутствует в виде отдельных скоплений в нуклеоплазме всех типов таницитов. В то время как нуклеофосмин локализуется только в ядрышках таницитов. Кроме того, характер распределения нуклеофосмина в этих субъядерных структурах сильно отличается от ядрышка к ядрышку. Как правило, белок В23 распределен в виде кольца по периферии ядрышка (рис. 3*a*). Реже этот белок может локализоваться в пределах ядрышка в виде двояковогнутого диска (рис. 36), подковы (рис. 36), отдельных глобул внутри ядрышка (рис 3г), а также распределяться в виде структуры округлой формы с поверхностной бороздой (рис. 3д, 3е). При старении характер распределения не меняется, однако центральная часть ядрышка, где нуклеолин и нуклеофосмин практически не присутствует, становится более выраженной (рис. 4*a*).

При изучении распределения конститутивного гетерохроматина в таницитах и его пространственных взаимоотношениях с ядрышком была поставлена двойная иммуногистохимическая реакция к H4K20me3 и нуклеофосмину. В таницитах конститутивный гетерохроматин представлен в виде отдельных скоплений округлой формы. Они локализуются преимущественно по периферии ядра, однако встречаются и диффузно распределенные глыбки небольшого размера, лежащие в центральной области ядра. Было выявлено, что характерным признаком для всех типов таницитов является увеличение размеров самих гетерохроматиновых глобул в раннем развитии. При старении в α-таницитах значительно увеличивается содержание гетерохроматина как по перифе-



**Рис. 2.** Возрастная динамика в размерах ядрышка различных субпопуляций таницитов. Черная линия показывает статистически значимую разницу между разными типами таницитов в пределах одного возраста. Цветные линии показывают статистически значимую разницу в диаметре ядрышек в каждой из популяций таницитов (в соответствии с легендой) между разными возрастными группами. \* p < 0.05; \*\* p < 0.01; \*\*\* p < 0.001; \*\*\*\* p < 0.0001.



**Рис. 3.** Характер распределения нуклеофосмина (белка В23) в ядрышках таницитов. Конфокальная лазерная микроскопия. Трехмерная реконструкция. *a*, *б*, *в* –  $\alpha$ 1-танициты, старые животные; *г*, *е* –  $\beta$ 1-танициты, старые животные;  $\partial - \alpha$ 1-танициты, 7 сутки постнатального развития. Масштабный отрезок 2 мкм.



**Рис. 4.** Профиль интенсивности флуоресценции исследуемых белков в ядрышке таницитов. Конфокальная лазерная микроскопия. Одиночный оптический срез. *а* – Распределение аргентофильных белков нуклеолина (*красный цвет*) и нуклеофосмин (*зеленый цвет*) в ядрышке таницитов у старых животных (20–24 мес). Стрелкой отмечена область наименьшей флуоресценции обоих белков. Головка стрелки указывает на пики флуоресценции зеленого и красного каналов. *б* – Зона колокализации Н4К20me3 (*красный цвет*) и нуклеофосмина (*зеленый цвет*) в ядрышке таницитов у старых животных (20–24 мес). Область колокализации (*желтый цвет*) отмечена толстой стрелкой.

рии ядер клеток, так и в центральных областях ядра, а в α1-таницитах может формировать сплошной периферический гетерохроматиновый слой (рис. 5). В β-таницитах содержание гетерохроматиновых агрегатов при старении меняется незначительно. При изучении пространственного расположения гетерохроматиновых скоплений относительно ядрышек было установлено, что в первую неделю развития и у старых животных в α1-таницитах почти все ядрышки погружены в гетерохроматин и окружены им со всех сторон (рис. 5). В α2- и β-таницитах в первую неделю развития, а также во всех типах таницитов на более поздних сроках развития наблюдается наличие околоядрышкового гетерохроматина, который примыкает к ядрышку с одной из сторон в виде небольшой глобулы (рис. 6). Полностью погруженных в гетерохроматин ядрышек на этих сроках выявлено не было. Однако у большинства ядрышек в области примыкания гетерохроматина формируется зона перекрывания (колокализации) нуклеофосмина и H4K20me3. Как правило, это зона небольшая и находится на границе соприкосновения этих двух белков (рис. 46). В единичных случаях встречается околоядрышковый гетерохроматин, который формирует впячивание в глубь ядрышка (рис. 6).

### ОБСУЖДЕНИЕ

Исследование архитектуры клеточного ядра в настоящее время является одним из магистральных направлений современной клеточной биологии. В нейробиологических исследованиях накоплен большой массив данных об организации ядра и его компонентов нейронов различных структур головного мозга [13—15], в то время как анализу глиальных клеток, в частности таницитов, в этой области уделено незаслуженно мало внимания [16]. Кроме того, исследования, посвященные организации ядра таницитов в постнатальном развитии и при старении, ранее не проводились. В связи с этим данные, представленные в настоящем исследовании, являются актуальными как для нейробиологии, так и для клеточной биологии в целом.

В рамках представленной работы нами были изучены ядрышки различных типов таницитов в раннем постнатальном развитии и при старении. Было установлено, что в раннем развитии количество ядрышек не меняется, однако при старении наблюдается уменьшение их числа. Кроме того, с возрастом для таницитов характерно увеличение размеров этой субъядерной структуры. Полученные результаты соотносятся с литературными данными. Было показано, что ядрышковые организаторы (nucleolar organizer regions, NORs), число которых определяет максимально возможное число ядрышек в клетке, имеют тенденцию с возрастом объединяться и формировать более крупные ядрышки [17]. Также была продемонстрирована завимость размера ядрышек и синтетической активности клетки, а также числа ядрышек и степени дифференицировки клетки [18, 19]. Это может свидетельствовать, что уменьшение числа ядрышек таницитов с возрастом происходит вследствие слияния ядрышек в более крупные, а также с закономерным увеличением синтетической активности по мере становления и формирования клеток в ходе раннего постнатального развития.



**Рис. 5.** Распределение гетерохроматиновых агрегатов в  $\alpha$ 1-таницитах. Двойная иммуногистохимическая реакция на H4K20me3 (*красный цвет*) и нуклеофосмин (*зеленый цвет*). Трехмерная реконструкция 28 (*a*) и 29 ( $\delta$ ) оптических срезов (режим Transparent). Объектив alpha Plan-Apochromat 100x/1.46 Oil DIC M27 (масляная иммерсия). *a* – 7 сутки постнатального развития,  $\delta$  – старое животное (20–24 мес.). Стрелки указывают на гетерохроматиновые скопления. Звездочка – полость желудочка.



**Рис. 6.** Околоядрышковый гетерохроматин в β2-таницитах. Двойная иммуногистохимическая реакция на H4K20me3 (*красный цвет*) и нуклеофосмин (*зеленый цвет*). Трехмерная реконструкция 24 оптических срезов (*a* – режим Transparent; *δ* – модуль Maximum). *a* – Стрелки указывают на околоядрышковый гетерохроматин. Масштабный отрезок равен 5 мкм. *δ* – Стрелкой отмечен околоядрышковый гетерохроматин, формирующий впячивание в глубь ядрышка. Двойной стрелкой отмечены гетерохроматиновые скопления на периферии ядра таницитов. Масштабный отрезок равен 2 мкм.

Также нами была отмечена разница в организации ядрышек среди различных типов таницитов, которые, несмотря на то что являются единой популяцией клеток, все же значительно отличаются по своим функциональным и цитохимическим свойствам. Это связано с тем, что они взаимодействуют с разными структурами в медиабазальном гипоталамусе и опосредуют их функции. Начиная с 30-х суток постнатального развития, самое крупное ядрышко присутствует в β1-таницитах, в то время как размеры ядрышек других типов исследуемых клеток не различались между собой статистически значимо. У взрослых и старых животных крупные ядрышки встречаются в  $\alpha 2$ -,  $\beta 1$ - и  $\beta 2$ -таницитах. Это может указывать на то, что для  $\beta 1$ -таницитов высокая синтетическая активность характерна еще в раннем постнатальном развитии, в то время как для  $\alpha 2$ - и  $\beta 2$ -таницитов она свойственна в более поздние сроки развития. Кроме того, полученные данные позволяют выделить популяцию  $\alpha 1$ -таницитов, для которой типично наличие некрупных ядрышек, но их количество больше, чем в других типах анализируемых клеток (за исключением  $\alpha 2$ -таницитов) на

протяжении всего постнатального развития. Это соответствует мнению о том, что именно этот тип таницитов осуществляет только транспортную, но не секреторную функцию. Кроме того, поскольку количество ядрышек коррелирует со степенью дифференцировки клетки, то присутствие большого числа ядрышек может указывать и на разную способность таницитов к пролиферации. Так, согласно литературным данным, в раннем постнатальном развитии все типы таницитов характеризуются способностью к пролиферации и дифференцировке в нейроны и глию, в то время как у половозрелых животных это свойство сохраняется только у  $\alpha$ -таницитов, а  $\beta$ -танициты являются коммитированными нейральными прогениторными клетками [1].

В рамках представленной работы нами были изучены два основных аргентофильных белка ядрышка – нуклеолин (белок С23) и нуклеофосмин (белок B23/NPM1). Было установлено, что и для нуклеолина, и для нуклеофосмина типично распределение в виде кольца или двояковогнутого диска. Однако характер распределения этих белков в ядрышках таницитов несколько различается. Так, пик интенсивности флуоресценции этих белков не совпадает: пик интенсивности флуоресценции нуклеолина располагается ближе к центру, по сравнению с нуклеофосмином, который тяготеет к периферии ядрышка (рис. 4а). Вероятно, такое распределение связано с тем, что, хотя оба этих белка задействованы в биогенезе рибосом, они вовлечены в разные этапы сборки прорибосомных частиц. Так, нуклеолин имеет высокую аффинность к одноцепочечной рДНК, в области нетранскрибируемого спейсера рДНК, расположенного выше сайта инициации транскрипции и, как следствие, регулирует транскрипцию рРНК, а также этот белок необходим для созревания рРНК и правильной сборки рибосомных частиц, т.е. задействован в ранних этапах созревания рибосомных субъединиц [20, 22]. Нуклеофосмин регулирует поздние этапы созревания рибосомных частиц, а именно он регулирет препроцессинг рРНК, действуя как эндорибонуклеаза, осуществялет высвобождение 28S рРНК посредством связывания со вторым внутренним транскрибируемым спейсером (ITS2) пре-РНК, а также задействован в экспорте субъединиц рибосом в цитоплазму [23, 24]. Отсутствие реакции либо слабая реакция к изучаемым белкам в центральных областях ядрышка может быть связано с тем, что часто здесь может локализоваться фибриллярный центр (ФЦ), в котором изучаемые белки, как правило, отсутствуют, что особенно отчетливо видно в крупных нейронах, где описан гигантский ФЦ [25].

Известно, что белок С23 является многофункциональным белком и выявляется в ядрышке, нуклеоплазме, цитоплазме и на плазматической мембране разных клеток. Различные посттрансляционные модификации нуклеолина и осушествление челночного транспорта опосредуют его многофункциональность. Было показано, что этот белок, помимо участия в биогенезе рибосом, задействован в организации и стабильности хроматина, метаболизме ДНК и РНК, цитокинезе, пролиферации клеток и их выживании, ангиогенезе, регуляции апоптоза, реакции на стресс и процессинге микроРНК, участии в межклеточном сигналинге, а также задействован в ряде патологических процессов [20, 25, 26]. В настоящем исследовании было установлено, что в таницитах нуклеолин помимо ядрышка также локализовался в нуклеоплазме в виде диффузно распределенных глыбок, но не в цитоплазме и не на плазматической мембране клеток. Неравномерность распределения нуклеолина в пределах нуклеоплазмы может быть связана с тем, что этот белок может выступать в качестве шаперона гистонов и локально регулировать транскрипционную активность различных генов. В то время как отсутствие этого белка в цитоплазме и на плазматической мембране может быть связана либо с недостаточной чувствительностью иммуногистохимического метода для выявления небольшого содержания этого белка в этих клеточных компартментах, либо с тем, что в таницитах, этот белок преимущественно задействован в ядрышковых и ядерных процессах.

В свою очередь, нуклеофосмин выявлялся только в пределах ядрышка исследуемых клеток. Согласно литературным источникам, нуклеофосмин локализуется в ядрышке (80% от общего содержания белка) и в нуклеоплазме (20% от общего содержания белка), а также может курсировать между ядрышком, цитоплазмой и плазматической мембраной, осуществляя челночный транспорт различных белков. Существует две изоформы нуклеофосмина – В23.1 и В23.2. N-Концевой и центральный домены у этих изоформ идентичны, в то время как С-концевой домен (имеющий сигнал ядрышковой локализации, Nucleolar localisation signal, NoLS) присутствует только в изоформе В23.1. Это обуславливает преимущественную локализую изоформы В23.1 в ядрышке, а В23.2 — в нуклеоплазме [27]. В настоящем исследовании были использованы антитела, которые выявляют С-концевой участок белка В23, т.е. изоформу В23.1, что объясняет его идентификацию только в пределах ядрышка таницитов.

Распределение гетерохроматиновых агрегатов также является важной характеристикой клеточного ядра. Гетерохроматин входит в состав сразу нескольких ядерных субкомпартментов, таких как ламинассоциированные домены, теломерные и центромерные участки, околоядрышковый гетерохроматин и др. В данном исследовании было показано, что с возрастом наблюдается увеличе-

ние размеров гетерохроматиновых скоплений в ядрах α1-таницитов, при этом в β-таницитах содержание гетерохроматина меняется незначительно. В литературных источниках данные об изменении содержания конститутивного гетерохроматина при старении противоречивы. Согласно одним данным, при старении происходит значительное снижение гетерохроматизации в клетках различных типов, так называемая "модель старения с потерей гетерохроматина" (heterochromatin loss model of aging) [28, 29]. Однако в исследовании Lezhava [30] было показано, что при старении в лимфоцитах человека происходит интенсивная гетерохроматизация хромосом. Предполагается, что в данном случае возрастное (после 70 лет) накопление хромосомных аберраций и аннеуплоидий, происходит вследствие активной гетерохроматизации ДНК и невозможности физического доступа репаративных ферментов к этим участкам. Прогрессивное усиление гетерохроматинизации при старении способствует инактивации ряда ранее функционирующих "активных генов". Это приводит к блоку определенных этапов метаболических процессов клеточных систем, которые происходят в норме, в результате чего недостаток многих специфических ферментов рано или поздно приводит к патологиям старения [30]. Вероятно, α-танициты также являются тем типом клеток, которые подвергаются гетерохроматизации при старении, что может отражаться на их функциях. В этом отношении при старении β-танициты характеризуются стабильностью организации изучаемых компартментов клеточного ядра, что, возможно, связано с их уникальной локализацией в области срединного возвышения, где располагаются капилляры фенестрированного типа (т.е. лишенные гематоэнцефалического барьера). Вероятно, это необходимо для поддержания нормального функционирования не только самих В-таницитов, но и адекватной работы гипоталамо-гипофизарной оси в целом.

При изучении пространственных взаимоотношений ядрышек и гетерохроматина было установлено, что ядрышки всех типов таницитов на всех исследованных сроках находятся в тесной ассоциации с околоядрышковым конститутивным гетерохроматином. В области их контакта формируется зона колокализации, что может свидетельствовать о структурно-функциональном взаимодействии этих двух компартментов. Известно, что нуклеофосмин имеет сайты связывания с тетрамером гистонов Н3-Н4 и Н2А-Н2В. а также линкерным гистоном Н1. Связываясь с гистоном, белок В23 выступает в качестве шаперона гистонов, и принимает участие в формировании нуклеосомной частицы [31]. Panee Lafarga и соавт. [32] в своих работах показали, что околоядрышковый гетерохроматин в ряде случаев формирует впячивание – хроматиновую ножку (chromatine pedicle), которая проходит через ПФК и касается фибриллярного центра ядрышка. Нами также было обнаружено, что в единичных клетках встречается околоядрышковый гетерохроматин, который формирует впячивание в глубь ядрышка.

