

СОДЕРЖАНИЕ

Том 87, № 4, 2022

Окислительный стресс и редокс-зависимый сигналинг при раке предстательной железы (обзор) <i>Е.В. Калинина, Л.А. Гаврилюк, В.С. Покровский</i>	459
Современные методы определения микроРНК (обзор) <i>О.Л. Бодулев, И.Ю. Сахаров</i>	474
Определение 2-оксокислот в экстрактах мозга крыс с помощью высокоэффективной жидкостной хроматографии <i>В.Н. Ташлицкий, А.В. Артюхов, Н.В. Федорова, М.А. Суконников, А.Л. Ксенофонов, В.И. Буник, Л.А. Баратова</i>	497
Нонсенс-мутации у эукариот (обзор) <i>Н.А. Потапова</i>	508
Механизмы регуляции функционирования белка-транспортёра Р-гликопротеина под действием оксида азота <i>А.В. Шулькин, Ю.В. Абаленихина, Е.А. Судакова, П.Ю. Мыльников, Е.Н. Якушева</i>	523
2-Амино-пиррол-карбоксилат ослабляет процессы гомологичной рекомбинации ДНК и вызывает сенситизацию опухолевых клеток к доксорубину <i>С.В. Бойчук, Ф.Ф. Бикиниева, И.Г. Мустафин, С.С. Зыкова, С.А. Рыжкин, А.Р. Галембикова</i>	539
Моделирование структуры комплекса тРНК-гуанинтрансглицозилазы человека с 7-метилгуанином и выявление факторов, определяющих взаимодействие фермента с ингибиторами <i>С.В. Пушкарев, В.А. Винник, И.В. Шаповалова, В.К. Швядас, Д.К. Нилов</i>	550
Гибридные/атипичные формы циркулирующих опухолевых клеток: современное состояние проблемы (обзор) <i>Е.В. Кайгородова, А.В. Козик, И.С. Заваруев, М.Ю. Грищенко</i>	558
Правила для авторов	571

CONTENTS

Vol. 87, Issue 4, 2022

Oxidative Stress and Redox-Dependent Signaling in Prostate Cancer (Review) <i>E. V. Kalinina, L. A. Gavriiliuk, and V. S. Pokrovsky</i>	459
Modern Methods for Determination of microRNAs (Review) <i>O. L. Bodulev and I. Y. Sakharov</i>	474
Analysis of the 2-Oxo Acids Content in Rat Brain Extracts Using High-Performance Liquid Chromatography <i>V. N. Tashlitsky, A. V. Artiukhov, N. V. Fedorova, M. A. Sukonnikov, A. L. Ksenofontov, V. I. Bunik, and L. A. Baratova</i>	497
Nonsense Mutations in Eukaryotes (Review) <i>N. A. Potapova</i>	508
Mechanisms of Regulation of the Functioning of the P-Glycoprotein Transporter Protein under the Action of Nitric Oxide <i>A. V. Shchulkin, Yu. V. Abalenikhina, E. A. Sudakova, P. Yu. Mylnikov, and E. N. Yakusheva</i>	523
2-APCA Attenuates Homology-Mediated DNA Repair and Sensitizes Cancer Cells to Doxorubicin <i>S. V. Boichuk, F. F. Bikinieva, I. G. Mustafin, S. S. Zykova, S. A. Ryzkin, and A. R. Galembikova</i>	539
Modeling the Structure of Human tRNA-Guanine Transglycosylase in Complex with 7-Methylguanine and Revealing the Factors that Determine the Enzyme Interaction with Inhibitors <i>S. V. Pushkarev, V. A. Vinnik, I. V. Shapovalova, V. K. Švedas, and D. K. Nilov</i>	550
Hybrid/Atypical Forms of Circulating Tumor Cells: Current State of the Problem (Review) <i>E. V. Kaigorodova, A. V. Kozik, I. S. Zavaruev, and M. Yu. Grishchenko</i>	558
Instructions to Authors	571

УДК 577.12

ОКИСЛИТЕЛЬНЫЙ СТРЕСС И РЕДОКС-ЗАВИСИМЫЙ СИГНАЛИНГ ПРИ РАКЕ ПРЕДСТАТЕЛЬНОЙ ЖЕЛЕЗЫ

Обзор

© 2022 Е.В. Калинина^{1*}, Л.А. Гаврилюк¹, В.С. Покровский²

¹ Российский университет дружбы народов, 117198 Москва, Россия; электронная почта: kalinina-ev@rudn.ru

² ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России, 115478 Москва, Россия

Поступила в редакцию 24.01.2022

После доработки 20.03.2022

Принята к публикации 20.03.2022

Возникновение и прогрессирование опухоли осложняется двойственной ролью активных форм кислорода (АФК) в этих процессах. Низкий уровень АФК необходим для многих внутриклеточных процессов метаболизма и пролиферации клеток, тогда как значительный рост уровня АФК может нарушать механизмы их регуляции, приводя к повреждению и гибели клеток. Длительный дисбаланс соотношения АФК/антиоксиданты и значительный рост уровня АФК на фоне снижения эффективности системы антиоксидантной защиты приводит к хроническому окислительному стрессу, вызывающему изменение редокс-зависимой регуляции и потенцированию опухолевой прогрессии. Многочисленные данные демонстрируют развитие окислительного стресса при раке простаты, который является одним из наиболее распространенных онкологических заболеваний. Однако причины его возникновения, изменения редокс-зависимого сигналинга и клеточного редокстаза всё ещё остаются малоизученными. В обзоре рассматривается состояние прооксидантных и антиоксидантных ферментных систем, дисбаланс которых приводит к развитию окислительного стресса при раке предстательной железы, оценивается изменение ключевых звеньев редокс-зависимого сигналинга и роль микроРНК в модуляции редокс-статуса опухолевых клеток.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: рак предстательной железы, окислительный стресс, антиоксидантные и прооксидантные ферменты, транскрипционные факторы Nrf2, NF-κB, редокс-зависимый сигналинг, микроРНК.

DOI: 10.31857/S0320972522040017, EDN: AQDUTG

ВВЕДЕНИЕ

Согласно статистическим данным ВОЗ, заболевания предстательной железы в последние десятилетия представляют серьёзную проблему во многих странах. Рак предстательной железы (РПЖ) является наиболее распространённым онкологическим заболеванием, и по частоте встречаемости он занимает второе место в структуре онкологической смертности после рака лёгкого [1]. Окислительный стресс, воспаление и передача сигналов андрогеновыми рецепторами (AR) играют ключевую роль в инициации, развитии и прогрессировании РПЖ. Активные формы кислорода (АФК) оказывают на

развитие злокачественных новообразований двойственное действие – либо инициируя онкогенез и поддерживая пролиферацию опухолевых клеток, либо вызывая их гибель. Генетические изменения обеспечивают выживание опухолевых клеток в присутствии высоких уровней АФК вследствие роста активности редокс-зависимых факторов транскрипции или увеличения содержания NADPH благодаря активации пентозофосфатного пути окисления глюкозы [2]. Многочисленные публикации подтверждают взаимосвязь между окислительным стрессом и воспалением, указывая на роль дефицита антиоксидантов при развитии процессов воспаления и РПЖ [3, 4].

В клетках РПЖ обнаружен высокий уровень окислительного стресса, который развивается в результате дисбаланса между прооксидантами и антиоксидантами и играет критическую роль в развитии и прогрессировании РПЖ [5, 6]. Установлено, что на ранней стадии развития рака опухолевые клетки подвергаются высокому окислительному стрессу (вследствие подавления активности антиоксидантных ферментов), который может приводить в последующем к ус-

Принятые сокращения: АФК – активные формы кислорода; РПЖ – рак предстательной железы; AR – андрогеновый рецептор; COX – циклооксигеназа; EGF – эпидермальный фактор роста; EGFR – рецептор эпидермального фактора роста; JNK – c-Jun N-терминальная киназа; LOX – липоксигеназа; NOX – NADPH-оксидаза; NF-κB – ядерный фактор κB; Nrf2 – NF-E2-зависимый фактор 2; STAT3 – сигнальный белок и активатор транскрипции 3; TRAMP – трансгенная аденокарцинома простаты.

* Адресат для корреспонденции.

тановлению более высокого по сравнению с исходным уровнем соотношения АФК/антиоксиданты [7].

Развитие РПЖ связано с изменением внутриклеточного сигналинга, в том числе MAPK-, Nrf2-, NF-κB- и AR-зависимых сигнальных путей, контролирующих значительное число сигнальных каскадов в опухолевой клетке и связанных с уровнем АФК [3, 6]. Однако характер их взаимосвязи с клеточным редокс-статусом всё ещё остаётся малоизученным. Редокс-зависимая регуляция клеточных процессов в настоящее время рассматривается как многоуровневая система, включающая не только белки и комплексы ферментов, но и некодирующие РНК, среди которых значительную роль играют многочисленные микроРНК, выполняющие роль онкогенов или онкосупрессоров, в том числе и посредством регуляции соотношения прооксиданты/антиоксиданты в опухолевых клетках [8, 9]. Такая функция микроРНК вызывает большой интерес в области исследования изменений клеточного редокс-статуса при развитии РПЖ.

В настоящем обзоре анализируется возникновение дисбаланса активности прооксидантных и антиоксидантных ферментных систем, приводящее к развитию окислительного стресса, оценивается состояние ключевых звеньев редокс-зависимого сигналинга и роль микроРНК в модуляции редокс-статуса опухолевых клеток при РПЖ.

АНТИОКСИДАНТНЫЕ, ПРООКСИДАНТНЫЕ ФЕРМЕНТЫ И РАЗВИТИЕ ОКИСЛИТЕЛЬНОГО СТРЕССА В ОПУХОЛЕВЫХ КЛЕТКАХ РАКА ПРЕДСТАТЕЛЬНОЙ ЖЕЛЕЗЫ

АФК образуются в процессах клеточного метаболизма, играют важную роль в передаче сигналов клетками, участвуют в процессах регуляции дифференцировки, пролиферации, биоэнергетики клеток. Среди основных источников генерации АФК выделяют «утечку» электронов в дыхательной цепи митохондрий и электрон-транспортной системе эндоплазматического ретикула с участием цитохромов P450 и b5, активность прооксидантных ферментов (NADPH-оксидазы, ксантинооксидазы, L-оксидазы аминокислот, моноаминооксидазы, липоксигеназы и др.), аэробные окислительно-восстановительные реакции с ионами металлов (реакция Фентона). В случае нарушения баланса АФК/антиоксиданты, сопровождающегося ростом внутриклеточного уровня АФК, в клетке возникает

состояние окислительного стресса, что приводит к адаптивной активации защитных антиокислительных механизмов, позволяющих вернуть нарушенный баланс [10]. Длительный дисбаланс соотношения АФК/антиоксиданты и значительный рост уровня АФК (на фоне снижения эффективности системы антиоксидантной защиты) приводит к хроническому окислительному стрессу, вызывающему повреждение структуры белков, липидов, ДНК и развитие патологии клетки, включая злокачественные новообразования [11–13].

Развитие окислительного стресса при РПЖ связано с дефицитом антиоксидантной защиты, обусловленным рядом причин (сопутствующие хронические воспалительные процессы, дефицит антиоксидантной диеты и др.), среди которых лидирующая роль принадлежит старению организма. Статистически показано, что риск развития РПЖ значительно повышается у мужчин старше 65 лет и связан со снижением уровня антиоксидантной системы [7, 10]. Согласно свободно-радикальной теории старения, с возрастом изменение прооксидантно/антиоксидантного баланса в сторону окислительного состояния происходит во многих тканях [14], что повышает вероятность онкогенеза [15].

При старении организма наблюдается снижение экспрессии гена *GSTP1*, изоформы глутатионтрансферазы, обладающей высокой активностью по отношению к продуктам окислительного повреждения ДНК и перекисного окисления липидов, что связано с повышением метилирования ДНК [16]. Установлено, что богатая CpG промоторная область гена *r1*-класса *GSTP1* метилирована по единичным сайтам рестрикции в большинстве клеток РПЖ в сравнении с нормальными клетками [17]. Потеря экспрессии *GSTP1* из-за гиперметилирования промотора является наиболее частым эпигенетическим изменением, наблюдаемым при РПЖ человека. Снижение экспрессии *GSTP1* может способствовать повышению образования АФК и повреждению ДНК.

Злокачественная трансформация приводит к изменению соотношения оксиданты/антиоксиданты благодаря адаптивной активации редокс-зависимых факторов транскрипции и соответствующему росту экспрессии антиоксидантных ферментов, нейтрализующих АФК до уровня, позволяющего опухолевым клеткам поддерживать высокую пролиферативную активность. В опухолевых клетках РПЖ отмечается рост экспрессии генов и активности ключевых антиоксидантных ферментов. Прогрессирование РПЖ делает раковые клетки более зависимыми от антиоксидантных ферментов, в част-

ности, таких как SOD, которая катализирует дисмутацию супероксид аниона до H_2O_2 [18]. На основании данных, полученных *in vivo*, сделан вывод, что p53 может регулировать экспрессию SOD2 между ранней и поздней стадиями РПЖ [19].

Важным источником АФК в клетках РПЖ является активность изоформ NOX, принадлежащих к семейству NADPH-оксидазы [20]. Семейство NOX состоит из семи изоферментов (NOX1–NOX5, DUOX1 и DUOX2), переносящих электроны от NADPH через мембраны на молекулярный кислород с образованием супероксид аниона.

Многочисленные данные указывают не только на значимую роль NADPH-оксидазы в развитии РПЖ (табл. 1), но и на существование противоречивых оценок роли отдельных изоформ. Так, на ксенографтах у иммунодефицитных мышей Balb/c nude показано, что сверхэкспрессия гена *NOX1* коррелировала с ростом опухоли рака простаты человека DU145 [21].

При исследовании трансгенной аденокарциномы простаты мышей (TRAMP) установлена более высокая экспрессия гена *NOX1* при интраэпителиальной неоплазии предстательной железы с высокой степенью злокачественности по сравнению с опухолью с низкой степенью злокачественности и нормальными эпителиальными клетками простаты [22]. Показано, что активность изоформы NOX1 связана с инициацией ангиогенеза путём активации VEGF в клетках ксенотрансплантата РПЖ человека DU145 [21]. В моделях на животных была установлена связь активности NOX1 с онкогенезом и развитием злокачественной опухоли простаты [23]. Показано участие изоформы NOX1 в метастазировании рака простаты [24]. Имеются сведения о гиперэкспрессии гена *NOX1* в клетках РПЖ человека в отличие от нормальной ткани простаты [24]. Однако в ряде работ не обнаружено существенных различий в уровнях мРНК NOX1 в доброкачественных и злокачественных клетках простаты [25, 26].

Таблица 1. Экспрессия изоформ NADPH-оксидазы (NOX, DUOX) в линиях клеток и опухолевой ткани рака предстательной железы

Линия клеток/ткань опухоли	ИЗОФОРМЫ							Ссылки
	NOX1	NOX2	NOX3	NOX4	NOX5	DUOX1	DUOX2	
PC-3	↑	↑		↑	↑	↑	↑	[2–29, 93, 94]
DU145	↑	↑		↑	↑	↑	↑	[27–29, 94, 95]
DU145, ксенографты у мышей	↑							[21]
VCaP	↑	↑			↑			[27–29]
U251		↑						[93]
LNCaP	↑	↑		↑	↑			[24, 27, 28, 94]
C4-2		↑						[96]
RWPE1, линия доброкачественных эпителиальных клеток простаты человека		↑				↑	↑	[28, 29]
EP156T, линия доброкачественных эпителиальных клеток простаты человека		↑				↑	↑	[29]
Аденокарцинома предстательной железы человека	↑			↑		↑	↑	[20, 24, 28]
TRAMP, трансгенная аденокарцинома простаты, мыши C57BL/6	↑							[22]

При исследовании пациентов со средней степенью пролиферации аденокарциномы простаты обнаружен низкий уровень экспрессии гена *NOX2* [25]. Также установлено, что экспрессия гена *NOX2* в злокачественных тканях простаты практически не отличается от уровня его экспрессии в доброкачественных тканях [26]. Таким образом, хотя в отдельных работах отмечается повышенная экспрессия гена *NOX2* в клетках рака простаты по сравнению с неопухолевыми тканями, результаты многих исследований *in vivo* указывают на отсутствие роли изоформы *NOX2*, как и *NOX3*, в развитии РПЖ.

Напротив, в клетках РПЖ отмечается повышенная экспрессия гена *NOX4*. Так, обнаружено, что ген *NOX4* гиперэкспрессируется в клетках РПЖ (DU145, PC-3 и LNCaP) в отличие от нормальной клеточной линии простаты [27]. Отмечается, что уровень мРНК *NOX4* в клетках РПЖ значительно выше, чем в клетках доброкачественных опухолей предстательной железы [26].

На основании отсутствия различий между экспрессией мРНК *NOX5* в нормальных тканях предстательной железы человека и в тканях РПЖ сделан вывод, что экспрессия мРНК *NOX5* не является маркером злокачественной трансформации [28]. Аналогичные результаты были получены в результате сравнения экспрессии гена *NOX5* в нормальных тканях предстательной железы человека и ткани РПЖ, что позволило сделать вывод об отсутствии существенного различия в уровнях экспрессии этого гена в злокачественных и доброкачественных тканях [26].

Высокий уровень экспрессии гена *DUOX1* (изоформа NADPH-оксидазы *DUOX1* – двойная оксидаза, один из основных источников образования H_2O_2) наблюдается как в нормальной ткани, так и в опухоли предстательной железы человека. Однако у некоторых пациентов с РПЖ установлен рост экспрессии *DUOX1* в клетках опухоли по сравнению с нормальными клетками [25]. Высокий уровень экспрессии гена *DUOX2* обнаружен и в опухолевых клетках DU145 [26]. Несмотря на то что роль *DUOX* при РПЖ до конца не ясна, тем не менее отмечается, что уровень АФК при РПЖ в клетках PC-3 в значительной степени поддерживается за счёт активности изоформ *DUOX1* и *DUOX2*, при этом генерация АФК может приводить к появлению устойчивости клеток опухоли к апоптозу за счёт позитивной регуляции передачи сигналов киназой АКТ [29].

Действие андрогенов при РПЖ вызывает повышение экспрессии генов субъединиц *p22phox*

и *gp91phox* NADPH-оксидазы и генерацию АФК изоформами *NOX2* и *NOX4* в андроген-чувствительной линии клеток 22Rv1 [30]. Подобно андрогенам, адипонектин вызывает существенное повышение экспрессии генов *NOX2* и *NOX4* в клетках РПЖ человека DU145 и 22Rv1 [31].

Определенный вклад в развитие окислительного стресса вносят циклооксигеназа (COX) и липоксигеназа (LOX), благодаря активности которых образуются гидроперекиси полиненасыщенных высших жирных кислот с последующим превращением в высокореакционноспособные бифункциональные электрофилы – 4-гидроксиноненали и 4-оксононенали, образующие сшивки в белках и ДНК [32]. Получены убедительные доказательства, подтверждающие роль катализируемого LOX метаболизма арахидоновой и линолевой кислот в развитии злокачественных новообразований [33–35]. Образующийся уровень гидроперекисей жирных кислот в процессе метаболизма арахидоновой или линолевой кислот влияет на регуляцию роста и выживаемость клеток, ангиогенез, клеточную инвазию, метастазирование и иммуномодуляцию.

На основании данных, полученных с использованием экспериментальных моделей РПЖ, предложено использовать изоформы 5-LOX и 12-LOX, ингибиторы которых проявляют антипролиферативную активность, в качестве биомаркеров этого типа злокачественных новообразований [36, 37]. 12-LOX способствует прогрессированию и метастазированию РПЖ. Обнаружено, что образующаяся в результате действия 12-LOX на арахидоновую кислоту 12(S)-гидроксиэйкозатетраеновая кислота вызывает активацию сигнального пути PI3K/АКТ/mTOR с последующим повышением экспрессии гена транскрипционного фактора HIF-1 α , что приводит к усилению экспрессии гена фактора роста эндотелия сосудов VEGF, способствуя активации его ангиогенного действия [36].

Активность изоформы 5-LOX также играет важную роль в выживании и пролиферации клеток РПЖ, поддерживая высокую экспрессию гена *c-MYC*. Ингибирование этой изоформы LOX резко подавляет экспрессию онкогена *c-Myc* в клетках опухоли [37].

Опухоли РПЖ имеют более высокую экспрессию гена изоформы 15-LOX-1 по сравнению с нормальной тканью, и уровень экспрессии совпадает с оценкой по шкале Глисона, тогда как экспрессия гена изоформы 15-LOX-2 подавлена в отличие от нормальной ткани [38]. Исследование влияния 15-LOX-1, 15-LOX-2 и их метаболитов на зависимый от эпидермального

фактора роста (EGF) сигналинг в клетках PC-3 позволило установить, что метаболит 15-LOX-1 (13-(S)-гидроксиоктадекадиеновая кислота) вызывает активацию киназы MAPK, в то время как метаболит 15-LOX-2 (15-(S)-гидроксиэйкозатетраеновая кислота) подавляет активность MAPK, приводя к активации и подавлению фосфорилирования PPAR γ соответственно [38]. Авторами сделан вывод о разных, если не противоположных, биологических функциях изоформ 15-LOX-1 и 15-LOX-2 в простате.

Роль изоформ LOX в развитии опухолей РПЖ человека в настоящее время установлена, несмотря на некоторые различия в механизме их действия (табл. 2). Так, изоформа 12-LOX рассматривается как прогностический маркер РПЖ [39]. При оценке экспрессии гена *12-LOX* в опухолевой ткани пациентов с РПЖ обнаружен значительный её рост, который коррелировал со степенью злокачественного роста, что позволило сделать вывод об изоформе 12-LOX, как о маркере агрессивного фенотипа РПЖ и плохого прогноза [40]. Повышенный уровень экспрессии генов *5-LOX* и *12-LOX* обнаружен в клеточных линиях PC-3 и DU145 [41]. Как в опухолевой ткани РПЖ человека, так и в клетках PC-3 обнаружена повышенная экспрессия гена *15-LOX-1*, уровень которой коррелирует со степенью злокачественности опухоли [34, 42, 43].

РЕДОКС-ЗАВИСИМЫЙ СИГНАЛИНГ В ОПУХОЛЕВЫХ КЛЕТКАХ РАКА ПРЕДСТАТЕЛЬНОЙ ЖЕЛЕЗЫ. РОЛЬ Nrf-, NF- κ B-, JNK- И AR-ЗАВИСИМЫХ СИГНАЛЬНЫХ ПУТЕЙ

Nrf2-сигнальный путь. Развитие хронического окислительного стресса при РПЖ, определяемого в первую очередь высоким уровнем АФК, приводит к определённому адаптивному изменению клеточного сигналинга, что сопровождается появлением так называемого «агрессивного» фенотипа опухолевых клеток. Транскрипционный фактор Nrf2 (NF-E2-зависимый фактор 2) является наиболее значимым в регуляции экспрессии генов ферментов как антиоксидантной системы, так и системы детоксикации для нормальных и опухолевых клеток [44–46]. Nrf2 кодируется геном *NFE2L2* и входит в семейство транскрипционных факторов CNC (семейство факторов транскрипции со структурой Cap «n» Collar, обладающих лейциновой «застежкой-молнией»), включающее помимо Nrf2 транскрипционные факторы NF-E2, Nrf1, Nrf3, VASN1 и ACH2. Nrf2 контролирует экспрессию

Таблица 2. Экспрессия изоформ липоксигеназы (LOX) в линиях клеток и опухолевой ткани рака предстательной железы человека

Линия клеток/ ткань опухоли	ИЗОФОРМЫ			Ссылки
	15-LOX-1	12-LOX	5-LOX	
PC-3	↑	↑	↑	[34, 41–43]
DU145	↑	↑	↑	[34, 41, 43]
LNCaP			↑	[37]
РПЖ, ткань опухоли		↑		[40]
CD133 ⁺ , стволовые клетки РПЖ			↑	[97]
CD44 ⁺ , стволовые клетки РПЖ			↑	[97]

генов как антиоксидантных ферментов, так и ферментов системы детоксикации и является наиболее жизненно важным сигнальным путём, используемым клетками для защиты от окислительного стресса [46].

При физиологических условиях Nrf2 связывается в цитоплазме с репрессорным белком Keap1 (Kelch-like ECH-associated protein 1), который способствует его деградации с помощью убиквитин-протеасомного пути. Стрессовые условия вызывают окисление остатков цистеина Keap1, что приводит к предотвращению убиквитинирования Nrf2 [47], способствуя транслокации Nrf2 в ядро, где он вместе с небольшими белками Maf связывается с антиоксидант-респонсивным элементом (ARE) или MARE (MAF recognition elements) в промоторной области более 250 генов-мишеней. Среди установленных в настоящее время ARE-содержащих генов, регулируемых Nrf2, находятся гены антиоксидантных ферментов Mn-SOD (*SOD2*), каталазы (*CAT*), гемоксигеназы 1 (*HO1*); гены ферментов, обеспечивающих поддержание внутриклеточного уровня низкомолекулярного антиоксиданта GSH за счёт его синтеза *de novo* и восстановления GSSG – N- и L-субъединицы γ -глутамилцистеинсинтетазы (γ -*GCSH*, γ -*GCSL*), γ -глутамилтрансферазы (γ -*Gt*), глутатионредуктазы (*GSR*); гены редоксинов – белков, участвующих в редокс-зависимой регуляции – тиоредоксина 1 (*TRX1*), тиоредоксинредуктазы 1 (*TRXR1*), пероксиредоксина 1 (*PRDX1*), пероксиредоксина 2 (*PRDX2*); гены других ферментов,

участвующих в детоксикации продуктов окислительного стресса, в частности, изоформ глутатион S-трансферазы — GSTP1-1 (*GSTP1*), GSTA4-4 (*GSTA4*), гены NADPH:хиноноксидоредуктазы 1 (*NQO1*), H- и L-субъединиц ферритина (*H-Ferritin*, *L-Ferritin*). Активация Nrf2, наряду с другими редокс-чувствительными транскрипционными факторами, в частности AP-1 и NF-κB, может приводить к редокс-зависимому изменению их экспрессии, обеспечивая развитие скоординированного ответа клетки на окислительный стресс. Согласно «реостатной» модели развития ответа на окислительный стресс, первый уровень защитного ответа на действие умеренных концентраций АФК обеспечивается активацией Nrf2, более высокий уровень АФК вызывает «включение» транскрипционных факторов AP-1 и NF-κB, дальнейшее повышение уровня АФК активирует механизмы апоптоза [2]. Предполагается, что транскрипционный фактор 53 (p53), контролирующий клеточный цикл, старение и апоптоз, осуществляет финальный ответ на крайне высокие уровни АФК. Следует отметить, что при чрезмерном окислительном стрессе накопившийся в ядре избыточный Nrf2 может связываться с регуляторной областью промотора гена *Klf9* (кодирующего Kruppel-подобный фактор 9) и активировать его экспрессию, что приводит к подавлению экспрессии генов антиоксидантных ферментов путём связывания *Klf9* с их репрессивными сайтами и вызывает клеточное повреждение в результате роста уровня АФК [48].

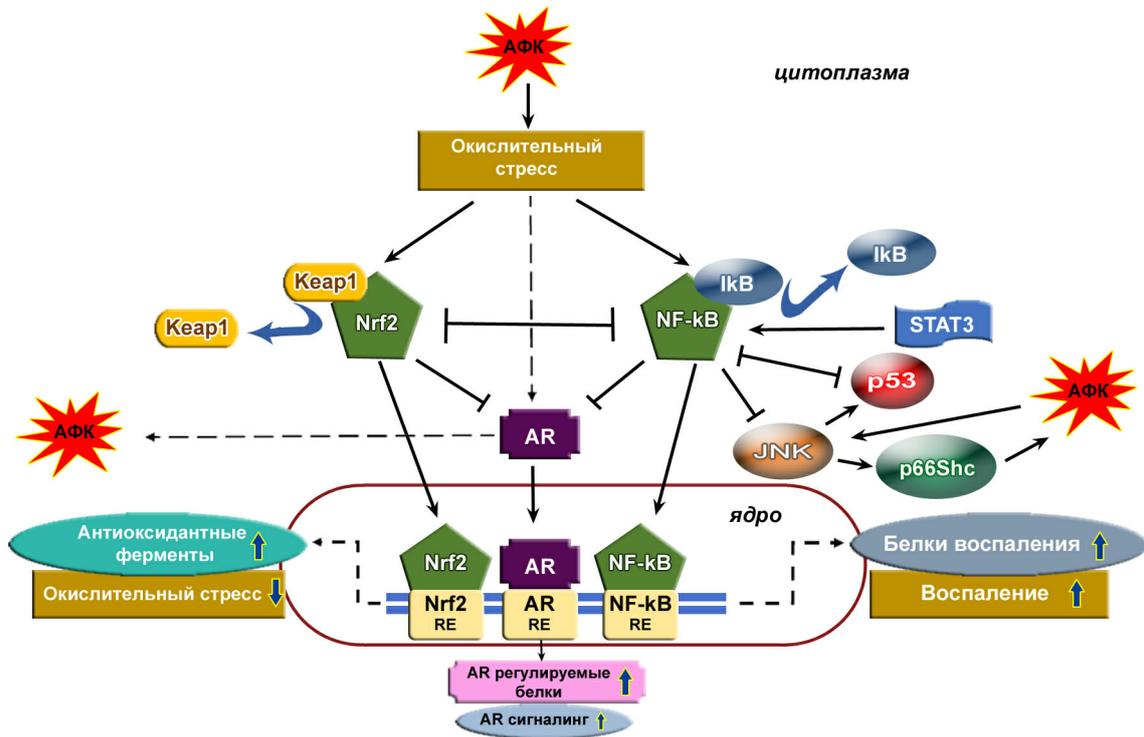
NF-κB-сигнальный путь. Во многих случаях развитие РПЖ сопровождается подавлением активности Nrf2. Так, снижение содержания Nrf2 обнаружено в процессе прогрессии трансгенной аденокарциномы простаты мышей [49]. Снижение экспрессии гена *NFE2L2* в клетках опухоли РПЖ сопровождается высоким уровнем окислительного стресса и повреждением ДНК [50]. Низкий уровень Nrf2 может способствовать процессу онкогенеза за счёт нарушения защитных механизмов клетки, что связано с развитием воспаления. В определённой степени это обусловлено тем, что снижение активности Nrf2 может вызывать активацию транскрипционного фактора NF-κB, способствующего развитию воспаления. Наличие трансрегуляторной («cross-talking») связи Nrf2 с NF-κB является критическим звеном в интеграции окислительного стресса и воспаления [51]. Подавление экспрессии гена *NFE2L2* увеличивает активность NF-κB и продукцию цитокинов, тогда как NF-κB может регулировать транскрипционную активность Nrf2 как положительно, так и отрицательно [51, 52].

Семейство транскрипционных факторов NF-κB включает белки, образующиеся путём гомодимерных или гетеродимерных комбинаций субъединиц p50, p52, p65/RelA, RelB и c-Rel. Для связывания с ДНК в белках служит N-концевой домен Rel, включающий около 300 аминокислотных остатков. NF-κB присутствует в цитоплазме в комплексе с ингибитором — белком IκB. Активация IκB-киназного комплекса (ИКК), который состоит из субъединиц ИКК-α и ИКК-β, приводит к фосфорилированию IκB. Фосфорилированные субъединицы ингибитора IκB в последующем подвергаются протеолизу, тогда как димеры NF-κB переносятся из цитоплазмы в ядро клетки. NF-κB контролирует экспрессию генов не только цитокинов, хемокинов, матриксных металлопротеиназ, провоспалительных ферментов (таких как циклооксигеназа 2, COX2), циклинов, антиапоптотических и проангиогенных белков, но и генов антиоксидантных (*SOD1*, *SOD2*, *HO1*) и прооксидантных ферментов (*CYP2E1*, *NOX2*, *XOR*, *NOS2*, *COX2*, *ALOX5* и *ALOX12*) [53], что может способствовать развитию редокс-зависимых путей адаптации [2].

Активация NF-κB происходит при разных типах злокачественных новообразований, включая рак простаты, и коррелирует с его прогрессированием, химиорезистентностью и метастазированием [54]. Во многих случаях активация гена-мишени димерами NF-κB посредством связывания со специфическими участками ДНК требует участия других факторов транскрипции, включая STAT, AP1, IRF и киназ сигнальных путей — mTOR, ERK1/2, JNK, p38, PI3K, AKT, WNT [53].