Таким образом, настоящее исследование представляет собой первый сравнительно-онтогенетический анализ ядрышек и конститутивного гетерохроматина в различных типах таницитов в ходе раннего постнатального развития и при старении. В данной работе была показана гетерогенность как в размерах ядрышек, так и в их количестве не только между различными субпопуляциями таницитов, но и в возрастном аспекте, что может свидетельствовать о различном функциональном статусе этих клеток. Так, было показано увеличение размеров ядрышек и уменьшения их количества с возрастом, что, вероятно, говорит о закономерном увеличении синтетической активности по мере становления и формирования клеток в ходе раннего постнатального развития. Впервые описано распределение главных аргентофильных белков ядрышка, нуклеолина и нуклеофосмина, а также конститутивного гетерохроматина в таницитах на различных этапах развития. Было продемонстрировано, что нуклеолин и нуклеофосмин имеют различную пространственную локализацию в пределах ядрышка. Распределение гетерохроматиновых скоплений различается среди субпопуляций таницитов в ходе старения: α-танициты подвержены интенсивной гетерохроматизации, в то время как β-танициты характеризуются стабильностью организации изучаемых компартментов клеточного ядра. Полученные данные существенно дополняют современное представление об организации ядрышкового аппарата и гетерохроматина в таницитах в ходе нормального развития и старения, что создает условия для определения роли этих субъядерных структур в патологических процессах при различного рода повреждающих воздействиях.

Представленные изображения получены с помощью оборудования Центра коллективного пользования научным оборудованием "Микробиом человека" при ФГБНУ "Институт экспериментальной медицины".

**Конфликт интересов.** Авторы заявляют, что у них нет конфликта интересов.

Источники финансирования. Работа финансировалась из средств Государственного задания ФГБНУ "Институт экспериментальной медицины".

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

### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Prevot V., Dehouck B., Sharif A., Ciofi P., Giacobini P., Clasadonte J. 2018. The versatile tanycyte: A hypothalamic integrator of reproduction and energy metabolism. *Endocr Rev.* 39 (3), 333–368.
- Rodríguez E., Guerra M., Peruzzo B., Blázquez J.L. 2019. Tanycytes: A rich morphological history to underpin future molecular and physiological investigations. J. Neuroendocrinol. 31 (3), e12690.
- Parlato R., Kreiner G. 2013. Nucleolar activity in neurodegenerative diseases: A missing piece of the puzzle? J. Mol. Med (Berl). 91 (5), 541–547.
- Parlato R., Bierhoff H. 2015. Role of nucleolar dysfunction in neurodegenerative disorders: a game of genes? *AIMS Mol. Sci.* 2 (3), 211–224.
- Yang K., Yang J., Yi J. 2018. Nucleolar stress: Hallmarks, sensing mechanism and diseases. *Cell Stress*. 2 (6), 125–140.
- Kourmouli N., Jeppesen P., Mahadevhaiah S., Burgoyne P., Wu R., Gilbert D.M., Bongiorni S., Prantera G., Fanti L., Pimpinelli S., Shi W., Fundele R., Singh P.B. 2004. Heterochromatin and tri-methylated lysine 20 of histone H4 in animals. *J. Cell. Sci.* 117 (Pt 12), 2491–501.
- Wang Z., Zang C., Rosenfeld J.A., Schones D.E., Barski A., Cuddapah S., Cui K., Roh T.Y., Peng W., Zhang M.Q., Zhao K. 2008. Combinatorial patterns of histone acetylations and methylations in the human genome. *Nat. Genet.* 40 (7), 897–903.
- Schotta G., Lachner M., Sarma K., Ebert A., Sengupta R., Reuter G., Reinberg D., Jenuwein T. 2004. A silencing pathway to induce H3-K9 and H4-K20 trimethylation at constitutive heterochromatin. *Genes Dev.* 18 (11), 1251–1262.
- Fraga M.F., Ballestar E., Villar-Garea A., Boix-Chornet M., Espada J., Schotta G., Bonaldi T., Haydon C., Ropero S., Petrie K., Iyer N.G., Pérez-Rosado A., Calvo E., Lopez J.A., Cano A., Calasanz M.J., Colomer D., Piris M.A., Ahn N., Imhof A., Caldas C., Jenuwein T., Esteller M. 2005. Loss of acetylation at Lys16 and trimethylation at Lys20 of histone H4 is a common hallmark of human cancer. *Nat. Genet.* 37, 391–400.
- Korzhevskii D.E., Sukhorukova E.G., Kirik O.V., Grigorev I.P. 2015. Immunohistochemical demonstration of specific antigens in the human brain fixed in zinc-ethanol-formaldehyde. *Eur. J. Histochem.* 59 (3), 2530.
- Paxinos G., Watson C. 2007. The rat brain in stereotaxic coordinates. 6<sup>th</sup> edition. New York: Elsevier/Academic Press. 456 p.
- Schindelin J., Arganda-Carreras I., Frise E., Kaynig V., Longair M., Pietzsch T., Preibisch S., Rueden C., Saalfeld S., Schmid B., Tinevez J.Y., White D.J., Hartenstein V., Eliceiri K., Tomancak P., Cardona A. 2012. Fiji: An open-source platform for biological-image analysis. *Nat. Meth.* 9 (7), 676–682.
- Berciano M.T., Villagrá N.T., Pena E., Navascués J., Casafont I., Lafarga M. 2002. Structural and functional compartmentalization of the cell nucleus in supraoptic neurons. *Microsc. Res. Tech.* 56 (2), 132–142.
- 14. Pleshakova I., Gusel'nikova V., Sufieva D., Korzhevskii D. 2018. The distribution of the nucleophos-

min (B23) and histone H4K20me3 in the granule cells of the rat cerebellar cortex. *Tsitologiya*. **60**, 632–638.

- Cohen S., Greenberg M.E. 2008. Communication between the synapse and the nucleus in neuronal development, plasticity, and disease. *Annu. Rev. Cel.l Dev. Biol.* 24, 183–209.
- Sufieva D.A., Kirik O.V., Korzhevskii D.E. 2018. Nucleolin and nucleoli in ependymocytes and tanycytes of the third ventricle of the rat brain. *Cell Tiss. Biol.* 12, 167–173.
- Pena E., Berciano M.T., Fernandez R., Ojeda J.L., Lafarga M. 2001. Neuronal body size correlates with the number of nucleoli and Cajal bodies, and with the organization of the splicing machinery in rat trigeminal ganglion neurons. J. Comp. Neurol. 430 (2), 250–263.
- Жарская О.О., Зацепина О.В. 2007. Динамика и механизмы реорганизации ядрышка в митозе. Цитология. 49 (5), 355–369.
- Watanabe-Susaki K., Takada H., Enomoto K., Miwata K., Ishimine H., Intoh A., Ohtaka M., Nakanishi M., Sugino H., Asashima M., Kurisaki A. 2014. Biosynthesis of ribosomal RNA in nucleoli regulates pluripotency and differentiation ability of pluripotent stem cells. *Stem Cells.* **32** (12), 3099–3111.
- Tajrishi M.M., Tuteja R., Tuteja N. 2011. Nucleolin: The most abundant multifunctional phosphoprotein of nucleolus. *Commun. Integr. Biol.* 4 (3), 267–275.
- Feric M., Vaidya N., Harmon T.S., Mitrea D.M., Zhu L., Richardson T.M., Kriwacki R.W., Pappu R.V., Brangwynne C.P. 2016. Coexisting liquid phases underlie nucleolar subcompartments. *Cell.* 165 (7), 1686– 1697.
- 22. Ginisty H., Sicard H., Roger B., Bouvet P. 1999. Structure and functions of nucleolin. *J. Cell. Sci.* **112** (Pt 6), 761–772.
- Lindström M.S. 2011. NPM1/B23: A multifunctional chaperone in ribosome biogenesis and chromatin remodeling. *Biochem. Res. Int.* 2011, 195209.
- 24. Colombo E., Alcalay M., Pelicci P. 2011. Nucleophosmin and its complex network: A possible therapeutic target in hematological diseases. *Oncogene*. **30**, 2595– 2609.
- Guselnikova V.V., Sufieva D.A., Korzhevsky D.E. 2020. Nucleophosmin, coilin, and argentophilic (AgNOR) proteins in the neurons of human substantia nigra. *Cell Tiss. Biol.* 14, 380–387.
- Jia W., Yao Z., Zhao J., Guan Q., Gao L. 2017. New perspectives of physiological and pathological functions of nucleolin (NCL). *Life Sci.* 186, 1–10.
- Ugrinova I., Petrova M., Chalabi-Dchar M., Bouvet P. 2018. Multifaceted nucleolin protein and its molecular partners in oncogenesis. *Adv. Protein Chem. Struct. Biol.* 111, 133–164.
- Владимирова Н.М., Потапенко Н.А., Сурина Е.А., Вольпина О.М. 2014. Особенности структурного состояния белка B23/нуклеофозмина в клетках головного мозга. Биол. мембраны. 31 (1), 57–67.
- Wang J., Jia S.T., Jia S. 2016. New insights into the regulation of heterochromatin. *Trends Genet.* 32 (5), 284– 294.

373

- Lee J.H., Kim E.W., Croteau D.L., Bohr V.A. 2020. Heterochromatin: An epigenetic point of view in aging. *Exp. Mol. Med.* 52, 1466–1474.
- Lezhava T. 2001. Chromosome and aging: Genetic conception of aging. *Biogerontology*. 2 (4), 253–260.
- 32. Frehlick L.J., Eirín-López J.M., Ausió J. 2007. New insights into the nucleophosmin/nucleoplasmin family of nuclear chaperones. *Bioessays.* **29** (1), 49–59.
- Lafarga M., Berciano M.T., Hervas J.P., Villegas J. 1989. Nucleolar organization in granule cell neurons of the rat cerebellum. *J. Neurocytol.* 18 (1), 19–26.

# Structural Characteristic of Nucleolus and Heterochromatin Aggregates of Rat Brain Tanycytes

## D. A. Sufieva<sup>1, \*</sup>, I. M. Pleshakova<sup>1</sup>, D. E. Korzhevskii<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Institute of Experimental Medicine, Saint Petersburg, 197376 Russia \*e-mail: dinobrione@gmail.com

This work was aimed at studying the structural organization of nucleolus and constitutive heterochromatin in different types of tanycytes during postnatal development and aging of rats. Using immunohistochemical methods and confocal laser microscopy, the distribution of nucleolus argentophilic proteins (nucleolin and nucleophosmin) and heterochromatin aggregates in tanycytes at various stages of postnatal development were described for the first time. The heterogeneity of size and number of nucleoli was demonstrated both in different tanycyte subpopulations and at different ages of an animal. This may indicate a different level of the tanycyte synthetic activity and the ability to proliferate during early postnatal development and aging. During aging, the distribution of heterochromatin aggregates differed among tanycyte subpopulations:  $\alpha$ -tanycytes undergo intense heterochromatization, while  $\beta$ -tanycytes are characterized by a stable organization of the studied compartments of the cell nucleus. The data obtained significantly supplement the modern understanding of organization of the structure of the cell nucleus of tanycytes during normal development and aging. This can subsequently serve as a basis for establishing the role of these subnuclear structures in pathological processes.

**Keywords:** tanycytes, nucleolus, constitutive heterochromatin, development, aging, nucleolin, nucleophosmin, H4K20me3, immunohistochemistry, confocal laser microscopy УДК 616-08-039.71

# НЕЙРОДЕГЕНЕРАЦИЯ АЛЬЦГЕЙМЕРОВСКОГО ТИПА. ВОЗМОЖНАЯ КОРРЕКЦИЯ УХУДШЕНИЯ ПАМЯТИ ПРИ ВНУТРИВЕННОМ ВВЕДЕНИИ ПРЕПАРАТА ЭКЗОСОМ

© 2021 г. Р. А. Полтавцева<sup>*a*, \*</sup>, Н. В. Бобкова<sup>*b*</sup>, Д. Ю. Жданова<sup>*b*</sup>, Е. В. Свирщевская<sup>*a*, *c*</sup>, Г. Т. Сухих<sup>*a*</sup>

<sup>а</sup> Национальный медицинский исследовательский центр акушерства, гинекологии и перинатологии им. академика В.И. Кулакова Министерства здравоохранения РФ, Москва, 117997 Россия <sup>b</sup>Институт биофизики клетки РАН, ФИЦ ПНЦБИ РАН, Пущино, Московская обл., 142290 Россия <sup>c</sup>Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, Москва, 117997 Россия \*e-mail: rimpol@mail.ru Поступила в редакцию 02.03.2021 г.

После доработки 16.05.2021 г. Принята к публикации 16.05.2021 г.

Болезнь Альцгеймера (БА) остается одной из социально значимых патологий, при которой до сих пор отсутствует эффективная терапия. Целью данной работы являлся анализ эффективности внутривенного (в/в) введения экзосом из кондиционированной среды, полученной при культивировании мультипотентных мезенхимальных стромальных клеток Вартонова студня пупочного канатика человека. Экзосомы выделяли с помощью колоночной фильтрации в гравитационном поле и характеризовали по экспрессии специфичных маркеров и связыванию с клетками фибробластов мыши L929 *in vitro*. На модели спорадической формы БА было показано, что в/в введение экзосом предотвращало ухудшение пространственной памяти у ольфакторно бульбэктомированных мышей (ОБЭ). Терапевтический эффект, по-видимому, обусловлен способностью экзосом проникать в мозг ОБЭ животных, что было подтверждено визуализацией флуоресцентно-меченных экзосом в коре и гиппокампе после их в/в введения.

**Ключевые слова:** болезнь Альцгеймера, мультипотентные мезенхимальные стромальные клетки Вартонова студня пупочного канатика человека, экзосомы, модель спорадической формы болезни Альцгеймера

DOI: 10.31857/S0233475521050066

### введение

Болезнь Альцгеймера (БА) – неизлечимое прогрессирующее нейродегенеративное заболевание, при котором происходит постепенная потеря памяти и ухудшение когнитивных функций [1-3]. Считается, что накопление белка бетаамилоида (АВ) является ключевым событием в патогенезе БА [1]. Предполагается, что к 2050 году число заболевших БА может достичь 100 миллионов человек, если не будут найдены подходы к лечению, которые способны остановить или замедлить прогрессирование заболевания [4-6]. Одной из причин неудач в разработке эффективных средств лечения этого тяжелого недуга является отсутствие валидированных моделей *in vivo* наиболее распространенной ненаследственной спорадической формы БА. Ольфакторно бульбэктомированные (ОБЭ) животные демонстрируют основные поведенческие, морфологические, биохимические и иммунологические признаки, характерные для развития БА у человека, что позволяет их использовать как модель данного заболевания [7, 8].

Среди разрабатываемых терапевтических подходов к лечению БА и других нейродегенеративных заболеваний особое место принадлежит клеточной терапии, основанной на использовании трансплантации различных клеток донора в организм реципиента [9, 10]. Наиболее изученными для использования в регенеративной медицине являются мультипотентные мезенхимальные стромальные клетки (ММСК), которые получили широкую известность за счет своей способности направленной миграции в поврежденный орган и участию в его восстановлении [11, 12]. Так, Zhao-Hong Xie и соавт. в своем исследовании на трансгенной APP/PS1 модели БА [13] показали, что после внутривенного (в/в) введения мультипотентных мезенхимальных стромальных клеток из Вартонова студня пупочного канатика (MMCK-BC) человека происходило значительное улучшение пространственного обучения и замедление ухудшения памяти, что было вызвано уменьшением отложения Аβ и понижением уровня его растворимой формы.

Однако в настоящее время известно, что положительный эффект обусловлен не столько за счет выживания трансплантированных ММСК и их последующей дифференцировки, а главным образом за счет выделяемых ими растворимых факторов, которые включают белковую и везикулярную фракции [9, 14–16]. Белковая фракция содержит различные пептиды, цитокины и ростовые факторы, а везикулярная включает экстраклеточные везикулы, которые подразделяют на микровезикулы и экзосомы [14, 17].

Экзосомы — мембранные образования, диаметром 30—100 нм, представляющие собой биологические наноконтейнеры, которые принимают участие в различных физиологических процессах, перенося заключенные в их составе белки, нуклеотиды и аминокислоты, жирные кислоты, мРНК, микроРНК и другие биологически активные соединения к клеткам-реципиентам, тем самым принимая участие в межклеточной коммуникации [6, 17, 18]. Кроме того, экзосомы лишены таких отрицательных свойств ММСК, как необходимость их иммунологической совместимости с тканью реципиента [10, 19].

В данной работе предпринята попытка визуализации проникновения в мозг меченых экзосом, выделенных из MMCK-BC, при их системном в/в введении с особым вниманием на возможность их локализации в гиппокампе и височной коре, в структурах мозга, принимающих участие в обучении и памяти. А также оценен терапевтический эффект экзосом на состояние пространственной памяти на модели спорадической формы болезни Альцгеймера у ОБЭ мышей.

#### МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Получение ММСК из Вартонова студня ткани пупочного канатика и их характеристика. Первичная культура ММСК была выделена из Вартонова студня ткани пупочного канатика. Забор материала производился с письменного информированного согласия здоровых обследованных рожениц после операции кесарева сечения. Дальнейшее выделение ММСК проводили в соответствии с протоколом, описанным нами ранее [20]. Культивирование клеток проводили в атмосфере 5%  $CO_2$  при 37°С в среде DMEM/F12 (1 : 1, Gibco, США) с добавлением 10% фетальной телячьей сыворотки, 2 мМ *L*-глутамина, 100 ед/мл пенициллина и 100 мкг/мл стрептомицина (ПанЭко, Россия) в культуральных флаконах 25 см<sup>2</sup> (Corning, США). Смену среды на 50% проводили, как правило, через трое суток. При достижении состояния 80% конфлюэнтности клетки пассировали в соотношении 1 : 2. Для снятия клеток с поверхности пластика применяли 0.05% раствор трипсина (ПанЭко). Экспрессию поверхностных маркеров ММСК анализировали с помощью проточной цитометрии с использованием первичных антител, конъюгированных с фикоэритрином (PE), к CD90, CD105, CD73, CD19, HLA-DR и конъюгированных с FITC HLA-ABC (BD, США), согласно протоколу фирмы-производителя [21]. Измерения проводили на приборе FACSCalibur (BD, США).

Выделение экзосом из культуральной жилкости ММСК-ВС и их характеристика. Для выделения экзосом использовали кондиционированную среду (КС), полученную при культивировании ММСК-ВС третьего пассажа. При достижении состояния 80% конфлюэнтности монослой отмывали 0.9% физиологическим раствором (ФР), добавляли бессывороточную среду DMEM/F12 (Thermo, США), 2 мМ *L*-глутамина, 100 ед/мл пенициллина и 100 мкг/мл стрептомицина. Клетки культивировали в течение двух суток при 37°С в атмосфере 5% СО2, затем отбирали КС, центрифугировали 10 мин при 200 g с целью удаления клеточного дебриса. Полученную КС использовали для выделения экзосом, которое осуществляли при помощи коммерческого набора для ультрафильтрации Exo:pure (Prostagnost, Россия) согласно протоколу производителя.

Наличие экзосом в выделенной фракции подтверждали с использованием антител к CD9, CD63 и CD81 человека, конъюгированных с PE, APC и FITC соответственно (Miltenyi Biotec, Германия), которые являются специфичными трансмембранными маркерами экзосом [22–24]. Образцы экзосом инкубировали с антителами 60 мин при 4°C, после чего 1 раз отмывали методом центрифугирования при 38000 g в течение 20 мин и анализировали на цитофлуориметре.

Для анализа проникновения экзосом в головной мозг и их локализации экзосомы окрашивали 1,1'-dioctadecyl-3,3,3',3'-tetramethylindocarbocyanine perchlorate (Dil, Invitrogen, США). Для окрашивания 1 мл экзосом инкубировали с 10 мкл 20 мМ Dil в течение 20 мин, затем 3 раза отмывали ФР с центрифугированием 38000 g в течение 20 мин. Полученный осадок растворяли в 1 мл ФР.

Для визуализации экзосом использовали клетки фибробластов мыши L929, которые культивировали в атмосфере 5% CO<sub>2</sub> при 37°C в среде RPMI-1640 с добавлением 7% фетальной телячьей сыворотки, 2 мМ *L*-глутамина, 100 ед/мл пенициллина и 100 мкг/мл стрептомицина на стерильных покровных стеклах до состояния адгезии. В культуры вносили меченные Dil экзосомы и инкубировали 1 ч при 37°С в атмосфере CO<sub>2</sub>. Для контрастного окрашивания мембран клеток в последние 10 мин вносили маркер аппарата Гольджи BODYPI-C7-Cer (Sigma, США) и ядерный краситель DAPI (Sigma). По окончании инкубации клетки фиксировали 2% параформальдегидом (Sigma), отмывали ФР и заливали полимеризующей средой Mowiol 4.88 (Calbiochem, США). Анализ проводили на конфокальном микроскопе Eclipse TE2000 (Nikon).

376

Изучение проникновения экзосом в головной мозг мышей после в/в введения. Для оценки возможного проникновения и распределения экзосом в головном мозге мышей при в/в введении раствор флуоресцентно-меченых экзосом или ФР в объеме 10 мкл/мышь, содержащих приблизительно 10<sup>8</sup> экзосом, вводили в/в в хвостовую вену заранее подготовленных групп 6-месячных мышей-самцов линии NMRI весом 25-30 г. Спустя 4 ч после введения экзосом мышам вводили внутрибрюшинно летальную дозу нембуталового наркоза (60 мг/кг) и осуществляли транскардиальную перфузию мозга охлажденным ФР. Мозг быстро извлекали на холоде и помещали в 4% раствор параформальдегида для дальнейшего проведения гистологического анализа. С этой целью готовили фронтальные срезы мозга толщиной 30 мкм на микротоме Техном МЗП-01 (Россия). Для анализа распределения экзосом в мозге использовали флуоресцентную и световую микроскопию (Leica DM 6000 В, Германия).

Модель спорадической формы болезни Альцгеймера на мышах. Для проведения экспериментов по анализу возможности проникновения используемых экзосом в головной мозг, а также по изучению влияния в/в введения препарата экзосом на пространственную память были отобраны 6-месячные мыши-самцы линии NMRI весом 25-30 г. Содержание мышей осуществлялось по 5-6 особей в клетке со свободным доступом к воде и стандартизированному корму в условиях естественной освещенности при температуре воздуха 21–23°С. Все исследования проводились в полном соответствии с Руководством по содержанию и уходу за лабораторными животными и правилами надлежащей лабораторной практики (приказ МЗ РФ от 01.04.2016 г., № 199н).

Удаление обонятельных луковиц проводили путем их двухсторонней аспирации через трепанационное отверстие в черепе со стереотаксическими координатами AP – 3, LM – 0, H – 2.5 в стерильных условиях у животных, которые находились под нембуталовым наркозом (40 мг/кг, внутрибрюшинно). При проведении процедуры скальпирования для местного обезболивания подкожно вводили 0.5% раствор новокаина. Контрольными животными являлись ложнооперированные (ЛО) мыши, подвергнутые аналогичной процедуре, за исключением удаления обонятельных луковиц. По окончании операции для профилактики развития инфекции каждому животному в мышцу задней лапы вводили антибиотик бициллин 5 в дозе 6000 ед.

Изучение эффекта в/в введения экзосом на пространственную память. Все животные были распределены по группам, включающим по 5–6 мышей в каждой: контрольные ольфакторно бульбэктомированные (ОБЭ + ФР) и ложнооперированные мыши с в/в введением ФР (ЛО + ФР); ольфакторно бульбэктомированные (ОБЭ + ЭКЗ) и ложнооперированные (ЛО + ЭКЗ) мыши с в/в введением раствора экзосом. Спустя две недели после операции начинали в/в введение раствора экзосом или ФР, которое осуществляли 2 раза в неделю в течение 3 недель.

Для проведения исследований по определению эффекта в/в введения раствора экзосом из ММСК-ВС животным вводили по 10 мкл раствора экзосом в ФР, содержащих приблизительно  $10^8$  экзосом, или только **ФР** в хвостовую вену животного. Через две недели после первого из шести введений экзосом начинали обучение ЛО и ОБЭ животных пространственному навыку в водном лабиринте Морриса. Для этой цели применялся круглый бассейн диаметром 80 см и глубиной 30 см, заполненный водой, с температурой 23°С. Площадь бассейна условно делилась на четыре равных сектора, в один из которых (третий отсек) при обучении помещалась спасательная платформа 5 см в диаметре, которую на 0.5 см погружали под поверхность воды. Для того чтобы животное не могло визуально обнаружить спасательную платформу, вода забелялась раствором сухого молока. До начала обучения в условиях видимой спасательной платформы у животных проверяли умение плавать и сохранность зрения. Смысл обучения состоял в том, чтобы за время теста животное могло найти спасательную платформу и по внешним визуальным стимулам окружающей обстановки запомнить ее местоположение в бассейне. Общая продолжительность обучения составляла пять дней по 4 ежедневных одноминутных сеанса. Скорость обучения оценивали по величине уменьшения латентного периода нахождения скрытой платформы. По истечению суток с момента окончания обучения осуществляли тестирование уровня пространственной памяти в течение одной минуты, но уже в условиях отсутствия спасательной платформы. Состояние пространственной памяти анализировали по двум параметрам: по времени пребывания животного в каждом секторе, а также по количеству заходов в каждый сектор бассейна, выраженному в процентах от общего числа посещений. После завершения поведенческого тестирования проводили морфоконтроль на полноту удаления



**Рис. 1.** Анализ экспрессии поверхностных маркеров ММСК Вартонова студня. Экспрессия специфичных маркеров ММСК CD73 (*a*), CD90 (*б*), CD105 (*b*) и HLA-ABC (*c*); отсутствие экспрессии маркеров лимфоидных клеток HLA-DR (*d*), CD45 (*e*) и CD19 (*ж*) клетками ММСК Вартонова студня.

обонятельных луковиц у ОБЭ мышей. Для статистической обработки данных использовали однофакторный анализ ANOVA с последующим posthoc анализом с применением критерия Tukey's HSD, а также двухсторонний критерий Стьюдента. Данные представлены как  $M \pm m$ . Различия считались значимыми при p < 0.05.

## РЕЗУЛЬТАТЫ

Характеристика экзосом ММСК-ВС. Одной из основных характеристик ММСК является экспрессия маркеров CD73, CD90 и CD105 и отсутствие экспрессии лимфоидных маркеров [21, 25]. Анализ экспрессии специфичных маркеров проводили методом проточной цитометрии. Показали, что ММСК-ВС экспрессируют CD73, CD90 и CD105, HLA-ABC и не экспрессируют ряд лимфоидных маркеров (рис. 1).

Выделение экзосом проводили методом колоночной фильтрации в гравитационном поле. Экзосомы концентрировали из 25 мл культуральной среды в 1 мл. Принадлежность выделенных микрочастиц к экзосомам оценивали по наличию на их поверхности специфических маркеров экзосом – CD9, CD63 и CD81 [12, 21]. Анализ экспрессии данных маркеров проводили методом проточной цитометрии и показали, что экзосомы, полученные из культуральной жидкости при культивировании MMCK-BC максимально экспрессируют CD63 (рис. 2*г*), в меньшей степени маркеры CD81 (рис. 2*б*) и CD9 (рис. 2*в*).

Изучение локализации флуоресцентно окрашенных экзосом в отделах головного мозга мышей. Прежде всего необходимо было исследовать возможность проникновения экзосом в мозг при их в/в введении, и в частности, в такие отделы головного мозга, как гиппокамп и неокортекс, поскольку преимущественно в этих структурах наблюдается гибель нейронов при БА.

Мы показали, что при в/в введении экзосом из MMCK-BC флуоресцентные частицы обнаруживаются в гиппокампе и неокортексе, что свидетельствует о проникновении экзосом в мозговую паренхиму через гематоэнцефалический барьер [26, 27]. На рис. 3 представлены микрофотографии срезов мозга мышей через 4 ч после в/в введения флуоресцентно меченных экзосом.



**Рис. 2.** Характеристика экзосом ММСК-ВС. *а*–*г*: Анализ экспрессии специфичных маркеров экзосом CD81 (*б*), CD9 (*в*) и CD63 (*г*) проводили в окне мелких объектов (*а*). Аутофлуоресценция показана на серой гистограмме. Сдвиг по оси абсцисс соответствует экспрессии маркеров (цветные гистограммы). *д*–*е*: Связывание экзосом с мембранами клеток фибробластов L929. Клетки культивировали на покровных стеклах, инкубировали с экзосомами (*д*, красные), дополнительно окрашивали мембраны маркером аппарата Гольджи (*е*, зеленый). Ядра окрашены DAPI (синий). Колокализация экзосом с мембранами клеток (*е*, желтый). Шкала – 25 мкм.

На репрезентативных микрофотографиях срезов мозга контрольных животных, которым в/в вводился только ФР, подобное свечение микрочастиц отсутствовало (рис. 4). Таким образом, нами был доказан факт возможности проникновения в головной мозг экзосом из ММСК-ВС при их в/в введении.

Эффект внутривенного введения экзосом ММСК-ВС на пространственную память ОБЭ мышей. В рамках данного исследования проведен анализ эффективности влияния в/в введения экзосом из ММСК-ВС человека на пространственную память ОБЭ мышей, моделирующих спорадическую форму БА.

В процессе обучения, проводимого через 4 недели после бульбэктомии или ложной операции, у всех групп экспериментальных животных наблюдалось ежедневное снижение латентного периода нахождения платформы. Было установлено, что в/в введение экзосом не оказывало влияния на способность к пространственному обучению ЛО и ОБЭ животных, о чем свидетельствует отсутствие достоверных различий (p > 0.05) латентных периодов нахождения спасательной платформы у групп ЛО + ФР и ЛО + ЭКЗ, и ОБЭ + ФР и ОБЭ + ЭКЗ в водном лабиринте Морриса ни в один из пяти дней обучения (рис. 5). Важно отметить, что обученность животных перед тестированием памяти у всех групп животных была одинакова, что подтверждается отсутствием достоверных различий (p > 0.05) латентных периодов обнаружения спасательной платформы на пятый день обучения.

Результаты факторного анализа данных по тестированию пространственной памяти в водном лабиринте Морриса приведены в табл. 1 и на рис. 6.

Время нахождения в третьем секторе лабиринта Морриса у групп животных: ЛО + ФР, ЛО + ЭКЗ, ОБЭ + ФР и ОБЭ + ЭКЗ составило (с):  $30.8 \pm 2.4$ ,  $30.2 \pm 2.7$ ,  $16.7 \pm 0.8$  и  $24 \pm 3.1$  соответственно. Соотношение количества заходов в третий сектор обучения к общему числу заходов во все сектора водного лабиринта (%):  $42.8 \pm 1.3$ ,  $45.5 \pm 2.9$ ,  $28 \pm 0.9$ 

2021



ОБЭ+ЭКЗ

ЛО+ЭКЗ

**Рис. 3.** Примеры распределения экзосом, меченных флуоресцентным красителем Dil, в неокортексе (*a*, *б*) и гиппокампе (*в*, *c*) ОБЭ (*a*, *в*) и ЛО (*б*, *c*) мышей через 4 ч после внутривенного введения. Шкала – 25 мкм. На микрофотографиях представлены участки мозга в проходящем свете с наложением соответствующих флуоресцирующих частиц.



**Рис. 4.** Репрезентативные микрофотографии срезов неокортекса (*a*, *б*) и гиппокампа (*в*, *г*) контрольных ЛО (*a*, *в*) и ОБЭ (*б*, *г*) мышей через 4 ч после внутривенного введения ФР. Шкала – 25 мкм.

БИОЛОГИЧЕСКИЕ МЕМБРАНЫ том 38 № 5 2021



**Рис. 5.** Динамика латентного периода нахождения спасательной платформы в водном лабиринте Морриса в ходе обучения экспериментальных групп животных в контроле и после в/в введения экзосом MMCK-BC. Данные представлены как  $M \pm m$ .

и 37  $\pm$  2.4 для групп ЛО +  $\Phi$ P, ЛО + ЭКЗ, ОБЭ +  $\Phi$ P и ОБЭ + ЭКЗ соответственно.

Анализ результатов состояния пространственной памяти показал, что в обеих группах ЛО мышей – ЛО +  $\Phi$ Р и ЛО + ЭКЗ животные достоверно отличали сектор обучения от индифферентных секторов как по времени нахождения, так и по числу заходов в него, что свидетельствует об отсутствии отрицательного влияния вводимого препарата экзосом на пространственную память животных. Контрольная группа ОБЭ мышей, которым вводился только  $\Phi$ Р, во время тестирования показала нарушение способности узнавать сектор обучения. Вместе с тем группа ОБЭ мышей, которым в/в шестикратно вводили раствор экзосом, характеризовалась достоверным предпочтением третьего таргетного сектора бассейна по обоим показателям оценки пространственной памяти (рис. 6). Таким образом, на модели спорадической формы БА было показано, что вводимые экзосомы способны замедлять процесс ухудшения памяти у ОБЭ животных, демонстрирующих характерные признаки данного заболевания.