Транскрипционные факторы NF-κB и STAT3 (сигнальный белок и активатор транскрипции 3) могут взаимодействовать как позитивно, так и негативно, регулируя, в частности, экспрессию генов пропролиферативных (*cyclin D1*, *MYC*) и антиапоптотических белков (*BCL-X_L*, *BCL-2*), индуцибельной синтазы оксида азота (*Nos2*) [55]. Белки семейства STAT — транскрипционные факторы, которые активируются при действии цитокинов и факторов роста, выполняя затем роль активаторов транскрипции генов. Установлено, что снижение экспрессии гена *STAT3* связано с уменьшением объёма опухоли РПЖ и подавлением её рецидива [56]. В опухолевых клетках предстательной железы PC-3 ингибирование сигнального пути сигналов Jak-1/STAT3 приводит к снижению пролиферации и активации апоптоза [57].

В то же время обнаружено, что такой медиатор воспаления, как интерлейкин-8 (IL-8), экспрессия которого значительно повышена в



Редокс-зависимая регуляция с участием Nrf2, NF-κB, AR в опухолевых клетках при РПЖ. Тип редокс-зависимой передачи сигналов при раке простаты зависит от уровня АФК и развития окислительного стресса. Действие средних концентраций АФК обеспечивает активацию Nrf2, тогда как более высокий уровень АФК вызывает «включение» транскрипционного фактора NF-κB и снижение экспрессии гена *NFE2L2*. Прогрессирование РПЖ связано с активацией сигнального белка и активатора транскрипции 3 (STAT3) при повышении уровня АФК. NF-κB и p53 могут взаимно подавлять трансактивацию друг друга. Инактивация p53 и активация NF-κB способствуют устойчивости к запрограммированной гибели клеток. Рост активности NF-κB вызывает снижение активности c-Jun *N*-терминальной киназы (JNK), активирующей p53. Однако АФК могут активировать JNK путём фосфорилирования. В свою очередь, активация JNK, усиливая фосфорилирование белка p66Shc, вызывает повышение генерации АФК. Активация JNK и подавление Nrf2 усиливают активацию AR. Активированный ростом АФК, NF-κB может напрямую связываться с сайтом AR, снижая его связывание с ДНК и влияние на транскрипцию регулируемых генов

клетках РПЖ и который может оказывать канцерогенное и проангиогенное действие, стимулирует пролиферацию клеток рака простаты и подавляет апоптоз за счёт активации сигнального пути STAT3/АКТ/NF-κB [58]. IL-8 вызывает активацию фосфорилирования киназы АКТ, которая активирует канонический путь NF-κB, усиливая фосфорилирование ингибиторной субъединицы IκBα с её последующим отделением от комплекса p50–p65–IκBα и транслокацией p50–p65 в ядро.

Активность STAT3 может оказывать влияние на уровень АФК в опухолевых клетках. Так, установлено, что эпидермальный фактор роста (EGF) способствует прогрессированию РПЖ через сигнальный каскад АФК/STAT3/HIF-1α/TWIST1/N-кадгерин, что связано с активацией STAT3 и повышением уровня АФК, и, как полагают авторы, указывает на новые биомаркеры и терапевтические мишени. В то же время показано, что ингибирование STAT3 может

приводить к повышенной генерации АФК, активации стресса эндоплазматического ретикулума и в конечном итоге апоптозу клеток рака простаты [59].

Во многих видах опухолей транскрипционные факторы NF-κB и p53 могут антагонистически регулировать активность друг друга [60]. Как p53, так и NF-κB могут взаимно подавлять трансактивацию друг друга и способность стимулировать экспрессию генов. Инактивация p53 связана с подавлением апоптоза, тогда как активация NF-κB способствует устойчивости к запрограммированной гибели клеток [61]. Данные клинических исследований указывают на высокую экспрессию NF-κB/p65/RelA, NF-κB/p50/RelB и cRel наряду со снижением активности p53 в образцах первичных и метастатических опухолей РПЖ [62]. Несмотря на то что мутации p53 обнаруживаются на ранней стадии рака простаты, установлено, что более высокая частота мутации p53 наблюдается при метастати-

ческом раке простаты поздних стадий по сравнению с локализованными опухолями [63]. Мутации p53 приводят к нарушению регуляции клеточного цикла, вызывая аномальную пролиферацию и злокачественную трансформацию [64]. Также следует отметить, что высокий уровень белка p53 в клетках РПЖ тесно связан с пролиферацией, миграцией и способностью к адгезии. В клетках рака простаты DU145 p53 вызывает активацию пути FAK/Src и повышение уровней фосфорилирования JNK и ERK [65]. В то же время обнаружено, что полифенол ресвератрол индуцирует апоптоз посредством передачи сигналов по пути HIF-1 α /АФК/p53 в клетках РПЖ TRAMP, что связано с повышенным уровнем p53 и АФК [66].

JNK-сигнальный путь. Рост активности NF- κ B вызывает снижение активации киназы JNK за счёт активации белков GADD45 β , XIAP, A20 [67]. Активность JNK, как одного из сигнальных путей MAPK, является необходимым фактором для роста карциномы простаты как *in vitro*, так и *in vivo*, что делает её новой мишенью в терапии РПЖ [68]. Среди киназ семейства JNK, также известного как стресс-активируемые MAP-киназы (SAPK) и включающего три киназы – JNK1, JNK2, JNK3, в клетках предстательной железы JNK1 и JNK2 экспрессируются на низком и среднем уровне, и их экспрессия значительно увеличивается при РПЖ [68, 69].

JNK участвует в контроле широкого спектра клеточных процессов, включая апоптоз, пролиферацию, миграцию, выживание, дифференцировку, воспаление. АФК, наряду с другими факторами, включая цитокины, патогены, факторы роста, могут активировать JNK путём фосфорилирования [70]. Две расположенные выше МКК протеинкиназы (МКК4 и МКК7) активируют фосфорилирование JNK по Thr183 и Tyr185 [71] и, в свою очередь, активируются серин/треониновыми протеинкиназами, включая группу MEKK, группу протеинкиназ смешанного происхождения – MLK, семейство киназ, регулирующих сигнал апоптоза – ASK, киназы TAK1 и TPL2 [72]. Среди белков-мишеней, которые активирует JNK, обнаружены транскрипционные факторы STAT1 и STAT3, p53, c-Myc, Elk1, ATF-2, NFAT, а также контролирующие апоптоз белки митохондриального семейства Bcl-2 (Bcl-2, Bad, Vim, Bax) [68].

Роль JNK-зависимой передачи сигналов при раке простаты неоднозначна и, по-видимому, зависит от уровня АФК и развития окислительного стресса. Обнаружено, что снижение внутриклеточного уровня NOX5 вызывало снижение фосфорилирования JNK1/3 и, как следствие,

подавление АФК-зависимого пролиферативного эффекта в опухолевых клетках простаты PC-3. Подобный эффект вызывал ингибитор JNK1 SP600125, который оказывал сильное антипролиферативное действие на культуре клеток PC-3 [26]. В то же время обнаружено, что С-подобный белок LanCL1 (lanthionine synthase C-like protein 1), член семейства LanCL, защищает клетки РПЖ LNCaP и PC-3 от окислительного стресса и способствует пролиферации клеток, снижая гибель клеток за счёт подавления сигнального пути JNK [73].

Регулируя антипролиферативную активность, JNK1 может подавлять РПЖ. Так, показано, что нокдаун серин/треониновой протеинфосфатазы 5 может способствовать фосфорилированию JNK1, что приводит к ингибированию пролиферации опухолевых клеток PC-3, DU145 и 22Rv1 [74]. Однако, с другой стороны, киназы JNK могут напрямую перемещаться в митохондрии при различных стрессовых условиях и активировать генерацию АФК и гибель клеток [75]. Обнаружено, что действие ригосертиба (также известного как ON01910 или Estybon, синтетический бензилстирилсульфон) приводит к активации JNK1/2, которая, в свою очередь, активирует белок p66Shc и вызывает повышение генерации АФК в митохондриях опухолевых клеток простаты PC-3 и DU145 [76]. Фосфорилирование p66Shc, прооксидантной изоформы семейства адаптерных белков ShcA, по Ser36 с помощью JNK1/2 приводит к усилению переноса электронов от цитохрома c на молекулярный кислород, тем самым активируя образование АФК [77]. Действие p66Shc может также усиливать генерацию АФК за счёт роста содержания NOX и/или нарушения соотношения внутриклеточных уровней антиоксидантных ферментов в результате подавления активности фактора транскрипции FOXO [78].

AR-сигнальный путь. Активация JNK-сигнального пути приводит к усилению фосфорилирования андрогенового рецептора по остатку Ser650 в клетках LNCaP, что способствует экспорту AR в цитоплазму, однако снижает его транслокацию в ядро [68]. Активность AR как транскрипционного фактора важна для прогрессии РПЖ. Связывание андрогенов с AR приводит к активации опухолевого роста, метастазированию и подавлению апоптоза опухолевых клеток. Связь активности AR с уровнем АФК в опухолевых клетках РПЖ имеет двойственный характер: с одной стороны, АФК могут стимулировать ядерную транслокацию AR и его транскрипционную активность, с другой стороны, активируемый AR, внутриклеточный сигналинг может приводить к активации прооксидантных

ферментных систем [79]. Между AR-респонсивными элементами и сайтами связывания NF-κB в промоторной области гена существует перекрывание, поэтому активированный ростом АФК транскрипционный фактор NF-κB может напрямую связываться с сайтом AR, изменяя его связывание с ДНК и влияя на транскрипцию регулируемого гена [80]. Рост АФК положительно влияет на содержание AR, усиливая экспрессию гена AR, повышая стабилизацию мРНК и Ptx1-опосредованную стабилизацию белка [81]. Значительное повышение содержания Nrf2 приводит к подавлению экспрессии гена и функции AR в клетках РПЖ за счёт снижения уровня АФК [82].

РОЛЬ микроРНК В РЕГУЛЯЦИИ КЛЕТОЧНОГО РЕДОКСТАЗА ПРИ РАКЕ ПРЕДСТАТЕЛЬНОЙ ЖЕЛЕЗЫ

В настоящее время особый интерес вызывает роль микроРНК в патогенезе различных заболеваний. МикроРНК представляют собой класс коротких одноцепочечных некодирующих РНК, подавляющих экспрессию генов на посттранскрипционном уровне посредством комплементарного спаривания оснований с 30 нетранслируемыми областями (UTR) мРНК-мишеней, ингибируя их трансляцию и/или вызывая их деградацию [83]. Учитывая тот факт, что микроРНК участвуют в регуляции важных для жизнеспособности клеток процессов, включая пролиферацию, дифференцировку и запрограммированную гибель клеток, становятся необходимым исследование их роли в механизме развития многих заболеваний, включая злокачественные новообразования [83]. Всё большее число данных свидетельствует в пользу значимого вклада микроРНК в механизм регуляции клеточного редокс-гомеостаза в опухолевых клетках и модуляцию злокачественного роста на разных стадиях онкогенеза [84]. Вопросы взаимосвязи микроРНК и внутриклеточных редокс-систем при РПЖ становятся актуальными и для исследований, касающихся поиска мишеней для терапевтического воздействия на опухолевые клетки особенно при агрессивном, устойчивом к лечению РПЖ (табл. 3).

Высокая скорость метаболизма быстро пролиферирующих раковых клеток характерна для повышенного внутриклеточного уровня генерации АФК прооксидантными ферментными системами, среди которых лидирующая роль принадлежит дыхательным комплексам митохондрий I и III. Митохондриальные ферменты, включая Mn-зависимую супероксиддисмута-

зу (SOD2), глутатионпероксидазу 2 (Gpx2) и тиоредоксинредуктазу 2 (TrxR2), составляют первичную систему антиоксидантной защиты в митохондриях, внося существенный вклад в поддержание редокс-баланса, необходимого для функциональной активности митохондрий. В клетках РПЖ установлена способность miR-17-3p подавлять активность всех трёх ферментов: SOD2, Gpx2 и TrxR2. Трансфекция miR-17-3p в клетках PC-3 (агрессивный тип РПЖ) вызывала значительное снижение содержания всех трёх ферментов и повышала чувствительность клеток РПЖ PC-3 к действию ионизирующего излучения [85]. Кроме того, авторами отмечается, что повышение экспрессии гена *miR-17-3p* может приводить к подавлению отдалённого эффекта индуцирующего действия ионизирующей радиации на экспрессию генов *SOD2*, *GPX2*, *TXNRD2* и, как следствие, сопровождаться снижением пролиферации опухолевых клеток за счёт значительного роста уровня АФК и снижения митохондриального дыхания [85]. Одним из механизмов терапии опухолей является активация генерации АФК при воздействии облучения или химиотерапии. Применение препарата LQB-118 (птерокарпанхинона), индуцирующего образование АФК и обладающего противоопухолевой активностью, на линиях клеток РПЖ — PC-3, LNCaP и LAPC4, и подкожных опухолях ксенографтах PC-3, привитых самцам Balb/c nude, приводило к адаптивному повышению активности SOD1. В исследуемых клетках РПЖ действие трёх микроРНК — miR-206, miR-1 и miR-101 — вызывало снижение внутриклеточного содержания SOD1 [86]. Однако эффективность каждой микроРНК в снижении активности SOD1 и повышении чувствительности к цитотоксическому действию LQB-118 значительно варьировала между линиями клеток РПЖ.

Мишенью miR-193a-5p при РПЖ может быть гемоксигеназа (HO-1), играющая важную роль в системе антиоксидантной защиты и редокс-зависимом сигналинге. В опухолевых тканях РПЖ обнаружено значительное повышение содержания miR-193a-5p, которое коррелировало с активностью HO-1 [87]. В клетках РПЖ человека (LNCaP, PC-3 и DU145) установлено, что повышение экспрессии гена *miR-193a-5p* сопровождается ростом содержания HO-1 по сравнению с нормальными эпителиальными клетками предстательной железы RWPE-1, тогда как использование ингибитора miR-193a-5p приводило к снижению содержания HO-1. При исследовании действия противоопухолевого препарата доцетаксела, используемого в терапии пациентов с метастазами РПЖ, на клетки PC-3-ксенографта РПЖ, привитых подкожно

Таблица 3. МикроРНК, участвующие в регуляции редокс-статуса опухолевых клеток рака предстательной железы

МикроРНК	Мишень	Активность фермента	Клетки/опухолевая ткань	Эффект	Ссылки
miR-17-3p	GPx2 TrxR2 SOD2	↓ ↓ ↓	PC-3	проонкогенный	[85]
miR-521	SOD2	↓	LNCaP	проонкогенный	[98]
miR-206, miR-1, miR-101	SOD1	↓	PC-3, LNCaP, LAPC4 PC-3, ксенографт мыши	проонкогенный	[86]
miR-193a-5p	HO-1	↑	PC-3 РПЖ-ткань опухоли человека PC-3, ксенографт мыши	проонкогенный	[87]
miR-101	COX-2	↑	LNCaP, PC-3	проонкогенный	[91]
miR-205	COX-2	↑	РПЖ-ткань опухоли человека, PC-3	проонкогенный	[99]
miR-21	NADPH-оксидаза (p47)	↑	PC-3M-MM2	проонкогенный	[88]
miR-137	NOX4	↑	PC-3	проонкогенный	[100]
miR-23b	NOX4	↑	LNCaP	проонкогенный	[90]

мышам *Valb/c nude*, установлено, что препарат вызывает развитие окислительного стресса, при котором рост экспрессии гена *miR-193a-5p* сопровождается повышением содержания HO-1, вызванном снижением содержания репрессора гена *HO1* в результате связывания *miR-193a-5p* с 3'-UTR областью мРНК *Vach2* [87].

К онкогенным микроРНК, способствующим инвазивному росту опухоли, относится *miR-21*, обнаруженная в процессе канцерогенеза при РПЖ. В опухолевых тканях пациентов с метастатическим РПЖ обнаружены высокие уровни *miR-21*, *p47* (*phox*) и АФК при снижении содержания белка программируемой клеточной смерти 4 (*PDCD4*, *programmed cell death 4*) [88].

В андроген-независимых клетках РПЖ (PC-3M-MM2) выявлена высокая экспрессия генов *miR-21* и *p47* (цитозольная субъединица NADPH-оксидазы). Трансфекция клеток с анти-*miR-21* и *p47* приводила к снижению экспрессии генов *miR-21* и *p47* с одновременным повышением содержания *PDCD4* и уменьшением инвазивности клеток РПЖ. Кроме того, нокаут гена *p22phox* (мембранносвязанная субъединица NADPH-оксидазы) также приводил к снижению уровня *miR-21* и подавлению метастазирования клеток РПЖ. Использование как хлорида дифенилениодония – ингибитора NADPH-оксидазы, так и антиоксиданта N-ацетилцистеина вызывало снижение экспрессии гена *miR-21* [88].

Низкий уровень экспрессии гена *miR-137* и, напротив, высокий уровень содержания изоформы NADPH-оксидазы NOX4 обнаружены в опухолевых клетках PC-3, что является важной особенностью для прогрессии РПЖ [89]. Повышение уровня *miR-137* способствует снижению содержания NOX4 и *Bcl-2* в клетках PC-3 и приводит к повышению содержания каспаз 3, 8 и 9, белков PARP и *Wax*, подавлению пролиферации и активации апоптоза опухолевых клеток [89]. NOX4 может быть мишенью также для *miR-23b* при РПЖ. Так, в клетках PC-3 снижение содержания *miR-23b* приводит к повышению внутриклеточного уровня NOX4 [90].

Хроническое воспаление связано с окислительным стрессом и онкогенезом и часто может ему предшествовать. COX-2, ключевой регулятор уровня простагландинов, способствует пролиферации и росту клеток, и повышение экспрессии гена *COX-2* часто обнаруживается в опухолевых тканях РПЖ. Установлено, что *miR-101* подавляет образование COX-2 путём связывания с 3'-нетранслируемой областью (3'-UTR) мРНК *COX-2* [91]. Между уровнем *miR-101* и уровнем белка COX-2 в линиях клеток РПЖ (ВРН^{CAFTD}, LNCaP, PC-3) наблюдалась обратная корреляция. *MiR-101* не только может снижать содержание белка COX-2, но одновременно понижает уровень EGFR, рецептора эпидермального фактора роста, в культивируемых клетках ВРН^{CmiR101} и тканях-ксенографтах этих

клеток [91]. EGFR, который находится на поверхности клетки и активируется лигандом, инициирует EGFR-зависимый синтез ДНК и пролиферацию клеток. Высокий уровень экспрессии гена *EGFR* наблюдается при многих видах злокачественных новообразований, включая РПЖ. Повышенная экспрессия гена *COX-2* приводит к EGFR-стимулированной пролиферации клеток, а продукт *COX-2* – PGE2 активирует сигнальные пути EGFR, способствуя развитию опухоли. Так, на андроген-независимых клетках РПЖ PC-3 была установлена EGFR-зависимая активация *COX-2*, запускаемая внутриклеточным PGE2, обладающим проонкогенным эффектом [92]. Представленные данные позволяют говорить о существовании тесной связи между miR-101 и *COX-2*, PGE2, EGFR, которая отвечает за пролиферацию клеток РПЖ.

Таким образом, многочисленные данные свидетельствуют о значимости развития окислительного стресса и изменения редокс-зависимой регуляции в процессах злокачественного роста при РПЖ, что связано с дисбалансом в регуляции уровня АФК в результате активации ряда прооксидантных систем и снижением антиоксидантной защиты. Значительная роль в мо-

дуляции редокс-зависимого баланса принадлежит микроРНК. Рост уровня АФК приводит к изменению редокс-зависимой регуляции с участием Nrf2-, NF-κB-, JNK-, AR-сигналинга в опухолевых клетках, что связано с прогрессией опухолевого роста. Тем не менее механизм и факторы контроля путей редокс-зависимого сигналинга в доброкачественных и злокачественных опухолях всё ещё остаются малоизученными. Дальнейшее исследование их роли и поиск эффективных модуляторов активности прооксидантных ферментных систем, ферментов антиоксидантной защиты и ключевых ферментов переноса редокс-зависимого сигнала может быть перспективным направлением в разработке новых подходов химиотерапии для подавления опухолевого роста при РПЖ.

Финансирование. Работа выполнена при поддержке Программы стратегического академического лидерства РУДН.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

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

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Rawla, P. (2019) Epidemiology of prostate cancer, *World J. Oncol.*, **10**, 63-89, doi: 10.14740/wjon1191.
2. Hayes, J. D., Dinkova-Kostova, A. T., and Tew, K. D. (2020) Oxidative stress in cancer, *Cancer Cell*, **38**, 167-197, doi: 10.1016/j.ccell.2020.06.001.
3. Staal, J., and Beyaert, R. (2018) Inflammation and NF-κB signaling in prostate cancer: mechanisms and clinical implications, *Cells*, **7**, 122, doi: 10.3390/cells7090122.
4. Tan, B. L., and Norhaizan, M. E. (2021) Oxidative stress, diet and prostate cancer, *World J. Mens Health*, **39**, 195-207, doi: 10.5534/wjmh.200014.
5. Shukla, S., Srivastava, J. K., Shankar, E., Kanwal, R., Nawab, A., et al. (2020) Oxidative stress and antioxidant status in high-risk prostate cancer subjects, *Diagnostics (Basel)*, **10**, 126, doi: 10.3390/diagnostics10030126.
6. Fahmy, O., Alhakamy, N. A., Rizg, W. Y., Bagalagel, A., Alamoudi, A. J., et al. (2021) Updates on molecular and biochemical development and progression of prostate cancer, *J. Clin. Med.*, **10**, 5127, doi: 10.3390/jcm10215127.
7. Szweczyk-Golec, K., Tyloch, J., and Czuczejko, J. (2015) Antioxidant defense system in prostate adenocarcinoma and benign prostate hyperplasia of elderly patients, *Neoplasma*, **62**, 119-123, doi: 10.4149/neo_2015_015.
8. D'Souza, L. C., Mishra, S., Chakraborty, A., Shekher, A., Sharma, A., et al. (2020) Oxidative stress and cancer development: are noncoding RNAs the missing links? *Antioxid. Redox. Signal*, **33**, 1209-1229, doi: 10.1089/ars.2019.7987.
9. Kalinina, E. V., Ivanova-Radkevich, V. I., and Chernov, N. N. (2019) Role of MicroRNAs in the regulation of redox-dependent processes, *Biochemistry (Moscow)*, **84**, 1233-1246, doi: 10.1134/S0006297919110026.
10. Snezhkina, A. V., Kudryavtseva, A. V., Kardymon, O. L., Savvateeva, M. V., Melnikova, N. V., et al. (2019) ROS generation and antioxidant defense systems in normal and malignant cells, *Oxid. Med. Cell Longev.*, **2019**, 6175804, doi: 10.1155/2019/6175804.
11. Sajjaboontawe, N., Supasitthumrong, T., Tunvirachaisakul, C., Nantachai, K., Snaboon, T., et al. (2020) Lower thiol, glutathione, and glutathione peroxidase levels in prostate cancer: a meta-analysis study, *Aging Male*, **23**, 1533-1544, doi: 10.1080/13685538.2020.1858048.
12. Martignano, F., Gurioli, G., Salvi, S., Calistri, D., Costantini, M., et al. (2016) GSTP1 methylation and protein expression in prostate cancer: diagnostic implications, *Dis. Markers*, **2016**, 4358292, doi: 10.1155/2016/4358292.
13. Debelec-Butuner, B., Bostanci, A., Ozcan, F., Singin, O., Karamil, S., et al. (2019) Oxidative DNA damage-mediated genomic heterogeneity is regulated by NKX3.1 in prostate cancer, *Cancer Invest.*, **37**, 113-126, doi: 10.1080/0737907.2019.1576192.
14. Liguori, I., Russo, G., Curcio, F., Bulli, G., Aran, L., et al. (2018) Oxidative stress, aging, and diseases, *Clin. Interv. Aging*, **13**, 757-772, doi: 10.2147/CIA.S158513.

15. Zhang, L., Wang, X., Cueto, R., Effi, C., Zhang, Y., et al. (2019) Biochemical basis and metabolic interplay of redox regulation, *Redox Biol.*, **26**, 101284, doi: 10.1016/j.redox.2019.101284.
16. Mohammadi, M., Irani, S., Salahshourifar, I., Hosseini, J., Moradi, A., et al. (2020) Investigation of GSTP1 and epigenetic regulators expression pattern in a population of Iranian patients with prostate cancer, *Hum. Antibodies*, **28**, 327-334, doi: 10.3233/HAB-200424.
17. Yang, Y., Fuentes, F., Shu, L., Wang, C., Pung, D., et al. (2017) Epigenetic CpG methylation of the promoter and reactivation of the expression of GSTP1 by astaxanthin in human prostate LNCaP cells, *AAPS J.*, **19**, 421-430, doi: 10.1208/s12248-016-0016-x.
18. Fukui, T., and Ushio-Fukai, M. (2011) Superoxide dismutases: role in redox signaling, vascular function, and diseases, *Antioxid. Redox Signal*, **15**, 1583-1606, doi: 10.1089/ars.2011.3999.
19. Dhar, S. K., Tangpong, J., Chaiswing, L., Oberley, T. D., and Clair, D. K. (2011) Manganese superoxide dismutase is a p53-regulated gene that switches cancers between early and advanced stages, *Cancer Res.*, **71**, 6684-6695, doi: 10.1158/0008-5472.CAN-11-1233.
20. Roy, K., Wu, Y., Meitzler, J. L., Juhasz, A., Liu, H., et al. (2015) NADPH oxidases and cancer, *Clin. Sci. (Lond)*, **128**, 863-875, doi: 10.1042/CS20140542.
21. Arbiser, J. L., Petros, J., Klafter, R., Govindajaran, B., McLaughlin, E. R., et al. (2002) Reactive oxygen generated by Nox1 triggers the angiogenic switch, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **99**, 715-720, doi: 10.1073/pnas.022630199.
22. Deep, G., Kumar, R., Jain, A. K., Dhar, D., Panigrahi, G. K., et al. (2016) Graviola inhibits hypoxia-induced NADPH oxidase activity in prostate cancer cells reducing their proliferation and clonogenicity, *Sci. Rep.*, **6**, 23135, doi: 10.1038/srep23135.
23. Tamura, R. E., Hunger, A., Fernandes, D. C., Laurindo, F. R., Costanzi-Strauss, E., et al. (2017) Induction of oxidants distinguishes susceptibility of prostate carcinoma cell lines to p53 gene transfer mediated by an improved adenoviral vector, *Hum. Gene Ther.*, **28**, 639-653, doi: 10.1089/hum.2016.139.
24. Lim, S. D., Sun, C. Q., Lambeth, J. D., Marshall, F., Amin, M., et al. (2005) Increased Nox1 and hydrogen peroxide in prostate cancer, *Prostate*, **62**, 200-207, doi: 10.1002/pros.20137.
25. Juhasz, A., Ge, Y., Markel, S., Chiu, A., Matsumoto, L., et al. (2009) Expression of NADPH oxidase homologues and accessory genes in human cancer cell lines, tumours and adjacent normal tissues, *Free Radic. Res.*, **43**, 523-532, doi: 10.1080/10715760902918683.
26. Höll, M., Koziel, R., Schäfer, G., Pircher, H., Pauck, A., et al. (2016) ROS signaling by NADPH oxidase 5 modulates the proliferation and survival of prostate carcinoma cells, *Mol. Carcinog.*, **55**, 27-39, doi: 10.1002/mc.22255.
27. Kumar, B., Koul, S., Khandrika, L., Meacham, R. B., and Koul, H. K. (2008) Oxidative stress in inherent in prostate cancer cells and is required for aggressive phenotype, *Cancer Res.*, **68**, 1777-1785, doi: 10.1158/0008-5472.CAN-07-5259.
28. Brar, S. S., Corbib, Z., Kennedy, T. P., Hemendinger, R., Thornton, L., et al. (2003) NOX5 NAD(P)H oxidase regulates growth and apoptosis in DU145 prostate cancer cells, *Am. J. Physiol. Cell Physiol.*, **285**, 353-369, doi: 10.1152/ajpcell.00525.2002.
29. Pettigrew, C. A., Clerkin, J. S., and Cotter, T. G. (2012) DUOX enzyme activity promotes AKT signalling in prostate cancer cells, *Anticancer Res.*, **32**, 5175-5181.
30. Lu, J. P., Monardo, L., Bryskin, I., Hou, Z. F., Trachtenberg, J., et al. (2010) Androgens induce oxidative stress and radiation resistance in prostate cancer cells through NADPH oxidase, *Prostate Cancer Prostatic Dis.*, **13**, 39-46, doi: 10.1038/pcan.2009.24.
31. Lu, J. P., Hou, Z. F., Duivenvoorden, W. C., Whelan, K., Honig, A., et al. (2012) Adiponectin inhibits oxidative stress in human prostate carcinoma cells, *Prostate Cancer Prostatic Dis.*, **15**, 28-35, doi: 10.1038/pcan.2011.53.
32. Speed, N., and Blair, I. A. (2011) Cyclooxygenase- and lipoxygenase-mediated DNA damage, *Cancer Metastasis Rev.*, **30**, 437-447, doi: 10.1007/s10555-011-9298-8.
33. Pidgeon, G. P., Lysaght, J., Krishnamoorthy, S., Reynolds, J. V., O'Byrne, K., et al. (2007) Lipoxygenase metabolism: roles in tumor progression and survival, *Cancer Metastasis Rev.*, **26**, 503-524, doi: 10.1007/s10555-007-9098-3.
34. Saboormaleki, S., Sadeghian, H., Bahrami, A. R., Orafaie, A., and Matin, M. M. (2018) 7-Farnesylcoumarin exerts anti-cancer effects on a prostate cancer cell line by 15-LOX-1 inhibition, *Arch. Iran Med.*, **21**, 251-259.
35. Iranpour, S., Al-Mosawi, A. K. M., Bahrami, A. R., Sadeghian, H., and Matin, M. M. (2021) Investigating the effects of two novel 4-MMPB analogs as potent lipoxygenase inhibitors for prostate cancer treatment, *J. Biol. Res. (Thessalon)*, **28**, 10, doi: 10.1186/s40709-021-00141-w.
36. Krishnamoorthy, S., Jin, R., Cai, Y., Maddipati, K. R., Nie, D., et al. (2010) 12-Lipoxygenase and the regulation of hypoxia-inducible factor in prostate cancer cells, *Exp. Cell Res.*, **316**, 1706-1715, doi: 10.1016/j.yexcr.2010.03.005.
37. Sarveswaran, S., Chakraborty, D., Chitale, D., Sears, R., and Ghosh, J. (2015) Inhibition of 5-lipoxygenase selectively triggers disruption of c-Myc signaling in prostate cancer cells, *J. Biol. Chem.*, **290**, 4994-5006, doi: 10.1074/jbc.M114.599035.
38. Hsi, L. C., Wilson, L. C., and Eling, T. E. (2002) Opposing effects of 15-lipoxygenase-1 and -2 metabolites on MAPK signaling in prostate. Alteration in peroxisome proliferator-activated receptor gamma, *J. Biol. Chem.*, **277**, 40549-40556, doi: 10.1074/jbc.M203522200.
39. Gondek, T., Szajewski, M., Szeffel, J., Aleksandrowicz-Wrona, E., Skrzypczak-Jankun, E., et al. (2014) Evaluation of 12-lipoxygenase (12-LOX) and plasminogen activator inhibitor 1 (PAI-1) as prognostic markers in prostate cancer, *Biomed. Res. Int.*, **2014**, 102478, doi: 10.1155/2014/102478.
40. Gao, X., Porter, A. T., and Honn, K. V. (1997) Involvement of the multiple tumor suppressor genes and 12-lipoxygenase in human prostate cancer. Therapeutic implications, *Adv. Exp. Med. Biol.*, **407**, 41-53, doi: 10.1007/978-1-4899-1813-0_7.
41. Matsuyama, M., Yoshimura, R., Mitsuhashi, M., Hase, T., Tsuchida, K., et al. (2004) Expression of lipoxygenase in human prostate cancer and growth reduction by its inhibitors, *Int. J. Oncol.*, **24**, 821-827, doi: 10.3892/ijo.24.4.821.
42. Goftari, S. N., Sadeghian, H., Bahrami, A. R., Maleki, F., and Matin, M. M. (2019) Stylosin and some of its synthetic derivatives induce apoptosis in prostate cancer cells as