## ОБСУЖДЕНИЕ

В нашем исследовании было показано, что внутривенное введение экзосом, секретируемых

Таблица 1.	Данные о	факторногс	анализа	групп	животных	после в,	/в введения
	7 1	1 1					

	Значение фактора выделения секторов при тестировании памяти					
Группа	по времени	пребывания	по количеству заходов			
	фактор F	достоверность <i>р</i> <	фактор F	достоверность <i>р</i> <		
$\Pi O + \Phi P (n = 5)$	45.6	0.001	63.3	0.001		
ЛО + ЭКЗ $(n = 6)$	18.7	0.001	27.1	0.001		
$OE\Theta + \Phi P (n = 6)$	13.4	0.001	2.46	0.1		
ОБЭ + ЭКЗ $(n = 6)$	8.99	0.001	16.1	0.001		

*Примечание. n* – количество животных в каждой экспериментальной группе.



**Рис. 6.** Влияние внутривенного введения экзосом из ММСК-ВС на пространственную память ольфакторно бульбэктомированных мышей: по времени нахождения (*a*) и числу заходов (*б*) групп мышей в сектора водного лабиринта Морриса. 1-4 – сектора лабиринта, 3 – сектор с платформой во время обучения. Достоверность различия данных в сравнении с 3 сектором с использованием критерия Tukey: \* p < 0.05; \*\* p < 0.01; \*\*\* p < 0.001.

ММСК-ВС, имеет выраженный терапевтический эффект, препятствуя потере пространственной памяти у ОБЭ мышей – модели спорадической формы БА. Известно, что ОБЭ мыши характеризуются развитием симптомокомплекса, сходного с наблюдаемым при БА и включающего ухудшение памяти, развитие депрессивно-подобного состояния, что происходит на фоне дефицита ацетилхолин- и серотонинергической систем мозга [28]. Причиной наблюдаемых изменений является развитие нейродегенеративного процесса, сопровождающегося гибелью нейронов в височной коре и полях гиппокампа, а также повышением уровня мозгового А $\beta$  [29]. Ранее мы показали, что внутримозговое и в/в введение ММСК, выделенных из фетального мозга, также купировало развитие ухудшения памяти и повышало нейрональную плотность в гиппокампе ОБЭ мышей [30]. Позитивные эффекты трансплантации ММСК, выделенных из разных источников, были неоднократно показаны на моделях БА и другими исследователями [9, 31, 32].

В настоящее время пристальное внимание уделяется экзосомам, выделенным из ММСК. Предполагается, что действие ММСК в основном опосредовано их экзосомами, которые вызывают эффекты, подобные родительским клеткам [33-35]. При выборе тканевого источника ММСК для выделения экзосом, мы, прежде всего, руководствовались наличием у этих клеток нейропротективного потенциала, обусловленного повышенным уровнем экспрессии нейротрофических и нейроростовых факторов NGF и BDNF, наряду с устойчивостью к стрессу при их выделении и культивировании. ММСК-ВС полностью отвечают этим критериям [36]. Среди отличительных маркеров экзосом выделяют белки семейства тетраспанинов: CD63, CD9, CD37, CD81, и CD82. Известно, что данные белки отсутствуют в других типах везикул [26, 36]. Существуют различные методы выделения экзосом: ультрацентрифугирование, ультрафильтрация, эксклюзионная хроматография, осаждение, методы, основанные на иммуноафинном связывании, а также различные способы в области микрофлюидики [37]. Каждый из перечисленных методов характеризуется своими достоинствами и недостатками, так что выбор конкретного метода выделения экзосом определяется конечной целью их использования. Для характеристики экзосом часто применяются методы анализа: вестерн-блот и иммуноферментный анализ, а также проточная цитометрия. Основным преимуществом первых двух методов является возможность обнаружения характерных для экзосом белков, их размера и количества, однако такие недостатки как низкая специфичность и высокая стоимость проведения процедур, делает более привлекательным метод проточной цитометрии, который отличается своей быстротой, воспроизводимостью, специфичностью и низкой стоимостью [17, 25]. Характеристика частиц, выделяемых ММСК-ВС, используемых в нашем эксперименте, свидетельствует об их принадлежности к экзосомам (рис. 2), поскольку они экспрессировали специфичные маркеры экзосом CD9, CD63 и CD81 [38]. Перечисленные маркеры являются трансмембранными белками, которые задействованы в биогенезе экзосом, поскольку клетки нокаутных по CD9, CD63 мышей характеризуются сниженным количеством выделяемых экзосом [39, 40].

Известно, что использование экзосом, выделенных из разных источников MMCK, оказывало терапевтический эффект как на *in vitro* и *in vivo* моделях БА [1, 33], так и на модели индуцибельного поражения нейронов гиппокампа [41]. В нашем исследовании *in vivo* на модели спорадической формы БА на ОБЭ животных мы впервые показали, что позитивным эффектом обладают и экзосомы, выделенные из MMCK-BC, при их в/в введении. Наши данные согласуются с результатами других исследователей эффектов в/в введения экзосом из ММСК, полученных из различных типов ткани, наблюдавших функциональное восстановление нарушений в мозге, вызванном индуцированным инсультом или экспериментальной травмой мозга на фоне усиления ремоделирования нейритов, активации нейрогенеза и восстановления нейрональной пластичности [42–44]. Эти факты являются косвенным подтверждением, что в/в введение экзосом является эффективным для восстановления функций центральной нервной системы (ЦНС).

В нашем исследовании флуоресцентно окрашенные экзосомы после в/в введения обнаружены в ткани мозга, что доказывает способность этих частиц преодолевать гематоэнцефалический барьер. Указанное свойство экзосом обеспечивает широкие возможности их применения для терапии нарушений в ЦНС. Такие структуры головного мозга как гиппокамп и неокортекс были выбраны нами не случайно, поскольку известно, что при БА происходит недиффузное развитие амилоидогенеза во всем мозге, а появление амилоидных бляшек наблюдается в отделах прямо или опосредованно связанных с системой обоняния [45], в число которых входят рассматриваемые нами отделы. Факт возможности проникновения вводимых нами экзосом из ММСК в головной мозг при в/в введении важен также ввиду того, что гиппокамп и неокортекс играют ключевую роль в выполнении важнейших когнитивных процессов: восприятии, обучении, памяти, и поражаются в первую очередь при БА [46-48].

Однако наши результаты по визуализации меченых экзосом в мозге после их в/в введения, как и немногочисленные данные других авторов, свидетельствуют о незначительном количестве проникающих в мозг экзосом. Детальное исследование распределения экзосом после их в/в введения показывает, что основное их количество остается в печени, селезенке и легких [49].

Наш метод in vivo исследования, к сожалению, не позволял определить тип клеток-мишеней, с которыми экзосомы взаимодействуют при их попадании в мозг. Однако по данным других исследователей экзосомы, выделенные из стволовых клеток пульпы зуба человека, способствуют восстановлению деятельности дофаминергических нейронов, подвергнутых апоптотическому действию 6-гидроксидофамина [50]. В специальном исследовании. в котором культуру клеток гиппокампа обрабатывали олигомерной формой АВ и экзосомами ММСК-ВС, показали, что экзосомы локализовались в основном в астроцитах, а не в нейронах [14]. В другой работе на модели травматического поражения мозга, где исследовались эффекты внутримозгового введения экзосом, выделенных из ММСК жировой ткани, путем двой-

ного флуоресцентного окрашивания срезов мозга было установлено, что экзосомы входили в микроглию и макрофаги и через подавление их активации вызывали торможение воспаления [35]. Эффект экзосом, выделенных из ММСК костного мозга, на когнитивные функции при развитии диабета был обусловлен вхождением экзосом в поврежденные нейроны и астроциты [51]. Интересно отметить, что в условиях кислородного или глюкозного дефицита экзосомы, выделяемые олигодендроцитами, входили в нейроны и повышали их выживаемость, принимая участие в регуляции окислительного стресса [12, 52]. Перечисленные данные свидетельствуют, что возможность вхождения экзосом в нейроны определяется как источником экзосом, так и состоянием самих нейронов. Развитие патологии способствует проникновению экзосом в клетки.

В настоящее время механизм нейропротективного и нейрорегенеративного эффектов экзосом, выделенных из ММСК, остается невыясненным. Установлено, что действие экзосом зависит как от их количества, так и от состава и соотношения белков, аминокислот и нуклеотидов, мРНК, микроРНК и мтРНК, липидов и других биологически активных соединений, которые не являются полностью идентичными по своему составу родительским ММСК [5, 53]. Обязательным компонентом внеклеточных везикул, включая и экзосомы, является белок теплового шока БТШ70 [38], который, как было показано в наших и многочисленных исследованиях других авторов, обладает мощным шаперонным и нейропротективным действием, что ярко проявляется в условиях нейродегенерации альцгеймеровского типа и старения [54-56].

Роль токсической олигомерной формы Аβ в индукции гибели нейронов и синапсов признается одной из ключевых при развитии спорадической и фамильной форм БА [57, 58]. Поэтому можно предположить, что подавление нейродегенеративного процесса альцгеймеровского типа под влиянием экзосом может быть опосредовано через присутствие в них нейтральной эндопептидазы (Неприлизин, НЕП), представляющей собой интегральный мембранный белок II типа, находящийся в плазматической мембране, активный центр которого расположен во внеклеточном пространстве. Являясь эктоферментом, НЕП обеспечивает протеолитическое расщепление широкого спектра субстратов [59]. Одна из наиболее важных функций, позволяющая рассматривать его в качестве одного из терапевтических агентов при БА – способность расщеплять на различных участках аминокислотной последовательности бета-амилоидные пептиды, а также олигомерные формы Аβ (1-40) и Аβ (1-42) [1, 59]. В 2013 году Katsuda с соавт. [1] на примере экзосом из ММСК жировой ткани показали присутствие

значительного количества НЕП в этих образованиях. В 2018 году Ding и соавт. [47] на модели БА у трансгенных животных (А $\beta$ PPswe/PS1dE9) продемонстрировали, что при в/в введении экзосом, полученных из MMCK-BC, наблюдалось увеличение экспрессии НЕП в результате активации клеток микроглии, что способствовало снижению уровня А $\beta$  в головном мозге, в том числе и его растворимой формы.

Антиоксидантный эффект всегда рассматривали как возможный механизм терапевтического действия при БА. В 2019 году были опубликованы данные о присутствии в экзосомах, выделенных из ММСК-ВС, фермента каталазы, который опосредует защиту нейронов гиппокампа от окислительного стресса и повреждения синапсов, индуцируемых олигомерами АВ [14]. Отдельную роль в очистке мозга от отложений АВ могут играть и экзосомы, непосредственно выделяемые нейронами, например, через торможение нейтральной сфингомиелиназы, препятствующей превращению сфингомиелина в церамид [60]. Очищению мозга от АВ отложений может способствовать связывание АВ с гликосфинголипидами, расположенными на поверхности нейральных экзосом [61]. Экзосомы, выделяемые нейронами, участвуют в регуляции синаптической пластичности, устанавливая число АМРА-рецепторов и влияя на глутаматергическую нейропередачу [62].

Внутриклеточный механизм действия экзосом при БА может быть опосредован их влиянием на состояние митохондрий. Снижение энергетического потенциала в клетках мозга и митохондриальная дисфункция являются ранним признаком развития нейродегенеративного процесса. Одним из факторов, вызывающих нарушение как дыхательной функции, так и биогенеза митохондрий, является накопление внутриклеточного Аβ [63]. Возможно, не случайно 10.3% белкового содержания в экзосомах, выделенных из ММСК костного мозга, приходится на митохондриальные белки [64, 65]. Интересно отметить, что на модели остеоартрита, также характеризующегося митохондриальной дисфункцией, было показано, что применение экзосом, выделенных из ММСК, сопровождалось их проникновением в хондроциты и колокализацией с митохондриями. Наблюдаемый позитивный терапевтический эффект сопровождался нормализацией функций митохондрий [65]. В наших недавних исследованиях также было показано, что восстановление памяти ОБЭ мышей – модели спорадической формы БА наблюдалось под влиянием интраназального введения функционально активных нейрональных митохондрий [66].

#### ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В заключении следует отметить, что, по-вилимому, в опосредованном позитивном терапевтическом эффекте экзосом, выделяемых из ММСК-ВС, задействован не один механизм, а многокомпонентная система, включающая и периферические звенья, которая под влиянием содержащихся в экзосомах регуляторных факторов, восстанавливает свою активность, приближая ее к функционированию, характерному для здорового организма. Действительно, как правило, под влиянием экзосом наблюдается одновременное изменение разнообразных показателей, отражающих деятельность, по-видимому, тесно связанных между собой функциональных единиц, включенных в сложную систему поллержания гомеостаза. Следует отметить, что на сегодняшний день пока остается недостаточно изученной функциональная активность отдельных компонентов протеома и транскриптома экзосом из ММСК-ВС, и для более точного анализа механизмов влияния данного препарата на функциональную активность ЦНС в норме и патологии требуется проведение дальнейших исследований, направленных на изучение как действия экзосом из ММСК и самих нейронов, так и рассмотрение роли отдельных биологически активных соединений, которые входят в состав экзосом.

Благодарности. Авторы выражают благодарность фирме "Prostagnost" и лично А.В. Кешелава за помощь в выделении экзосом и В.С. Чернышёву за помощь в оценке размера экзосом.

Конфликт интересов. Авторы декларируют отсутствие явных и потенциальных конфликтов интересов, связанных с публикацией настоящей статьи.

Источники финансирования. Исследование выполнено при финансовой поддержке гранта РНФ № 18-15-00392п и гранта РФФИ в рамках научного проекта № 19-315-90047.

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

Acknowledgments: The reported study was funded by RSF № 18-15-00392 and RFBR, project number 19-315-90047.

### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Katsuda T., Tsuchiya R., Kosaka N., Yoshioka Y., Takagaki K., Oki K., Takeshita F., Sakai Y., Kuroda M., Ochiya T. 2013. Human adipose tissue-derived mesenchymal stem cells secrete functional neprilysin-bound exosomes. *Sci. Rep.* **3** (1), 1–11. https://doi.org/10.1038/srep01197
- Cai Z.Y., Xiao M., Quazi S.H., Ke Z.Y. 2018. Exosomes: A novel therapeutic target for Alzheimer's dis-

ease? Neural Regen. Res. 13 (5), 930–935. https://doi.org/10.4103/1673-5374.232490

- Polanco J.C., Hand G.R., Briner A., Li C., Götz J. 2021. Exosomes induce endolysosomal permeabilization as a gateway by which exosomal tau seeds escape into the cytosol. *Acta neuropathol.* 141 (2), 235–256. https://doi.org/10.1007/s00401-020-02254-3
- Deane R., Bell R.D., Sagare A., Zlokovic B.V. 2009. Clearance of amyloid-beta peptide across the bloodbrain barrier: Implication for therapies in Alzheimer's disease. *CNS Neurol. Disord. Drug Targets*. 8 (1), 16–30. https://doi.org/10.2174/187152709787601867
- Vlassov A.V., Magdaleno S., Setterquist R., Conrad R. 2012. Exosomes: Current knowledge of their composition, biological functions, and diagnostic and therapeutic potentials. *Biochim. Biophys. Acta.* 1820 (7), 940–948.

https://doi.org/10.1016/j.bbagen.2012.03.017

- Izadpanah M., Dargahi L., Ai J., Asgari Taei A., Ebrahimi Barough S., Mowla S.J., TavoosiDana G., Farahmandfar M. 2020. Extracellular vesicles as a neprilysin delivery system memory improvement in Alzheimer's disease. *Iran J. Pharm. Res.* **19** (2), 45–60. https://doi.org/10.22037/ijpr.2020.112062.13508
- Aleksandrova I.Y., Kuvichkin V.V., Kashparov I.A., Medvinskaya N.I., Nesterova I.V., Lunin S.M., Samokhin A.N., Bobkova N.V. 2004. Increased level of β-amyloid in the brain of bulbectomized mice. *Biochemistry*. 69 (2), 176–180.
- Poltavtseva R.A., Samokhin A.N., Bobkova N.V., Alexandrova M.A., Sukhikh G.T. 2020. Effect of transplantation of neural stem and progenitor cells on memory in animals with Alzheimer's type neurodegeneration. *Bull. Exp. Biol. Med.* 168, 589–596.
- 9. *Regenerative medicine: Laboratory to clinic.* 2017. Ed. Mukhopadhyay A. Singapore: Springer, 537 p. https://doi.org/10.1007/978-981-10-3701-6
- Жданова Д.Ю., Бобкова Н.В. 2020. Перспективы использования экзосом для диагностики и лечения болезни Альцгеймера. *Нейрокомпьютеры: разработка, применение.* 22 (4), 55–60.
- Kang X., Zuo Z., Hong W., Tang H., Geng W. 2019. Progress of research on exosomes in the protection against ischemic brain injury. *Front. Neurosci.* 13, 1149. https://doi.org/10.3389/fnins.2019.01149
- Guo M., Yin Z., Chen F., Lei P. 2020. Mesenchymal stem cell-derived exosome: A promising alternative in the therapy of Alzheimer's disease. *Alzheimers Res. Ther.* 12 (1), 1–14. https://doi.org/10.1186/s13195-020-00670-x
- Xie Z.H., Liu Z., Zhang X.R., Yang H., Wei L.F., Wang Y., Xu S.L., Sun L., Lai C., Bi J.Z., Wang X.Y. 2016. Wharton's Jelly-derived mesenchymal stem cells alleviate memory deficits and reduce amyloid-β deposition in an APP/PS1 transgenic mouse model. *Clin. Exp. Med.* 16 (1), 89–98. https://doi.org/10.1007/s10238-015-0375-0
- Bodart-Santos V., de Carvalho L.R.P., de Godoy M.A., Batista A.F., Saraiva L.M., Lima L.G., Abreu C.A., De Felice F.G., Galina A., Mendez-Otero R., Ferreira S.T. 2019. Extracellular vesicles derived from human Wharton's jelly mesenchymal stem cells protect

2021

БИОЛОГИЧЕСКИЕ МЕМБРАНЫ том 38 № 5

hippocampal neurons from oxidative stress and synapse damage induced by amyloid- $\beta$  oligomers. *Stem Cell Res. Ther.* **10** (1), 1–13. https://doi.org/10.1186/s13287-019-1432-5

15. Poltavtseva R.A., Poltavtsev A.V., Lutsenko G.V., Svirshchevskaya E.V. 2019. Myths, reality and future of mesenchymal stem cell therapy. *Cell Tissue Res.* **375** (3), 563–574.

https://doi.org/10.1007/s00441-018-2961-4

- 16. Cai G., Cai G., Zhou H., Zhuang Z., Liu K., Pei S., Wang Y., Wang H., Wang X., Xu S., Cui C., Sun M., Guo S., Jia K., Wang X., Zhang D. 2021. Mesenchymal stem cell-derived exosome miR-542-3p suppresses inflammation and prevents cerebral infarction. *Stem Cell Research & Therapy.* **12** (1), 1–12. https://doi.org/10.1186/s13287-020-02030-w
- Rastogi S., Sharma V., Bharti P.S., Rani K., Modi G.P., Nikolajeff F., Kumar S. 2021. The evolving landscape of exosomes in neurodegenerative diseases: Exosomes characteristics and a promising role in early diagnosis. *Int. J. Mol. Sci.* 22 (1), 440.
- Iranifar E., Seresht B.M., Momeni F., Fadaei E., Mehr M.H., Ebrahimi Z., Rahmati M., Kharazinejad E., Mirzaei H. 2019. Exosomes and microRNAs: New potential therapeutic candidates in Alzheimer disease therapy. J. Cell Physiol. 234 (3), 2296–2305. https://doi.org/10.1002/jcp.27214
- Jafari D., Malih S., Eslami S.S., Jafari R., Darzi L., Tarighi P., Samadikuchaksaraei A. 2019. The relationship between molecular content of mesenchymal stem cells derived exosomes and their potentials: Opening the way for exosomes based therapeutics. *Biochimie*. 165, 76–89.

https://doi.org/10.1016/j.biochi.2019.07.009

- Zhdanova D.Y., Poltavtseva R.A., Svirshchevskaya E.V., Bobkova N.V. 2021. Effect of intranasal administration of multipotent mesenchymal stromal cell exosomes on memory of mice in Alzheimer's disease Model. *Bull. Exp. Biol. Med.* **170** (4), 575–582. https://doi.org/10.1007/s10517-021-05109-3
- 21. Galipeau J., Krampera M., Barrett J., Dazzi F., Deans R.J., DeBruijn J., Dominici M., Fibbe W.E., Gee A.P., Gimble J.M., Hematti P., Koh M.B., LeBlanc K., Martin I., McNiece I.K., Mendicino M., Oh S., Ortiz L., Phinney D.G., Planat V., Shi Y., Stroncek D.F., Viswanathan S., Weiss D.J., Sensebe L. 2016. International society for cellular therapy perspective on immune functional assays for mesenchymal stromal cells as potency release criterion for advanced phase clinical trials. *Cytotherapy.* 18 (2), 151–159.
- Andreu Z., Yáñez-Mó M. 2014. Tetraspanins in extracellular vesicle formation and function. *Front. Immunol.* 5, 442. https://doi.org/10.3389/fimmu.2014.00442

https://doi.org/10.3389/fimmu.2014.00442

- Konoshenko M.Y., Lekchnov E.A., Vlassov A.V., Laktionov P.P. 2018. Isolation of extracellular vesicles: General methodologies and latest trends. *Biomed Res. Int.* (2018), 8545347. https://doi.org/10.1155/2018/8545347
- Sidhom K., Obi P.O., Saleem A. 2020. A review of exosomal isolation methods: is size exclusion chromatography the best option? *Int. J. Mol. Sci.* 21 (18), 6466. https://doi.org/10.3390/ijms21186466

- Kalluri R., LeBleu V.S. 2020. The biology, function, and biomedical applications of exosomes. *Science*. 367, 6478. https://doi.org/10.1126/science.aau6977
- Saint-Pol J., Gosselet F., Duban-Deweer S., Pottiez G., Karamanos Y. 2020. Targeting and crossing the bloodbrain barrier with extracellular vesicles. *Cells.* 9 (4), 851. https://doi.org/10.3390/cells9040851
- Elliott R.O., He M. 2021. Unlocking the power of exosomes for crossing biological barriers in drug delivery. *Pharmaceutics.* 13 (1), 122. https://doi.org/10.3390/pharmaceutics13010122
- Гуляева Н.В., Бобкова Н.В., Колосова Н.Г., Самохин А.Н., Степаничев М.Ю., Стефанова Н.А. 2017. Молекулярно-клеточные механизмы патогенеза спорадической формы болезни Альцгеймера: исследования *in vivo* на моделях грызунов. *Биохимия*. 82 (10), 1427–1443.
- Александрова И.Ю., Кувичкин В.В., Кашпаров И.А., Медвинская Н.И., Нестерова И.В., Лунин С.М., Самохин А.Н., Бобкова Н.В. 2004. Повышенный уровень β-амилоида в мозге у бульбэктомированных мышей. Биохимия. 69 (2), 218–224.
- Bobkova N.V., Poltavtseva R.A., Samokhin A.N., Sukhikh G.T. 2013. Therapeutic effect of mesenchymal multipotent stromal cells on memory in animals with Alzheimer-type neurodegeneration. *Bull. Exp. Biol. Med.* 156 (1), 119–121.
- 31. Lee J.K., Jin H.K., Bae J.S. 2009. Bone marrow-derived mesenchymal stem cells reduce brain amyloid-β deposition and accelerate the activation of microglia in an acutely induced Alzheimer's disease mouse model. *Neurosci. Lett.* **450** (2), 136–141. https://doi.org/10.1016/j.neulet.2008.11.059
- 32. Lee H.J., Lee J.K., Lee H., Carter J.E., Chang J.W., Oh W., Yung Y.S., Suh J.G., Lee B.H., Jin H.K., Bae J.S. 2012. Human umbilical cord blood-derived mesenchymal stem cells improve neuropathology and cognitive impairment in an Alzheimer's disease mouse model through modulation of neuroinflammation. *Neurobiol. Aging.* 33 (3), 588–602. https://doi.org/10.1016/j.neurobiolaging.2010.03.024
- 33. de Godoy M.A., Saraiva L.M., de Carvalho L.R.P., Vasconcelos-Dos-Santos A., Beiral H.J.V., Ramos A.B., Silva L.R.P., Leal R.B., Monteiro V.H.S., Braga C.V., de Araujo-Silva C.A., Sinis L.C., Bodart-Santos V., Kasai-Brunswick T.H., Alcantara C.L., Lima A.P.C.A., da Cunha-E Silva N.L., Galina A., Vieyra A., De Felice F.G., Mendez-Otero R., Ferreira S.T. 2018. Mesenchymal stem cells and cell-derived extracellular vesicles protect hippocampal neurons from oxidative stress and synapse damage induced by amyloid-β oligomers. *J. Biol. Chem.* 293 (6), 1957–1975.
- 34. Mendt M., Rezvani K., Shpall E. 2019. Mesenchymal stem cell-derived exosomes for clinical use. *Bone Marrow Transplant*. **54** (2), 789–792.
- Chen Y., Li J., Ma B., Li N., Wang S., Sun Z., Xue C., Han Q., Wei J., Zhao R.C. 2020. MSC-derived exosomes promote recovery from traumatic brain injury via microglia/macrophages in rat. *Aging (Albany NY)*. 12 (18), 18274–18296. https://doi.org/10.18632/aging.103692

 Petrenko Y., Vackova I., Kekulova K., Chudickova M., Koci Z., Turnovcova K., Kupcova Skalnikova H., Vodicka P., Kubinova S. A. 2020. A comparative analysis of multipotent mesenchymal stromal cells derived from different sources, with a focus on neuroregenerative potential. *Sci. Rep.* 10 (1), 1–15.

https://doi.org/10.1038/s41598-020-61167-z

- Kurian T.K., Banik S., Gopal D., Chakrabarti S., Mazumder N. 2021. Elucidating methods for isolation and quantification of exosomes: A review. *Mol. Biotech.* 63 (4), 249–266. https://doi.org/10.1007/s12033-021-00300-3
- Kowal J., Arras G., Colombo M., Jouve M., Morath J.P., Primdal-Bengtson B., Dingli F., Loew D., Tkach M., Théry C. 2016. Proteomic comparison defines novel markers to characterize heterogeneous populations of extracellular vesicle subtypes. *Proc. Natl. Acad. Sci.* USA. 113 (8), E968–E977.

https://doi.org/10.1073/pnas.1521230113

- Chairoungdua A., Smith D.L., Pochard P., Hull M., Caplan M.J. 2010. Exosome release of β-catenin: a novel mechanism that antagonizes Wnt signaling. *J. Cell Biol.* 190 (6), 1079–1091. https://doi.org/10.1083/jcb.201002049
- Hurwitz S.N., Conlon M.M., Rider M.A., Brownstein N.C., Meckes Jr, D.G. 2016. Nanoparticle analysis sheds budding insights into genetic drivers of extracellular vesicle biogenesis. *J. Extracell. Vesicles.* 5 (1), 31295.

https://doi.org/10.3402/jev.v5.31295

 Chen S.Y., Lin M.C., Tsai J.S., He P.L., Luo W.T., Herschman H., Li H.J. 2019. EP4 antagonist-elicited extracellular vesicles from mesenchymal stem cells rescue cognition/learning deficiencies by restoring brain cellular functions. *Stem Cells Transl. Med.* 8 (7), 707– 723.

https://doi.org/10.1002/sctm.18-0284

- 42. Xin H., Li Y., Cui Y., Yang J.J., Zhang Z.G., Chopp M. 2013. Systemic administration of exosomes released from mesenchymal stromal cells promote functional recovery and neurovascular plasticity after stroke in rats. J. Cereb. Blood Flow Metab. 33 (11), 1711–1715. https://doi.org/10.1038/jcbfm.2013.152
- Zhang Y., Chopp M., Meng Y., Katakowski M., Xin H., Mahmood A., Xiong, Y. 2015. Effect of exosomes derived from multipluripotent mesenchymal stromal cells on functional recovery and neurovascular plasticity in rats after traumatic brain injury. *J. Neurosurg.* 122 (4), 856–867.

https://doi.org/10.3171/2014.11.JNS14770

- 44. Kim D.K., Nishida H., An S.Y., Shetty A.K., Bartosh T.J., Prockop D.J. 2016. Chromatographically isolated CD63+ CD81+ extracellular vesicles from mesenchymal stromal cells rescue cognitive impairments after TBI. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **113** (1), 170–175.
- Brunjes P.C., Frazier L.L. 1986. Maturation and plasticity in the olfactory system of vertebrates. *Brain Res. Rev.* 11 (1), 1–45. https://doi.org/10.1016/0165-0173(86)90008-1
- 46. Tulving E., Markowitsch H.J. 1997. Memory beyond the hippocampus. *Curr. Opin. Neurobiol.* 7 (2), 209– 216. https://doi.org/10.1016/S0959-4388(97)80009-8

- Ding M., Shen Y., Wang P., Xie Z., Xu S., Zhu Z., Wang Y., Lyu Y., Wang D., Xu L., Bi J., Yang H. 2018. Exosomes isolated from human umbilical cord mesenchymal stem cells alleviate neuroinflammation and reduce amyloid-beta deposition by modulating microglial activation in Alzheimer's disease. *Neurochem. Res.* 43 (11), 2165–2177.
- 48. Sekeres M.J., Winocur G., Moscovitch M. 2018. The hippocampus and related neocortical structures in memory transformation. *Neurosci. Lett.* **680**, 39–53. https://doi.org/10.1016/j.neulet.2018.05.006
- Wiklander O.P., Nordin J.Z., O'Loughlin A., Gustafsson Y., Corso G., Mäger I., Vader P., Lee Y., Sork H., Seow Y., Heldring N., Alvarez-Erviti L., Smith C.I., Le Blanc K., Macchiarini P., Jungebluth P., Wood M.J., Andaloussi S.E. 2015. Extracellular vesicle in vivo biodistribution is determined by cell source, route of administration and targeting. *J. Extracell. Vesicles.* 4 (1), 26316.

https://doi.org/10.3402/jev.v4.26316

 Jarmalavičiūtė A., Tunaitis V., Pivoraitė U., Venalis A., Pivoriūnas A. 2015. Exosomes from dental pulp stem cells rescue human dopaminergic neurons from 6-hydroxydopamine–induced apoptosis. *Cytotherapy*. 17 (7), 932– 939.

https://doi.org/10.1016/j.jcyt.2014.07.013

- Nakano M., Nagaishi K., Konari N., Saito Y., Chikenji T., Mizue Y., Fujimiya M. 2016. Bone marrow-derived mesenchymal stem cells improve diabetesinduced cognitive impairment by exosome transfer into damaged neurons and astrocytes. *Sci. Rep.* 6 (1), 1–14. https://doi.org/10.1038/srep24805
- 52. Fröhlich D., Kuo W.P., Frühbeis C., Sun J.J., Zehendner C.M., Luhmann H.J., Pinto S., Toedling J., Trotter J., Krämer-Albers E.M. 2014. Multifaceted effects of oligodendroglial exosomes on neurons: Impact on neuronal firing rate, signal transduction and gene regulation. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.* **369** (1652), 20130510.

https://doi.org/10.1098/rstb.2013.0510

- 53. Haraszti R.A., Didiot M.C., Sapp E., Leszyk J., Shaffer S.A., Rockwell H.E., Gao F., Narain N.R., DiFiglia M., Kiebish M.A., Aronin N., Khvorova A. 2016. High-resolution proteomic and lipidomic analysis of exosomes and microvesicles from different cell sources. *J. Extracell. Vesicles.* 5 (1), 32570. https://doi.org/10.3402/jev.v5.32570
- Bobkova N.V., Garbuz D.G., Nesterova I., Medvinskaya N., Samokhin A., Alexandrova I., Yashin V., Karpov V., Kukharsky M., Ninkina N., Smirnov A., Nudler E., Evgen'ev M. 2014. Therapeutic effect of exogenous hsp70 in mouse models of Alzheimer's disease. J. Alzheimer's Dis. 38 (2), 425–435.
- 55. Bobkova N.V., Evgen'ev M., Garbuz D.G., Kulikov A.M., Morozov A., Samokhin A., Velmeshev D., Medvinskaya N., Nesterova I., Pollock A., Nudler E. 2015. Exogenous Hsp70 delays senescence and improves cognitive function in aging mice. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **112** (52), 16006–16011.
- Evgen'ev M.B., Krasnov G.S., Nesterova I.V., Garbuz D.G., Karpov V.L., Morozov A.V., Snezhkina A., Samokhin A., Sergeev A., Kulikov A., Bobkova N.V. 2017. Molecular mechanisms underlying neuroprotec-
tive effect of intranasal administration of human Hsp70 in mouse model of Alzheimer's disease. *J. Alzheimer's Dis.* **59** (4), 1415–1426.