- 15-lipoxygenase enzyme inhibitors, *Naunyn Schmiedebergs Arch. Pharmacol.*, **392**, 1491-1502, doi: 10.1007/s00210-019-01689-0.
43. Hosseinymehr, M., Matin, M. M., Sadeghian, H., Bahrami, A. R., and Kaseb-Mojaver, N. (2016) 8-Farnesyloxycoumarin induces apoptosis in PC-3 prostate cancer cells by inhibition of 15-lipoxygenase-1 enzymatic activity, *Anticancer Drugs*, **27**, 854-862, doi: 10.1097/CAD.0000000000000399.
44. Robertson, H., Dinkova-Kostova, A. T., and Hayes, J. D. (2020) NRF2 and the ambiguous consequences of its activation during initiation and the subsequent stages of tumorigenesis cancers, *Cancers*, **12**, 3609, doi: 10.3390/cancers12123609.
45. Zimta, A.-A., Cenariu, D., Irimie, A., Magdo, L., Nabavi, S. M., et al. (2019) The role of Nrf2 activity in cancer development and progression, *Cancers*, **11**, 1755, doi: 10.3390/cancers11111755.
46. Sekine, H., Motohashi, H. (2021) Roles of CNC transcription factors NRF1 and NRF2 in cancer, *Cancers (Basel)*, **13**, 541, doi: 10.3390/cancers13030541.
47. Taguchi, K., and Yamamoto, M. (2021) The KEAP1-NRF2 system as a molecular target of cancer treatment, *Cancers (Basel)*, **13**, 46, doi: 10.3390/cancers13010046.
48. Zucker, S. N., Fink, E. E., Bagati, A., Mannava, S., Bianchi-Smiraglia, A., et al. (2014) Nrf2 amplifies oxidative stress via induction of Klf9, *Mol Cell*, **53**, 916-928, doi: 10.1016/j.molcel.2014.01.033.
49. Barve, A., Khor, T. O., Nair, S., Reuhl, K., Suh, N., et al. (2009) Tocopherol-enriched mixed tocopherol diet inhibits prostate carcinogenesis in TRAMP mice, *Int. J. Cancer*, **124**, 1693-1699, doi: 10.1002/ijc.24106.
50. Frohlich, D. A., McCabe, M. T., Arnold, R. S., and Day, M. L. (2008) The role of Nrf2 in increased reactive oxygen species and DNA damage in prostate tumorigenesis, *Oncogene*, **27**, 4353-4362, doi: 10.1038/onc.2008.79.
51. Wardyn, J. D., Ponsford, A. H., and Sanderson, C. M. (2015) Dissecting molecular cross-talk between Nrf2 and NF- κ B response pathways, *Biochem. Soc. Trans.*, **43**, 621-626, doi: 10.1042/BST20150014.
52. Buelna-Chontal, M., and Zazueta, C. (2013) Redox activation of Nrf2 and NF- κ B: a double end sword? *Cell Signal*, **25**, 2548-2557, doi: 10.1016/j.cellsig.2013.08.007.
53. Taniguchi, K., and Karin, M. (2018) NF- κ B, inflammation, immunity and cancer: coming of age, *Nat. Rev. Immunol.*, **18**, 309-324, doi: 10.1038/nri.2017.142.
54. Jin, R., Yi, Y., Yull, F. E., Blackwell, T. S., Clark, P. E., et al. (2014) NF- κ B gene signature predicts prostate cancer progression, *Cancer Res.*, **74**, 2763-2772, doi: 10.1158/0008-5472.CAN-13-2543.
55. Grivennikov, S. I., and Karin, M. (2010) Dangerous liaisons: STAT3 and NF- κ B collaboration and crosstalk in cancer, *Cytokine Growth Factor Rev.*, **21**, 11-19, doi: 10.1016/j.cytogfr.2009.11.005.
56. Jiang, L. H., Hao, Y. L., and Zhu, J. W. (2019) Expression and prognostic value of HER-2/neu, STAT3 and SOCS3 in hepatocellular carcinoma, *Clin. Res. Hepatol. Gastroenterol.*, **43**, 282-291, doi: 10.1016/j.clinre.2018.09.011.
57. Wang, X., Wang, B., Zhou, L., Wang, X., Veeraraghavan, V. P., et al. (2020) *Ganoderma lucidum* put forth anti-tumor activity against PC-3 prostate cancer cells via inhibition of Jak-1/STAT-3 activity, *Saudi. J. Biol. Sci.*, **27**, 2632-2637, doi: 10.1016/j.sjbs.2020.05.044.
58. Guo, Y., Zang, Y., Lv, L., Cai, F., Qian, T., et al. (2017) IL-8 promotes proliferation and inhibition of apoptosis via STAT3/AKT/NF- κ B pathway in prostate cancer, *Mol. Med. Rep.*, **16**, 9035-9042, doi: 10.3892/mmr.2017.7747.
59. Chen, W., Li, P., Liu, Y., Yang, Y., Ye, X., et al. (2018) Isoalantolactone induces apoptosis through ROS-mediated ER stress and inhibition of STAT3 in prostate cancer cells, *J. Exp. Clin. Cancer Res.*, **37**, 309, doi: 10.1186/s13046-018-0987-9.
60. Gudkov, A. V., and Komarova, E. A. (2016) p53 and the carcinogenicity of chronic inflammation, *Cold Spring Harb. Perspect. Med.*, **6**, a026161, doi: 10.1101/cshperspect.a026161.
61. Schneider, G., Henrich, A., Greiner, G., Wolf, V., Lovas, A., et al. (2010) Crosstalk between stimulated NF- κ B and the tumor suppressor p53, *Oncogene*, **29**, 2795-2806, doi: 10.1038/onc.2010.46.
62. Shankar, E., Zhang, A., Franco, D., and Gupta, S. (2017) Betulinic acid-mediated apoptosis in human prostate cancer cells involves p53 and nuclear factor- κ B (NF- κ B) pathways, *Molecules*, **22**, 264, doi: 10.3390/molecules22020264.
63. Dong, J. T. (2006) Prevalent mutations in prostate cancer, *J. Cell Biochem.*, **97**, 433-447, doi: 10.1002/jcb.20696.
64. Meek, D. W. (2015) Regulation of the p53 response and its relationship to cancer, *Biochem. J.*, **469**, 325-346, doi: 10.1042/BJ20150517.
65. Wan, J., Zhang, J., and Zhang, J. (2018) Expression of p53 and its mechanism in prostate cancer, *Oncol. Lett.*, **16**, 378-382, doi: 10.3892/ol.2018.8680.
66. Wang, D., Gao, Z., and Zhang, X. (2018) Resveratrol induces apoptosis in murine prostate cancer cells via hypoxia-inducible factor 1- α (HIF-1 α)/reactive oxygen species (ROS)/P53 signaling, *Med. Sci. Monit.*, **24**, 8970-8976, doi: 10.12659/MSM.913290.
67. Papa, S., Zazzeroni, F., Pham, C. G., Bubici, C., and Franzoso, G. (2004) Linking JNK signaling to NF- κ B: a key to survival, *J. Cell Sci.*, **117**, 5197-5208, doi: 10.1242/jcs.01483.
68. Xu, R., and Hu, J. (2020) The role of JNK in prostate cancer progression and therapeutic strategies, *Biomed. Pharmacother.*, **121**, 109679, doi: 10.1016/j.biopha.2019.109679.
69. Nikoloudaki, G., Brooks, S., Peidl, A. P., Tinney, D., and Hamilton, D. W. (2020) JNK signaling as a key modulator of soft connective tissue physiology, pathology, and healing, *Int. J. Mol. Sci.*, **21**, 1015, doi: 10.3390/ijms21031015.
70. Takata, T., Araki, S., Tsuchiya, Y., and Watanabe, Y. (2020) Oxidative stress orchestrates MAPK and nitric-oxide synthase signal, *Int. J. Mol. Sci.*, **21**, 8750, doi: 10.3390/ijms21228750.
71. Dou, Y., Jiang, X., Xie, H., He, J., and Xiao, S. (2019) The Jun N-terminal kinases signaling pathway plays a "seesaw" role in ovarian carcinoma: a molecular aspect, *J. Ovarian Res.*, **12**, 99, doi: 10.1186/s13048-019-0573-6.
72. Acosta, A. M., and Kadko, S. S. (2016) Mitogen-activated protein kinase signaling pathway in cutaneous melanoma: an updated review, *Arch. Pathol. Lab. Med.*, **140**, 1290-1296, doi: 10.5858/arpa.2015-0475-RS.
73. Wang, J., Xiao, Q., Chen, X., Tong, S., Sun, J., et al. (2018) LanCL1 protects prostate cancer cells from oxidative stress via suppression of JNK pathway, *Cell Death. Dis.*, **9**, 197, doi: 10.1038/s41419-017-0207-0.
74. Lv, J. M., Chen, L., Gao, Y., Huang, H., Pan, X. W., et al. (2018) PPP5C promotes cell proliferation and survival in

- human prostate cancer by regulating of the JNK and ERK1/2 phosphorylation, *Oncol. Ther.*, **11**, 5797-5809, doi: 10.2147/OTT.S161280.
75. Chambers, J., Pachori, A., Howard, S., Iqbal, S., and LoGrasso, P. (2012) Inhibition of JNK mitochondrial localization and signaling is protective against ischemia/reperfusion injury in rats, *J. Boil. Chem.*, **288**, 4000-4011, doi: 10.1074/jbc.M112.406777.
 76. Günther, J. K., Nikolajevic, A., Ebner, S., Troppmair, J., and Khalid, S. (2020) Rigosertib-activated JNK1/2 eliminate tumor cells through p66Shc activation, *Biology (Basel)*, **9**, 99, doi: 10.3390/biology9050099.
 77. Galimov, E. R. (2010) The role of p66shc in oxidative stress and apoptosis, *Acta Naturae*, **2**, 44-51, doi: 10.32607/20758251-2010-2-4-44-51.
 78. Eid, R. A., Zaki, M. S. A., Eldeen, M. A., Alshehri, M. M., Shati, A. A., et al. (2020) Exendin-4 protects the hearts of rats from ischaemia/reperfusion injury by boosting antioxidant levels and inhibition of JNK/p66Shc/NADPH axis, *Clin. Exper. Pharmacol. Physiol.*, **47**, 1240-1253, doi: 10.1111/1440-1681.13299.
 79. Han, C., Wang, Z., Xu, Y., Chen, S., Han, Y., et al. (2020) Roles of reactive oxygen species in biological behaviors of prostate cancer, *Biomed. Res. Int.*, **2020**, 1269624, doi: 10.1155/2020/1269624.
 80. Khurana, N., and Sikka, S. C. (2018) Targeting crosstalk between Nrf-2, NF- κ B and androgen receptor signaling in prostate cancer, *Cancers*, **10**, 352, doi: 10.3390/cancers10100352.
 81. Yu, J., Zhou, P., Du, W., Xu, R., Yan, G., et al. (2020) Metabolically stable diphenylamine derivatives suppress androgen receptor and BET protein in prostate cancer, *Biochem. Pharmacol.*, **177**, 113946, doi: 10.1016/j.bcp.2020.113946.
 82. Schultz, M. A., Hagan, S. S., Datta, A., Zhang, Y., Freeman, M. L., et al. (2014) Nrf1 and Nrf2 transcription factors regulate androgen receptor transactivation in prostate cancer cells, *PLoS One*, **9**, e87204, doi: 10.1371/journal.pone.0087204.
 83. Uzuner, E., Ulu, G. T., Gürler, S. B., and Baran, Y. (2022) The role of miRNA in cancer: pathogenesis, diagnosis, and treatment, *Methods Mol. Biol.*, **2257**, 375-422, doi: 10.1007/978-1-0716-1170-8_18.
 84. Ali Syeda, Z., Langden, S. S., Munkhzul, C., Lee, M., and Song, S. (2020) Regulatory mechanism of microRNA expression in cancer, *J. Int. J. Mol. Sci.*, **21**, 1723, doi: 10.3390/ijms21051723.
 85. Xu, Z., Zhang, Y., Ding, J., Hu, W., Tan, C., et al. (2018) miR-17-3p downregulates mitochondrial antioxidant enzymes and enhances the radiosensitivity of prostate cancer cells, *Mol. Ther. Nucleic Acids*, **13**, 64-77, doi: 10.1016/j.omtn.2018.08.009.
 86. Martino, T., Kudrolli, T. A., Kumar, B., Salviano, I., Mencialha, A., et al. (2018) The orally active pterocarpanquinone LQB-118 exhibits cytotoxicity in prostate cancer cell and tumor models through cellular redox stress, *Prostate*, **78**, 140-151, doi: 10.1002/pros.23455.
 87. Yang, Z., Chen, J.-S., Wèn, J.-K., Gao, H.-T., Zheng, B., et al. (2017) Silencing of miR-193a-5p increases the chemosensitivity of prostate cancer cells to docetaxel, *J. Exp. Clin. Cancer Res.*, **36**, 178, doi: 10.1186/s13046-017-0649-3.
 88. Jajoo, S., Mukherjee, D., Kaur, T., Sheehan, K. E., Sheth, S., et al. (2013) Essential role of NADPH oxidase-dependent reactive oxygen species generation in regulating microRNA-21 expression and function in prostate cancer, *Antioxid. Redox Signal.*, **19**, 1863-1876, doi: 10.1089/ars.2012.4820.
 89. Wu, Q.-Q., Zheng, B., Weng, G.-B., Yang, H.-M., Ren, Y., et al. (2019) Downregulated NOX4 underlies a novel inhibitory role of microRNA-137 in prostate cancer, *J. Cell Biochem.*, **120**, 10215-10227, doi: 10.1002/jcb.28306.
 90. Kim, H.-K., Lee, H.-Y., Riaz, T. A., Bhattarai, K. R., Chaudhary, M., et al. (2021) Chalcone suppresses tumor growth through NOX4-IRE1 α sulfonation-RIDD-miR-23b axis, *Redox Biol.*, **40**, 101853, doi: 10.1016/j.redox.2021.101853.
 91. Hao, Y., Gu, X., Zhao, Y., Greene, S., Sha, W., et al. (2011) Enforced expression of miR-101 inhibits prostate cancer cell growth by modulating the COX-2 pathway *in vivo*, *Cancer Prev. Res. (Phila)*, **4**, 1073-1083, doi: 10.1158/1940-6207.CAPR-10-0333.
 92. Madrigal-Martínez, A., Constâncio, V., Lucio-Cazaña, F. J., and Fernández-Martínez, A. B. (2019) Prostaglandin₂ stimulates cancer-related phenotypes in prostate cancer PC3 cells through cyclooxygenase-2, *J. Cell Physiol.*, **234**, 7548-7559, doi: 10.1002/jcp.27515.
 93. Jossan, S., Sung, S.-Y., Lao, K., Chung, L. W. K., and Johnstone, P. A. S. (2008) Radiation modulation of microRNA in prostate cancer cell lines, *Prostate*, **68**, 1599-1606, doi: 10.1002/pros.20827.
 94. Gandellini, P., Giannoni, E., Casamicheli, A., Taddei, M. L., Callari, M., et al. (2014) miR-205 hinders the malignant interplay between prostate cancer cells and associated fibroblasts, *Antioxid. Redox Signal.*, **20**, 1045-1059, doi: 10.1089/ars.2013.5292.
 95. Zang, Y., Zhu, J., Li, Q., Tu, J., Li, X., et al. (2020) miR-137-3p modulates the progression of prostate cancer by regulating the JNK3/EZH2 axis, *Oncol. Targets Ther.*, **13**, 7921-7932, doi: 10.2147/OTT.S256161.
 96. Meitzler, J. L., Antony, S., Wu, Y., Juhasz, A., Liu, H., et al. (2014) NADPH oxidases: a perspective on reactive oxygen species production in tumor biology, *Antioxid. Redox Signal.*, **20**, 2873-2889, doi: 10.1089/ars.2013.5603.
 97. Kumar, S., Singh, R. K., and Meena, R. (2016) Emerging targets for radioprotection and radiosensitization in radiotherapy, *Tumour Biol.*, **37**, 11589-11609, doi: 10.1007/s13277-016-5117-8.
 98. Sarveswaran, S., Varma, N. R. S., Morisetty, S., and Ghosh, J. (2019) Inhibition of 5-lipoxygenase downregulates stemness and kills prostate cancer stem cells by triggering apoptosis via activation of c-Jun N-terminal kinase, *Oncotarget*, **10**, 424-436, doi: 10.18632/oncotarget.13422.
 99. Wartenberg, M., Hoffmann, E., Schwandt, H., Grünheck, F., Petros, J., et al. (2005) Reactive oxygen species-linked regulation of the multidrug resistance transporter P-glycoprotein in Nox-1 overexpressing prostate tumor spheroids, *FEBS Lett.*, **579**, 4541-4549, doi: 10.1016/j.febslet.2005.06.078.
 100. Jones, K. J., Chetram, M. A., Bethea, D. A., Bryant, L. K., Odero-Marrah, V., et al. (2013) Cysteine (C)-X-C Receptor 4 regulates NADPH Oxidase-2 during oxidative stress in prostate cancer cells, *Cancer Microenvironment*, **6**, 277-288, doi: 10.1007/s12307-013-0136-0.

**OXIDATIVE STRESS AND REDOX-DEPENDENT
SIGNALING IN PROSTATE CANCER****Review****E. V. Kalinina^{1*}, L. A. Gavriliuk¹, and V. S. Pokrovsky²**¹ Peoples's Friendship University of Russia (RUDN University), 117198 Moscow, Russia; e-mail: kalinina-ev@rudn.ru² Federal State Budgetary Institution «National Medical Research Center of Oncology named after N.N. Blokhin» of the Ministry of Health of Russia, 115478 Moscow, Russia

The rise and progression of a tumor is complicated by the dual role of ROS. A low ROS level is necessary for many intracellular metabolic processes and cell proliferation, while a significant increase in the ROS level causes disruption of the mechanisms of their Cancerinactivation, leading to the damage and cell death. A long-term imbalance in the ROS/antioxidant ratio and a significant increase of the ROS level due to the decrease in the effectiveness of the antioxidant defense system leads to chronic oxidative stress, which causes the damage of proteins, lipids, DNA and the development of cancer growth. Numerous data demonstrate the development of oxidative stress in prostate cancer, which is the most common cancer among men. However, the reasons for its occurrence, changes in redox signaling and cellular redox homeostasis are still poorly understood. The review examines the state of prooxidant and antioxidant enzyme systems, the imbalance of activity of which leads to the development of oxidative stress in prostate cancer, evaluates the change in the key links of the redox signaling and the role of the contribution of microRNAs in modulating the redox status of cancer cells.

Keywords: prostate cancer, oxidative stress, antioxidant and prooxidant enzymes, transcription factors Nrf2, NF-κB, redox-dependent signaling, microRNA

УДК 543.94

СОВРЕМЕННЫЕ МЕТОДЫ ОПРЕДЕЛЕНИЯ микроРНК

Обзор

© 2022 О.Л. Бодулев, И.Ю. Сахаров*

Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, химический факультет,
119991 Москва, Россия; электронная почта: sakharovivan@gmail.com

Поступила в редакцию 21.01.2022

После доработки 21.03.2022

Принята к публикации 21.03.2022

В настоящем обзоре рассмотрены современные методы количественного и полуколичественного определения микроРНК – малых некодирующих РНК, влияющих на такие биологические процессы, как развитие, дифференциация, метаболизм и формирование иммунологического ответа и рассматриваемых в качестве перспективных биомаркёров в диагностике ряда заболеваний.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: биоанализ, микроРНК, нуклеиновые кислоты, амплификация, полимеразы.

DOI: 10.31857/S0320972522040029, **EDN:** AQFBVE

ВВЕДЕНИЕ

В последнее время неуклонно возрастает необходимость в методах анализа нуклеиновых кислот [1]. Среди аналитов этой группы все более пристальное внимание обращают на себя микроРНК (миРНК), концентрация которых в биологических материалах человека при широком спектре заболеваний отличается от концен-

трации тех же миРНК у здоровых людей [2]. Известно, что концентрация миРНК в биологических образцах крайне низка, а число миРНК, чьи последовательности имеют между собою высокую гомологию, велико. Все это приводит к необходимости разработки высокочувствительных и высокоселективных методов определения миРНК [3].

В настоящем обзоре будут рассмотрены методы количественного и полуколичественного определения миРНК, среди которых будут описаны как традиционные методы, такие как нозерн-блоттинг, полимеразная цепная реакция с обратной транскрипцией и микрочипы, так и новые, разрабатываемые в последние годы методы определения с улучшенными аналитическими параметрами.

ХИМИЧЕСКАЯ СТРУКТУРА И БИОХИМИЧЕСКИЕ ФУНКЦИИ микроРНК

МиРНК представляют собой класс малых некодирующих РНК, обнаруженных в широком спектре растений, вирусов и млекопитающих [1]. Гены миРНК обычно располагаются в кластерах, которые транскрибируются как полицистроны. Кроме того, они могут быть локализованы между другими генами (межгенные) или в интронах, кодирующих мРНК (миРтронны). Первичные транскрипты миРНК, известные как при-миРНК (в основном длиной 100–1000 н.), транскрибируются РНК-полимеразами II и III в ядре клетки. Впоследствии при-

Принятые сокращения: МИА – методы изотермической амплификации нуклеиновых кислот; миРНК – микроРНК; СЕАМ – циклический ферментативный метод амплификации (Cycle Enzymatic Amplification Method); СНА – метод каталитической сборки шпильки (Catalytic Hairpin Assembly); сгРНК – «направляющая» РНК; Crispr/Cas – метод коротких палиндромных повторов, регулярно расположенных группами, с ассоциированным белком (Clustered Regularly Interspaced Palindromic Repeats/CRISPR associated protein); ЕХРАР – экспоненциальная реакция амплификации нуклеиновых кислот (Exponential amplification reaction); НСR – реакция цепной гибридизации (Hybridization Chain Reaction); НRCA – разветвлённый метод катящегося кольца (Hyperbranched Rolling Circle Amplification); ICSDP – амплификационный метод с полимеризацией и замещением (Isothermal Circular-Strand-Displacement Polymerization); LAMP – петлевая изотермическая амплификация (Loop-mediated isothermal Amplification); NB – нозерн-блоттинг (Northern Blotting); PCR – полимеразная цепная реакция (Polymerase Chain Reaction); RCA – метод катящегося кольца (Rolling Circle Amplification); RT-PCR – полимеразная цепная реакция с обратной транскрипцией (Reverse Transcriptase PCR); RT-qPCR – количественная полимеразная цепная реакция с обратной транскрипцией (quantitative RT-PCR); SEXPAR – симметричная экспоненциальная реакция амплификации нуклеиновых кислот (Symmetrical Exponential Amplification Reaction).

* Адресат для корреспонденции.

миРНК расщепляются РНКазой III Drosha с образованием предшественников миРНК (70–100 н.) шпилечной структуры (пре-миРНК) [4]. В настоящее время описано более 38 000 пре-миРНК из 271 организма [5]. Экспортин-5 обеспечивает транспорт пре-миРНК из ядра в цитоплазму, где под действием фермента Dicer из пре-миРНК формируются короткие зрелые миРНК. Длина зрелых миРНК составляет примерно 18–24 н. В настоящее время около 49 000 последовательностей миРНК представлены в реестре миРНК (miRBase), в том числе 2600 миРНК человека [6].

Из одной молекулы пре-миРНК могут быть получены несколько различных миРНК, при этом часть миРНК генерируются из 3'-последовательностей пре-миРНК, другие – из 5'-последовательностей [7]. Исследования секвенирования показали, что в биологических образцах зрелые миРНК представляют собой не молекулу со строго определённой последовательностью нуклеотидов, а набор гомологичных молекул различной длины. Причинами этого являются гетерогенность процессинга предшественника нуклеазами, а также посттранскрипционные модификации 3'- или 5'-концов полноразмерных миРНК. Показано, что такая модификация может оказывать влияние на стабильность и активность миРНК [8].

Уровень экспрессии зрелых миРНК представляет наибольший интерес для исследователей, изучающих их биологические функции. Первая публикация с описанием миРНК появилась в 1993 г. [9], однако по прошествии уже более 25 лет интерес к изучению роли миРНК в регуляции генов и функционировании клеточных процессов не только не угасает, а лишь постоянно возрастает. Зрелые миРНК могут регулировать экспрессию генов после их включения в активный РНК-индуцированный комплекс сайленсинга, где они взаимодействуют со специфическими сайтами матричной РНК, вызывая репрессию трансляции, а иногда и деградацию целевой мРНК [10].

Как было оценено, среднее количество копий отдельных видов миРНК на клетку равно 500, и их экспрессия может превышать среднюю экспрессию мРНК. Однако содержание различных миРНК в клетках сильно различается, и такое различие в концентрации может составлять более четырёх порядков. Так, миРНК-1 присутствует в скелетных мышцах в количестве, превышающем 80 000 копий на клетку, тогда как в одной клетке мозга находится лишь 1 копия миРНК-381 [11].

Исследования, проведённые на лабораторных организмах, показали, что миРНК участву-

ют в регуляции таких важных биологических процессов, как развитие, дифференциация, метаболизм и формирование иммунологического ответа [12–13]. Проведённые исследования позволили установить взаимосвязь между изменениями в уровне экспрессии миРНК и развитием онкологических заболеваний человека [14]. При этом было найдено, что уровень экспрессии некоторых миРНК в образцах злокачественных тканей был повышен, в то время как для других миРНК зарегистрировано подавление их экспрессии. Результирующий эффект зависел от типа и стадии заболевания. Изменение концентрации миРНК отмечено и в процессе лечения заболеваний. Показано, что уровни экспрессии миРНК влияют на скорость роста опухоли и помогают выбрать эффективную стратегию терапевтического лечения пациентов [15].

Кроме онкологических заболеваний высокая роль экспрессии миРНК была также отмечена при аутоиммунных [16], неврологических [17] и сердечно-сосудистых заболеваниях [18]. По этой причине в последние годы значительные усилия исследователей были направлены на разработку новых высокочувствительных и специфичных методов анализа экспрессии миРНК.

МЕТОДЫ ДЕТЕКЦИИ микроРНК

Нозерн-блоттинг (Northern blotting, NB) является хорошо стандартизированным методом детекции миРНК. В этом методе анализируемый образец миРНК подвергается электрофоретическому разделению с последующим его переносом на нитроцеллюлозную мембрану. Детекция миРНК осуществляется после её реакции с комплементарными радио-/флуоресцентно-мечеными зондами [19]. NB, с помощью которого идентифицировались самые первые миРНК, применяется для профилирования экспрессии миРНК [9, 20]. К сожалению, данный метод имеет низкую чувствительность и времязатратен.

Этот факт стимулировал исследования по усовершенствованию NB [21–23]. Для этого было предложено использовать олигонуклеотидные зонды с применением запертых нуклеиновых кислот (LNA) [22], а также заменить УФ-фиксацию зондов на нитроцеллюлозной мембране на их химическую иммобилизацию с помощью 1-этил-3-(3'-диметиламинопропил)-карбодиимида [23]. Более того, использовалась хемилюминесцентная детекция продуктов гибридизации с применением щелочной фосфатазы вместо детекции радиоизотопа P^{32} [24].

Kim et al. [25] объединили в одной методике все вышеобозначенные подходы, что позволило им с помощью NB проводить определение миРНК с пределом обнаружения 1 пМ, т.е. понизить предел обнаружения на 3 порядка. Кроме того, эти изменения позволили сократить время анализа NB.

Несмотря на сделанные улучшения, в сравнении с другими методами NB остаётся методом с низкой чувствительностью (в нано/пиколярном диапазоне) [26]. Кроме того, к недостаткам NB также следует отнести сложность его исполнения, низкую производительность и требование значительного количества исходного образца (5–50 мкг РНК) [25].

Микрочипы. Технология микрочипов основывается на регистрации взаимодействия анализируемых миРНК со специфичными зондами, зонально иммобилизованными на чипе. С использованием такой технологии, позволяющей в одном образце одновременно проводить детекцию большого числа различных аналитов, были определены миРНК в биологических жидкостях (цельной крови, плазме, сыворотке, моче и слезах), гомогенатах ткани и экзосомах, а также проведена оценка изменения уровня их экспрессии на разных стадиях развития онкологических заболеваний различного типа [27–29]. Следует отметить, что метод является полуколичественным и применим лишь для регистрации изменений в уровне экспрессии миРНК. Методы на основе микрочипов характеризуются узкими рабочими диапазонами по сравнению с другими методами, в связи с чем существенные отклонения в уровне экспрессии при исследовании данным методом могут оставаться незарегистрированными [30]. Кроме того, в классических вариантах метод характеризуется низкой чувствительностью и специфичностью.

При использовании микрочипов осуществляется ферментативное удлинение последовательности выделенных миРНК, за счёт чего они приобретают способность прочно взаимодействовать с комплементарным ДНК линкером, иммобилизованным на чипе [2]. Методы такого типа характеризуются пределом обнаружения в нано/пиколярном диапазоне, и для проведения такого анализа требуется от десятков до сотен нг РНК. Дополнительное затруднение связано с различной специфичностью полиаденилаз к различным анализируемым миРНК, что понижает точность такого мультиплексного анализа [30].

Альтернативный вариант конструирования микрочипов основан на постгибризационном введении аналитической метки в образуемый дуплекс аналита и зонда. В этом случае T4-лига-

за формирует новую ковалентную связь между сближенными друг с другом концами иммобилизованного на чипе зонда и детектирующего зонда с флуоресцентной меткой. Сближение указанных последовательностей происходит при формировании специфического сэндвич-комплекса с участием миРНК. Такой метод показал высокую чувствительность с пределом обнаружения миРНК-143, равным 30 фМ [31].

Для повышения селективности метода в отношении пре- и при-миРНК используются иммобилизованные зонды шпильчатой структуры [32]. Следует отметить, что селективность относительно прекурсов миРНК может быть значимой лишь при прямом проведении определения миРНК в образцах. Выделение же на предварительном этапе анализа фракции коротких РНК из исследуемых образцов позволяет избежать влияния пре- и при-миРНК на получаемые результаты.

Чувствительность микрочипов для детекции миРНК повышается при использовании в качестве захватывающих зондов LNA-олигонуклеотидов [33]. Чувствительность анализа также может быть повышена добавлением в схему анализа стадии амплификации, например полимеразной цепной реакции [30].

Модификация конструкции микрочипов дополнительно повышает стоимость и без того дорогостоящего метода анализа. Хотя такой подход приводит к улучшению чувствительности и специфичности анализа, все же проблема узких рабочих диапазонов микрочипов остаётся пока неразрешённой. Несмотря на указанные недостатки, микрочипы остаются очень востребованными при проведении профилирования миРНК, так как позволяют проводить одновременно скрининг большого числа разных миРНК [34].

Кроме указанных выше гибридных методов, в литературе описаны также и другие безамплификационные методы анализа миРНК [35–40]. В первую очередь здесь следует упомянуть многочисленные разработки электрохимических биосенсоров. В таких сенсорах детекция комплексов анализируемой миРНК с комплементарным ей зондом может проводиться как с использованием зондов с ковалентно связанными электроактивными метками, так и зондов, меченных ферментами или интеркалирующими метками. Большинство электрохимических биосенсоров без проведения амплификации сигнала демонстрируют пределы обнаружения миРНК в нано/пиколярном диапазоне и выше [35–37].

Описаны также оптические безамплификационные биосенсоры. Среди них благодаря

простоте и скорости проведения вызывают интерес гомогенные методы с применением пероксидаза-подобных ДНКзимов [38]. Наибольшая чувствительность безамплификационных биосенсоров обнаружена при использовании детектирующей системы на основе поверхностного плазмонного резонанса. Пределы обнаружения таких биосенсоров достигают пикомолярных значений [39]. Более того, в некоторых случаях удалось развить методы анализа с пределами обнаружения в фемто- и субфемтомолярных диапазонах [40]. К недостаткам такого метода следует отнести его высокую стоимость, а также сложность приготовления сенсорной подложки.

Как указано выше, концентрация микроРНК в биологических объектах достаточно низкая, поэтому невысокая чувствительность безамплификационных методов затрудняет их применение для определения микроРНК в реальных образцах. В тех же случаях, когда удаётся получить высокую чувствительность, протоколы таких методов становятся чрезвычайно сложными, что, в свою очередь, приводит к резкому повышению стоимости анализа. В связи с этим в большинстве случаев гибридные методы определения микроРНК дополняются методами амплификации нуклеиновых кислот.