 Sadigh-Eteghad S., Sabermarouf B., Majdi A., Talebi M., Farhoudi M., Mahmoudi J. 2015. Amyloid-beta: A crucial factor in Alzheimer's disease. *Med. Princ. Pract.* 24 (1), 1–10.

https://doi.org/10.1159/000369101

- Madav Y., Wairkar S., Prabhakar B. 2019. Recent therapeutic strategies targeting beta amyloid and tauopathies in Alzheimer's disease. *Brain Res. Bull.* 146, 171–184.
- Malito E., Hulse R.E., Tang W.J. 2008. Amyloid β-degrading cryptidases: Insulin degrading enzyme, presequence peptidase, and neprilysin. *Cell. Mol. Life Sci.* 65 (16), 2574–2585. https://doi.org/10.1007/s00018-008-8112-4
- Dinkins M.B., Dasgupta S., Wang G., Zhu G., Bieberich E. 2014. Exosome reduction in vivo is associated with lower amyloid plaque load in the 5XFAD mouse model of Alzheimer's disease. *Neurobiol. Aging.* 35 (8), 1792–1800.

https://doi.org/10.1016/j.neurobiolaging.2014.02.012

 Yuyama K., Sun H., Sakai S., Mitsutake S., Okada M., Tahara H., Furukawa J., Fujitani N., Shinohara Y., Igarashi Y. 2014. Decreased amyloid-β pathologies by intracerebral loading of glycosphingolipid-enriched exosomes in Alzheimer model mice. *J. Biol. Chem.* 289 (35), 24488–24498. https://doi.org/10.1074/jbc.M114.577213

- 62. Delpech J.C., Herron S., Botros M.B., Ikezu T. 2019. Neuroimmune crosstalk through extracellular vesicles in health and disease. *Trends Neurosci.* **42** (5), 361–372. https://doi.org/10.1016/j.tins.2019.02.007
- 63. Аветисян А.В., Самохин А.Н., Александрова И.Ю., Зиновкин Р.А., Симонян Р.А., Бобкова Н.В. 2016. Функциональное нарушение митохондрий неокортекса и гиппокампа у мышей с бульбэктомией – модели болезни Альцгеймера. Биохимия. 81 (6), 802–812.
- 64. Choi D.S., Kim D.K., Kim Y.K., Gho Y.S. 2013. Proteomics, transcriptomics and lipidomics of exosomes and ectosomes. *Proteomics*. **13** (10–11), 1554–1571. https://doi.org/10.1002/pmic.201200329
- 65. Chen P., Zheng L., Wang Y., Tao M., Xie Z., Xia C., Gu C., Chen J., Qiu P., Mei S., Ning L., Shi Y., Fang C., Fan S., Lin X. 2019. Desktop-stereolithography 3D printing of a radially oriented extracellular matrix/mesenchymal stem cell exosome bioink for osteochondral defect regeneration. *Theranostics*. 9 (9), 2439–2459. https://doi.org/10.7150/thno.31017
- 66. Бобкова Н.В., Жданова Д.Ю., Белослудцева Н.В., Миронова Г.Д. Таргетная неинвазивная трансплантация в мозг функционально активных митохондрий для лечения нейродегенеративных заболеваний. Патент Российской Федерации на изобретение. Заявка № 2019127519 от 02.09.2019.

# Alzheimer's Type Neurodegeneration. Possible Correction of Memory Impairment with Intravenous Injection of Exosomes

R. A. Poltavtseva<sup>1, \*</sup>, N. V. Bobkova<sup>2</sup>, D. Yu. Zhdanova<sup>2</sup>, E. V. Svirshchevskaya<sup>1, 3</sup>, G. T. Sukhikh<sup>1</sup>

<sup>1</sup>National Medical Research Center for Obstetrics, Gynecology, and Perinatology named after Academician V.I. Kulakov, Ministry of Healthcare of the Russian Federation, Moscow, 117997 Russia

<sup>2</sup>Institute of Cell Biophysics, Russian Academy of Sciences, FRC PSCBR RAS,

Pushchino, Moscow oblast, 142290 Russia

<sup>3</sup>Semyakin–Ovchinnikon Institute of Bioorganic Chemistry, Russian Academy of Sciences, Moscow, 117997 Russia \*e-mail: rimpol@mail.ru

Alzheimer's disease (AD) remains one of the socially significant pathologies for which there is still no effective therapy. The aim of this work was to analyze the effectiveness of intravenous administration of exosomes obtained from the cultural fluid of multipotent mesenchymal stromal cells obtained from the Wharton jelly of the human umbilical cord. Exosomes were isolated by column filtration in a gravitational field and characterized by size, number, expression of specific markers, and *in vitro* binding to mouse fibroblasts L929. On a model of sporadic AD, it was shown that intravenous administration of exosomes prevented the deterioration of spatial memory in olfactory bulbectomized mice (OBX). Visualization of fluorescently labeled exosomes in the cortex and hippocampus after their intravenous administration indicates that the therapeutic effect could be due to the ability of exosomes to enter the brain of OBX animals.

**Keywords:** Alzheimer's disease, multipotent mesenchymal stromal cells, Wharton jelly, human umbilical cord, exosomes, model of the sporadic form of Alzheimer's disease

УДК 577.352.465

# РІ828 ПОДАВЛЯЕТ Са<sup>2+</sup>-СИГНАЛИЗАЦИЮ, ИНИЦИИРУЕМУЮ АМИНЕРГИЧЕСКИМИ АГОНИСТАМИ, ПО МЕХАНИЗМУ, НЕЗАВИСИМОМУ ОТ ИНГИБИРОВАНИЯ РІЗ-КИНАЗЫ

© 2021 г. Е. А. Дымова<sup>*a*</sup>, О. А. Рогачевская<sup>*a*</sup>, Е. А. Воронова<sup>*a*</sup>, П. Д. Котова<sup>*a*</sup>, \*

<sup>а</sup>Институт биофизики клетки РАН, ФИЦ ПНЦБИ РАН, Пущино, Московская обл., 142290 Россия \*e-mail: p.d.kotova@gmail.com Поступила в редакцию 19.02.2021 г. После доработки 23.03.2021 г. Принята к публикации 26.03.2021 г.

Самые разнообразные биологические процессы регулируются при участии гептаспиральных трансмембранных рецепторов (G-protein coupled receptor, GPCR-рецепторы), включая GPCR-рецепторы адреналина, ацетилхолина, гистамина, дофамина и серотонина. Многие из этих аминергических GPCR-рецепторов сопряжены с фосфоинозитидным каскадом и инициируют внутриклеточную  $Ca^{2^+}$ -сигнализацию, которая регулируется различными ферментами, в том числе фосфатидилинозитол-3-киназой (PI3-киназа). Известно, что некоторые ингибиторы PI3-киназы могут оказывать неспецифическое действие на внутриклеточные мишени, не относящиеся к семейству PI3-киназ. В данной работе с помощью мониторинга внутриклеточного  $Ca^{2^+}$  в одиночных клетках нами показано, что ингибитор PI3-киназы PI828 блокирует мобилизацию внутриклеточного  $Ca^{2^+}$ , вызванную активацией мускариновых, гистаминовых и серотониновых рецепторов. Ряд полученных данных указывает на то, что этот эффект не связан с ингибированием PI3-киназы, а, скорее всего, обусловлен прямым действием PI828 на перечисленные аминергические GPCR-рецепторы.

**Ключевые слова:** аминергические GPCR-рецепторы, PI828, Ca<sup>2+</sup>-сигнализация, PI3-киназа **DOI:** 10.31857/S0233475521050042

### введение

Аминергические GPCR-рецепторы составляют группу гептаспиральных трансмембранных рецепторов (G-protein coupled receptor, GPCR-peцептор), активируемых биогенными аминами, включая адреналин, гистамин, дофамин и серотонин. Из структурных соображений в подсемейство аминергических GPCR-рецепторов также включены мускариновые рецепторы ацетилхолина [1]. Аминергические GPCR-рецепторы широко представлены в клетках различных типов и регулируют самые разнообразные физиологические процессы от передачи нервного возбуждения и сокращения мышечных волокон до пролиферации и дифференцировки клеток. Участие этих рецепторов в физиологических процессах обусловлено их сопряжением с различными внутриклеточными сигнальными системами, в частности с кальциевой (Ca<sup>2+</sup>) [2–4]. Все больше фактов указывают на то, что агонист-индуцированная Са<sup>2+</sup>сигнализация регулируется в том числе при участии фосфатидилинозитол-3-киназ класса I (PI3-киназ) – ферментов, катализирующих образование фосфолипида фосфатидилинозитол-

многих сигнальных белков [5, 6]. В некоторых работах показано, что ингибиторы PI3-киназ связываются с рядом внутриклеточных белков, не относящихся к семейству РІЗ-киназ [7, 8]. Ранее нами было продемонстрировано, что ингибитор PI3-киназы LY294002 и его неактивный аналог LY303511 подавляют внутриклеточные Ca<sup>2+</sup>-сигналы, инициируемые такими аминергическими агонистами, как ацетилхолин, гистамин и серотонин. Полученные данные свидетельствовали о том, что LY294002 и LY303511 влияли на Ca<sup>2+</sup>-сигнализацию, инициируемую данными агонистами, независимым от PI3-киназ образом, скорее всего воздействуя на аминергические рецепторы напрямую [9]. Оставалось неясным, являются ли соединения LY294002 и LY303511 уникальными в этом отношении, или другие ингибиторы PI3-киназы также могут оказывать антагонистическое действие на аминергические рецепторы. В данной работе исследовали эффекты ингибитора РІЗ-киназы РІ828 на Са<sup>2+</sup>-сигналы, вызываемые

3,4,5-трисфосфата (PIP3), который, в свою очередь, координирует локализацию и активность агонистами аминергических рецепторов, в клетках различных линий.

тывали с помощью программы Sigma Plot 12.5 (Systat Software).

### МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Культивирование и трансфекция клеток. В работе использовали клетки почки эмбриона человека линии НЕК 293, клетки глиомы мозга крысы линии С6 и клетки яичника китайского хомячка ранее полученной нами моноклональной линии СНО/5-НТ2С, экспрессирующие рекомбинантный серотониновый рецептор 5-НТ2С. Клетки используемых линий культивировали во влажной атмосфере с 5% CO<sub>2</sub> в воздухе при 37°С. Клетки линии НЕК 293 культивировали в среде DMEM (Gibco), содержащей 4.5 г/л глюкозы, 10% эмбриональной бычьей сыворотки (HyClone), 100 мг/мл гентамицина (Sigma), 2 мМ глутамина (Sigma). Клетки линий С6 и СНО/5-НТ2С культивировали в среде F12 (Gibco), содержащей 10% эмбриональной бычьей сыворотки (HyClone), 100 мг/мл гентамицина (Sigma), 2мМ глутамина (Sigma). Клетки всех используемых линий трансфицировали плазмидным вектором CMV-R-GECO1 (Addgene) с целью индукции экспрессии R-GECO1 – генетически кодируемого сенсора цитозольного Ca<sup>2+</sup>. Для трансфекциии использовали набор для липофекции Lipofectamine 3000 (Invitrogen) по оптимизированному согласно рекомендациям производителя протоколу. Для физиологических экспериментов использовали клетки через 24-48 ч после трансфекции.

Мониторинг внутриклеточного Ca<sup>2+</sup> в одиночных клетках. Клетки прикрепляли ко дну фотометрической камеры с помощью адгезивного материала Cell Tak (Corning) и выдерживали при комнатной температуре 30 мин. Внеклеточный раствор содержал (мМ): 130 NaCl, 5 KCl, 2 CaCl<sub>2</sub>, 1 MgCl<sub>2</sub>, 10 HEPES, pH 7.4, 10 глюкозы. Фотометрические эксперименты проводили с использованием инвертированного флуоресцентного микроскопа Axiovert 135 (Zeiss), оборудованного объективом Plan NeoFluar 20×/0.75 и цифровой ЕМССД камерой LucaR (Andor Technology). Флуоресценцию клеток возбуждали на длине волны 572  $\pm$  17.5 нм, эмиссию регистрировали в области 634 ± 34 нм, что соответствует спектральным характеристикам R-GECO1. Изменение концентрации Ca<sup>2+</sup> в цитоплазме оценивали по относительному изменению интенсивности флуоресценции R-GECO1  $\Delta F/F_0$ , где  $\Delta F = F - F_0$ , F и  $F_0$  – интенсивность эмиссии Ca<sup>2+</sup>-индикатора в текущий момент времени и в начале регистрации, соответственно. Количественный фотометрический анализ изображений осуществляли с использованием программы NIS Elements (Nikon). Полученные экспериментальные данные обраба-

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Для анализа влияния PI828 на Ca<sup>2+</sup>-сигналы. инициированные ацетилхолином и гистамином, использовали клетки, эндогенно экспрессирующие мускариновые или гистаминовые GPCR-рецепторы, а именно, клетки почки эмбриона человека НЕК293 и клетки глиомы мозга крысы С6 соответственно. Кратковременная стимуляция соответствующих клеток ацетилхолином (1 мкМ) или гистамином (2 мкМ) инициировала в них Са<sup>2+</sup>-ответы, которые полностью подавлялись в присутствии PI828 в концентрации 10-30 мкМ (рис. 1*a*, 1*б*). Для исследования влияния PI828 на серотонин-индуцированную Ca<sup>2+</sup>-сигнализацию использовали моноклональную линию клеток яичника китайского хомячка СНО/5-НТ2С. полученную нами ранее путем трансфекциии клеток СНО плазмидным вектором, несущим кДНК серотонинового рецептора 5-НТ2С. Как и в случае Са<sup>2+</sup>-ответов на ацетилхолин и гистамин (рис. 1а, 1б), РІ828 в концентрации 3 мкМ обратимо блокировал Ca<sup>2+</sup>-ответы клеток CHO/5-HT2C на серотонин (1 нМ) (рис. 1*в*).

Формально, полученные результаты можно рассматривать как свидетельство участия PI3-киназы в генерации Ca<sup>2+</sup>-ответов на перечисленные агонисты аминергических рецепторов. Между тем ингибитор PI3-киназы другой химической природы вортманнин (wortmannin) (1–10 мкМ) не влиял на способность клеток генерировать  $Ca^{2+}$ -ответы на те же агонисты (рис. 2). Поскольку вортманнин и PI828 вызывали различные физиологические эффекты, можно было думать, что эти соединения действовали на разные клеточные мишени. Иными словами, нечувствительность клеточных ответов к вортманнину указывала на то, что эффекты PI828, скорее всего, не были специфическими, т.е. не были опосредованы ингибированием PI3-киназы. В пользу такой точки зрения также свидетельствовал тот факт, что PI828 способен связываться не только с PI3-киназой, но и с рядом других внутриклеточных белков [7]. Кроме того, РІ828 является структурным аналогом LY294002 - другого ингибитора PI3-киназы, который может влиять на Са<sup>2+</sup>-сигнализацию независимым от PI3-киназы образом [9, 10]. Отметим в качестве дополнительного аргумента, что вортманнин ингибирует PI3-киназу необратимым образом [11], и поэтому способность PI828, апплицированного после вортманнина, ингибировать клеточные ответы (рис. 2) также не могла быть связана с его действием на PI3-киназу. Важно также отметить, что ингибирование Са<sup>2+</sup>-ответов наблюдалось при аппликации PI828



**Рис. 1.** PI828 ингибирует Ca<sup>2+</sup>-ответы клеток различных линий на аминергические агонисты. a-e – Репрезентативные регистрации Ca<sup>2+</sup>-ответов одиночных клеток на агонисты аминергических рецепторов и ATP в контроле и в присутствии PI828. Здесь и далее моменты и продолжительность аппликаций веществ обозначены горизонтальными линиями выше экспериментальной кривой. Изменение внутриклеточного Ca<sup>2+</sup> характеризовали относительной флуоресценцией R-GECO1  $\Delta F/F_0$ , где  $\Delta F = F - F_0$ , F и  $F_0$  – текущая интенсивность эмиссии индикатора и его эмиссия в начале регистрации соответственно. a – Ответы клетки НЕК293 на ацетилхолин (ACh) (1 мкМ) и ATP (5 мкМ) (n = 147);  $\delta$  – ответы клетки C6 на гистамин (Hist) (2 мкМ) и ATP (5 мкМ) (n = 53); e – ответы клетки CHO/5-HT2C на серотонин (Ser) (1 нМ) и ATP (5 мкМ) (n = 108).

одновременно с исследуемым агонистом (рис. 1, 2), хотя обычно ингибирование внутриклеточных мишеней в интактных клетках требует времени для проникновения ингибитора через плазматическую мембрану. При этом  $Ca^{2+}$ -ответы этих же клеток на агонист пуринергических рецепторов АТР (5 мкМ) не изменялись в присутствии PI828 даже в случае предынкубации с ним (рис. 1). Совокупность перечисленных особенностей феноменологии действия PI828 на  $Ca^{2+}$ -ответы, вызванные использованными в работе аминергическими агонистами, позволяет думать, что их подавление в данном случае вызвано не ингибированием PI3-киназы, а ранее не описанным экстраклеточным действием этого соединения.

Таким образом, в данной работе нами показано, что ингибитор PI3-киназы PI828 блокирует мобилизацию внутриклеточного Ca<sup>2+</sup>, вызванную активацией мускариновых и гистаминовых



**Рис. 2.** Ca<sup>2+</sup>-ответы клеток различных линий на агонисты аминергических рецепторов в различных условиях. Репрезентативные регистрации Ca<sup>2+</sup>-ответов клетки HEK293 на 1 мкМ ACh (n = 54) (a), клетки глиомы C6 на 3 мкМ Hist (n = 27) (6) и клетки CHO/5-HT2C на 1 нМ Ser (n = 76) (a) в контроле и в присутствии вортманнина (Wortm) (10 мкМ) и PI828 (30 мкМ).

рецепторов, и серотонинового рецептора 5-НТ2С. Суммируя результаты, полученные при изучении Ca<sup>2+</sup>-ответов клеток трех различных линий, можно утверждать, что эффект данного соединения не был связан с ингибированием PI3-киназы, а, скорее всего, был обусловлен его прямым действием на перечисленные аминергические GPCR-рецепторы, как и в случае соединений LY294002 и LY303511 [9]. Для подтверждения возможности связывания PI828 с различными аминергическими рецепторами в дальнейшем мы планируем использовать методы молекулярной динамики.

Конфликт интересов. Авторы декларируют отсутствие явных и потенциальных конфликтов интересов, связанных с публикацией настоящей статьи.

Источники финансирования. Работа выполнена при поддержке гранта РНФ № 19-75-10068 в части получения клеточных линий с экспрессией генетически-кодируемых сенсоров и проекта № 20-74-00056 в части физиологических экспериментов.

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

### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- 1. Vass M., Podlewska S., de Esch I.J.P., Bojarski A.J., Leurs R., Kooistra A.J., de Graaf C. 2019. Aminergic GPCR-ligand interactions: A chemical and structural map of receptor mutation data. *J. Med. Chem.* **62** (8), 3784–3839.
- Moya-García A.A., Pino-Ángeles A., Sánchez-Jiménez F., Urdiales J.L., Medina M.Á. 2021. Histamine, metabolic remodelling and angiogenesis: A systems level approach. *Biomolecules.* 11 (3), 415.
- Pytliak M., Vargová V., Mechírová V., Felšöci M. 2011. Serotonin receptors – from molecular biology to clinical applications. *Physiol. Res.* 60 (1), 15–25.
- 4. Brown D.A. 2019. Acetylcholine and cholinergic receptors. *Brain Neurosci. Adv.* **3**, 2398212818820506.
- Vanhaesebroeck B., Guillermet-Guibert J., Graupera M., Bilanges B. 2010. The emerging mechanisms of isoform-specific PI3K signalling. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 11, 329–341.

- 6. Jean S., Kiger A.A. 2014. Classes of phosphoinositide 3-kinases at a glance. *J. Cell Sci.* **127**, 923–928.
- Gharbi S.I., Zvelebil M.J., Shuttleworth S.J., Hancox T., Saghir N., Timms J.F., Waterfield M.D. 2007. Exploring the specificity of the PI3K family inhibitor LY294002. *Biochem. J.* 404 (1), 15–21.
- Dittmann A., Werner T., Chung C.W., Savitski M.M., Fälth Savitski M., Grandi P., Hopf C., Lindon M., Neubauer G., Prinjha R.K., Bantscheff M., Drewes G. 2014. The commonly used PI3-kinase probe LY294002 is an inhibitor of BET bromodomains. *ACS Chem. Biol.* 9 (2), 495–502.
- Kotova P.D., Kochkina E.N., Lyamin O.O., Rogachevskaja O.A., Kovalenko N.P., Ivashin D.S., Bystrova M.F., Enukashvily N.I., Kolesnikov S.S. 2020. Calcium signaling mediated by aminergic GPCRs is impaired by the PI3K inhibitor LY294002 and its analog LY303511 in a PI3K-independent manner. *Eur. J. Pharmacol.* 880, 173182.
- Tolloczko B., Turkewitsch P., Al-Chalabi M., Martin J.G. 2004. LY-294002 [2-(4-morpholinyl)-8-phenyl-4H-1benzopyran-4-one] affects calcium signaling in airway smooth muscle cells independently of phosphoinositide 3-kinase inhibition. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **311** (2), 787–793.
- Powis G., Bonjouklian R., Berggren M.M., Gallegos A., Abraham R., Ashendel C., Zalkow L., Matter W.F., Dodge J., Grindey G. 1994. Wortmannin, a potent and selective inhibitor of phosphatidylinositol-3-kinase. *Cancer Res.* 54 (9), 2419–2423.

# PI828 Impairs Ca<sup>2+</sup> Signaling Mediated by Aminergic Agonists in a PI3-kinase Independent Manner

E. A. Dymova<sup>1</sup>, O. A. Rogachevskaja<sup>1</sup>, E. A. Voronova<sup>1</sup>, P. D. Kotova<sup>1</sup>, \*

<sup>1</sup>Institute of Cell Biophysics, Russian Academy of Sciences, FRC PSCBR RAS, Pushchino, Moscow oblast, 142290 Russia \*e-mail: p.d.kotova@gmail.com

A wide variety of biological processes are regulated by G-protein coupled receptors (GPCRs), including adrenaline, acetylcholine, histamine, dopamine and serotonin receptors. Many of these aminergic GPCRs are coupled to the phosphoinositide cascade and initiate intracellular  $Ca^{2+}$  signaling, which is regulated by various enzymes, including phosphoinositide 3-kinase (PI3K). Reportedly, certain PI3-kinase inhibitors exert nonspecific effects on cell functions by aiming at intracellular targets unrelated to the PI3K family. Here we monitored intracellular  $Ca^{2+}$  in individual cells of several lines and found that the activation of muscarinic, histamine, or serotonin GPCRs led to the mobilization of intracellular  $Ca^{2+}$  and that the PI3-kinase inhibitor PI828 rendered cells irresponsive. The evidence obtained indicated that PI828 effect on cell responsivity was not associated with the inhibition of PI3-kinase, but presumably took place due to the direct action of PI828 on the appropriate aminergic GPCRs.

Keywords: aminergic GPCR, PI828, Ca<sup>2+</sup> signaling, PI3-kinase

———— КРАТКИЕ СООБЩЕНИЯ ———

УДК 577

# ОЦЕНКА СЕЛЕКТИВНОСТИ ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ ФОСФОЛИПАЗЫ A2 С МЕМБРАНАМИ ИЗ РОРС/РОРС С ПОМОЩЬЮ ПОСТРОЕНИЯ КАРТ ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ

### © 2021 г. А. С. Алексеева<sup>*a*</sup>, П. Е. Волынский<sup>*a*</sup>, И. А. Болдырев<sup>*a*</sup>, \*

<sup>а</sup>Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, Москва, 117997 Россия \*e-mail: ivan@lipids.ibch.ru Поступила в редакцию 23.04.2021 г. После доработки 12.05.2021 г. Принята к публикации 13.05.2021 г.

Регулирование активности и селективности фосфолипазы А2 (ФЛА2), способной отшеплять жирную кислоту из второго положения (sn-2) фосфолипида, осуществляется через мембраносвязывающий и каталитический сайты фермента. Для осуществления гидролитической активности ФЛА2 сначала должна связаться с фосфолипидной мембраной, при этом эффективность связывания зависит от состава мембраны. Мембраносвязывающий участок ФЛА2 сформирован несколькими десятками аминокислот, и его состав различается от фермента к ферменту, ключевую роль во взаимодействии играют гидрофобные и положительно заряженные аминокислоты. В данной работе мы исследовали взаимодействие ФЛА2 из яда пчелы с фосфолипидными бислоями из пальмитоилолеоилфосфатидилхолина (РОРС), содержащими различное количество пальмитоилолеоилфосфатидилглицерина (РОРG). На основании измерения собственной флуоресценции белка и анизотропии флуоресценции липидного зонда мы предлагаем построение карт взаимодействия липид-белок, которые отражают как эффективность связывания белка, так и изменения строения мембраны. В последних учитывается изменение анизотропии флуоресценции метки, которая в свою очередь является мерой подвижности липидного окружения флуоресцентного зонда. Анализ карт взаимодействия показал, что есть связь между подвижностью липидов и эффективностью связывания фермента – оптимум взаимодействия ФЛА2 с мембранами из смеси РОРС/РОРС лежит в области наибольшей подвижности липидов, а не в области наибольшего отрицательного заряда. Такая зависимость дополняет существующие представления о процессе распознавания ферментом поверхности мембраны и селекции липидов уже связанным с мембраной ферментом. Предлагаемый метод построения карт может быть распространен на другие мембраноактивные белки.

Ключевые слова: фосфолипаза A2, субстратная специфичность, взаимодействие липид-белок, флуоресцентная спектроскопия

DOI: 10.31857/S0233475521050030

### введение

Секреторная фосфолипаза A2 (сФЛА2) — интерфейсный белок, способный гидролизовать липиды на поверхности биологической мембраны и селективно отщеплять жирную кислоту из второго положения (*sn-2*) фосфолипида. Участок белка контактирующий с поверхностью мембраны принято называть мембраносвязывающим сайтом (в англоязычной литературе — interfacial binding site, IBS). Он отвечает за удержание фермента на поверхности мембраны. Каталитический сайт сФЛА2 отвечает непосредственно за гидролиз отдельной молекулы субстрата. Строение каталитического сайта высококонсервативно и для разных представителей сФЛА2 уже достаточно хорошо изучено (ключевую роль играют остатки His и Asp в каталитическом кармане) [1]. Мембраносвязывающий сайт формируется несколькими десятками аминокислот, и его строение варьируется от фермента к ферменту [2]. Для представительного набора сФЛА2 человека и мыши (всего 16 различных сФЛА2) [3] было показано, что гидролиз однокомпонентных липосом из фосфатидилхолина, фосфатидилсерина или фосфатидилглицерина проходит с разной эффективностью. В случае липосом из фосфатидилхолина развитие реакции

Сокращения: сФЛА2 — секреторная фосфолипаза A2, bvPLA2 — фосфолипаза A2 из яда пчелы Apis mellifera, IBS — мембраносвязывающий сайт, POPC — пальмитоилолеоилфосфатидилхолин, POPG — пальмитоилолеоилфосфатидилглицерин, TMB-PC — 1,3,5,7-тетраметил-BODIPYмеченый фосфатидилхолин.

(появление продукта) сопровождалось лаг-фазой для некоторых сФЛА2, в то время как отрицательно заряженные липиды гидролизовались без задержки всеми сФЛА2. В целом, скорость гидролиза липосом из фосфатидилглицерина была самой высокой. В то же время для многокомпонентных липосом из смеси фосфатидной кислоты, фосфатидилхолина, фосфатидилэтаноламина, фосфатидилметанола, фосатидилсерина и фосфатидилинозита в эквимолярном соотношении, лизофосфатидилхолин обнаруживался в большем количестве, чем другие лизолипиды, т.е. из смеси липидов предпочтительнее гидролизуется именно фосфатидилхолин [3].

Таким образом, активность и селективность сФЛА2 определяется совместной работой сайта IBS и каталитического сайта. Для детектирования конечной гидролитической активности сФЛА2 разработан широкий набор методик [4, 5], но для более детального изучения функционирования интерфейсных белков применяется сложный комплекс экспериментальных подходов [6]. Невыясненным остается момент распознавания ферментом поверхности мембраны и процесс селекции липидов уже связанным с мембраной ферментом.

Для изучения селективности сФЛА2 предпринимаются исследования механизма взаимодействия фермента с мембраной. Так, с помощью молекулярной динамики было исследовало взаимодействие с мембранами различного состава синовиальной сФЛА2 человека [7] и показано, что около половины аминокислот фермента контактируют с поверхностью мембраны, обеспечивая частичное погружение белка в мембрану. С помощью молекулярной динамики, с привлечением масс-спектрометрии показано, что липидная мембрана работает как аллостерический активатор для сФЛА2 [8], т.е. связывание с мембраной приводит к конформационным изменениям и активирует фермент [9]. С помощью комбинации методов конфокальной микроскопии и ИК-спектрометрии было показано, что в связывании сФЛА2 с поверхностью мембраны может участвовать кальций [10], который ориентирует молекулы белка на поверхности мембраны и активирует фермент. Также с помощью флуоресцентной микроскопии и атомно-силовой микроскопии было показано, как по мере изменений в структуре мембраны, вызванных действием сФЛА2, количество адсорбированного белка увеличивается, т.е. формируются новые липидные сайты связывания сФЛА2 [11]. Изучалась и реакция липидного бислоя на связывание фермента. Так, гетеродимерная ФЛА2 из яда гадюки Никольского вызывает агрегацию липидного бислоя и образование мультислойных липидных частиц [12]. ФЛА2 из яда пчелы, встраиваясь в мембрану, образует углубление на ее поверхности, что приводит к появлению гидрофобного несоответствия между областями бислоя в зоне контакта и за ее пределами, следствием чего становится вытеснение головок фосфолипидов из области контакта с белком (образуется гидрофобное пятно) и утоньшение бислоя [13].

В данной работе мы анализируем сродство сФЛА2 из яда пчелы к фосфолипидным бислоям, состоящим из нейтрального РОРС и отрицательно зараженного РОРС в различных соотношениях, с помощью флуоресцентной спектроскопии. Сочетание измерений собственной флуоресценции белка и анизотропии флуоресценции липидного зонда, а также анализ данных с помощью построения карт взаимодействия позволяет получить новую информацию о взаимодействии фермента с мембраной.

### МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Для получения липосом использовали пальмитоилолеоилфосфатидилхолин (POPC) и пальмитоилолеоилфосфатидилглицерин (POPG) (Avanti Polar Lipids, США); 1,3,5,7-тетраметил-BODIPYмеченый фосфатидилхолин (TMB-PC) был синтезирован ранее [14]. Фосфолипазу А2 из яда пчелы *Apis mellifera* (bvPLA2), 1.0 мМ, производства Sigma-Aldrich, растворяли в буфере 0.1 М Трис-HCl, 0.1 M NaCl (pH 8.5), концентрация фермента контролировалась по оптической плотности при 280 нм с помощью спектрофотометра Nano Drop OneC (Thermo Fisher).

Липосомы были получены методом гидратации липидной пленки и экструзии. Аликвоты фосфолипидов и флуоресцентный зонд упаривали из смеси хлороформ-метанол (2:1) и сушили при 7 Па не менее 40 мин. Липидную пленку гидратировали в течение 2 ч при комнатной температуре в 0.1 М Трис-HCl буфере, содержащем 0.1 М NaCl, pH 8.5, и проводили 6–10 циклов замораживания/оттаивания (жидкий азот/+40°С). Затем суспензию 10 раз пропускали через два поликарбонатных мембранных фильтра с размером пор 100 нм (Nucleopore, США) на мини-экструдере Avanti. Такой способ приготовления липосом позволяет получать преимущественно моноламеллярные липосомы с узким распределением по размерам [15, 16]. Были получены липосомы на основе РОРС, содержащие 0, 10, 15, 20, 25, 30 мол. % РОРС с добавлением 0.025 мол. % ТМВ-РС. При соотношении молекул зонда к липидам 1/4000 не наблюдается переноса энергии между соседними флуорофорами ТМВ, и анизотропия флуоресценции зависит только от подвижности флуорофора (см. также [17, 18]).

Спектры флуоресценции белка, а также анизотропию флуоресценции ТМВ-РС регистрировали на спектрометре F-4000 (Hitachi, Япония) при  $\lambda_{ex} = 280$  нм,  $\lambda_{em} = 340$  нм и  $\lambda_{ex} = 480$  нм,  $\lambda_{em} = 510$  нм, соответственно. Измерения проводили в кварцевой кювете  $0.5 \times 0.5$  см, при постоянном перемешивании и термостатировании (25°С).