АМПЛИФИКАЦИОННЫЕ МЕТОДЫ АНАЛИЗА микроРНК

Полимеразная цепная реакция. На настоящий момент наиболее популярным методом амплификации нуклеиновых кислот является полимеразная цепная реакция (Polymerase Chain Reaction, PCR), которая в случае микроРНК дополняется реакцией обратной транскрипции (Reverse Transcriptase PCR, RT-PCR) [1]. Для количественного определения микроРНК нашёл широкое применение PCR в реальном времени (quantitative PCR, qPCR). Малый размер молекул микроРНК существенно усложняет их определение методом RT-qPCR, так как требуются праймеры меньшего, чем микроРНК, размера. Это существенно уменьшает температуру плавления образующихся дуплексов и оказывает серьёзное влияние на эффективность и специфичность метода. Для решения этой задачи применяется стратегия превращения микроРНК в более длинную одноцепочечную ДНК, которая далее используется для проведения qPCR. Для этого последовательность анализируемой микроРНК комплементарно взаимодействует с удлинённым с 5'-конца праймером, после чего осуществляется элонгация последнего. В дальнейшем

полученный продукт подвергается qPCR (рис. 1), при этом используемый праймер может иметь как линейную (рис. 1, а), так и шпильчатую структуру (рис. 1, б), в которой свободный «хвост» комплементарен анализируемой микроРНК. Ранее в группе Guegler проводилось сравнительное исследование qPCR с использованием указанных типов праймеров [41]. Полученные результаты показали, что при применении праймера шпильчатой структуры эффективность амплификации более чем в 100 раз выше (в сравнении с линейным аналогом). Следует также отметить, что использование шпильчатого праймера повысило способность метода различать зрелые микроРНК от их прекурсоров. Повышение эффективности амплификации при использовании шпильчатого праймера может быть связано с увеличением термостабильности его комплекса с микроРНК благодаря стэкинг-взаимодействиям нуклеотидов в стебле шпильки, тогда как специфичность метода, по видимому, увеличивается за счёт нахождения большей части некомплементарного микроРНК фрагмента праймера не в свободном, а в связанном состоянии. Метод с применением такого праймера получил название «стебель-петлевая полимеразная цепная реакция в реальном времени с обратной транскрипцией» (stem-loop RT-qPCR) и успешно применяется для оценки уровней экспрессии опухолевых микроРНК в образцах биоптатов [42], экзосом [43], сыворотки крови [44] и мочи [45].

Для повышения специфичности определения микроРНК был разработан метод, названный двуххвостовой PCR (2-tailed RT-qPCR) [46]. В данном подходе используется праймер шпильчатой структуры, хвосты которого комплементарны двум концевым последовательностям анализируемой микроРНК (рис. 1, в). Благодаря образованию такого комплекса становится возможным различать изомеры (термин введён для микроРНК, чьи последовательности различаются между собой только на один нуклеотид в крайних положениях молекулы). Данный метод способен детектировать микроРНК с концентрацией до 2 аМ и рабочим диапазоном в 7 порядков. С его применением был исследован уровень экспрессии трёх микроРНК (микроРНК let-7а, микроРНК-21 и микроРНК-193а) в ткани мозжечка мыши. Полученные результаты совпали с результатами анализа, проведённого с применением коммерческого набора TaqMan.

Известно, что методы, использующие в своих схемах обратную транскриптазу, активность которой довольно чувствительна к компонентам реакционной среды, часто имеют пониженную точность [47]. Этот негативный факт привёл к

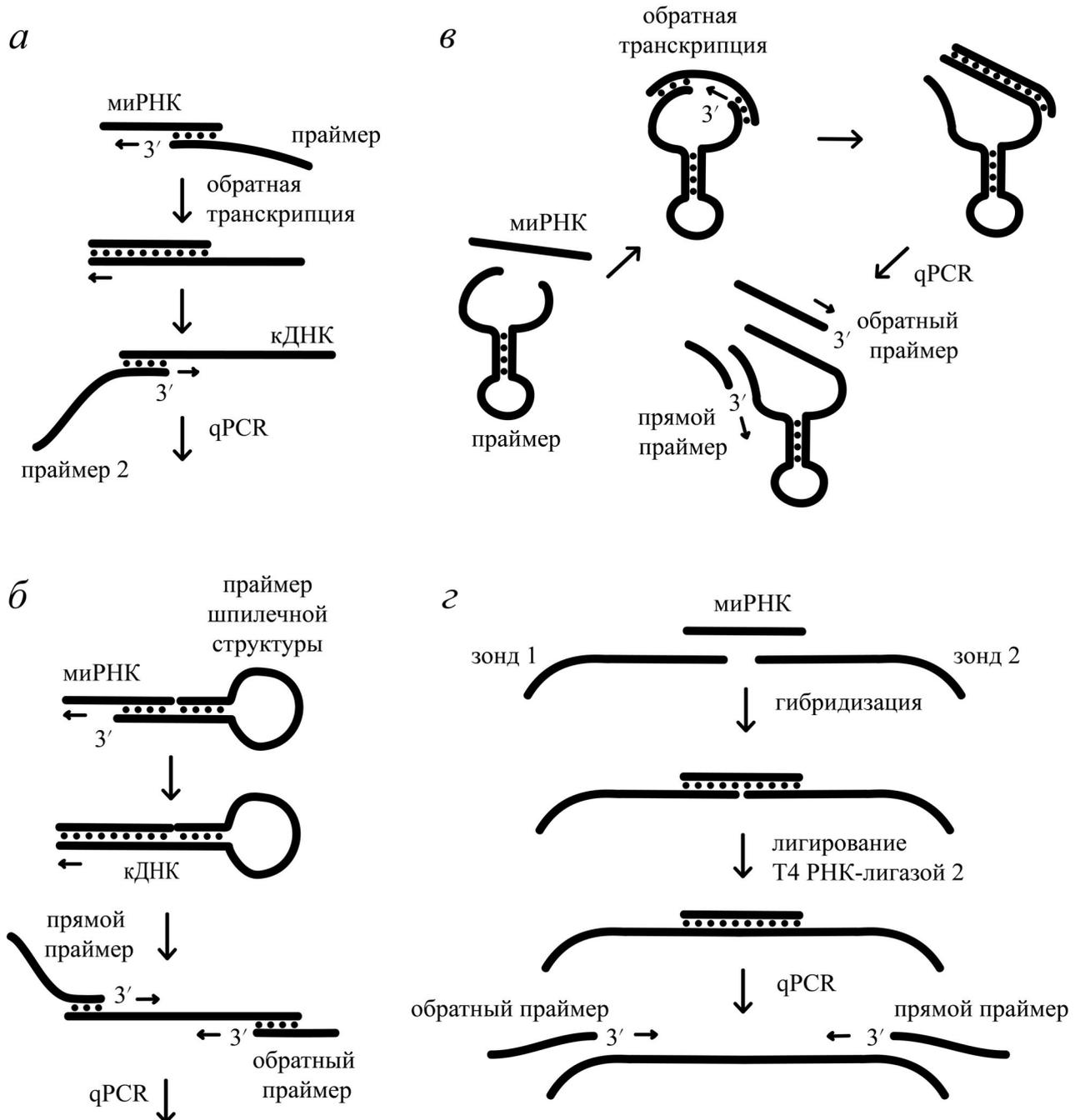


Рис. 1. Схемы модификаций полимеразной цепной реакции в реальном времени (qPCR) для определения миРНК: *а* – полимеразная цепная реакция в реальном времени с обратной транскрипцией и использованием линейного праймера (RT-qPCR); *б* – стебель-петлевая полимеразная цепная реакция в реальном времени с обратной транскрипцией (stem-loop RT-qPCR); *в* – двуххвостовая полимеразная цепная реакция в реальном времени с обратной транскрипцией (2-tailed RT-qPCR); *з* – лигирующая полимеразная цепная реакция в реальном времени (ligation qPCR)

конструированию метода анализа, получившего в литературе название «лигирующая PCR в реальном времени» (ligation qPCR), в котором отсутствует этап обратной транскрипции миРНК. В данном методе концевые последовательности двух зондов в присутствии анализируемой

миРНК лигируются T4 РНК-лигазой 2, и полученная в результате этого ДНК амплифицируется в qPCR (рис. 1, з). Основываясь на данной схеме анализа, был разработан флуоресцентный метод определения миРНК let-7a [48]. Предел обнаружения и линейный диапазон составили

0,2 фМ и 0,2 фМ–2 нМ соответственно. Кросс-реактивность метода в отношении миРНК let-7c и миРНК let-7a-3 составила 22 и 0,17% соответственно. Когда же в этом методе для измерения флуоресценции использовалась технология цифровой детекции сигнала, предел обнаружения миРНК let-7a и его линейный диапазон составили 20 аМ и 20 аМ–200 фМ, т.е. все величины сместились в область более низких концентраций [49]. Более того, одновременно повысилась и точность определения аналита. Следует отметить, что PCR с цифровой детекцией сигнала становится все более популярной в исследованиях миРНК [50, 51].

Секвенирование следующего поколения (next-generation sequencing, NGS). В настоящее время данный метод активно применяется в анализе миРНК. На первом этапе NGS к анализируемым молекулам миРНК присоединяют с обоих концов дополнительные олигонуклеотидные последовательности, после чего проводится RT-PCR. Продукты амплификации секвенируются, что позволяет определить как последовательность миРНК, так и их концентрацию в образце. В отличие от других методов, NGS может использоваться для определения как известных, так и неизвестных миРНК, в связи с чем в настоящее время этот метод широко используется для создания библиотек миРНК, присутствующих в разных организмах [52]. Вместе с тем проведение метода и обработка полученных данных требует значительного времени, дорогостоящего оборудования, а также высококвалифицированных специалистов [53]. По этой причине метод не целесообразно использовать для количественного определения известных миРНК.

Среди методов определения миРНК RT-qPCR считается «золотым стандартом», в связи с чем он часто используется для подтверждения данных, полученных другими методами [54]. Однако при этом важно учитывать, что на регистрацию аналитического сигнала в RT-qPCR может оказывать влияние неспецифичная гибридизация праймеров, образование неспецифических продуктов, как результат катализа полимеразы, и ингибирование Taq-полимеразы компонентами анализируемой пробы, что в конечном счёте может привести к ложноположительным и ложноотрицательным сигналам [55–57]. Помимо вышеобозначенного, за счёт необходимости проведения циклического изменения температуры, данный метод анализа требует дорогостоящего оборудования. В связи с этим в последние годы активно развиваются методы детекции миРНК с применением методов изотермической амплификации нуклеиновых кислот (МИА).

МЕТОДЫ ИЗОТЕРМИЧЕСКОЙ АМПЛИФИКАЦИИ, ПРИВОДЯЩИЕ К ПОВЫШЕНИЮ АНАЛИТИЧЕСКОГО СИГНАЛА ЗА СЧЁТ ПОВЫШЕНИЯ КОНЦЕНТРАЦИИ АНАЛИТА

Все известные МИА можно разделить на: (а) методы амплификации, приводящие к повышению аналитического сигнала за счёт повышения концентрации аналита, и (б) методы амплификации, приводящие к повышению аналитического сигнала за счёт многократного реагирования одних и тех же молекул аналита [1].

Метод амплификации катящегося кольца (Rolling-Circle-Amplification, RCA) является одним из наиболее часто применяемых в анализе миРНК МИА первой группы. Этот метод основывается на использовании «замочного» зонда, линейного ДНК-олигонуклеотида, концы которого смыкаются при комплементарном взаимодействии с анализируемой миРНК (рис. 2, а). Формирование такого комплекса позволяет ферментативно лигировать концы зонда. Впоследствии с использованием кольцевого зонда осуществляется элонгация миРНК ДНК-полимеразой, обладающей способностью к замещению цепи. Обычно в RCA используются phi 29 или Bst-полимеразы. В результате проведения амплификации осуществляется синтез одноцепочечной ДНК-последовательности с образованием множества копий компонента зонда в виде конкатемеров. Обычно RCA проводится при температуре 30–37 °С [58–61].

В работе Kumara et al. [61] описан метод определения миРНК-24 с использованием RCA. В этом методе на стадии элонгации к последовательности миРНК добавлялся, кроме традиционной смеси dNTP, меченный нафталинидом dUNTP, что приводило к синтезу флуоресцирующего продукта. Предел обнаружения такого флуоресцентного метода составил 3,6 фМ миРНК.

Известны также другие варианты RCA. Так, кроме кольцевого зонда, описано применение и гантелеобразного зонда шпильчатой структуры [62]. В последнем случае за счёт наличия шпильки в структуре зонда увеличивается специфичность амплификации и соответственно определения миРНК. В другом варианте RCA Li et al. [63] предложили «замочные» зонды с однонуклеотидными заменами в комплементарном аналиту фрагменте. В этом случае повышалась специфичность определения миРНК-let-7a по отношению к близкородственным миРНК.

В отличие от указанных выше, в некоторых работах высокомолекулярный продукт амплификации RCA подвергали ферментативной

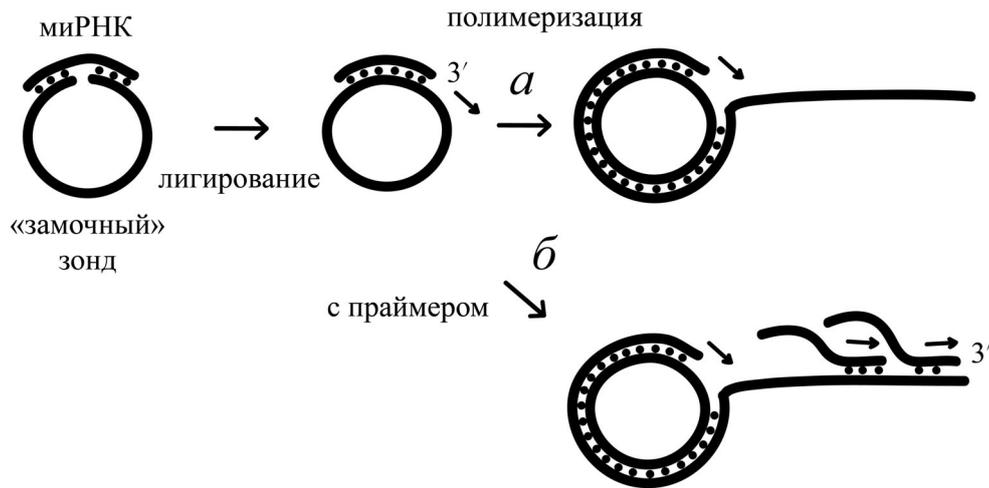


Рис. 2. Схемы методов амплификации катящегося кольца (RCA, а) и гиперразветвлённой амплификации катящегося кольца (HRCA, б) при определении миРНК

рестрикции. На данном принципе Liu et al. [64] сконструировали метод RCA с экспоненциальной амплификацией, где фрагмент зонда, комплементарный анализируемой миРНК, обособлен сайтами рестрикции. Это приводило к тому, что синтезированный конкатемер после его комплементарного комплексообразования с исходным «замочным» зондом подвергался специфическому расщеплению рестриктазой, образуя большое число молекул ДНК-олигонуклеотида, последовательность которого аналогична последовательности анализируемой миРНК. Вследствие этого такие молекулы синтезированного олигонуклеотида инициировали RCA, так как, по сути, они являются дополнительными праймерами. В данном исследовании рабочий диапазон при определении миРНК флуоресцентным методом составил 30 аМ–30 фМ. Метод был применён для количественной оценки содержания миРНК let-7a в клетках A549 (карцинома лёгких человека).

Высокочувствительные методы определения миРНК также могут быть сконструированы сочетанием RCA с микрофлюидным электрофорезом. Chen et al. [65] сконструировали микрофлюидный чип для определения миРНК-21, чувствительность которого позволила количественно оценить содержание этой миРНК, используя как образец всего лишь 20 клеток. С помощью данного метода найдено, что концентрация миРНК-21 в клетках линий HepG2 и HL-7702 равна 49,8 и 11,4 пМ соответственно.

Более распространённая модификация RCA, позволяющая осуществлять экспоненциальную амплификацию, основывается на использовании дополнительных праймеров, комплементарных высокомолекулярному продукту RCA.

Данная модификация получила название «гиперразветвлённая RCA» (Hyperbranched RCA, HRCA) (рис. 2, б). При определении миРНК-21 с помощью HRCA был достигнут предел обнаружения, равный 10 аМ. Рабочий диапазон данного метода не был широк (до 100 фМ), однако при этом величина сигнала в пределах рабочего диапазона повышалась более чем в 90 раз [66]. Последний факт указывает на высокое значение коэффициента чувствительности, определяемого как значение первой производной градуировочной функции при определённой концентрации аналита, что позволило оценить концентрацию аналита с высокой точностью [67]. Разработанный метод применялся для анализа уровня экспрессии миРНК-21 в ткани печени пациентов с гепатоцеллюлярной карциномой. Таким образом, методы, основанные на экспоненциальных модификациях RCA, обладают экстремально высокой чувствительностью.

Выше отмечалось, что рабочий диапазон метода с применением HRCA недостаточно широк по сравнению с большинством описанных методов для миРНК. Однако этот факт ни в коем случае не следует относить к недостаткам метода. Методы анализа миРНК с широким рабочим диапазоном предпочтительно использовать при оценке их экспрессии в неописанных образцах или при количественном определении определённых миРНК, концентрация которых в норме и патологии сильно отличается. Однако если различие в концентрации миРНК в образцах здоровых людей и пациентов не велико [68–69], то предпочтительно использование методов с более узким рабочим диапазоном, но максимально возможным коэффициентом чувствительности. Таким образом, методы анализа

миРНК как с широким, так и с узким рабочими диапазонами представляют интерес для диагностической медицины.

В научной литературе отмечены и недостатки RCA, связанные с протеканием фоновой амплификации (в отсутствие аналита), что в конечном счёте ухудшает аналитические параметры метода определения миРНК. Аналогичный вопрос в равной степени относится и к другим методам амплификации. В случае методов амплификации с применением полимераз (в частности, RCA) данный процесс связывают с межмолекулярными взаимодействиями молекул зонда и их дальнейшей элонгацией, взаимодействием их с дополнительно используемыми праймерами, присутствием в анализируемых образцах дополнительных нуклеиновых кислот, а также побочными активностями используемых полимераз [70]. Для элиминирования влияния фоновых реакций на определение миРНК следует применять методы детекции, специфичные к продуктам основной (аналит-зависимой) реакции.

Экспоненциальная реакция амплификации (EXponential Amplification Reaction, EXPAR) является ещё одним широко используемым при определении миРНК методом из группы МИА, приводящим к повышению аналитического сигнала за счёт повышения концентрации аналита. В EXPAR применяется зонд, представляющий из себя две полностью комплементарные аналиту ДНК-последовательности, связанные друг с другом одной из цепей сайта рестрикции никазы (рис. 3, а). При взаимодействии аналита с 3'- и 5'- концами зонда образуются дуплексы. Тот дуплекс, в котором аналит гибризован с 3'- концом зонда, удлиняется ДНК-полимеразой с отсутствием (3'→5')-экзонуклеазной активности (полимеразы phi 29, фрагмент Кленова, полимеразы Vent и Bst). В результате этого наблюдается формирование сайта рестрикции никазы и ферментативный гидролиз комплементарной зонду последовательности, после чего образуемая последовательность аналита элонгируется вновь [71].

В пионерской работе по применению метода EXPAR при анализе миРНК с использованием флуоресцентной детекции предел обнаружения миРНК let-7a составил 0,1 фМ. Его рабочий диапазон покрывал 10 порядков концентрации аналита. В то же время следует отметить, что аналитический сигнал при этом изменялся лишь в 6 раз, что указывает на низкое значение коэффициента чувствительности метода. Для наиболее структурно близких аналиту миРНК let-7e и миРНК let-7f кросс-реактивность составила 17,6 и 0,6% соответственно [72].

Для повышения специфичности EXPAR были применены «арочные» зонды. Как видно на рис. 3, б, в этом методе используется комплекс основного зонда и дополнительного зонда-блокатора, при этом концы последовательности блокатора комплементарны концам основного зонда. Так как фрагмент основного зонда, вступающий в реакцию с аналитом, частично находится в дуплексе, метод характеризуется повышенной специфичностью. Данная стратегия была успешно применена Wu et al. [73] для определения миРНК-141. Кросс-реактивность миРНК-200a, наиболее структурно близкой к анализируемой миРНК-141, составила всего 3%. При флуоресцентной детекции образуемых на подложке продуктов амплификации нанокластеров серебра был получен предел обнаружения 1 фМ при довольно узком рабочем диапазоне (до 500 фМ).

Серьёзной проблемой, ограничивающей чувствительность методов с применением EXPAR, является интенсивная неспецифическая реакция, протекающая при отсутствии аналита. В случае EXPAR данная проблема усугубляется использованием зондов (превышающих как минимум в 2 раза последовательность аналита по длине) в высокой концентрации. Для уменьшения димеризации зондов и снижения эффекта побочных активностей используемых полимераз рекомендуется проводить EXPAR при повышенной температуре (55 °С) с использованием термофильных ферментов [74]. Следует заметить, что данный подход полностью указанную проблему не решает.

Интересная модификация метода, позволяющая элиминировать развитие фоновой реакции вследствие образования димеров зондов и их дальнейшей элонгации и названная «симметричная EXPAR» (Symmetric EXPAR, SEXPAR), была предложена Chen et al. [75]. Зонд в данном методе представляет из себя гантелеобразную замкнутую последовательность, содержащую два комплементарных аналиту домена. При этом часть каждого из доменов находится в стебле шпильки, а домены связаны между собой сайтом рестрикции никазы (рис. 3, в). При связывании миРНК с зондом в присутствии полимеразы осуществляется его элонгация, при этом, как только происходит формирование сайта рестрикции, элонгируемая последовательность подвергается ферментативному гидролизу и впоследствии вытесняется. Именно благодаря замкнутой геометрии зонда предотвращается протекание фоновой реакции, вызванной взаимодействием зондов. Шпильчатая структура доменов зонда, связывающих аналит, призвана повысить специфичность формирования комп-

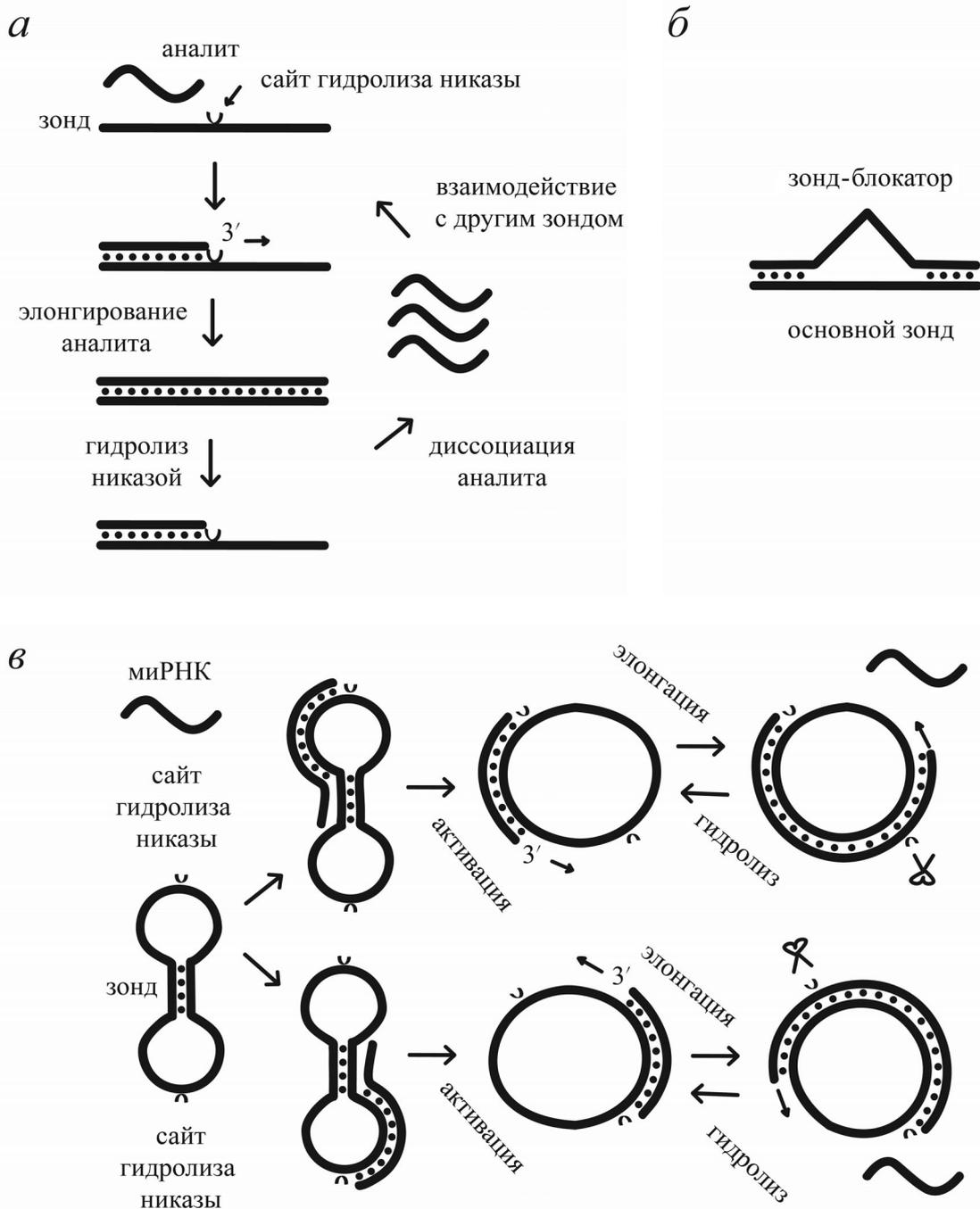


Рис. 3. Схемы метода экспоненциальной реакции амплификации (EXPAR, *a*), EXPAR с «арочным» зондом (*б*) и метода симметричной экспоненциальной реакции амплификации (SEXPAR, *в*), используемых при определении миРНК

лекса миРНК–зонд. При использовании флуоресцентного метода детекции с применением SEXPAR получен экстремально низкий предел обнаружения миРНК let-7a, который составил 1 аМ. Верхний предел рабочего диапазона этого метода равен 1 нМ, т.е. рабочий концентрационный диапазон метода составил 9 порядков. Кроме того, авторами продемонстрирована

чрезвычайно низкая кросс-реактивность с миРНК let-7e (ближайшим гомологом), которая была менее чем $10^{-3}\%$, тогда как в случае применения классического варианта EXPAR эта величина равнялась 13,2%. Впоследствии метод был успешно применён для анализа миРНК let-7a в тканях и сыворотке крови человека, при этом показав бóльшую точность, чем RT-qPCR.

Петлевая изотермическая амплификация (Loop-isothermal-AMplification, LAMP) известна как один из наиболее эффективных и быстрых методов изотермической амплификации нуклеиновых кислот. Несмотря на то что оригинальная схема LAMP разработана для амплификации высокомолекулярной ДНК, в настоящее время описаны варианты данного метода, используемые для анализа микроРНК [76]. В этом случае анализируемая микроРНК играет роль одного из праймеров. С заменой прямого внешнего праймера в классической LAMP на микроРНК и двухцепочечной ДНК-матрицы на одноцепочечную ранее разработан метод определения микроРНК паразитов *Fasciola hepatica* и *Fasciola gigantica* [77]. Как видно на рис. 4, а, с 3'-концевой последовательностью ДНК-зонда последовательно взаимодействуют прямой внутренний праймер и микроРНК. Bst-Полимераза элонгирует оба праймера, а так как данный фермент обла-

дает способностью к замещению цепи, одновременно происходит вытеснение первого праймера. Впоследствии на 3'-конце первичного продукта осуществляется связывание и элонгация другой пары праймеров, а именно обратных внутреннего и внешнего праймеров. Это приводит к формированию гантелеобразных структур на обоих концах образованной последовательности, после чего запускается каскад дальнейших циклов амплификации. Температура проведения амплификации – 60 °С. Детекция сигнала не специфична к последовательности аналита и проводится при помощи флуоресцентных интеркалирующих красителей.

Использование вышеизложенного метода позволило провести определение микроРНК-novel-shared-03 в диапазоне концентраций 0,1 фМ–0,1 нМ [77]. Описанный метод показал хорошую специфичность, так как гомологичные микроРНК с однонуклеотидными заменами не определялись

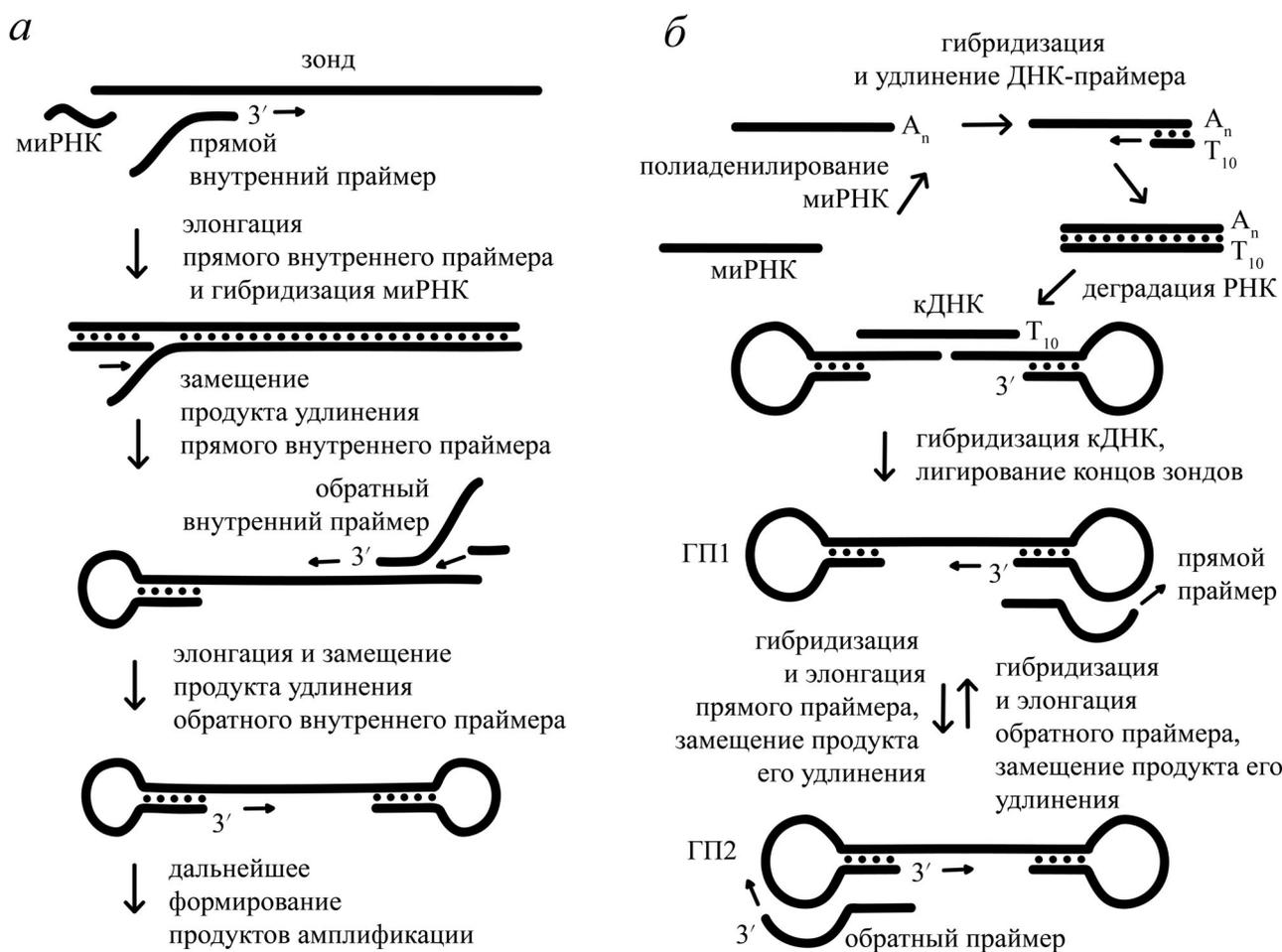


Рис. 4. Схемы метода петлевой изотермической амплификации (LAMP, а) и метода «лигирующей» петлевой изотермической амплификации (ligation LAMP, б), используемых при определении микроРНК. A_n – Полиаденилиновая последовательность, T₁₀ – последовательность из десяти тиминовых нуклеотидов

даже в концентрации, равной 100 фМ. Для обнаружения инфицированных животных был успешно проведён анализ паразитических миРНК в образцах сыворотки быков.

В другом варианте LAMP, названном «лигирующей» LAMP (ligation-LAMP), предварительно полученный транскрипт миРНК взаимодействовал с хвостовыми последовательностями двух шпилечных зондов, соединяя их, что в присутствии лигазы приводило к формированию ковалентной связи между шпилечными зондами с образованием гантелеобразной последовательности (ГП1, рис. 4, б) [78]. Далее с 3'-конца ГП1 осуществлялась её элонгация полимеразой со способностью к замещению цепи и одновременное взаимодействие с прямым праймером, его элонгация и вытеснение продукта удлинения (второй гантелеобразной последовательности (ГП2)) растущей цепью ГП1. Замыкание цикла амплификации происходило благодаря удлинению 3'-конца ГП2 и её взаимодействию с обратным праймером, в результате чего при дальнейших актах элонгации и замещения вытеснялась ГП1.

При исследовании специфичности данного метода показано, что кросс-реактивность в отношении миРНК-21 с одной нуклеотидной заменой равна 22%. Предел обнаружения миРНК-21 и рабочий диапазон составили 0,2 фМ и 1 фМ–1 нМ соответственно. Метод был успешно применён для количественного определения миРНК-21 в клетках раковых линий MCF-10A, HT 1080, HeLa и MCF-7. Относительно ранее рассмотренной модификации LAMP данный метод более сложен и требует больше времени за счёт проведения реакции обратной транскрипции.

В заключение отметим, что несмотря на эффективность и скорость амплификации LAMP, число публикаций, описывающих её применение при определении миРНК, невелико.

МИА, ПРИВОДЯЩИЕ К ПОВЫШЕНИЮ АНАЛИТИЧЕСКОГО СИГНАЛА БЕЗ ИЗМЕНЕНИЯ КОНЦЕНТРАЦИИ микроРНК

Циклический ферментативный метод амплификации (Circle-Enzymatic-Amplification, CEAM) стал одним из первых методов изотермической амплификации, приводящих к повышению аналитического сигнала без изменения концентрации аналита и нашедших применение в анализе миРНК. Известно большое число публикаций с описанием методов определения миРНК, основанных на CEAM. В этом методе амплификации последовательность распознающего зонда после его комплексообразования с миРНК подвергается

ферментативному расщеплению. Для этого могут быть применены различные ферменты: дуплекс-специфическая нуклеаза [79–81], экзонуклеаза [82–89] и эндонуклеаза [90–92]. В результате гидролиза зонда происходит диссоциация модифицированного дуплекса, а освободившаяся последовательность миРНК взаимодействует со следующей молекулой зонда (рис. 5, а).

Опубликован ряд работ, описывающих методы определения миРНК на основе CEAM с использованием эндонуклеазы. В большинстве таких методов формируются олигонуклеотидные структуры Y-формы [90, 91]. В работе Miao et al. [90] на поверхности углеродного электрода через золотые наночастицы иммобилизован ДНК-олигонуклеотид, связанный с электроактивной меткой (зонд 1). При специфическом взаимодействии миРНК, зонда 1 и дополнительного зонда (зонд 2) происходило формирование Y-комплекса, причём на одной из ветвей Y-комплекса, образованной зондами 1 и 2, формируется сайт рестрикции эндонуклеазы Nb.BbvCI. После расщепления эндонуклеазой Y-комплекс распался, благодаря чему электрохимическая метка диффундировала в раствор, что приводило к понижению регистрируемого сигнала, а освободившаяся миРНК инициировала следующий цикл амплификации. Базируясь на данной схеме, при определении миРНК был достигнут низкий предел обнаружения (30 аМ) и широкий рабочий диапазон (100 аМ–1 нМ). Кросс-реактивность метода, оценённая в отношении изомеров, составила 4%. Высокая чувствительность метода позволила провести анализ миРНК-21 в образцах сыворотки пациентов с раком груди.

Гораздо реже в методе CEAM используется T7-экзонуклеаза. В этом случае после взаимодействия миРНК с распознающим зондом последовательность зонда в образовавшемся комплексе подвергается ферментативному гидролизу в (5'→3')-направлении, в результате чего миРНК высвобождается и формирует дуплекс с другой молекулой-зондом. Чувствительность таких методов сильно зависит от используемых методов детекции. Так, при использовании электрохимической детекции предел обнаружения часто лежит в фемтомолярном диапазоне [84–86]. В случае применения оптических методов детектируемость миРНК ниже; их пределы обнаружения находятся в пикомолярном диапазоне [82, 83]. Описаны единичные работы по применению в данном методе экзонуклеазы III, гидролизующей последовательность зонда в дуплексе с аналитом в (3'→5')-направлении [87–89]. Малое число таких работ может

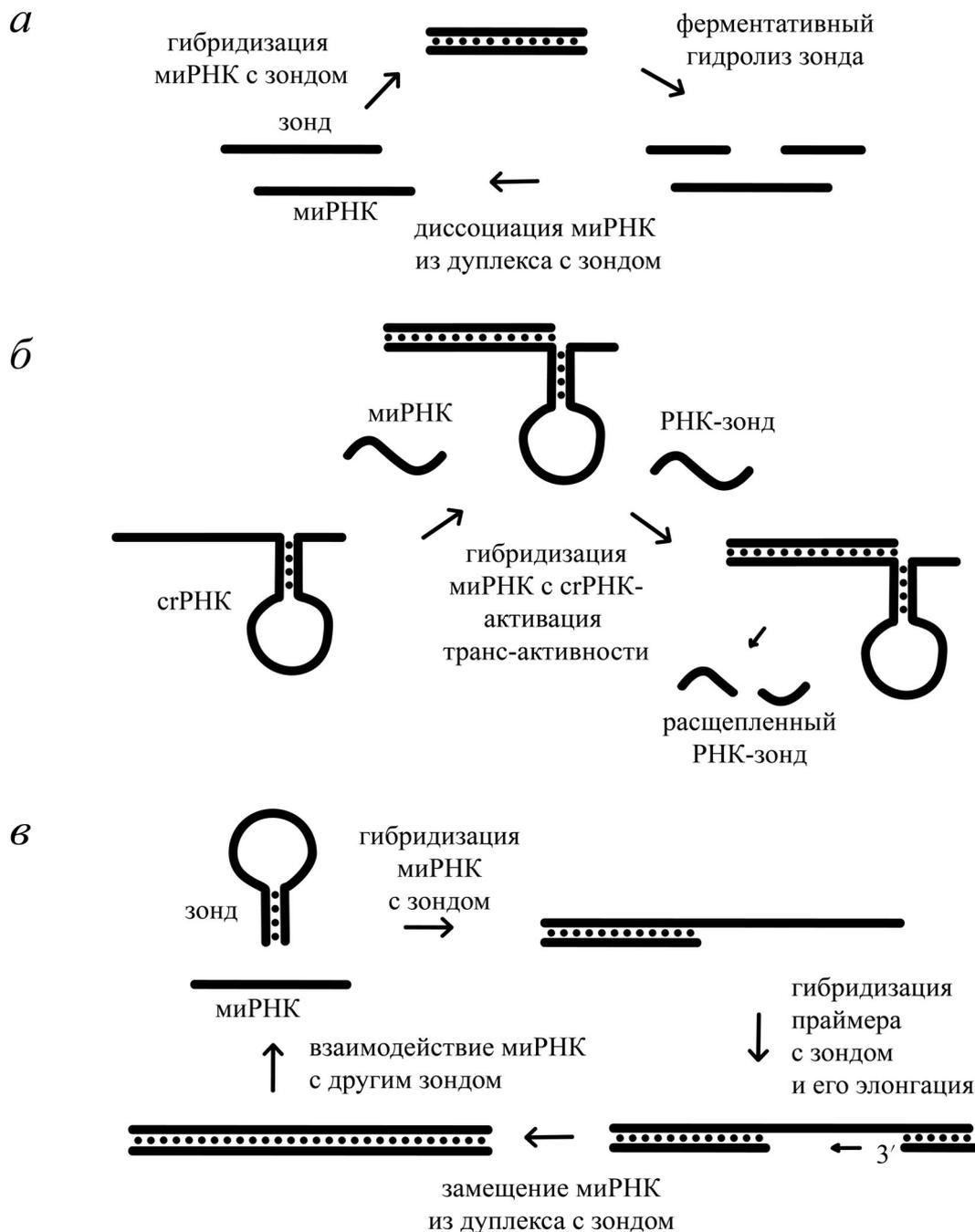


Рис. 5. Схема реакций изотермической амплификации, приводящих к повышению аналитического сигнала без изменения концентрации аналита и проводимых с применением ферментов, при определении миРНК: *a* – циклический ферментативный метод амплификации (CEAM); *б* – CRISPR/Cas13a; *в* – амплификационный метод с полимеризацией и замещением (ICSDP)

быть связано с побочной активностью экзонуклеазы III, которая способна подвергать расщеплению одноцепочечные молекулы нуклеиновых кислот, включая и миРНК.

Системы CRISPR/Cas в последние годы начали использовать для амплификации сигнала в аналитических методах определения нуклеино-

вых кислот [93]. В литературе описаны разные CRISPR/Cas-системы [94], однако в случае анализа миРНК применяется исключительно CRISPR/Cas13a, относящаяся к семейству систем типа IV [95]. На сегодняшний день представлено весьма ограниченное количество публикаций, описывающих методы детекции

миРНК с использованием системы CRISPR/Cas13a.

Данная система включает в себя «направляющую» РНК (сРНК) и РНК-мишень (аналит). сРНК находится в положительно заряженном канале, образуемом в результате конформационных изменений при её включении в CRISPR/Cas13a. Присутствие в реакционном растворе, кроме CRISPR/Cas13a, также РНК-мишени, например миРНК, приводит к тому, что белки Cas13a приобретают способность каталитически гидролизовать РНК, т.е. проявляют активность РНКазы. Расщепление последовательности РНК-мишени происходит за пределами её комплементарности с сРНК, при этом места рестрикции детерминируются первичной и вторичной структурами РНК-мишени [95]. После активации РНК-мишенью CRISPR/Cas13a проявляет также РНКазную активность по отношению к неспецифическим одноцепочечным РНК. Такая активность CRISPR/Cas13a называется коллатеральной или *транс*-активностью. Проявление данной способности CRISPR/Cas13a легло в основу ряда методов определения миРНК.

В присутствии анализируемой миРНК благодаря её взаимодействию с сРНК и активации *транс*-активности Cas13a происходит расщепление меченых РНК-зондов, что приводит к амплификации сигнала (рис. 5, б). На основе описанного принципа разработаны флуоресцентные, колориметрические и электрохимические методы детекции миРНК [96–98].

Следует отметить, что чувствительность методов определения миРНК с помощью системы CRISPR/Cas13a невысока и находится в пиколярном интервале [99]. Другим недостатком данного подхода является необходимость проведения анализа миРНК в особо чистых помещениях, предназначенных для работы с РНК.

Недавно Sha et al. [100] описали каскадный метод с применением CRISPR/Cas для определения миРНК-17. На первом амплификационном этапе была задействована система CRISPR/Cas13a, а на втором – CRISPR/Cas14a. Анализируемая миРНК активировала проявление *транс*-активности Cas13a, которая гидролизовала связь между двумя урацилами, включёнными в петлю шпилечного ДНК-зонда. После гидролиза шпилька трансформировалась в дуплекс, одна из цепей которого вступала в реакцию замещения цепи с сРНК в составе CRISPR/Cas14a, что, в свою очередь, активировало проявление *транс*-активности Cas14a, гидролизующей линейные ДНК-зонды с флуоресцентной меткой и тушителем на концах. Предел обнаружения и рабочий диапазон определения

миРНК-17 составили 1,3 фМ и 6,2–500 фМ соответственно. Авторами отмечается, что достигнутая в методе чувствительность на 3 порядка выше, чем в случае применения одноэтапного метода с применением CRISPR/Cas13a. Кроме того, показано, что при использовании сРНК с введённым некомплемментарным анализу нуклеотидом метод демонстрирует особенно высокую селективность относительно близкородственных миРНК. Разработанный каскадный CRISPR/Cas-метод был использован при определении миРНК-17 в экстрактах из сыворотки крови больных аденокарциномой груди.

Системы CRISPR/Cas также применялись в сочетании и с другими методами изотермической амплификации, такими как RCA [101] и EXPAR [102], что в конечном счёте позволило сконструировать высокочувствительные каскадные методы определения миРНК.

Амплификационный метод с полимеризацией и замещением (Isothermal Circular Strand Displacement Polymerization, ICSDP) является ещё одним относительно редко используемым в анализе миРНК МИА, приводящим к повышению аналитического сигнала без изменения концентрации аналита. В этом методе анализируемая миРНК специфически взаимодействует с зондом шпилечной структуры, в результате чего последний раскрывается, что приводит к высвобождению из стебля шпильки фрагмента, комплементарного праймеру (рис. 5, в). Это позволяет праймеру гибридизоваться с зондом, после чего праймер элонгируется полимеразой. Чаще других для этих целей используется фрагмент Кленова, а элонгация проводится при низких температурах. В процессе удлинения праймера одновременно происходит замещение последовательности миРНК. Высвобожденный из комплекса аналит вступает в реакцию с другой молекулой зонда. Концентрация миРНК соответствует количеству образовавшегося дуплекса, который определяется такими методами, как флуоресценция [103, 104], электрохимия [105], хемилюминесценция [106, 107]. Таким образом, в ICSDP молекула миРНК выполняет роль катализатора реакции раскрытия шпилечного зонда.

Недавно описан гетерогенный метод определения миРНК-39, в котором для амплификации сигнала применён ICSDP [107]. В этом методе использовался биотинилированный праймер, в связи с чем образованный в процессе гетерогенной амплификации продукт также содержал биотин, который впоследствии эффективно взаимодействовал с конъюгатом стрептавидина и полипероксидазы. Сигнал детектировался методом усиленной хемилюминесценции с использованием фенотиозиновых усилителей. Предел

обнаружения составил 400 фМ, при этом получено высокое значение коэффициента чувствительности метода (в пределах рабочего диапазона сигнал возрастал более чем в 500 раз). При определении миРНК-39 в образцах коротких РНК, полученных из лизатов клеточных линий, показано отсутствие матричного эффекта, что позволило использовать буферные растворы миРНК в качестве калибраторов. Так как миРНК-39 обнаруживается в нематоде *Caenorhabditis elegans* и отсутствует в организме человека, данный метод предложено использовать для оценки эффективности выделения миРНК из биоматериала человека [90, 105].

В методах определения миРНК с ICSDP используются и другие детектирующие системы. Так, в работе Wang et al. [104] шпилечный зонд был мечен флуоресцентной меткой, в то время как праймер предварительно иммобилизовался на поверхности наночастиц золота. При образовании в процессе амплификации дуплексов флуоресцентные метки сближались с поверхностью наночастиц, что приводило к тушению флуоресценции. Предел обнаружения метода, разработанного для определения миРНК-21, и его линейный диапазон составили 1,5 фМ и 10 фМ–10 нМ соответственно. Кроме того, продемонстрирована способность метода к выявлению однонуклеотидных замен. Метод был использован для определения миРНК-21 в экзосомах, секретируемых клетками HeLa.

Методы определения миРНК, основанные на ICSDP, в целом характеризуются низкими значениями предела обнаружения, а за счёт применения шпилечного зонда являются высокоспецифичными.

Реакция цепной гибридизации. В отличие от вышеописанных МИА для проведения реакции цепной гибридизации (hybridization chain reaction, HCR) не требуется участия какого-либо фермента. Понятно, что такие методы менее дорогостоящие и им не присущи недостатки, связанные с применением ферментов (см. выше). HCR основана на комплементарном взаимодействии двух зондов шпилечной структуры, катализируемом последовательностью олигонуклеотида, в частности миРНК (рис. 6). При взаимодействии миРНК с первым зондом происходит высвобождение домена, способного раскрыть шпилечную структуру второго. В свою очередь, при раскрытии второго зонда в нём из дуплекса освобождается фрагмент последовательности, способный раскрыть шпилечную структуру первого зонда. Таким образом, в присутствии аналита формируется цепная дуплексная структура, состоящая из используемых зондов. Правила моделирования используемых в HCR шпилек сформулированы в работе Ang и Yung [108]. Если один или оба зонда содержат в своей структуре аналитическую метку, то полимеризация зондов приводит к амплификации регистрируемого сигнала.

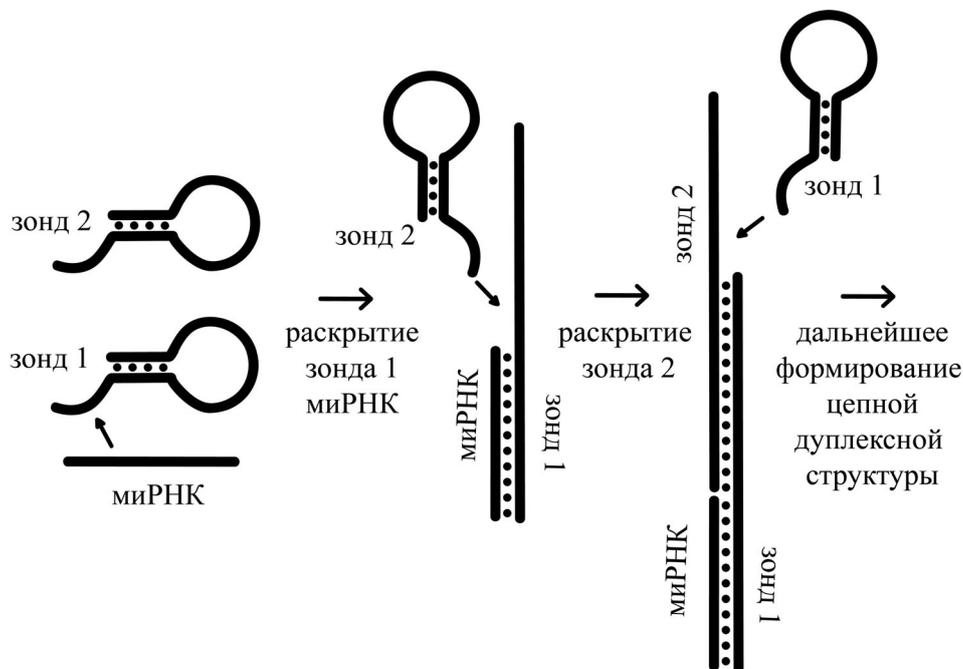


Рис. 6. Схема реакции цепной гибридизации (HCR), используемой при определении миРНК

С использованием HCR разработано большое количество методов определения миРНК, многие из которых являются высокочувствительными и способны детектировать аналиты в фемто- и аттомолярных концентрационных диапазонах [109–112]. Недавно Zhang et al. [109] использовали HCR для амплификации сигнала микрочипов. В данной работе ДНК-зонд 1 с одного из концов был связан с тетраэдрической ДНК-структурой, ковалентно иммобилизованной на поверхность чипа. При взаимодействии аналита с иммобилизованным ДНК-зондом 1 в систему вносился зонд шпильчатой структуры 2, который раскрывался аналитом. Освобождённый благодаря этому домен зонда 2 служил инициатором взаимодействия пары HCR-зондов, которые полимеризовались с образованием двухцепочечной ДНК. Для данного метода наблюдался очень низкий предел обнаружения (10 аМ), при этом линейное нарастание сигнала регистрировалось вплоть до 100 фМ. Высокая специфичность данного метода позволила различить однонуклеотидные замены в структуре миРНК [109].

Как и для большинства других методов амплификации, в случае применения HCR наблюдается повышенный фоновый сигнал, обусловленный спонтанной (при отсутствии аналита) полимеризацией зондов. Недавно описан подход понижения фонового сигнала, основанный на обработке экзонуклеазой I захватывающего зонда-шпильки, предварительно иммобилизованного на поверхности электрода. В результате действия фермента удалялись шпильчатые последовательности, имеющие дефекты в их вторичной структуре [113]. После такой обработки предел обнаружения миРНК-122 составил 100 аМ с рабочим диапазоном до 100 нМ. Разработанный метод показал свою эффективность при определении миРНК-122 в экзосомах раковых клеток HepG2 и SCF-7.

Для дополнительного повышения эффективности данного метода амплификации разработана разветвлённая HCR, где образуемый дуплекс содержит фрагмент одного из зондов, свободный от какого-либо взаимодействия, который, в свою очередь, является инициатором полимеризации другой пары зондов (зондов 3 и 4). В конечном счёте происходит образование разветвлённой структуры, состоящей из последовательностей четырёх зондов.

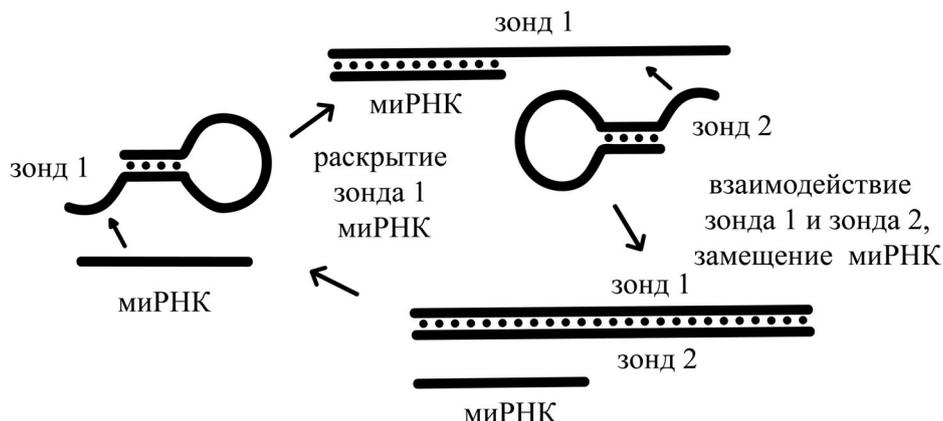
С применением разветвлённой HCR разработан ряд методов определения миРНК [114–117]. Следует отметить, что сравнение аналитических параметров методов определения миРНК, созданных на основе базовой и разветвлённой HCR, не выявило в явной форме ка-

ких-либо преимуществ одного метода амплификации перед другим. Справедливости ради остаётся отметить, что данное заключение сделано при сравнении данных, полученных в различных лабораториях при определении различных миРНК, а не на основании прямого сравнения указанных методов амплификации в одной и той же работе.

Метод каталитической сборки шпилек. Наряду с HCR при разработке методов определения миРНК не менее широко используется метод каталитической сборки шпилек (Catalytic Hairpin Assembly, CHA). Для проведения данной амплифицирующей реакции так же, как и в случае HCR, не требуется присутствия каких-либо ферментов. CHA основывается на аналит-зависимом взаимодействии двух комплементарных друг другу шпильчатых зондов (рис. 7). Так как используемые зонды находятся в шпильчатой (закрытой) форме, их спонтанная гибридизация затруднена. На первом этапе аналит гибридизуется с первым зондом (зонд 1). Появление одноцепочечного фрагмента в образованном дуплексе является иницирующим центром для взаимодействия с зондом 2. По завершении амплификационного цикла формируется комплекс зондов 1 и 2 и молекула миРНК в свободном состоянии, что позволяет ей вступать в реакцию со следующей молекулой зонда 1. Таким образом, одна молекула аналита способна катализировать образование большого числа дуплексов зондов 1 и 2.

На настоящий момент среди МИА, используемых в методах анализа миРНК, CHA является наиболее популярным. В данных методах CHA успешно сочетается с различными методами детекции. Хотя для таких методов наблюдается большой разброс значений предела обнаружения (от пикомолярных до субфемтомолярных концентраций) [118–120], что требует отдельного исследования, способность с помощью данного типа изотермической амплификации конструирования ультрочувствительных методов анализа указывает на перспективность CHA. Недавно Jin и Xu [121] описали микрочип на стекле, функционирующий с применением CHA. Для данного чипа с флуоресцентной детекцией предел обнаружения миРНК-21 и миРНК-155 был одинаков и составил 1,3 фМ. Полученные значения были очень низкими по сравнению с аналогичными величинами, обычно характерными для микрочипов. Разработанный чип также был высокоспецифичен в отношении исследуемых миРНК. Следует отметить, что высокая специфичность в целом характерна для методов, основанных на CHA [119, 122–124].

a



б

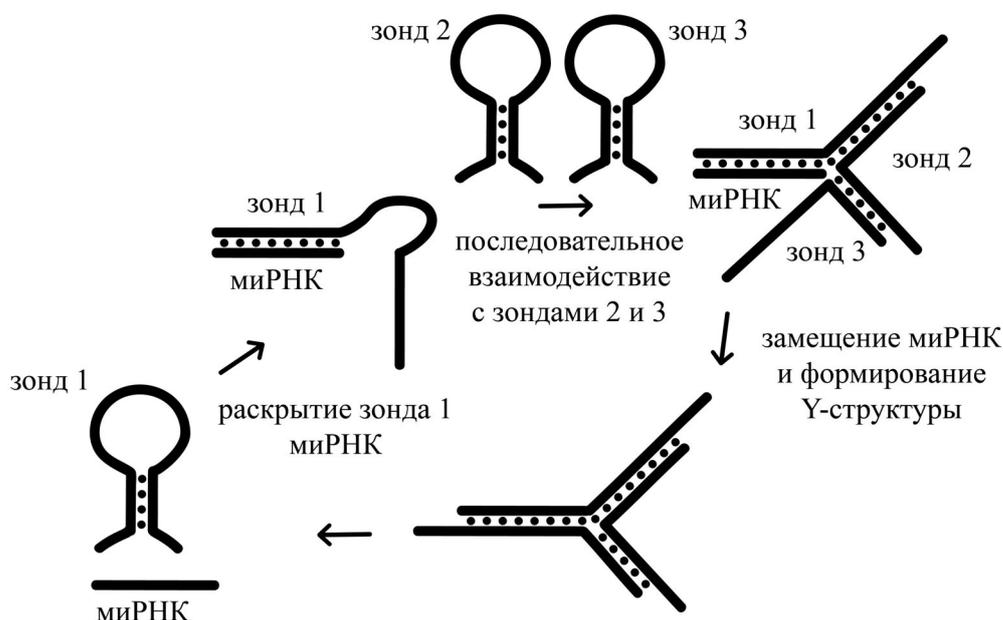


Рис. 7. Схема реакции каталитической сборки шпилек (СНА, *a*) и схема реакции СНА с образованием Y-структур (*б*), используемых при определении микроРНК

Кроме базового варианта СНА с участием двух зондов, описаны методы анализа микроРНК с применением трёх шпилечных зондов, из которых в конечном счёте образуются Y-структуры. В электрохимическом методе анализа микроРНК-181 [124] итоговые биотинилированные Y-структуры формировались вблизи поверхности электрода и впоследствии реагировали с конъюгатом стрептавидина и щелочной фосфатазы (рис. 7, *a*). Определение ферментативной активности фосфатазы вольтамперометрическим методом позволило получить предел обнаружения микроРНК-181, равный 7 фМ. Рабочий диапазон данного метода лежал в интервале 10 фМ–100 нМ, т.е. был достаточно широким.

С помощью разработанного метода успешно проведены определения микроРНК-181 в экзосомах сывороток крови больных с ишемической болезнью сердца и здоровых людей.

Существенным фактором, ограничивающим чувствительность методов с использованием СНА, является фоновая реакция зондов в отсутствие аналита. Для понижения степени протекания данной реакции были предложены различные стратегии. Одной из первых была предложена стратегия использования одного из зондов с одним или двумя нуклеотидами не комплементарными другому зонду. Это понизило вероятность гибридизации шпилек, находящихся в динамическом равновесии между открытой и

закрытой формами [125]. Jiang et al. [125] назвали данный метод СНА с некомплементарным противостоянием нуклеотидов (Mismatched Catalytic Hairpin Assembly, мСНА). Применение мСНА позволяет значительно понизить интенсивность фоновой реакции, однако полностью её подавить не способно.

Другой причиной, приводящей к протеканию фоновой реакции, является наличие в растворах шпилечных зондов молекул с дефектной вторичной структурой. Так как шпилечная структура зондов формируется на этапе их отжига, недавно проведено детальное исследование влияния условий отжига олигонуклеотидных зондов на интенсивность фоновой реакции в мСНА [126]. Понижение концентрации олигонуклеотидов, а также оптимизация концентрации солей (таких как NaCl и MgCl₂) в буфере отжига зондов привело к снижению интенсивности фоновой реакции и позволило в 20 раз понизить предел обнаружения миРНК-141. Несмотря на достигнутые значительные успехи при решении данной задачи, на сегодняшний день окончательного решения данной проблемы пока не предложено.

Таким образом, в настоящее время с использованием разнообразных методов амплификации нуклеиновых кислот разработано большое число методов определения миРНК. Однако так как концентрация некоторых миРНК в биологических образцах крайне низкая, а в некоторых случаях при патологических состояниях она дополнительно понижается [14], требуются методы анализа с повышенной чувствительностью. Кроме того, как было уже отмечено выше, для более точной оценки концентрации миРНК требуются методы с высокими значениями коэффициента чувствительности.

Каскадные методы амплификации. Для улучшения данных аналитических параметров, характеризующих методы определения миРНК, могут быть использованы каскадные методы амплификации, в которых используется сочетание различных типов амплификации. В таких методах анализа миРНК запускает первый тип амплификации, а образующийся продукт является инициатором для последующей амплификации.

Используя данный подход, недавно был сконструирован метод определения миРНК let-7a, в котором последовательно использовались RCA и LAMP [127]. При детекции продукта LAMP флуоресцентным методом миРНК let-7a детектировалось вплоть до 10 аМ. Кросс-реактивность метода в отношении других миРНК семейства let-7 не превышала 19%. Описаны также высокочувствительные методы анализа

миРНК, основанные на сочетании RCA с CEAM или СНА. В одних методах CEAM [128] и СНА [129] используются на втором этапе после RCA, в других – RCA используется для повышения эффективности CEAM [130] и СНА [131]. Объединение RCA с CRISPR/Cas13a позволило разработать метод с субфемтомольными пределами обнаружения миРНК [132].

Ранее отмечалось, что при использовании EXPAR образуется большое количество неспецифических продуктов, что, в свою очередь, приводит к ложноположительным сигналам. Для устранения этого недостатка Liu et al. [133] предложили метод с каскадной амплификацией, в котором вместо неспецифической детекции продуктов с помощью интеркалирующих красителей использовался СНА, позволяющий специфически детектировать миРНК-зависимый продукт EXPAR. Предел обнаружения миРНК-21, достигнутый при помощи данного метода, составил 3 фМ.

Описано также применение каскадных бесферментных методов амплификации. Fu et al. [134] применили стратегию каскадной амплификации, основанной на сочетании СНА и HCR. В этом методе HCR-зонды содержали инвертазу как метку, что позволило регистрировать аналитический сигнал, образующийся при определении миРНК-155, с помощью мобильного глюкометра. Предел обнаружения данного метода составил 0,36 фМ. Следует отметить, что при отсутствии второй амплификации в каскаде чувствительность детекции миРНК понижалась на 3 порядка. Благодаря взаимодействию миРНК с зондом шпилечной структуры на первом этапе метод также показал высокую специфичность.

Таким образом, с использованием каскадных методов амплификации разработаны методы определения миРНК с чрезвычайно высокой чувствительностью, вплоть до аттомолярных концентраций [135–136]. В то же время следует отметить, что не во всех описанных случаях применение каскадной амплификации было успешным. Хотя на настоящий момент число публикаций, посвящённых разработке новых методов определения миРНК с применением каскадной амплификации невелико, наблюдается тенденция повышения интереса к данному подходу улучшения чувствительности анализа миРНК.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Детальный анализ литературы показывает, что с каждым годом разрабатывается всё больше

новых высокоэффективных методов определения микроРНК. Многие из них позволяют успешно оценивать уровень микроРНК-маркёров в клетках, экзосомах и биологических жидкостях, таких как сыворотка/плазма крови, моча, слезы, что является хорошим заделом для развития малоинвазивной диагностики. Полученные при этом новыми методами данные согласуются с результатами, демонстрируемыми RT-qPCR [64, 78, 124]. Разрабатываемые методы обладают высокой чувствительностью и специфичностью. Вместе с тем пока внимание большинства исследователей акцентировано на оценках предела обнаружения, рабочего диапазона и специфичности разрабатываемых методов, оставляя за скобками такой важный аналитический параметр, как коэффициент чувствительности, часто являющийся ключевым при регистрации отклонений в уровне экспрессии микроРНК в образцах пациентов с различными патологиями. Данная проблема заслуживает более пристального рассмотрения [67].

Для повышения чувствительности анализа микроРНК используются разнообразные методы амплификации. В последние годы из-за простоты проведения большой интерес исследователей привлекают МИА. Особенно заманчиво выглядит перспектива создания методов анализа на основе бесферментных МИА, что позволит, с одной стороны, преодолеть проблему синтеза неспецифических продуктов полимеразы, а с другой стороны, понизить стоимость определения микроРНК. Кроме повышения чувствитель-

ности за счёт применения методов амплификации, улучшается и специфичность методов определения микроРНК, что чрезвычайно важно, учитывая высокое разнообразие микроРНК в биологических объектах. Применение каскадных методов амплификации и высокочувствительных методов детекции [137–138] создаёт платформу для дальнейшего повышения чувствительности методов анализа микроРНК.

Большое внимание специалистов привлекают не только аналитические параметры методов анализа микроРНК, но также их технологичность, стоимость производства и лёгкость автоматизации. Не последнее место среди этих требований занимает и производительность метода анализа. С учётом сказанного, в первую очередь проявляется интерес к оптическим методам анализа микроРНК, основанным на применении МИА.