Анизотропию флуоресценции рассчитывали по формуле:

$$R = (I_{VV} - GI_{VH}) / (I_{VV} + 2GI_{VH}),$$

где I — интенсивность сигнала флуоресценции при различной ориентации поляризаторов. Ориентация поляризаторов обозначается индексами V (вертикально) и H (горизонтально). Первым приводится ориентация поляризатора на стороне возбуждения, затем на стороне испускания. VH поляризатор на стороне возбуждения ориентирован вертикально, поляризатор на стороне испускания ориентирован горизонтально; VV — оба поляризатора ориентированы вертикально. G-фактор определен как  $I_{HV}/I_{HH}$ . HV — поляризатор на стороне возбуждения ориентирован горизонтально, поляризатор на стороне испускания ориентирован вертикально; HH — оба поляризатора ориентированы горизонтально.

Для построения изотерм связывания регистрировали спектры флуоресценции bvPLA2 (1.2 мкМ) при изменяющейся концентрации липидов в системе. Ферментативная активность bvPLA2 была заблокирована добавлением 5 мМ EDTA (за счет удаления из системы необходимого кофактора,  $Ca^{2+}$ ). Аликвоты липосом добавляли при постоянном перемешивании (конечные концентрации липидов 20, 38, 78, 150, 280, 460 и 800 мкМ) и термостатировании (25°С). Фоновый сигнал рассеяния липосом вычитали из спектров испускания белка.

Построение карты взаимодействия bvPLA2 с мембранами из РОРС/РОРС проводили с помощью программы Scilab. Сначала строили трехмерный график, где X – соотношение белок/липид, У - соотношение липидов в смеси (липидный состав мембраны), Z – значение ( $F_0 - F$ )/ $F_0$ , где *F*<sub>0</sub> – интенсивность флуоресценции белка до добавления липидов в систему, F – интенсивность флуоресценции белка после добавления липидов. Затем трехмерный график преобразовывали в набор изолиний (кривых на плоскости при Z = const, задаваемых пересечением этих плоскостей с трехмерной экспериментальной фигурой). Карта изменений мембраны была получена аналогичным образом, но для значений по оси Z использовали значение анизотропии флуоресценции мембранного зонда, R.

#### РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

#### Связывание сФЛА2 на поверхности мембраны

Связывание bvPLA2 с мембранами липосом характеризовалось по собственной флуоресценции фермента при заблокированной ферментативной активности (за счет удаления из системы необходимого кофактора,  $Ca^{2+}$ , с помощью EDTA). сФЛА2 из яда пчелы имеет в своем составе два остатка триптофана, которые при изменении полярности окружения (связывании с мембраной) меняют квантовый выход. При титровании раствора белка эмульсией липосом меняется интенсивность собственной флуоресценции белка (рис. 1*a*), эти изменения можно представить в относительном виде:

$$(F_0 - F)/F_0$$

где  $F_0$  – интенсивность флуоресценции белка до добавления липидов в систему, F – интенсивность флуоресценции белка после добавления липидов.

Кривые изменения  $(F_0 - F)/F_0$  в зависимости от концентрации липидов можно использовать как изотермы связывания для определения сродства сФЛА2 к определенному липидному составу мембраны (рис. 16). В настоящей работе набор изотерм связывания bvPLA2 для серии липидных смесей из POPC/POPG преобразован в карту (рис. 16), где ордината – соотношение белок/липид, а абсцисса – соотношение липидов в смеси (состав мембраны). Значение ( $F_0 - F$ )/ $F_0$  показано на карте в виде изолиний.

#### Регистрация изменений в мембране

Наблюдение за изменением состояния мембраны проводится с помощью флуоресцентных липидных зондов (по анизотропии флуоресценции). В данном случае используется ТМВ-РС (BODIPY-меченый фосфатидилхолин) [18], однако можно использовать и другие мембранные зонды. Например, для лаурдана и продана, возможно, удобнее будет регистрировать изменение спектра испускания [19]. Анизотропия флуоресценции представляет собой меру подвижности флуорофора: чем ниже анизотропия флуоресценции, тем подвижнее оказывается зонд (увеличивается вращательная и поступательная диффузия зонда). В мембранах анизотропия флуоресценции метки зависит от плотности упаковки липидов и их подвижности. Максимальное значение анизотропии ТМВ (в растворе пропиленгликоля при  $-70^{\circ}$ C) - 0.39, что соответствует полностью заторможенному зонду [18]. Масштаб изменений анизотропии флуоресценции ТМВ-РС в липидной мембране от 0.18 (гелевая фаза) до 0.10 (жидкокристаллическая фаза) [18]. Таким образом, измерения значений анизотропии на сотые доли отражает значительные изменения в подвижности липидов мембраны.

На карте изменений мембраны ордината — соотношение белок/липид, абсцисса — содержание липидов в смеси, а значения анизотропии флуоресценции показаны на карте в виде изолиний



**Рис. 1.** Оценка специфичности взаимодействия сФЛА2 с фосфолипидными мембранами из POPC/POPG с помощью построения карт взаимодействия. *а* – Пример изменения собственной флуоресценции белка при титровании эмульсией липосом (1.2 мкМ bvPLA2,  $\lambda_{ex} = 280$  нм,  $\lambda_{em} = 290-450$  нм); стрелкой показано направление изменений при увеличении концентрации липосом в системе. *б* – Изотерма связывания сФЛА2 ( $\lambda_{ex} = 280$  нм,  $\lambda_{em} = 340$  нм, сплошная линия) и анизотропия флуоресценции мембранного зонда ТМВ-РС ( $\lambda_{ex} = 480$  нм,  $\lambda_{em} = 510$  нм, пунктирная линия). Подобные кривые были получены для разных составов липосом, для примера приведена изотерма связывания липосом из РОРС. *в* – Карта связывания *с* – Карта изменения мембраны. Цветом отмечены экстремумы значенй.

(рис. 1г). На карте изменений мембраны (рис. 1г) наблюдалось два минимума анизотропии: при 10 и 15% POPG для соотношений белок/липид 8 и 3 соответственно (отмечено цветом). Минимальное значение анизотропии флуоресценции соответствует максимальной подвижности флуоресцентной метки, которая определяется плотностью упаковки липидов вокруг метки в мембране.

#### Совпадение рельефа карт связывания белка и изменений мембраны

На карте связывания белка (рис. 1*в*) наблюдался максимум связывания, который представляет собой хребет начинающийся в точке (x; y = 8.5; 10, участок отмечен цветом). В этой точке достигается насыщение мембраны белком. Дальнейшее увеличение соотношения белок/липиды не меняет значение ( $F_0 - F$ )/ $F_0$ .

Важно, что начало хребта на карте связывания белка (рис. 1*в*) и минимум на карте изменений мембраны (рис. 1*г*) совпадают: максимальное связывание белка соответствует максимальной подвижности липидов (минимуму анизотропии). В данном случае такое условие выполняется для липосом, содержащих 10% POPG. Такое совпадение имеет рациональное объяснение: для осуществления гидролиза сФЛА2 необходимо встроиться в мембрану, для этого белок раздвигает в стороны полярные головки липидов [13]. Соответственно, если диффузия липидов ограничена, это сделать сложнее, чем если липиды диффундируют свободно. Иными словами, скорость диффузии липидов влияет на константу связывания белка с мембраной, и таким образом меняет стационарное распределение "белок в растворе-белок на поверхности мембраны", которое в свою очередь определяет значение  $(F_0 - F)/F_0$ . Рассматриваемый пример показывает, что не только в разных фазах, но и в рамках одной фазы подвижность липилов может влиять на фермента, что в конечном счете может определять скорость гидролиза липидов.

Обнаруженная нами связь между подвижностью липидов и эффективностью связывания фермента может быть ключом для понимания субстратной специфичности сФЛА2 в отношении мембран разного состава.

#### ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В данной работе мы предложили новый метод исслелования связывания сФЛА2 с липилным бислоем. Метод состоит в построении карты связывания белка и карты изменения мембраны. Карта связывания белка основана на данных изотерм связывания белка на липидных мембранах различного состава. Карта изменения мембраны основана на отслеживании изменения анизотропии флуоресценции липидного зонда при сорбции белка на мембрану для различных соотношений липид-белок. Сопоставление карт позволило обнаружить связь между подвижностью липидов и эффективностью связывания фермента. Это может быть ключом для понимания субстратной специфичности сФЛА2 в отношении мембран разного состава.

Конфликт интересов. Авторы декларируют отсутствие явных и потенциальных конфликтов интересов, связанных с публикацией настоящей статьи.

Источники финансирования. Исследование выполнено при финансовой поддержке Российского научного фонда, грант № 19-75-00101.

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

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Dennis E.A., Cao J., Hsu Y.-H., Magrioti V., Kokotos G. 2011. Phospholipase A2 enzymes: physical structure, biological function, disease implication, chemical inhibition, and therapeutic intervention., Chem. Rev. 111, 6130-6185 https://doi.org/10.1021/cr200085w

БИОЛОГИЧЕСКИЕ МЕМБРАНЫ Nº 5 2021 том 38

- 2. Winget J.M., Pan Y.H., Bahnson B.J. 2006. The interfacial binding surface of phospholipase A2s. Biochim. Biophys. Acta. 1761, 1260-1269. https://doi.org/10.1016/j.bbalip.2006.08.002
- 3. Singer A.G., Ghomashchi F., Calvez Le C., Bollinger J., Bezzine S., Rouault M., Sadilek M., Nguyen E., Lazdunski M., Lambeau G., Gelb M.H. 2002. Interfacial kinetic and binding properties of the complete set of human and mouse groups I, II, V, X, and XII secreted phospholipases A2. J. Biol. Chem. 277, 48535-48549.

https://doi.org/10.1074/jbc.M205855200

- 4. Алексеева А.С., Болдырев И.А. 2020. Фосфолипаза А2. Методы мониторинга активности. Биол. Мембраны. 37, 323-336. https://doi.org/10.31857/S0233475520050035
- 5. Alekseeva A.S., Korotaeva A.A., Samoilova E.V., Volynsky P.E., Vodovozova E.L., Boldyrev I.A. 2014. Secretory phospholipase A2 activity in blood serum: The challenge to sense. Biochem. Biophys. Res. Commun. 454, 178-182. https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2014.10.069
- 6. Roberts M.F., Khan H.M., Goldstein R., Reuter N., Gershenson A. 2018. Search and subvert: Minimalist bacterial phosphatidylinositol-specific phospholipase C enzymes. Chem. Rev. 118, 8435-8473. https://doi.org/10.1021/acs.chemrev.8b00208
- 7. Qin S.S., Yu Y.X., Li Q.K., Yu Z.W. 2013. Interaction of human synovial phospholipase A2 with mixed lipid bilayers: A coarse-grain and all-atom molecular dynamics simulation study. Biochemistry. 52, 1477-1489. https://doi.org/10.1021/bi3012687
- 8. Mouchlis V.D., Bucher D., McCammon J.A., Dennis E.A. 2015. Membranes serve as allosteric activators of phospholipase A 2, enabling it to extract, bind, and hydrolyze phospholipid substrates. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 112, E516-E525. https://doi.org/10.1073/pnas.1424651112
- 9. Mouchlis V.D., Chen Y., McCammon A.J., Dennis E.A. 2018. Membrane allostery and unique hydrophobic sites promote enzyme substrate specificity. J. Am. Chem. Soc. 140, 3285-3291. https://doi.org/10.1021/jacs.7b12045
- 10. Kai S., Li X., Li B., Han B., Lu X. 2017. Calcium-dependent hydrolysis of supported planar lipids was triggered by honey bee venom phospholipase A2 with the right orientation at the interface. Phys. Chem. Chem. *Phys.* **20**, 63–67. https://doi.org/10.1039/c7cp06344j
- 11. Hong C.Y., Han C.T., Chao L. 2016. Nonspecific binding domains in lipid membranes induced by phospholipase A2. Langmuir. 32, 6991-6999. https://doi.org/10.1021/acs.langmuir.5b03915
- Alekseeva A.S., Tretiakova D.S., Chernikov V.P., Utkin Y.N., Molotkovsky J.G., Vodovozova E.L. Boldyrev I.A. 2017. Heterodimeric V. nikolskii phospholipases A2 induce aggregation of the lipid bilayer. Toxicon. 133, 169-179. https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2017.05.015
- 13. Alekseeva A.S., Volynsky P.E., Krylov N.A., Chernikov V.P., Vodovozova E.L., Boldyrev I.A. 2021. Phospholipase A2 way to hydrolysis: Dint formation, hydrophobic mismatch, and lipid exclusion. Biochim.

*Biophys. Acta – Biomembr.* **1863**, 183481. https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2020.183481

- Boldyrev I.A., Zhai X., Momsen M.M., Brockman H.L., Brown R.E., Molotkovsky J.G. 2007. New BODIPY lipid probes for fluorescence studies of membranes. *J. Lipid Res.* 48, 1518–1532. https://doi.org/10.1194/ilr.M600459-JLR200
- Olson F., Hunt C.A., Szoka F.C., Vail W.J., Papahadjopoulos D. 1979. Preparation of liposomes of defined size distribution by extrusion through polycarbonate membranes. *Biochim. Biophys. Acta – Biomembr.* 557, 9–23.

https://doi.org/10.1016/0005-2736(79)90085-3

 Supaporn S. 2011. Effect of freeze-thawing process on the size and lamellarity of PEG-lipid liposomes. *Open Colloid Sci. J.* 4, 1–8. https://doi.org/10.2174/1876530001104010001

- Sachl R., Boldyrev I.A., Johansson L.B. 2010. Localisation of BODIPY-labelled phosphatidylcholines in lipid bilayers. *Phys. Chem. Chem. Phys.* 12, 6027–6034. https://doi.org/10.1039/b926953c
- Tretiakova D.S., Alekseeva A.S., Galimzyanov T.R., Boldyrev A.M., Chernyadyev A.Y., Ermakov Y.A., Batishchev O.V., Vodovozova E.L., Boldyrev I.A. 2018. Lateral stress profile and fluorescent lipid probes. FRET pair of probes that introduces minimal distortions into lipid packing, *Biochim. Biophys. Acta – Biomembr.* 1860, 2337–2347. https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2018.05.020
- Parasassi T., Krasnowska E.K., Bagatolli L., Gratton E. 1998. Laurdan and prodan as polarity-sensitive fluorescent membrane probes. *J. Fluoresc.* 8, 365–373. https://doi.org/10.1023/A:1020528716621

# Estimation of the Phospholipase A2 Selectivity on POPC/POPG Membranes Using the Interaction Map

A. S. Alekseeva<sup>1</sup>, P. E. Volynsky<sup>1</sup>, I. A. Boldyrev<sup>1, \*</sup>

<sup>1</sup>Shemyakin–Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry, Russian Academy of Sciences, Moscow, 117997 Russia \*e-mail: ivan@lipids.ibch.ru

The regulation of the activity and selectivity of phospholipase A2 (PLA2), which is capable of cleaving fatty acid from the second position (sn-2) of the phospholipid, is carried out through the membrane-binding and catalytic sites of the enzyme. For hydrolytic activity, PLA2 must first bind to the phospholipid membrane, and the binding efficiency depends on the composition of the membrane. The membrane-binding site of PLA2 is formed by several tens of amino acids and its composition differs from enzyme to enzyme; hydrophobic and positively charged amino acids play a key role in the interaction. In this work, we investigated the interaction of PLA2 from bee venom with phospholipid bilavers of palmitovloleovlphosphatidylcholine (POPC) containing different amounts of palmitovloleovlphosphatidylglycerol (POPG). Based on the measurement of the intrinsic fluorescence of the protein and the anisotropy of the fluorescence of the lipid probe, we propose the construction of lipid-protein interaction maps, which reflect both the efficiency of protein binding and changes in the structure of the membrane. The latter take into account the change in the anisotropy of the fluorescence of the label, which in turn is a measure of the mobility of the lipid environment of the fluorescent probe. Analysis of interaction maps showed that there is a relationship between lipid mobility and enzyme binding efficiency: the optimum interaction of PLA2 with membranes from a POPC/POPG mixture lies in the region of the highest lipid mobility, and not in the region of the highest negative charge. This dependence complements the existing understanding of the process of recognition of the membrane surface by the enzyme and the selection of lipids by the enzyme already bound to the membrane. The proposed mapping method can be extended to other membrane-active proteins.

Keywords: phospholipase A2, substrate specificity, lipid-protein interaction, fluorescence spectroscopy