Все вышесказанное показывает актуальность дальнейших интенсивных исследований в области разработки методов определения микроРНК и их внедрения в аналитическую практику.

Финансирование. Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (грант № 21-54-53007).

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

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

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Bodulev, O. L., and Sakharov, I. Y. (2020) Isothermal nucleic acid amplification techniques and their use in bioanalysis, *Biochemistry (Moscow)*, **85**, 147-166, doi: 10.1134/S0006297920020030.
2. Pritchard, C. C., Cheng, H. H., and Tewari, M. (2012) MicroRNA profiling: Approaches and considerations, *Nat. Rev. Genet.*, **13**, 358-369, doi: 10.1038/nrg3198.
3. De Planell-Saguer, M., and Rodicio, M. C. (2011) Analytical aspects of microRNA in diagnostics: A review, *Anal. Chim. Acta*, **699**, 134-152, doi: 10.1016/j.aca.2011.05.025.
4. Ragan, C., Zuker, M., and Ragan, M. A. (2011) Quantitative prediction of miRNA-mRNA interaction based on equilibrium concentrations, *PLoS Comput. Biol.*, **7**, e1001090, doi: 10.1371/journal.pcbi.1001090.
5. Kozomara, A., Birgaoanu, M., and Griffiths-Jones, S. (2019) miRBase: From microRNA sequences to function, *Nucleic Acids Res.*, **47**, D155-D162, doi: 10.1093/nar/gky1141.
6. Plotnikova, O., Baranova, A., and Skoblov, M. (2019) Comprehensive analysis of human microRNA-mRNA interactome, *Front. Genet.*, **10**, 933, doi: 10.3389/fgene.2019.00933.
7. Krol, J., Loedige, I., and Filipowicz, W. (2010) The widespread regulation of microRNA biogenesis, function and decay, *Nat. Rev. Genet.*, **11**, 597-610, doi: 10.1038/nrg2843.
8. Katoh, T., Sakaguchi, Y., Miyauchi, K., Suzuki, T., Kashiwabara, S. I., et al. (2009) Selective stabilization of mammalian microRNAs by 3' adenylation mediated by the cytoplasmic poly (A) polymerase GLD-2, *Genes Dev.*, **23**, 433-438, doi: 10.1101/gad.1761509.
9. Lee, R. C., Feinbaum, R. L., and Ambros, V. (1993) The *C. elegans* heterochronic gene *lin-4* encodes small RNAs with antisense complementarity to *lin-14*, *Cell*, **75**, 843-854, doi: 10.1016/0092-8674(93)90529-Y.
10. Bartel, D. P. (2009) MicroRNAs: target recognition and regulatory functions, *Cell*, **136**, 215-233, doi: 10.1016/j.cell.2009.01.002.
11. Liang, Y., Ridzon, D., Wong, L., and Chen, C. (2007) Characterization of microRNA expression profiles in normal human tissues, *BMC Genom.*, **8**, 1-20, doi: 10.1186/1471-2164-8-166.
12. Wienholds, E., Kloosterman, W. P., Miska, E., Alvarez-Saavedra, E., Berezikov, E., et al. (2005) MicroRNA expression in zebrafish embryonic development, *Science*, **309**, 310-311, doi: 10.1126/science.1114519.
13. Alvarez-Garcia, I., and Miska, E. A. (2005) MicroRNA functions in animal development and human disease, *Development*, **132**, 4653-4662, doi: 10.1242/dev.02073.

14. Lu, J., Getz, G., Miska, E.A., Alvarez-Saavedra, E., Lamb, J., et al. (2005) MicroRNA expression profiles classify human cancers, *Nature*, **435**, 834-838, doi: 10.1038/nature03702.
15. Lee, J. S., Ahn, Y. H., Won, H. S., Sun, D. S., Kim, Y. H., et al. (2017) Prognostic role of the microRNA-200 family in various carcinomas: a systematic review and meta-analysis, *BioMed Res. Int.*, **2017**, doi: 10.1155/2017/1928021.
16. Zhang, L., Wu, H., Zhao, M., and Lu, Q. (2020) Identifying the differentially expressed microRNAs in autoimmunity: a systemic review and meta-analysis, *Autoimmunity*, **53**, 122-136, doi: 10.1080/08916934.2019.1710135.
17. He, M., Zhang, H. N., Tang, Z. C., Gao, S. G. (2021) Diagnostic and therapeutic potential of exosomal microRNAs for neurodegenerative diseases, *J. Neural Transplant. Plast.*, **2021**, doi: 10.1155/2021/8884642.
18. Ono, K., Kuwabara, Y., and Han, J. (2011) MicroRNAs and cardiovascular diseases, *FEBS J.*, **278**, 1619-1633, doi: 10.1111/j.1742-4658.2011.08090.x.
19. Sempere, L. F., Freemantle, S., Pitha-Rowe, I., Moss, E., Dmitrovsky, E., et al. (2004) Expression profiling of mammalian microRNAs uncovers a subset of brain-expressed microRNAs with possible roles in murine and human neuronal differentiation, *Genome Biol.*, **5**, 1-11, doi: 10.1186/gb-2004-5-3-r13.
20. Wightman, B., Ha, I., Ruvkun, G. (1993) Posttranscriptional regulation of the heterochronic gene *lin-14* by *lin-4* mediates temporal pattern formation in *C. elegans*, *Cell*, **75**, 855-862, doi: 10.1016/0092-8674(93)90530-4.
21. Válczy, A., Hornyik, C., Varga, N., Burgyán, J., Kauppinen, S., et al. (2004) Sensitive and specific detection of microRNAs by northern blot analysis using LNA-modified oligonucleotide probes, *Nucleic Acids Res.*, **32**, e175-e175, doi: 10.1093/nar/gnh171.
22. Várallyay, E., Burgyán, J., and Havelda, Z. (2008) MicroRNA detection by northern blotting using locked nucleic acid probes, *Nat. Protoc.*, **3**, 190-196, doi: 10.1038/nprot.2007.528.
23. Pall, G. S., Codony-Servat, C., Byrne, J., Ritchie, L., and Hamilton, A. (2007) Carbodiimide-mediated cross-linking of RNA to nylon membranes improves the detection of siRNA, miRNA and piRNA by northern blot, *Nucleic Acids Res.*, **35**, e60, doi: 10.1093/nar/gkm112.
24. Ramkissoon, S. H., Mainwaring, L. A., Sloand, E. M., Young, N. S., and Kajigaya, S. (2006) Nonisotopic detection of microRNA using digoxigenin labeled RNA probes, *Mol. Cell. Probes*, **20**, 1-4, doi: 10.1016/j.mcp.2005.07.004.
25. Kim, S. W., Li, Z., Moore, P. S., Monaghan, A. P., Chang, Y., et al. (2010) A sensitive non-radioactive northern blot method to detect small RNAs, *Nucleic Acids Res.*, **38**, e98-e98, doi: 10.1093/nar/gkp1235.
26. Johnson, B. N., and Mutharasan, R. (2014) Biosensor-based microRNA detection: techniques, design, performance, and challenges, *Analyst*, **139**, 1576-1588, doi: 10.1039/C3AN01677C.
27. Dong, H., Lei, J., Ding, L., Wen, Y., Ju, H., et al. (2013) MicroRNA: function, detection, and bioanalysis, *Chem. Rev.*, **113**, 6207-6233, doi: 10.1021/cr300362f.
28. Shimomura, A., Shino, S., Kawauchi, J., Takizawa, S., Sakamoto, H., et al. (2016) Novel combination of serum microRNA for detecting breast cancer in the early stage, *Cancer Sci.*, **107**, 326-334, doi: 10.1111/cas.12880.
29. Gungormez, C., Aktas, H. G., Dilsiz, N., and Borazan, E. (2019) Novel miRNAs as potential biomarkers in stage II colon cancer: microarray analysis, *Mol. Biol. Rep.*, **46**, 4175-4183, doi: 10.1007/s11033-019-04868-7.
30. Li, W., and Ruan, K. (2009) MicroRNA detection by microarray, *Anal. Bioanal. Chem.*, **394**, 1117-1124, doi: 10.1007/s00216-008-2570-2.
31. Ueno, T., and Funatsu, T. (2014) Label-free quantification of microRNAs using ligase-assisted sandwich hybridization on a DNA microarray, *PLoS One*, **9**, e90920, doi: 10.1371/journal.pone.0090920.
32. Wang, H., Ach, R. A., and Curry, B. O. (2007) Direct and sensitive miRNA profiling from low-input total RNA, *RNA*, **13**, 151-159, doi: 10.1261/rna.234507.
33. Castoldi, M., Schmidt, S., Benes, V., Noerholm, M., Kulozik, A. E., et al. (2006) A sensitive array for microRNA expression profiling (miChip) based on locked nucleic acids (LNA), *RNA*, **12**, 913-920, doi: 10.1261/rna.2332406.
34. Liu, C. G., Calin, G. A., Volinia, S., and Croce, C. M. (2008) MicroRNA expression profiling using microarrays, *Nat. Protoc.*, **3**, 563-578, doi: 10.1038/nprot.2008.14.
35. Tian, R., Ning, W., Chen, M., Zhang, C., Li, Q., et al. (2019) High performance electrochemical biosensor based on 3D nitrogen-doped reduced graphene oxide electrode and tetrahedral DNA nanostructure, *Talanta*, **194**, 273-281, doi: 10.1016/j.talanta.2018.09.110.
36. Kutluk, H., Bruch, R., Urban, G. A., and Dincer, C. (2020) Impact of assay format on miRNA sensing: Electrochemical microfluidic biosensor for miRNA-197 detection, *Biosens. Bioelectron.*, **148**, 111824, doi: 10.1016/j.bios.2019.111824.
37. Smith, D. A., Simpson, K., Cicero, M. L., Newbury, L. J., Nicholas, P., et al. (2021) Detection of urinary microRNA biomarkers using diazo sulfonamide-modified screen-printed carbon electrodes, *RSC Adv.*, **11**, 18832-18839, doi: 10.1039/D0RA09874D.
38. Bodulev, O. L., and Sakharov, I. Y. (2019) Chemiluminescent determination of microRNA-141 using target-dependent activation of the peroxidase-mimicking DNAzyme, *Anal. Lett.*, **52**, 813-824, doi: 10.1080/00032719.2018.1498506.
39. Lai, M., and Slaughter, G. (2019) Label-free MicroRNA optical biosensors, *Nanomaterials*, **9**, 1573, doi: 10.3390/nano9111573.
40. Xue, T., Liang, W., Li, Y., Sun, Y., Xiang, Y., et al. (2019) Ultrasensitive detection of miRNA with an antimonene-based surface plasmon resonance sensor, *Nat. Commun.*, **10**, 1-9, doi: 10.1038/s41467-018-07947-8.
41. Chen, C., Ridzon, D. A., Broomer, A. J., Zhou, Z., Lee, D. H., et al. (2005) Real-time quantification of microRNAs by stem-loop RT-PCR, *Nucleic Acids Res.*, **33**, e179, doi: 10.1093/nar/gni178.
42. Lao, T. D., and Le, T. A. H. (2020) Development of stem-loop real-time PCR technique for miRNA-141 expression analysis in nasopharyngeal carcinoma, *Asian J. Pharm. Res. Health Care*, **11**, 30-36, doi: 10.18311/ajphrc/2019/24990.
43. Xu, Y. F., Hannafon, B. N., Khatiri, U., Gin, A., and Ding, W. Q. (2019) The origin of exosomal miR-1246 in human cancer cells, *RNA Biol.*, **16**, 770-784, doi: 10.1080/15476286.2019.1585738.
44. Zhang, L., Lin, J., Ye, Y., Oba, T., Gentile, E., et al. (2018) Serum microRNA-150 predicts prognosis for early-stage non-small cell lung cancer and promotes tumor cell proliferation by targeting tumor suppressor gene SRCIN1, *Clin. Pharmacol. Ther.*, **103**, 1061-1073, doi: 10.1002/cpt.870.
45. Konoshenko, M. Y., Lekhnov, E. A., Bryzgunova, O. E., Zaporozhchenko, I. A., Yarmoschuk, S. V., et al. (2020) The panel of 12 cell-free microRNAs as potential biomarkers in prostate neoplasms, *Diagnostics*, **10**, 38, doi: 10.3390/diagnostics10010038.
46. Androvic, P., Valihrach, L., Elling, J., Sjoback, R., and Kubista, M. (2017) Two-tailed RT-qPCR: A novel method

- for highly accurate miRNA quantification, *Nucleic Acids Res.*, **45**, e144-e144, doi: 10.1093/nar/gkx588.
47. Raabe, C. A., Tang, T. H., Brosius, J., and Rozhdestvensky, T. S. (2014) Biases in small RNA deep sequencing data, *Nucleic Acids Res.*, **42**, 1414-1426, doi: 10.1093/nar/gkt1021.
48. Zhang, J., Li, Z., Wang, H., Wang, Y., Jia, H., and Yan, J. (2011) Ultrasensitive quantification of mature microRNAs by real-time PCR based on ligation of a ribonucleotide-modified DNA probe, *Chem. Commun.*, **47**, 9465-9467, doi: 10.1039/C1CC13466C.
49. Tian, H., Sun, Y., Liu, C., Duan, X., Tang, W., et al. (2016) Precise quantitation of microRNA in a single cell with droplet digital PCR based on ligation reaction, *Anal. Chem.*, **88**, 11384-11389, doi: 10.1021/acs.analchem.6b01225.
50. Zhao, G., Jiang, T., Liu, Y., Huai, G., Lan, C., et al. (2018) Droplet digital PCR-based circulating microRNA detection serve as a promising diagnostic method for gastric cancer, *BMC Cancer*, **18**, 1-10, doi: 10.1186/s12885-018-4601-5.
51. Cirillo, P. D., Margiotti, K., Mesoraca, A., and Giorlandino, C. (2020) Quantification of circulating microRNAs by droplet digital PCR for cancer detection, *BMC Res. Notes*, **13**, 1-6, doi: 10.1186/s13104-020-05190-3.
52. Friedländer, M. R., Chen, W., Adamidi, C., Maaskola, J., Einspanier, R., et al. (2008) Discovering microRNAs from deep sequencing data using miRDeep, *Nat. Biotechnol.*, **26**, 407-415, doi: 10.1038/nbt1394.
53. Dave, V. P., Ngo, T. A., Pernestig, A. K., Tilevik, D., Kant, K., et al. (2019) MicroRNA amplification and detection technologies: opportunities and challenges for point of care diagnostics, *Lab. Invest.*, **99**, 452-469, doi: 10.1038/s41374-018-0143-3.
54. Castoldi, M., Collier, P., Nolan, T., and Benes, V. (2013) Expression profiling of microRNAs by quantitative real-time PCR: the good, the bad, and the ugly, *PCR Technology: Current Innovations*, 307-319, Boca Raton, FL: CRC Press.
55. Borst, A., Box, A. T. A., and Fluit, A. C. (2004) False-positive results and contamination in nucleic acid amplification assays: suggestions for a prevent and destroy strategy, *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.*, **23**, 289-299, doi: 10.1007/s10096-004-1100-1.
56. García, P. B., Robledo, N. L., and Islas, A. L. (2004) Analysis of non-template-directed nucleotide addition and template switching by DNA polymerase, *Biochemistry*, **43**, 16515-16524, doi: 10.1021/bi0491853.
57. Lomidze, L., Williford, T. H., Musier-Forsyth, K., and Kankia, B. (2018) Isothermal amplification of long DNA segments by quadruplex priming amplification, *Anal. Methods*, **10**, 2972-2979, doi: 10.1039/C8AY00843D.
58. Jonstrup, S. P., Koch, J., and Kjems, J. (2006) A microRNA detection system based on padlock probes and rolling circle amplification, *RNA*, **12**, 1747-1752, doi: 10.1261/rna.110706.
59. Wu, X., Zhu, S., Huang, P., and Chen, Y. (2016) Highly specific quantification of microRNA by coupling probe-rolling circle amplification and Förster resonance energy transfer, *Anal. Biochem.*, **502**, 16-23, doi: 10.1016/j.ab.2016.03.001.
60. Li, R., Liu, Q., Jin, Y., and Li, B. (2020) Sensitive colorimetric determination of microRNA let-7a through rolling circle amplification and a peroxidase-mimicking system composed of trimeric G-triplex and hemin DNAzyme, *Microchim. Acta*, **187**, 1-8, doi: 10.1007/s00604-019-4093-2.
61. Kumara, G. S. R., Pandith, A., and Seo, Y. J. (2020) Highly fluorescent morpholine naphthalimide deoxyuridine nucleotide for the detection of miRNA 24-3P through rolling circle amplification, *Analyst*, **145**, 4777-4781, doi: 10.1039/D0AN00723D.
62. Zhou, Y., Huang, Q., Gao, J., Lu, J., Shen, X., et al. (2010) A dumbbell probe-mediated rolling circle amplification strategy for highly sensitive microRNA detection, *Nucleic Acids Res.*, **38**, e156, doi: 10.1093/nar/gkq556.
63. Li, R., Wang, Y., Wang, P., and Lu, J. (2017) A dual discrimination mode for improved specificity towards let-7a detection via a single-base mutated padlock probe-based exponential rolling circle amplification, *Luminescence*, **32**, 1574-1581, doi: 10.1002/bio.3362.
64. Liu, H., Li, L., Duan, L., Wang, X., Xie, Y., Tong, L., et al. (2013) High specific and ultrasensitive isothermal detection of microRNA by padlock probe-based exponential rolling circle amplification, *Anal. Chem.*, **85**, 7941-7947, doi: 10.1021/ac401715k.
65. Chen, S., Zhao, J., Xu, C., Sakharov, I. Y., and Zhao, S. (2021) Absolute quantification of microRNAs in a single cell with chemiluminescence detection based on rolling circle amplification on a microchip platform, *Anal. Chem.*, **93**, 9218-9225, doi: 10.1021/acs.analchem.1c01463.
66. Zhang, X., Liu, Y., Yang, Y., Huang, J., Wang, H., et al. (2018) Ligation-promoted hyperbranched rolling circle amplification enables ultrasensitive detection of microRNA in clinical specimens, *Sens. Actuators B Chem.*, **277**, 634-639, doi: 10.1016/j.snb.2018.09.058.
67. Бодулев О. Л., Сахаров И. Ю. (2022) Планшетный хемилюминесцентный метод определения микроРНК-141, основанный на применении каталитической сборки шпилек и конъюгата стрептавидина и полипероксидазы, *Журн. Анал. Химии*, **77**, 366-374, doi: 10.31857/S0044450222040053.
68. Eslamizadeh, S., Heidari, M., Agah, S., Faghiehloo, E., Ghazi, H., et al. (2018) The role of microRNA signature as diagnostic biomarkers in different clinical stages of colorectal cancer, *Cell J.*, **20**, 220, doi: 10.22074/cellj.2018.5366.
69. Zhang, S., Liu, C., Zou, X., Geng, X., Zhou, X., et al. (2021) MicroRNA panel in serum reveals novel diagnostic biomarkers for prostate cancer, *PeerJ*, **9**, e11441, doi: 10.7717/peerj.11441.
70. Zyrina, N. V., and Antipova, V. N. (2021) Nonspecific synthesis in the reactions of isothermal nucleic acid amplification, *Biochemistry (Moscow)*, **86**, 887-897, doi: 10.1134/S0006297921070099.
71. Van Ness, J., Van Ness, L. K., and Galas, D. J. (2003) Isothermal reactions for the amplification of oligonucleotides, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **100**, 4504-4509, doi: 10.1073/pnas.0730811100.
72. Jia, H., Li, Z., Liu, C., and Cheng, Y. (2010) Ultrasensitive detection of microRNAs by exponential isothermal amplification, *Angew. Chem. Int. Ed.*, **49**, 5498-5501, doi: 10.1002/anie.201001375.
73. Wu, H., Wu, J., Liu, Y., Wang, H., and Zou, P. (2019) Fluorometric determination of microRNA using arched probe-mediated isothermal exponential amplification combined with DNA-templated silver nanoclusters, *Microchim. Acta*, **186**, 1-8, doi: 10.1007/s00604-019-3836-4.
74. Reid, M. S., Le, X. C., and Zhang, H. (2018) Exponential isothermal amplification of nucleic acids and assays for proteins, cells, small molecules, and enzyme activities: An EXPAR example, *Angew. Chem. Int. Ed.*, **57**, 11856-11866, doi: 10.1002/anie.201712217.
75. Chen, J., An, T., Ma, Y., Situ, B., Chen, D., et al. (2018) Isothermal amplification on a structure-switchable symmetric toehold dumbbell-template: A strategy enabling MicroRNA analysis at the single-cell level with ultrahigh specificity and accuracy, *Anal. Chem.*, **90**, 859-865, doi: 10.1021/acs.analchem.7b03713.

76. Li, C., Li, Z., Jia, H., and Yan, J. (2011) One-step ultrasensitive detection of microRNAs with loop-mediated isothermal amplification (LAMP), *Chem. Commun.*, **47**, 2595-2597, doi: 10.1039/C0CC03957H.
77. Tran, D. H., and Phung, H. T. T. (2020) Detecting *Fasciola hepatica* and *Fasciola gigantica* microRNAs with loop-mediated isothermal amplification (LAMP), *J. Parasit. Dis.*, **44**, 364-373, doi: 10.1007/s12639-019-01164-w.
78. Du, W., Lv, M., Li, J., Yu, R., and Jiang, J. (2016) A ligation-based loop-mediated isothermal amplification (ligation-LAMP) strategy for highly selective microRNA detection, *Chem. Commun.*, **52**, 12721-12724, doi: 10.1039/C6CC06160E.
79. Liu, L., Deng, D., Wu, D., Hou, W., Wang, L., et al. (2021) Duplex-specific nuclease-based electrochemical biosensor for the detection of microRNAs by conversion of homogeneous assay into surface-tethered electrochemical analysis, *Anal. Chim. Acta*, **1149**, 338199, doi: 10.1016/j.aca.2021.338199.
80. Yin, B. C., Liu, Y. Q., and Ye, B. C. (2012) One-step, multiplexed fluorescence detection of microRNAs based on duplex-specific nuclease signal amplification, *J. Am. Chem. Soc.*, **134**, 5064-5067, doi: 10.1021/ja300721s.
81. Ma, X., Xu, H., Qian, K., Kandawa-Schulz, M., Miao, W., et al. (2020) Electrochemical detection of microRNAs based on AuNPs/CNNS nanocomposite with Duplex-specific nuclease assisted target recycling to improve the sensitivity, *Talanta*, **208**, 120441, doi: 10.1016/j.talanta.2019.120441.
82. Sang, Y., Xu, Y., Xu, L., Cheng, W., Li, X., et al. (2017) Colorimetric and visual determination of microRNA via cycling signal amplification using T7 exonuclease, *Microchim. Acta*, **184**, 2465-2471, doi: 10.1007/s00604-017-2238-8.
83. Zheng, Y., Chen, J., Li, Y., Xu, Y., Chen, L., et al. (2021) Dual-probe fluorescent biosensor based on T7 exonuclease-assisted target recycling amplification for simultaneous sensitive detection of microRNA-21 and microRNA-155, *Anal. Bioanal. Chem.*, **413**, 1605-1614, doi: 10.1007/s00216-020-03121-6.
84. Wang, M., Fu, Z., Li, B., Zhou, Y., Yin, H., et al. (2014) One-step, ultrasensitive, and electrochemical assay of microRNAs based on T7 exonuclease assisted cyclic enzymatic amplification, *Anal. Chem.*, **86**, 5606-5610, doi: 10.1021/ac5010376.
85. Zhang, P., Zhuo, Y., Chang, Y., Yuan, R., and Chai, Y. (2015) Electrochemiluminescent graphene quantum dots as a sensing platform: A dual amplification for microRNA assay, *Anal. Chem.*, **87**, 10385-10391, doi: 10.1021/acs.analchem.5b02495.
86. Chen, Z., Xie, Y., Huang, W., Qin, C., Yu, A., et al. (2019) Exonuclease-assisted target recycling for ultrasensitive electrochemical detection of microRNA at vertically aligned carbon nanotubes, *Nanoscale*, **11**, 11262-11269, doi: 10.1039/c9nr02543j.
87. Liu, M. X., Liang, S., Tang, Y., Tian, J., Zhao, Y., et al. (2018) Rapid and label-free fluorescence bioassay for microRNA based on exonuclease III-assisted cycle amplification, *RSC Adv.*, **8**, 15967-15972, doi: 10.1039/c8ra01605d.
88. Tang, Y., Liu, M., Zhao, Z., Li, Q., Liang, X., et al. (2019) Fluorometric determination of microRNA-122 by using ExoIII-aided recycling amplification and polythymine induced formation of copper nanoparticles, *Microchim. Acta*, **186**, 133, doi: 10.1007/s00604-019-3237-8.
89. Yan, X. M., Wang, Y. Q., Chen, Y., Chen, Z. P., and Yu, R. Q. (2020) Detection of microRNAs by the combination of exonuclease-III assisted target recycling amplification and repeated-fishing strategy, *Anal. Chim. Acta*, **1131**, 1-8, doi: 10.1016/j.aca.2020.07.025.
90. Miao, P., Wang, B., Yu, Z., Zhao, J., and Tang, Y. (2015) Ultrasensitive electrochemical detection of microRNA with star trigon structure and endonuclease mediated signal amplification, *Biosens. Bioelectron.*, **63**, 365-370, doi: 10.1016/j.bios.2014.07.075.
91. Huang, Y., Wang, W., Wu, T., Xu, L. P., Wen, Y., et al. (2016) A three-line lateral flow biosensor for logic detection of microRNA based on Y-shaped junction DNA and target recycling amplification, *Anal. Bioanal. Chem.*, **408**, 8195-8202, doi: 10.1007/s00216-016-9925-x.
92. Luo, L., Wang, L., Zeng, L., Wang, Y., Weng, Y., et al. (2020) A ratiometric electrochemical DNA biosensor for detection of exosomal microRNA, *Talanta*, **207**, 120298, doi: 10.1016/j.talanta.2019.120298.
93. Gong, S., Zhang, S., Lu, F., Pan, W., Li, N., and Tang, B. (2021) CRISPR/Cas-based *in vitro* diagnostic platforms for cancer biomarker detection, *Anal. Chem.*, **93**, 11899-11909, doi: 10.1021/acs.analchem.1c02533.
94. Kim, S., Ji, S., and Koh, H. R. (2021) CRISPR as a diagnostic tool, *Biomolecules*, **11**, 1162, doi: 10.3390/biom11081162.
95. Zhang, F. (2019) Development of CRISPR-Cas systems for genome editing and beyond, *Q. Rev. Biophys.*, **52**, e6, 1-31, doi: 10.1017/S0033583519000052.
96. Shan, Y., Zhou, X., Huang, R., and Xing, D. (2019) High-fidelity and rapid quantification of miRNA combining crRNA programmability and CRISPR/Cas13a trans-cleavage activity, *Anal. Chem.*, **91**, 5278-5285, doi: 10.1021/acs.analchem.9b00073.
97. Yuan, C., Tian, T., Sun, J., Hu, M., Wang, X., et al. (2020) Universal and naked-eye gene detection platform based on the clustered regularly interspaced short palindromic repeats/Cas12a/13a system, *Anal. Chem.*, **92**, 4029-4037, doi: 10.1021/acs.analchem.9b05597.
98. Bruch, R., Johnston, M., Kling, A., Mattmüller, T., Baaske, J., et al. (2021) CRISPR-powered electrochemical microfluidic multiplexed biosensor for target amplification-free miRNA diagnostics, *Biosens. Bioelectron.*, **177**, 112887, doi: 10.1016/j.bios.2020.112887.
99. Granados-Riveron, J. T., and Aquino-Jarquín, G. (2021) CRISPR/Cas13-based approaches for ultrasensitive and specific detection of microRNAs, *Cells*, **10**, 1655, doi: 10.3390/cells10071655.
100. Sha, Y., Huang, R., Huang, M., Yue, H., Shan, Y., et al. (2021) Cascade CRISPR/Cas enables amplification-free microRNA sensing with fM-sensitivity and single-base-specificity, *Chem. Commun.*, **57**, 247-250, doi: 10.1039/D0CC06412B.
101. Zhang, G., Zhang, L., Tong, J., Zhao, X., and Ren, J. (2020) CRISPR-Cas12a enhanced rolling circle amplification method for ultrasensitive miRNA detection, *Microchem. J.*, **158**, 105239, doi: 10.1016/j.microc.2020.105239.
102. Zhou, T., Huang, R., Huang, M., Shen, J., Shan, Y., et al. (2020) CRISPR/Cas13a powered portable electrochemiluminescence chip for ultrasensitive and specific miRNA detection, *Adv. Sci.*, **7**, 1903661, doi: 10.1002/adv.201903661.
103. Giuffrida, M. C., Zanolli, L. M., D'Agata, R., Finotti, A., Gambari, R., et al. (2015) Isothermal circular-strand-displacement polymerization of DNA and microRNA in digital microfluidic devices, *Anal. Bioanal. Chem.*, **407**, 1533-1543, doi: 10.1007/s00216-014-8405-4.
104. Wang, B., You, Z., and Ren, D. (2019) Target-assisted FRET signal amplification for ultrasensitive detection of microRNA, *Analyst*, **144**, 2304-2311, doi: 10.1039/C8AN02266F.
105. Ma, W., Situ, B., Lv, W., Li, B., Yin, X., et al. (2016) Electrochemical determination of microRNAs based on

- isothermal strand-displacement polymerase reaction coupled with multienzyme functionalized magnetic microcarriers, *Biosens. Bioelectron.*, **80**, 344-351, doi: 10.1016/j.bios.2015.12.064.
106. Cai, S., Ye, J., Al-Maskri, A. A. A., Sun, L., and Zeng, S. (2019) A conformational switch-based aptasensor for the chemiluminescence detection of microRNA, *Luminescence*, **34**, 823-829, doi: 10.1002/bio.3677.
107. Solovjev, A. M., Galkin, I. I., Pletjushkina, O. Y., Medvedko, A. V., Zhao, S., et al. (2021) Isothermal chemiluminescent assay based on circular strand-displacement polymerization reaction amplification for cel-miRNA-39-3p determination in cell extracts, *Int. J. Biol. Macromolecules*, **182**, 987-992, doi: 10.1016/j.ijbiomac.2021.04.101.
108. Ang, Y. S., and Yung, L.-Y. L. (2016) Rational design of hybridization chain reaction monomers for robust signal amplification, *Chem. Commun.*, **52**, 4219-4222, doi: 10.1039/C5CC08907G.
109. Zhang, H., Liu, X., Zhang, C., Xu, Y., Su, J., et al. (2020) A DNA tetrahedral structure-mediated ultrasensitive fluorescent microarray platform for nucleic acid test, *Sens. Actuators B Chem.*, **321**, 128538, doi: 10.1016/j.snb.2020.128538.
110. Miao, P., Tang, Y., and Yin, J. (2015) MicroRNA detection based on analyte triggered nanoparticle localization on a tetrahedral DNA modified electrode followed by hybridization chain reaction dual amplification, *Chem. Commun.*, **51**, 15629-15632, doi: 10.1039/C5CC05499K.
111. Ge, Z., Lin, M., Wang, P., Pei, H., Yan, J., et al. (2014) Hybridization chain reaction amplification of microRNA detection with a tetrahedral DNA nanostructure-based electrochemical biosensor, *Anal. Chem.*, **86**, 2124-2130, doi: 10.1021/ac4037262.
112. Liu, H., Bei, X., Xia, Q., Fu, Y., Zhang, S., et al. (2016) Enzyme-free electrochemical detection of microRNA-21 using immobilized hairpin probes and a target-triggered hybridization chain reaction amplification strategy, *Microchim. Acta*, **183**, 297-304, doi: 10.1007/s00604-015-1636-z.
113. Guo, Q., Yu, Y., Zhang, H., Cai, C., and Shen, Q. (2020) Electrochemical sensing of exosomal microRNA based on hybridization chain reaction signal amplification with reduced false-positive signals, *Anal. Chem.*, **92**, 5302-5310, doi: 10.1021/acs.analchem.9b05849.
114. Xiong, Z., Pan, R., Hu, Q., Yun, W., Li, N., et al. (2020) One-step triggered branched DNA nanostructure for ultra-sensitive electrochemical detection of microRNA, *Microchem. J.*, **158**, 105186, doi: 10.1016/j.microc.2020.105186.
115. Hosseinzadeh, E., Ravan, H., Mohammadi, A., and Pourghadamyari, H. (2020) Colorimetric detection of miRNA-21 by DNAzyme-coupled branched DNA constructs, *Talanta*, **216**, 120913, doi: 10.1016/j.talanta.2020.120913.
116. Li, Y., Huang, C. Z., and Li, Y. F. (2019) Ultrasensitive electrochemiluminescence detection of MicroRNA via one-step introduction of a target-triggered branched hybridization chain reaction circuit, *Anal. Chem.*, **91**, 9308-9314, doi: 10.1021/acs.analchem.9b02580.
117. Shen, Z., He, L., Wang, W., Tan, L., and Gan, N. (2020) Highly sensitive and simultaneous detection of microRNAs in serum using stir-bar assisted magnetic DNA nanospheres-encoded probes, *Biosens. Bioelectron.*, **148**, 111831, doi: 10.1016/j.bios.2019.111831.
118. Shuai, H. L., Huang, K. J., Xing, L. L., and Chen, Y. X. (2016) Ultrasensitive electrochemical sensing platform for microRNA based on tungsten oxide-graphene composites coupling with catalyzed hairpin assembly target recycling and enzyme signal amplification, *Biosens. Bioelectron.*, **86**, 337-345, doi: 10.1016/j.bios.2016.06.057.
119. Ji, D., Mou, X., and Kwok, C. K. (2019) Label-free and ratiometric detection of microRNA based on target-induced catalytic hairpin assembly and two fluorescent dyes, *Anal. Methods*, **11**, 4808-4813, doi: 10.1039/C9AY01891C.
120. Li, C., Huang, Y., and Yang, Y. (2021) Coupling of an antifouling and reusable nanoplatfrom with catalytic hairpin assembly for highly sensitive detection of nucleic acids using zeta potential as signal readout, *Sens. Actuators B Chem.*, **326**, 128845, doi: 10.1016/j.snb.2020.128845.
121. Jin, F., and Xu, D. (2021) A fluorescent microarray platform based on catalytic hairpin assembly for MicroRNAs detection, *Anal. Chim. Acta*, **1173**, 338666, doi: 10.1016/j.aca.2021.338666.
122. Jiang, Z., Wang, H., Zhang, X., Liu, C., and Li, Z. (2014) An enzyme-free signal amplification strategy for sensitive detection of microRNA via catalyzed hairpin assembly, *Anal. Methods*, **6**, 9477-9482, doi: 10.1039/C4AY02142H.
123. Zhang, Y., Zhang, X., Situ, B., Wu, Y., Luo, S., et al. (2021) Rapid electrochemical biosensor for sensitive profiling of exosomal microRNA based on multifunctional DNA tetrahedron assisted catalytic hairpin assembly, *Biosens. Bioelectron.*, **183**, 113205, doi: 10.1016/j.bios.2021.113205.
124. Zhang, R. Y., Luo, S. H., Lin, X. M., Hu, X. M., Zhang, Y., et al. (2021) A novel electrochemical biosensor for exosomal microRNA-181 detection based on a catalytic hairpin assembly circuit, *Anal. Chim. Acta*, **1157**, 338396, doi: 10.1016/j.aca.2021.338396.
125. Jiang, Y. S., Bhadra, S., Li, B., and Ellington, A. D. (2014) Mismatches improve the performance of strand-displacement nucleic acid circuits, *Angew. Chem. Int. Ed.*, **126**, 1876-1879, doi: 10.1002/ange.201307418.
126. Bodulev, O. L., Zhao, S., and Sakharov, I. Y. (2021) Improving the sensitivity of the miRNA assay coupled with the mismatched catalytic hairpin assembly reaction by optimization of hairpin annealing conditions, *Anal. Chem.*, **93**, 6824-6830, doi: 10.1021/acs.analchem.1c00820.
127. Tian, W., Li, P., He, W., Liu, C., and Li, Z. (2019) Rolling circle extension-actuated loop-mediated isothermal amplification (RCA-LAMP) for ultrasensitive detection of microRNAs, *Biosens. Bioelectron.*, **128**, 17-22, doi: 10.1016/j.bios.2018.12.041.
128. Zhou, C., Huang, R., Zhou, X., and Xing, D. (2020) Sensitive and specific microRNA detection by RNA dependent DNA ligation and rolling circle optical signal amplification, *Talanta*, **216**, 120954, doi: 10.1016/j.talanta.2020.120954.
129. Zhuang, J., Lai, W., Chen, G., and Tang, D. (2014) A rolling circle amplification-based DNA machine for miRNA screening coupling catalytic hairpin assembly with DNAzyme formation, *Chem. Commun.*, **50**, 2935-2938, doi: 10.1039/C3CC49873E.
130. Fan, T., Mao, Y., Liu, F., Zhang, W., Lin, J. S., et al. (2019) Label-free fluorescence detection of circulating microRNAs based on duplex-specific nuclease-assisted target recycling coupled with rolling circle amplification, *Talanta*, **200**, 480-486, doi: 10.1016/j.talanta.2019.01.038.
131. Wang, S., Lu, S., Zhao, J., Ye, J., Huang, J., and Yang, X. (2019) An electric potential modulated cascade of catalyzed hairpin assembly and rolling chain amplification for microRNA detection, *Biosens. Bioelectron.*, **126**, 565-571, doi: 10.1016/j.bios.2018.09.088.
132. Huang, M., Huang, R., Yue, H., Shan, Y., and Xing, D. (2020) Ultrasensitive and high-specific microRNA detection using hyper-branching rolling circle amplified

- CRISPR/Cas13a biosensor, *Sens. Actuators B Chem.*, **325**, 128799, doi: 10.1016/j.snb.2020.128799.
133. Liu, H., Tian, T., Zhang, Y., Ding, L., Yu, J., et al. (2017) Sensitive and rapid detection of microRNAs using hairpin probes-mediated exponential isothermal amplification, *Biosens. Bioelectron.*, **89**, 710-714, doi: 10.1016/j.bios.2016.10.099.
134. Fu, P., Xu, M., Xing, S., Zhao, Y., and Zhao, C. (2021) Dual cascade isothermal amplification reaction based glucometer sensors for point-of-care diagnostics of cancer-related microRNAs, *Analyst*, **146**, 3242-3250, doi: 10.1039/D1AN00037C.
135. Song, W., Zhang, F., Song, P., Zhang, Z., He, P., et al. (2021) Untrasensitive photoelectrochemical sensor for microRNA detection with DNA walker amplification and cation exchange reaction, *Sens. Actuators B Chem.*, **327**, 128900, doi: 10.1016/j.snb.2020.128900.
136. Yuan, Y. H., Chi, B. Z., Wen, S. H., Liang, R. P., Li, Z. M., et al. (2018) Ratiometric electrochemical assay for sensitive detecting microRNA based on dual-amplification mechanism of duplex-specific nuclease and hybridization chain reaction, *Biosens. Bioelectron.*, **102**, 211-216, doi: 10.1016/j.bios.2017.11.030.
137. Bodulev, O. L., Burkin, K. M., Efremov, E. E., and Sakharov, I. Y. (2020) One-pot microplate-based chemiluminescent assay coupled with catalytic hairpin assembly amplification for DNA detection, *Anal. Bioanal. Chem.*, **412**, 5105-5111, doi: 10.1007/s00216-020-02438-6.
138. Kolosova, A. Y., and Sakharov, I. Y. (2019) Triple amplification strategy for the improved efficiency of a microplate-based assay for the chemiluminescent detection of DNA, *Anal. Lett.*, **52**, 1352-1362, doi: 10.1080/00032719.2018.1539091.

MODERN METHODS FOR DETERMINATION OF microRNAs

Review

O. L. Bodulev and I. Y. Sakharov*

*Department of Chemistry, Lomonosov Moscow State University,
119991 Moscow, Russia; E-mail: sakharovivan@gmail.com*

This review discusses modern methods for the quantitative and semi-quantitative determination of miRNAs, small non-coding RNAs that affect many biological processes such as development, differentiation, metabolism and the formation of an immunological response and are considered promising biomarkers in the diagnosis of a number of diseases.

Keywords: bioanalysis, microRNA, nucleic acids, amplification, polymerases

УДК 577.25

ОПРЕДЕЛЕНИЕ 2-ОКСОКИСЛОТ В ЭКСТРАКТАХ МОЗГА КРЫС С ПОМОЩЬЮ ВЫСОКОЭФФЕКТИВНОЙ ЖИДКОСТНОЙ ХРОМАТОГРАФИИ

© 2022 В.Н. Ташлицкий¹, А.В. Артюхов^{2,3}, Н.В. Федорова², М.А. Суконников¹, А.Л. Ксенофонтов^{2*}, В.И. Буник^{2,3,4}, Л.А. Баратова^{2*}

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

² Институт физико-химической биологии имени А.Н. Белозерского, Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, 119991 Москва, Россия; электронная почта: baratova@belozersky.msu.ru, ksenofon@belozersky.msu.ru

³ Сеченовский университет, кафедра биохимии, 119991 Москва, Россия

⁴ Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, факультет биоинженерии и биоинформатики, 119991 Москва, Россия

Поступила в редакцию 17.03.2022

После доработки 20.03.2022

Принята к публикации 20.03.2022

2-Оксокислоты принимают участие в ряде важнейших метаболических процессов, в связи с этим они могут быть использованы как биомаркеры для диагностики болезней человека. С учетом опубликованных методов и известных проблем определения содержания 2-оксокислот в тканях млекопитающих нами был разработан оптимизированный метод высокоэффективной жидкостной хроматографии 2,4-динитрофенилгидразиновых производных 2-оксокислот. Ввиду своей химической устойчивости 2,4-динитрофенилгидразиновые производные 2-оксокислот обладают рядом преимуществ по сравнению с ранее использовавшимися производными фенилгидразина. В работе определено содержание пирувата, глиоксилата, 2-оксоглутарата, 2-оксомалоната и 4-метилтио-2-оксобутирата в метанол-уксусных экстрактах мозга крыс, обсуждены вопросы пробоподготовки при проведении анализов экстрактов мозга млекопитающих. Представленные валидационные характеристики метода демонстрируют, что предел количественного определения достигает 2 нмоль/г ткани для каждой из пяти 2-оксокислот. Разработанный метод позволяет исследовать тонкие изменения содержания 2-оксокислот как (пато)физиологических индикаторов метаболизма в тканях млекопитающих.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: ВЭЖХ, 2-оксокислоты, экстракты мозга крыс, 2,4-динитрофенилгидразин, валидация метода.

DOI: 10.31857/S0320972522040030, **EDN:** AQNHJK

ВВЕДЕНИЕ

2-Оксокислоты (или α -кетокислоты) представляют собой органические соединения, содержащие в α -положении по отношению к карбоксильной группе карбонильную группу. Располагаясь на пересечении различных метаболических путей, 2-оксокислоты, в частности пируват (Pyr), 2-оксоглутарат (2-OG) и оксалоацетат, формируют узлы метаболических сетей, служа-

щих для взаимодействия между гликолизом, циклом Кребса, глюконеогенезом и распадом отдельных аминокислот [1]. Другие 2-оксокислоты участвуют в метаболизме отдельных аминокислот в качестве интермедиатов (2-оксоизовалерат, 2-оксоизокапроат, 2-оксо-3-метилвалерат, 2-оксоадипат, 2-оксобутират и 4-метилтио-2-оксобутират (МТОВ)) или побочных продуктов (фенилпируват, глиоксилат (Glx)). В связи с этим они могут служить прогностическими биомаркерами в диагностике и при анализе протекания ряда болезней человека. Так, недостаточное или избыточное содержание 2-оксокислот в организме обнаруживалось, например, при гиповитаминозе витаминов группы В, гипоксии, раке, голодании, диабете, различных наследственных заболеваниях, в моделях нейродегенеративных заболеваний и при других нарушениях [2–8].

Принятые сокращения: 2-ОМ – 2-оксомалонат; 2-ОГ – 2-оксоглутарат; ОФ ВЭЖХ – обращенно-фазная высокоэффективная жидкостная хроматография; DNPН – 2,4-динитрофенилгидразин; Glx – глиоксилат; LOD – нижний предел детекции; LOQ – нижний предел количественного определения; МТОВ – 4-метилтио-2-оксобутират; Pyr – пируват.

* Адресат для корреспонденции.

Разрабатываемые в последние годы высокопроизводительные масс-спектрометрические методы LC-MS/MS/MS для анализа низкомолекулярных метаболитов позволяют проводить оценку нескольких сотен соединений (так называемых метаболомов) для исследования ответов на различные стрессы, а также изучать проявления различных заболеваний, таких как рак, диабет и нейродегенерация. Так, при изучении течения болезни Хантингтона на модели *Drosophila melanogaster* изменения в уровнях Pуг и 2-ОГ были идентифицированы на симптоматической стадии заболевания, что, ввиду узловой роли этих 2-оксокислот, свидетельствует о серьезных метаболических изменениях в ходе развития болезни [7]. Описанные в литературе изменения уровня 2-ОГ в плазме крови при голодании трактуются авторами как имеющие сигнальное значение, поскольку данное соединение способно служить модулятором транскрипции. Так, 2-ОГ активирует 2-ОГ-зависимые пролилгидроксилазы, за счет чего дестабилизируются транскрипционные факторы, в результате чего при продолжительном голодании активируются процессы как глобального катаболизма, так и анаболизма [8]. В последнее время отдельные 2-оксокислоты также интенсивно изучаются в связи с онкологическими заболеваниями, поскольку могут регулировать экспрессию генов, в частности, эпигенетически, влияя на модификации ДНК и гистонов. Таким образом, данные об изменениях в содержании 2-оксокислот в клетках могут свидетельствовать и о возможных эпигенетических модификациях [9].

Большинство методов количественного определения 2-оксокислот включает в себя использование аналитической ВЭЖХ совместно с дериватизацией анализируемых соединений. Так, использование в качестве дериватирующего агента фенилгидразина позволило детектировать полученные производные фенилгидразона спектрофотометрически для количественного определения Glx, Pуг и 2-ОГ в моче [10, 11]. При этом вне хроматографических методов одним из наиболее ранних дериватирующих агентов для количественной детекции 2-оксокислот можно считать его производное 2,4-динитрофенилгидразин (DNPH) [12]. Ввиду того, что DNPH-производные разных 2-оксокислот имеют разные максимумы поглощения в диапазоне 380–520 нм, данный метод предлагался к использованию, в частности, для определения активностей трансаминаз [13]. В дальнейшем, благодаря высокой стабильности образующихся производных, дериватизация DNPH с последующей ВЭЖХ и спектрофотометрической детекцией дериватов использовалась для

количественного определения различных альдегидов и кетонов [14, 15]. В случае 2-оксокислот хроматографическое разделение их DNPH-производных использовалось лишь для сравнения чувствительности с другим дериватирующим агентом, *o*-фенилендиамином [16].

Серьезный недостаток ранних работ, описывающих применение разных агентов, дериватирующих 2-оксокислоты, состоял в том, что при узком спектре определяемых 2-оксокислот все они были нацелены на решение чисто практических задач. При этом валидированных методов количественного определения одновременно нескольких биологически важных 2-оксокислот в одном опыте просто не существовало. Кроме того, несмотря на успешное использование *o*-фенилендиамина в качестве дериватирующего агента [17], для эффективного ВЭЖХ анализа 2-оксокислот в моче и плазме крови требовалась предварительная очистка 2-оксокислот на колонке с гидразидным гелем и экстракция их дериватизованных производных этилацетатом.

В более поздних работах уже приводятся некоторые валидационные параметры, такие как предел чувствительности (LOD), предел количественного определения (LOQ) и соотношение сигнал : шум. В случае использования *o*-фенилендиамина в качестве дериватирующего агента при флюориметрической детекции минимальное значение LOQ составило 1,2 мкМ [18, 19] и LOD – порядка 0,25 [11] и 0,39 мкМ [19]. При использовании в качестве дериватирующего агента 4,5-метилendioкси-1,2-диаминобензола был показан более низкий предел чувствительности – 0,014 мкМ (сигнал : шум = 5 : 1) [6]. При использовании DNPH в качестве дериватирующего агента и спектрофотометрической детекции продукта дериватизации проводилась валидация методики определения формальдегида в кормах и пище животных [15], при которой значение чувствительности достигало ~ 40 мкМ, но не для 2-оксокислот.

В большей части работ, где использованы хроматографические методы определения 2-оксокислот, применяется обращенно-фазная (ОФ) ВЭЖХ. При этом во всех работах без исключения проведению непосредственного анализа предшествует стадия дериватизации. Среди возможных дериватирующих реагентов наиболее используемыми оказались фенилгидразин и его 2,4-динитро-производное (спектрофотометрическая детекция) либо *o*-фенилендиамин и его 4,5-метилendioкси-производное (флюориметрическая детекция).

В данной работе нами предложен метод ОФ ВЭЖХ со спектрофотометрической детек-

цией с предварительной химической дериватизацией DNPН 2-оксокислот в экстрактах головного мозга животных. Среди анализируемых 2-оксокислот Glx, 2-OG и Pуг ранее определялись в крови и моче животных и человека, в то время как данные по ВЭЖХ определению 2-оксомалоната (2-OM) и МТОВ в животных объектах вовсе отсутствуют. Аналогично методу количественного определения формальдегида [15], реакции DNPН с 2-оксокислотами также дают соединения (гидразоны), поглощающие в видимом свете (380–520 нм). Применение этой методики позволило бы увеличить чувствительность определения по сравнению с УФ-детекцией (324 нм) этих производных при дериватизации с фенилгидразином [10, 11]. Более того, DNPН-производные карбонильных соединений имеют высокую химическую стабильность [15] в отличие от разрушающихся в течение нескольких дней производных фенилгидразина, что особенно выражено для глиоксилата [11]. Нами получены валидационные характеристики метода, которые показывают, что предел количественного определения достигает 1 мкМ для каждой из пяти 2-оксокислот. Метод был использован для оценки содержания 2-оксокислот в метанол-уксусных экстрактах мозга крыс, что позволяет расширить область применения ВЭЖХ определения 2-оксокислот не только для биологических жидкостей, но и в экстрактах тканей животных. Мы полагаем, что тонкий анализ содержания 2-оксокислот, являющихся низкомолекулярными индикаторами отдельных узлов метаболизма, позволит прогнозировать пути продукции энергии из углеводов и аминокислот в дополнении к ранее разработанным методам определения свободных аминокислот в гомогенатах мозга [20–22].

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Все использованные реактивы обладали наивысшей доступной чистотой. Они были приобретены у следующих производителей: 2,4-динитрофенилгидразина гидрохлорид (99%, кат. № 162325.1608, «PanReac», Испания), ацетонитрил (HPLC-gradient grade, кат. № 221881.1611, «PanReac»), фосфорная кислота, концентрированная для ВЭЖХ (для HPLC, 85–90%, кат. № 79606-500ML, «Honeywell Fluka», США), метанол (кат. № 106018, 99,8% чистоты, «Supelco», Германия), хлороформ (кат. № 102444, 99,8% чистоты, «Supelco»), пируват (кат. № 106619, 99% чистоты, «Merck»), уксусная кислота (кат. № 161008, 99,5% чистоты, «Panreac»), KH_2PO_4 (#A1043, 99,5% чистоты, Biochimica, «PanReac»),

остальные органические соединения – «Sigma-Aldrich» (США), включая стандарты 2-оксокислот, в частности, 2-оксомалонат (кат. № K4625, 98% чистоты), 2-оксоглутарат (кат. № K1750, 98,5% чистоты), 4-метилтио-2-оксобутират (кат. № K6000, 97% чистоты) и глиоксилат (кат. № G4627, 98% чистоты). Пируват и 4-метилтио-2-оксобутират использовались в виде натриевых солей, 2-оксомалонат – в виде моногидрата динатриевой соли, 2-оксоглутарат – в виде кислоты, а глио-ксилат – в виде моногидрата кислоты. Для приготовления растворов использовали деионизированную воду (Millipore Milli-Q PLUS, $R \geq 18,2 \text{ МОМ}\cdot\text{см}$).

Приготовление растворов. Для приготовления дериватирующей смеси к 10 мл ацетонитрила добавляли 10 мкл 85%-ной фосфорной кислоты, вносили навеску 10 мг 2,4-динитрофенилгидразина гидрохлорида. Для приготовления исходного раствора стандартов 2-оксокислот (2 мМ) в 1,5-миллитровые пробирки помещали по 10 мкл концентрированных (100 мМ) растворов Glx, Pуг, 2-OM, 2-OG и МТОВ, добавляли 450 мкл воды. Для приготовления раствора сравнения (50 мкМ) в пробирки помещали 10 мкл исходного раствора стандартов 2-оксокислот (2 мМ) и добавляли 390 мкл воды. Для приготовления испытуемых растворов в пробирки помещали 150 мкл раствора образца, холостого раствора (вода) или раствора сравнения, 150 мкл дериватирующего раствора и инкубировали при комнатной температуре в течение 2 ч.

Хроматографический анализ DNPН-производных 2-оксокислот. Хроматографию осуществляли с использованием ВЭЖХ-системы Agilent 1200 с диодноматричным детектором («Agilent», США) и колонки Synergi Max-RP 250 мм × 4,6 мм («Phenomenex», США), с размером частиц сорбента 5 мкм при температуре 25 °С. Скорость потока составляла 1 мл/мин. Детекцию проводили спектрофотометрически при длине волны 360 нм. Остальные хроматографические условия определяли в процессе разработки метода.

Получение метанол-уксусных экстрактов мозга крыс и удаление липидной фракции. Экстракты коры головного мозга самцов крыс линии Wistar готовили с использованием метанола и уксусной кислоты согласно опубликованной методике [20]. Вкратце, хранившуюся при –70 °С ткань гомогенизировали в 8-кратном объеме ледяного метанола. Полученный гомогенат разводили в 2,5 раза 0,2%-ной уксусной кислотой, перемешивали в шейкере Excella E24 («New Brunswick Scientific», Германия) во льду в течение 30 мин при 180 об./мин. Денатурированные белки уда-

ляли центрифугированием в течение 20 мин при 21 500 *g* и 4 °С. Супернатант отбирали в чистые охлажденные пробирки и хранили при –70 °С. Перед анализом из экстрактов удаляли липидную фракцию с помощью экстракции хлороформом [23] с модификациями, использовавшимися для экстракции метаболитов из животных клеток [24]. Так, метанол-уксусный экстракт смешивали с одним объемом хлороформа, тщательно встряхивали в течение 1 мин и центрифугировали в течение 5 мин при 3500 *g*. Верхнюю фракцию, содержащую полярные соединения, аккуратно отделяли от нижней липидной фракции, разделяли на 2 мл аликвоты и высушивали с помощью вакуумного концентратора Eppendorf Concentrator Plus («Хеликон», Россия) при комнатной температуре. Высушенные аликвоты полярной фракции хранили при температуре –70 °С до проведения анализа. Непосредственно перед анализом аликвоты разводили в 200 мкл 50 мМ калий-фосфатного буфера, рН 6,0.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Разработка ВЭЖХ метода разделения DNPН-производных 2-оксокислот. Для выбора оптимального значения рН подвижной фазы была использована программа ACD/Phys Chem History версия 2020.2.0 («ACD/Labs», Канада). На основании структур химических соединений программа рассчитывает для каждого соединения значения *pK* и *logD* – гидрофобность (распределение октанол/вода), определенную с учетом рН раствора. В результате при выбранном значении рН, при котором все исследуемые компоненты имеют одну доминирующую ионную форму, различия в *logD* способствуют удовлетворительному разделению компонентов в условиях ОФ ВЭЖХ. При этом нужно учитывать рН-диапазон, в котором производителем допускается использовать выбранную хроматографическую колонку. Распределения ионных форм 2-оксокислот в зависимости от рН для каждого из шести соединений (5 производных 2-оксокислот и свободный дериватирующий агент) приведены на рис. 1.

Расчётная зависимость содержания доминирующей ионной формы соединения от рН среды для всех шести соединений представлена на рис. 2, *а*. Показано, что максимальное содержание доминирующей ионной формы для всех шести соединений наблюдается в диапазоне от 5,9 до 6,2. Зависимость гидрофобности (*logD*) от рН среды всех компонентов (рис. 2, *б*) подтверждает, что для достижения лучшего разделения компонентов предпочтительное значение рН

около 6,0. Наибольшее значение *logD* имеет свободный DNPН и можно предположить, что пики всех оставшихся пяти анализируемых компонентов будут иметь время удерживания меньше, чем пик DNPН. Выбранная для анализа колонка Synergi Max-RP допускает использование подвижной фазы с рН в диапазоне 1,5–10. Выбранное значение рН 6,0 находится в допустимом диапазоне.

На основании представленных на рис. 2 данных была выбрана подвижная фаза А: 15 мМ калия фосфат, рН 6,0 в воде. В качестве сильного элюента использовали 100% ацетонитрил. Для оптимизации градиента ацетонитрила использовали программу ACD/AutoChrom 2020.2.0 («ACD/Labs»). Для построения моделей зависимости удерживания каждого пика от концентрации ацетонитрила были проведены 3 градиентных разделения в условиях, указанных в табл. 1. В таблице приведены рассчитанные и экспериментальные времена удерживания пиков анализируемых компонентов. Идентификацию пиков осуществляли на основании анализа продуктов дериватизации каждой отдельной 2-оксокислоты (рис. 3, *а*). Видно, что большинство 2-оксокислот образуют 2 пика производных с DNPН, вероятно, по причине наличия цис-транс изомеров (далее обозначены как -1 и -2).

Из таблицы видно, что линейная двухпараметрическая модель $\ln k' = a + b \times X$ (где *k'* – коэффициент емкости, *X* – содержание ацетонитрила в подвижной фазе, *a* и *b* – коэффициенты регрессии) удовлетворительно описывает данные, полученные по 3 экспериментальным градиентам. Предсказанный оптимальный градиент 20–40% ацетонитрила за 15 мин был реализован с модификацией подвижной фазы А: ацетонитрил/вода (20 : 80) и 12 мМ калия фосфат, рН 6,0. Градиентная программа в этом случае имеет вид, приведенный в табл. 2.

Результаты анализа модельной смеси (рис. 3, *б*) с использованием этой градиентной программы показывают достаточное разрешение (> 1,0) компонентов: 2-ОМ (3,5), 2-ОГ (9,8), МТОВ (1,7), Glx-1 (13,1), Glx-2 (10,1) и Руг-1 (16,0).

Полученные валидационные характеристики подобранного метода разделения представлены в табл. 3.

Оказалось, что для веществ, образующих 2 пика продуктов дериватизации, площади индивидуальных пиков обладают большей изменчивостью по сравнению с суммой площадей пиков. На основании полученных валидационных характеристик можно сделать вывод, что метод позволяет с достаточно большой точностью определять все исследованные 2-оксокислоты,

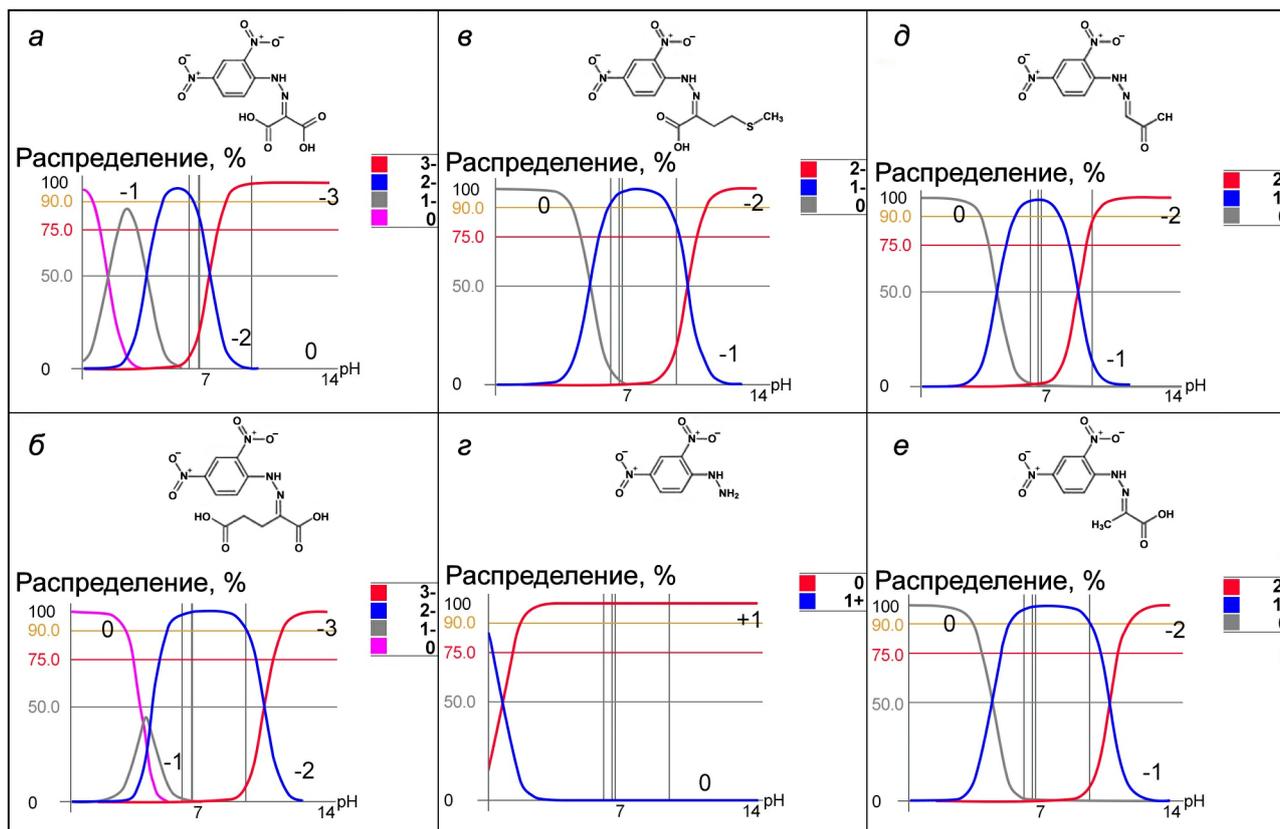


Рис. 1. pH-Зависимость распределения ионных форм 2-ОМ-DNPH (а), 2-ОГ-DNPH (б), МТОВ-DNPH (в), DNPH (з), Glx-DNPH (д) и Pux-DNPH (е). Цифрами рядом с кривыми обозначен заряд ионных форм

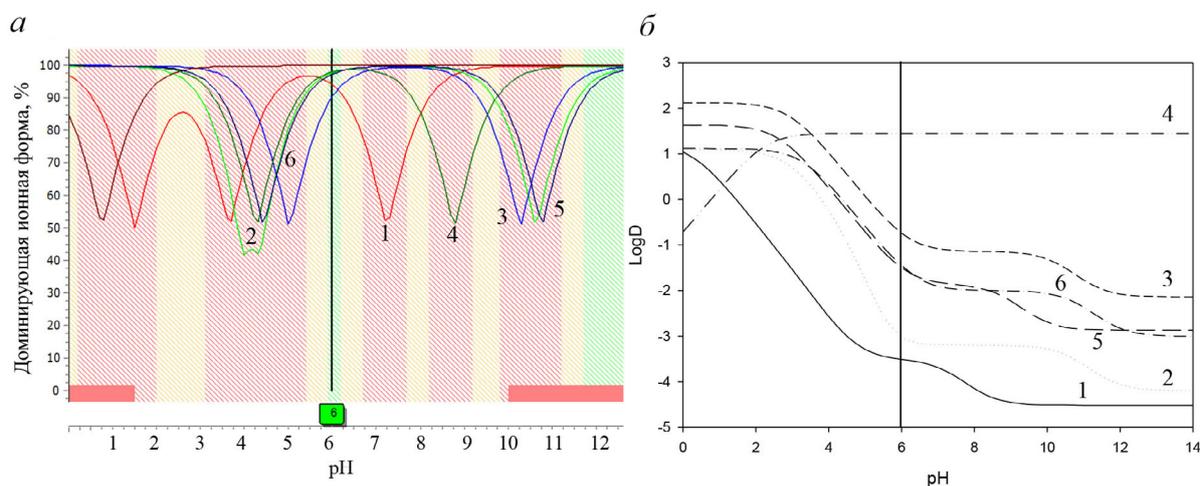


Рис. 2. а – pH-Зависимость распределения доминирующих ионных форм шести соединений; б – pH-зависимость распределения октанол/вода ($\log D$) шести соединений: 2-ОМ-DNPH (1), 2-ОГ-DNPH (2), МТОВ-DNPH (3), DNPH (4), Glx-DNPH (5) и Pux-DNPH (6). Вертикальной линией обозначено выбранное рабочее значение pH среды. Участки за пределами рабочего диапазона отмечены красным цветом. Расчеты проведены с помощью ACD/Phys Chem History

кроме серосодержащей МТОВ, обладающей недостаточными стабильностью и разрешимостью второго пика с пиком дериватизирующего агента (DNPH).

Анализ 2-оксокислот в образцах гомогенатов мозга крыс. Несмотря на стабильность и надежность метода, количественное определение содержания 2-оксокислот в биологических жид-

Таблица 1. Рассчитанные и экспериментальные времена удерживания пиков анализируемых компонентов, полученные по исходным градиентным программам

Условия ОФ ВЭЖХ*	Тип	Glx-1	Glx-2	Pyг-1	Pyг-2	МТОВ-1	МТОВ-2	2-OG	2-OM	DNPH
5–50% (20 мин)	модель	14,9	18,0	16,5	19,8	19,5	24,1	13,4	12,6	22,7
	опыт	15,5	18,2	17,1	19,9	19,1	24,1	14,2	13,4	22,9
5–50% (40 мин)	модель	21,5	25,5	24,5	30,3	28,3	35,9	19,6	17,7	33,6
	опыт	21,4	25,4	24,6	30,4	28,2	35,9	19,5	17,3	33,7
20–60% (30 мин)	модель	9,0	13,4	11,4	16,3	15,6	22,2	6,7	5,7	20,2
	опыт	8,9	13,3	11,2	16,2	15,8		6,6	5,7	20,1
20–40% (1 мин); 40–60% (5 мин)	модель	9,0	13,4	11,4	16,3	15,6	21,8	6,7	5,7	20,2

* Приведены условия градиента ацетонитрила; подвижная фаза: 15 мМ калия фосфат, pH 6,0.

костях и тканях методом ВЭЖХ далеко не всегда представляет собой простую задачу. Первая проблема связана с корректной пробоподготовкой. Это, в первую очередь, полнота осаждения белков с использованием специальных реагентов и необходимость удаления примесных компонентов, прежде всего липидной природы, мешающих последующему анализу. И в этом отношении подготовка проб из мозга животных представляет особую сложность, связанную с высоким содержанием липидов разной природы. Несмотря на подбор условий максимально возможного удаления липидной составляющей мозга, даже незначительное остаточное содержание липидов в образцах для анализа, как показал наш опыт работы, достаточно быстро снижает хроматографические качества колонки.

Предложенные условия хроматографического разделения 2-оксокислот были использованы

для измерения содержания указанных соединений в метанол-уксусных экстрактах головного мозга животных (пример хроматограммы для одного из испытуемых образцов приведен на рис. 4).

Усреднение результатов анализов экстрактов из образцов мозга разных крыс (табл. 4) показало, что содержание 2-оксокислот дает сходимые результаты: для исследованных образцов стандартная ошибка среднего составляет: 8, 13, 17, 20 и 22% от среднего значения для 2-OM, МТОВ, Pyг, 2-OG и Glx соответственно. Наблюдаемые высокие значения дисперсии для части соединений (Glx, 2-OG и Pyг), предположительно, обусловлены индивидуальными особенностями метаболизма в головном мозге.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Систематическое исследование метаболомов, метаболомика, – безусловно, перспективное развивающееся направление, по влиянию в мире претендующее на одинаковые позиции с геномикой и протеомикой, однако банк данных метаболомов еще сравнительно мал, а для количественного анализа конкретного аналита требуется персональная аналитическая методика количественного определения. Зачастую более показательно использование таргетированного подхода, такого как измерение небольшого числа 2-оксокислот.

Ранние методы, используемые для количественного определения 2-оксокислот в клиничес-

Таблица 2. Оптимизированная градиентная программа

Время, мин	Состав подвижной фазы		Режим элюирования
	А, %	Б, %	
0 → 15	100 → 75	0 → 25	линейный градиент
15 → 20	75	25	изократический режим
20 → 22	75 → 100	25 → 0	линейный градиент
22 → 30	100	0	изократический режим

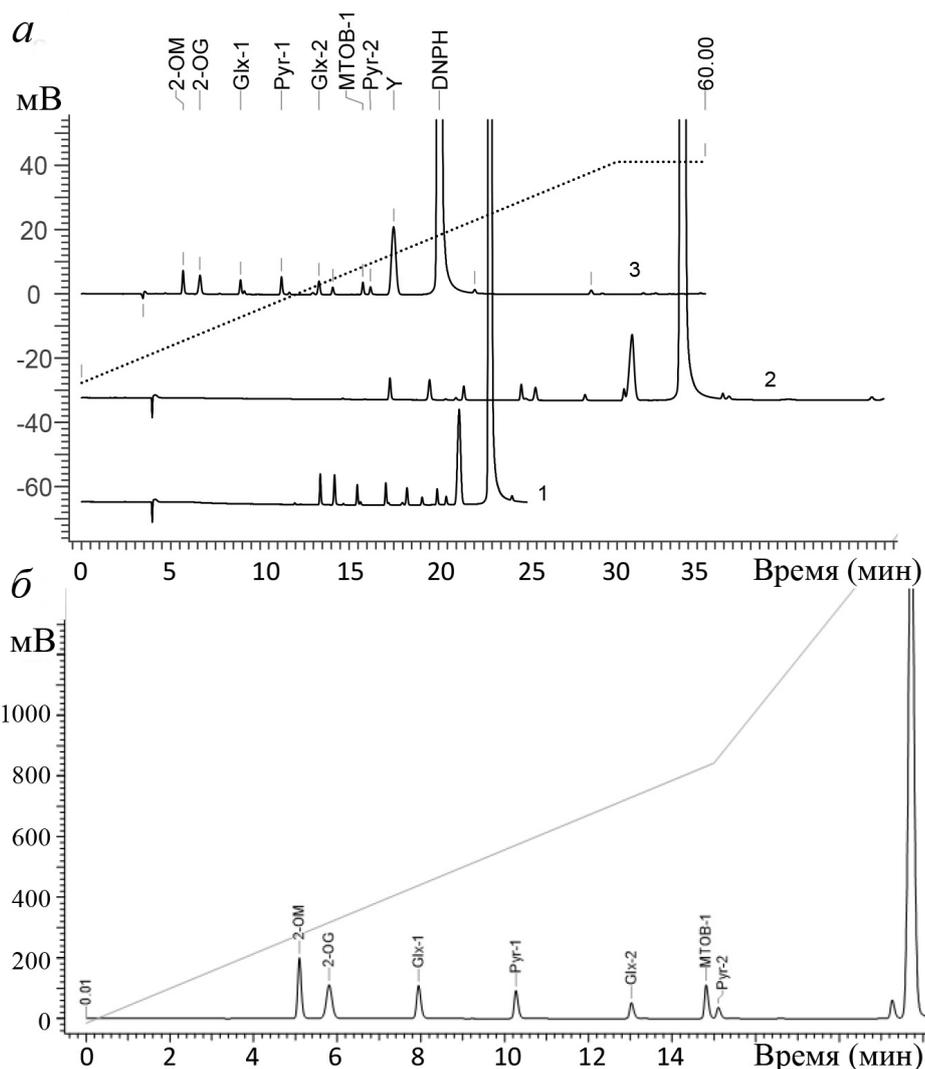


Рис. 3. а – Хроматограммы для построения моделей зависимости удерживания смеси 2-оксокислот от концентрации ацетонитрила в подвижной фазе. Градиент 5–50% (Б) за 20 мин (1), градиент 5–50% (Б) за 40 мин (2), градиент 20–60% (Б) за 30 мин (3). б – Хроматограмма модельной смеси 2-оксокислот, полученная с использованием оптимизированной градиентной программы (условия представлены в табл. 2). Пик Y – побочный продукт дериватизации 2-оксокислот (не идентифицирован)

ких и научных лабораториях, были основаны на ферментативных NADH-зависимых реакциях с последующей регистрацией изменения поглощения или флуоресценции. Реакции этого типа легко проводимы и достаточно надежны как минимум для одностадийных методик. Многостадийные методы менее используемы; они зачастую требуют дополнительных веществ и ферментов и, следовательно, более дорогие и менее надежные. Тем не менее большинство ферментативных тестов применимо для количественного определения только одного вещества одновременно. Вышеупомянутые трудности в детекции 2-оксокислот удавалось частично разрешить при использовании аналитической ВЭЖХ

совместно с дериватизацией анализируемых соединений [10, 11]. Так, в случае *o*-фенилендиамина, 2-оксокислотные производные которого могут быть детектированы спектрофотометрически или флуориметрически [16], результаты хроматографического анализа 2-оксокислот с разветвленной цепью (2-оксоизовалерата, 2-оксокизокапроата и 2-оксо-3-метилвалерата) в плазме крови давали схожие результаты с традиционным ферментативным методом [35], что позволило использовать его для определения и других 2-оксокислот [17, 36]. Производное *o*-фенилендиамина, 4,5-метилendioкси-1,2-диаминобензол, также зарекомендовал себя в качестве дериватирующего агента ввиду более

Таблица 3. Валидационные характеристики разработанного метода

Параметр валидации	Критерий приемлемости	Значения				
		2-OM	2-OG	МТОВ-1	Glx-1 + Glx-2	Pyг-1 + Pyг-2
Линейность в аналитическом диапазоне 1-200 мкМ	коэффициент корреляции (R) $\geq 0,99$	0,99	0,99	0,99	0,99	0,99
		98,7%	99,8%	107,6%	99,4%	106,0%
Правильность в аналитическом диапазоне 1-200 мкМ	среднее значение восстановления должно быть от 90,0 до 110,0%	2,5%	3,3%	10,8%	2,5%	8,5%
	коэффициент вариации (RSD) $\leq 15,0\%$					
Предел количественного определения	минимальная концентрация, при которой отношение сигнал/шум ≥ 10	Среднее отношение сигнал/шум пиков 2-оксокислот при концентрации 1 мкМ				
		141	111	89	97 / 25	90 / 18
Стабильность аналитических растворов при комнатной температуре	отклонение площадей, рассчитанное для 24 ч относительно «нулевой» точки, не должно превышать 10,0%	2,3%	2,3%	-25,0%	2,5%	2,0%

высокой чувствительности методик с его использованием [6]. Однако, несмотря на наличие исследований, использующих фенилгидразин для ОФ ВЭЖХ определения 2-оксокислот в биологических образцах [10, 11], работы с применением его более стабильного производного, DNPН, отсутствуют.

Определенное в нашей работе с помощью ОФ ВЭЖХ и DNPН среднее содержание пирувата в головном мозге крысы близко к таковому, определенному с помощью ферментативных методов по данным литературы (табл. 4). Glx в норме не детектируется в головном мозге (табл. 4), как и в других тканях, за исключением

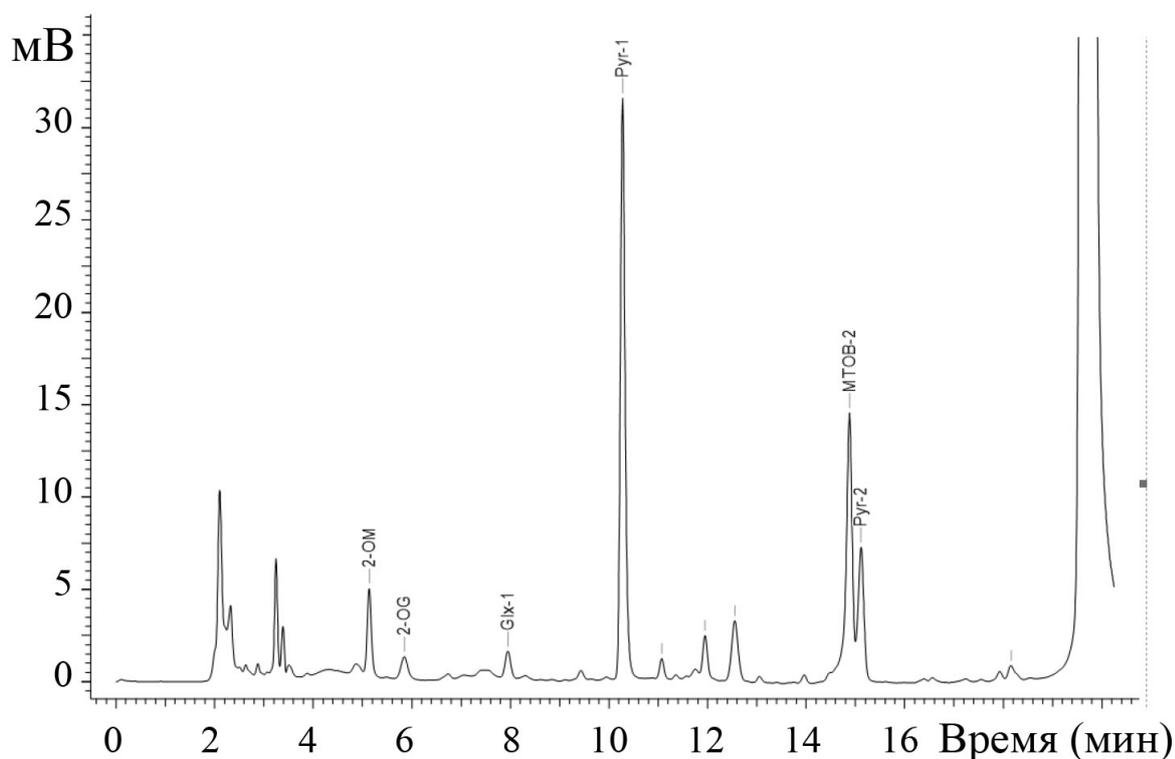


Рис. 4. Хроматографическое разделение 2-оксокислот в экстракте головного мозга крысы с использованием разработанной градиентной программы (рис. 3, б и табл. 2)

Таблица 4. Сравнение содержания 2-оксокислот в головном мозге крысы, полученных в настоящем исследовании, с литературными данными

2-Оксокислоты	Метод	Значения, нмоль/г	Ссылки
Pyr	ВЭЖХ с DNPH	86 ± 14	данная работа
	спектрофотометрия с ЛДГ	129 ± 22	[25–27]
	флюориметрия с ЛДГ	115 ± 6	[28–32]
	флюориметрия с пируватоксидазой и Amplex Red	56	[33]
	экстракция производного с DNPH	59	[34]
2-OG	ВЭЖХ с DNPH	2,6 ± 0,5	данная работа
	спектрофотометрия с ГДГ	190	[27]
	флюориметрия с ГДГ	115 ± 4	[28, 29, 31]
Glx	ВЭЖХ с DNPH	3,1 ± 0,7	данная работа
	бумажная хроматография с DNPH	<1	[34]
МТОВ	ВЭЖХ с DNPH	38 ± 5	данная работа
2-OM	ВЭЖХ с DNPH	5,0 ± 0,4	данная работа

Примечание. ЛДГ – лактатдегидрогеназа, ГДГ – глутаматдегидрогеназа.

почек, однако может определяться при тиаминном дефиците у животных [34]. Измерение содержания 2-ОМ и МТОВ в мозге животных не описано в литературе, хотя концентрация последнего в плазме здоровых людей составляет порядка 0,15 мкМ [37]. Тем не менее при анализе экстрактов мозга крыс измеряемая концентрация 2-ОГ была много ниже концентрации Pyr, несмотря на их близкое содержание в мозге согласно данным литературы (табл. 4). Эта особенность может свидетельствовать об исчезновении 2-ОГ на разных стадиях анализа. Причинами низких уровней данного метаболита в анализируемых экстрактах мозга могут быть низкое содержание 2-ОГ в мозге по сравнению с другими тканями, потери 2-ОГ при хранении и высушивании экстрактов, быстрая деградация данного метаболита в промежутке между декапитацией и полной заморозкой коры больших полушарий (не более нескольких минут). Так, одной из причин низкого содержания 2-ОГ в экстрактах мозга может быть его восстановительное аминирование до глутамата, которое в том числе может идти неферментативно в метанол-содержащих экстрактах тканей с использованием пиридоксамина, и в особенности мочевины, в качестве доноров аминогруппы [38]. В некоторых работах наблюдали миллимолярные концентрации мочевины в мозге млекопитающих

[39], что на порядок выше концентрации 2-оксоглутарата по данным литературы (табл. 4). Таким образом, нельзя исключить неферментативное превращение 2-ОГ в глутамат при пробоподготовке и хранении метанол-уксусных экстрактов.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В данной работе предложен новый метод ОФ ВЭЖХ для измерения уровней 2-оксокислот, Glx, 2-ОГ, 2-ОМ, Pyr и МТОВ, использующий спектрофотометрическую детекцию продуктов химической дериватизации 2-оксокислот 2,4-динитрофенилгидразином. Определены валидационные характеристики метода и содержание 2-оксокислот в метанол-уксусных экстрактах мозга крыс. В дополнение к ранее разработанным методам определения аминокислот [20, 21] данный метод количественного определения 2-оксокислот может быть полезен для определения маркерной роли 2-оксокислот во взаимодействии путей метаболизма углеводов и аминокислот. Известно, что именно в таких узлах пересечения метаболизма локализованы полиферментные комплексы дегидрогеназ 2-оксокислот, которые являются основными регуляторами концентрации данных молекул в

клетках в силу осуществляемых комплексами процессов необратимой деградации 2-оксокислот. Более того, в случае нейродегенеративных заболеваний показано снижение функций 2-оксоглутаратдегидрогеназного и пируватдегидрогеназного комплексов, связанное с характерным для таких патологий метаболическим стрессом [40]. Информация об уровнях 2-оксокислот, в дополнение к определению аминокислот и ферментативных активностей в образцах, будет способствовать лучшему пониманию метаболизма головного мозга животных в норме и при патологических состояниях.

Финансирование. Работа поддержана грантом РНФ № 18-14-00116 (руководитель В.И. Буник).

Благодарности. Авторы выражают благодарность А.В. Граф (НИИ физико-химической биологии и биологический факультет МГУ имени М.В. Ломоносова) за предоставленные образцы коры головного мозга крыс.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

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

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Graham, D. E. (2011) 2-oxoacid metabolism in methanogenic CoM and CoB biosynthesis, *Methods Enzymol.*, **494**, 301-326, doi: 10.1016/B978-0-12-385112-3.00015-9.
- Muhling, J., Paddenberg, R., Hempelmann, G., and Kummer, W. (2006) Hypobaric hypoxia affects endogenous levels of alpha-keto acids in murine heart ventricles, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **342**, 935-939, doi: 10.1016/j.bbrc.2006.02.054.
- Hutson, S. M., and Harper, A. E. (1981) Blood and tissue branched-chain amino and alpha-keto acid concentrations: Effect of diet, starvation, and disease, *Am. J. Clin. Nutr.*, **34**, 173-183, doi: 10.1093/ajcn/34.2.173.
- Hoang, M., and Joseph, J. W. (2020) The role of alpha-ketoglutarate and the hypoxia sensing pathway in the regulation of pancreatic beta-cell function, *Islets*, **12**, 108-119, doi: 10.1080/19382014.2020.1802183.
- Kronberger, L., Semmelrock, H. J., Schaur, R. J., Schauenstein, E., Schreibmayer, W., et al. (1980) Tumor host relations. VI. Is alpha-ketoglutarate a tumor marker? Association with tumor extent in humans – correlation with tumor size in rats, *J. Cancer Res. Clin. Oncol.*, **97**, 295-299, doi: 10.1007/BF00405781.
- Shibata, K., Nakata, C., and Fukuwatari, T. (2016) High-performance liquid chromatographic method for profiling 2-oxo acids in urine and its application in evaluating vitamin status in rats, *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **80**, 304-312, doi: 10.1080/09168451.2015.1083395.
- Bertrand, M., Decoville, M., Meudal, H., Birman, S., and Landon, C. (2020) Metabolomic nuclear magnetic resonance studies at presymptomatic and symptomatic stages of Huntington's disease on a Drosophila model, *J. Proteome Res.*, **19**, 4034-4045, doi: 10.1021/acs.jproteome.0c00335.
- Kondoh, H., Teruya, T., and Yanagida, M. (2020) Metabolomics of human fasting: new insights about old questions, *Open Biol.*, **10**, 200176, doi: 10.1098/rsob.200176.
- Losman, J. A., Koivunen, P., and Kaelin, W. G., Jr. (2020) 2-Oxoglutarate-dependent dioxygenases in cancer, *Nat. Rev. Cancer*, **20**, 710-726, doi: 10.1038/s41568-020-00303-3.
- Petrarulo, M., Pellegrino, S., Bianco, O., Marangella, M., Linari, F., et al. (1988) High-performance liquid chromatographic determination of glyoxylic acid in urine, *J. Chromatography*, **432**, 37-46, doi: 10.1016/s0378-4347(00)80631-3.
- Lange, M., and Malysz, M. (1994) Fast method for the simultaneous determination of 2-oxo acids in biological fluids by high-performance liquid chromatography, *J. Chromatography. B Biomed. Appl.*, **662**, 97-102, doi: 10.1016/0378-4347(94)00383-1.
- Tonhazy, N. E., White, N. G., and Umbreit, W. W. (1950) A rapid method for the estimation of the glutamic-aspartic transaminase in tissues and its application to radiation sickness, *Arch. Biochem.*, **28**, 36-42.
- Reitman, S., and Frankel, S. (1957) A colorimetric method for the determination of serum glutamic oxalacetic and glutamic pyruvic transaminases, *Am. J. Clin. Pathol.*, **28**, 56-63, doi: 10.1093/ajcp/28.1.56.
- De Ochs, S. M., Fasciotti, M., Barreto, R. P., de Figueiredo, N. G., Albuquerque, F. C., et al. (2010) Optimization and comparison of HPLC and RRLC conditions for the analysis of carbonyl-DNPH derivatives, *Talanta*, **81**, 521-529, doi: 10.1016/j.talanta.2009.12.036.
- Wahed, P., Razzaq, M. A., Dharmapuri, S., and Corrales, M. (2016) Determination of formaldehyde in food and feed by an in-house validated HPLC method, *Food Chem.*, **202**, 476-483, doi: 10.1016/j.foodchem.2016.01.136.
- Singh, B. K., Szamosi, I., and Shaner, D. (1993) A high-performance liquid chromatography assay for threonine/serine dehydratase, *Anal. Biochem.*, **208**, 260-263, doi: 10.1006/abio.1993.1043.
- Hayashi, T., Tsuchiya, H., Todoriki, H., and Naruse, H. (1982) High-performance liquid chromatographic determination of alpha-keto acids in human urine and plasma, *Anal. Biochem.*, **122**, 173-179, doi: 10.1016/0003-2697(82)90267-6.
- Martis, S., Droux, B. M., Deboudard, F., Nasser, W., Meyer, S., et al. (2020) Separation and quantification of 2-Keto-3-deoxy-gluconate (KDG) a major metabolite in pectin and alginate degradation pathways, *Anal. Biochem.*, **619**, 114061, doi: 10.1016/j.ab.2020.114061.
- Marangella, M., Petrarulo, M., Bianco, O., Vitale, C., Finocchiaro, P., et al. (1991) Glycolate determination detects type I primary hyperoxaluria in dialysis patients, *Kidney Int.*, **39**, 149-154, doi: 10.1038/ki.1991.19.
- Ksenofontov, A. L., Boyko, A. I., Mkrtychyan, G. V., Tashlitsky, V. N., Timofeeva, A. V., et al. (2017) Analysis of free amino acids in mammalian brain extracts, *Biochemistry (Moscow)*, **82**, 1183-1192, doi: 10.1134/S000629791710011X.
- Trofimova, L., Ksenofontov, A., Mkrtychyan, G., Graf, A., Baratova, L., et al. (2016) Quantification of rat brain amino acids, *Anal. Data Consistency*, **12**, 349-356, doi: 10.2174/1573411011666151006220356.
- Artiukhov, A. V., Kazantsev, A. V., Lukashev, N. V., Bellinzoni, M., and Bunik, V. I. (2020) Selective inhibition of 2-oxoglutarate and 2-oxoadipate dehydrogenases by the phosphonate analogs of their 2-oxo acid substrates, *Front. Chem.*, **8**, 596187, doi: 10.3389/fchem.2020.596187.

23. Bligh, E. G., and Dyer, W. J. (1959) A rapid method of total lipid extraction and purification, *Can. J. Biochem. Physiol.*, **37**, 911-917, doi: 10.1139/o59-099.
24. Trofimova, L. K., Araujo, W. L., Strokina, A. A., Fernie, A. R., Bettendorff, L., et al. (2012) Consequences of the alpha-ketoglutarate dehydrogenase inhibition for neuronal metabolism and survival: Implications for neurodegenerative diseases, *Curr. Med. Chem.*, **19**, 5895-5906, doi: 10.2174/092986712804143367.
25. Schenker, S., McCandless, D. W., Brophy, E., and Lewis, M. S. (1967) Studies on the intracerebral toxicity of ammonia, *J. Clin. Invest.*, **46**, 838-848, doi: 10.1172/JCI105583.
26. Dale, R. A. (1965) Effects of sampling procedures on the contents of some intermediate metabolites of glycolysis in rat tissues, *J. Physiol.*, **181**, 701-711, doi: 10.1113/jphysiol.1965.sp007792.
27. Miller, A. L., Hawkins, R. A., Harris, R. L., and Veech, R. L. (1972) The effects of acute and chronic morphine treatment and of morphine withdrawal on rat brain *in vivo*, *Biochem. J.*, **129**, 463-469, doi: 10.1042/bj1290463.
28. Goldberg, N. D., Passonneau, J. V., and Lowry, O. H. (1966) Effects of changes in brain metabolism on the levels of citric acid cycle intermediates, *J. Biol. Chem.*, **241**, 3997-4003.
29. Holowach, J., Kauffman, F., Ikossi, M. G., Thomas, C., and McDougal, D. B., Jr. (1968) The effects of a thiamine antagonist, pyriethamine, on levels of selected metabolic intermediates and on activities of thiamine-dependent enzymes in brain and liver, *J. Neurochem.*, **15**, 621-631, doi: 10.1111/j.1471-4159.1968.tb08961.x.
30. Gardiner, M., Smith, M. L., Kagstrom, E., Shohami, E., and Siesjo, B. K. (1982) Influence of blood glucose concentration on brain lactate accumulation during severe hypoxia and subsequent recovery of brain energy metabolism, *J. Cereb. Blood Flow Metab.*, **2**, 429-438, doi: 10.1038/jcbfm.1982.49.
31. Folbergrova, J., MacMillan, V., and Siesjo, B. K. (1972) The effect of hypercapnic acidosis upon some glycolytic and Krebs cycle-associated intermediates in the rat brain, *J. Neurochem.*, **19**, 2507-2517, doi: 10.1111/j.1471-4159.1972.tb01310.x.
32. Thurston, J. H., Hauhart, R. E., and Schiro, J. A. (1983) Lactate reverses insulin-induced hypoglycemic stupor in suckling-weanling mice: Biochemical correlates in blood, liver, and brain, *J. Cereb. Blood Flow Metab.*, **3**, 498-506, doi: 10.1038/jcbfm.1983.77.
33. Soto, M., Orliaguet, L., Reyzer, M. L., Manier, M. L., Caprioli, R. M., et al. (2018) Pyruvate induces torpor in obese mice, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **115**, 810-815, doi: 10.1073/pnas.1717507115.
34. Liang, C. C. (1962) Studies on experimental thiamine deficiency. Trends of keto acid formation and detection of glyoxylic acid, *Biochem. J.*, **82**, 429-434, doi: 10.1042/bj0820429.
35. Schadewaldt, P., Hummel, W., Trautvetter, U., and Wendel, U. (1989) A convenient enzymatic method for the determination of 4-methyl-2-oxopentanoate in plasma: Comparison with high performance liquid chromatographic analysis, *Clin. Chim. Acta*, **183**, 171-182, doi: 10.1016/0009-8981(89)90333-1.
36. Wendel, U., Even, G., Langenbeck, U., Schadewaldt, P., and Hummel, W. (1992) Determination of (S)- and (R)-2-oxo-3-methylvaleric acid in plasma of patients with maple syrup urine disease, *Clin. Chim. Acta*, **208**, 85-91, doi: 10.1016/0009-8981(92)90024-k.
37. Blom, H. J., Ferenci, P., Grimm, G., Yap, S. H., and Tangerman, A. (1991) The role of methanethiol in the pathogenesis of hepatic encephalopathy, *Hepatology*, **13**, 445-454.
38. Wiese, E. K., Hitosugi, S., Buhrow, S. A., Loa, S. T., Sreedhar, A., et al. (2020) Reductive amination of alpha-Ketoglutarate in metabolite extracts results in glutamate overestimation, *J. Chromatogr. A*, **1623**, 461169, doi: 10.1016/j.chroma.2020.461169.
39. Arieff, A. I., Massry, S. G., Barrientos, A., and Kleeman, C. R. (1973) Brain water and electrolyte metabolism in uremia: Effects of slow and rapid hemodialysis, *Kidney Int.*, **4**, 177-187, doi: 10.1038/ki.1973.100.
40. Bunik, V. (2017) *Vitamin-Dependent Multienzyme Complexes of 2-Oxo Acid Dehydrogenases: Structure, Function, Regulation and Medical Implications*, Nova Science Publisher.

ANALYSIS OF THE 2-OXO ACIDS CONTENT IN RAT BRAIN EXTRACTS USING HIGH-PERFORMANCE LIQUID CHROMATOGRAPHY

V. N. Tashlitsky¹, A. V. Artiukhov^{2,3}, N. V. Fedorova², M. A. Sukonnikov¹,
A. L. Ksenofontov^{2*}, V. I. Bunik^{2,3,4}, and L. A. Baratova^{2*}

¹ Faculty of Chemistry, Lomonosov Moscow State University, 119991 Moscow, Russia

² Belozersky Institute of Physicochemical Biology, Lomonosov Moscow State University, 119991 Moscow, Russia; e-mail: baratova@belozersky.msu.ru, ksenofon@belozersky.msu.ru

³ Sechenov University, Department of Biochemistry, 119991 Moscow, Russia

⁴ Faculty of Bioengineering and Bioinformatics, Lomonosov Moscow State University, 119991 Moscow, Russia

2-Oxo acids are involved in a number of important metabolic processes and can be used as biomarkers for a number of human diseases. The paper analyzes the available methods for determining the content of 2-oxo acids in the mammalian brain according to the literature. An optimized method for high-performance liquid chromatography of 2,4-dinitrophenylhydrazine derivatives of 2-oxo acids has been developed. Due to their high chemical stability, the 2,4-dinitrophenylhydrazine derivatives have shown a number of advantages, in comparison with previously used phenylhydrazine derivatives. The validation characteristics of the method are determined. The issues of sample preparation during the analysis of mammalian brain extracts are discussed. Using the derivatizing agent, the concentrations of pyruvate, glyoxylate, 2-oxoglutarate, 2-oxomalonnate, and 4-methylthio-2-oxobutyrate were measured in methanol-acetic extracts of rat brain. The developed method facilitates studying of subtle changes in the cell and tissue content of 2-oxo acids as indicators of metabolism.

Keywords: HPLC, 2-oxo acids, rat brain extracts, 2,4-dinitrophenylhydrazine, method validation

НОНСЕНС-МУТАЦИИ У ЭУКАРИОТ

Обзор

© 2022 Н.А. Потапова

*Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт проблем передачи информации имени А.А. Харкевича Российской академии наук (ИППИ РАН), 127051 Москва, Россия;
электронная почта: nadezhdalpotapova@gmail.com*

Поступила в редакцию 12.01.2022

После доработки 14.02.2022

Принята к публикации 22.03.2022

Нонсенс-мутации представляют собой мутации, в результате которых появляется стоп-кодон. В то время как продолжает оставаться общепринятым рассмотрение этих мутаций как одних из самых вредных, приводящих к преждевременной терминации синтеза белка на рибосоме и, как следствие, к возникновению дефектного полипептида, накапливаются данные, согласно которым не все нонсенс-мутации вредны. Также существуют молекулярные механизмы, которые позволяют нивелировать потенциальное неблагоприятное воздействие данных мутаций. В представленном обзоре рассмотрены актуальные сведения о нонсенс-мутациях в геномах эукариот, характеристиках таковых мутаций и молекулярных механизмах предотвращения или смягчения их неблагоприятных эффектов.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: нонсенс-мутация, стоп-кодон, эукариоты, отрицательный отбор, положительный отбор.

DOI: 10.31857/S0320972522040042, **EDN:** AQHSSS

ВВЕДЕНИЕ

Нонсенс-мутации — это мутации, в результате которых появляется преждевременный стоп-кодон. Их ещё часто называют «преждевременными стоп-кодонами», «преждевременными терминирующими кодонами», а также они являются подмножеством мутаций, называемых «нуль-мутациями» или «нуль-аллелями». Последние из указанных названий были определены ещё в XX веке, когда при проведении электрофоретических исследований белки, кодируемые генами, в которых произошла нонсенс-мутация, практически никогда не обнаруживались.

В норме стоп-кодон обозначает конец транскрипта и именно на нём останавливается трансляция белка. Если в результате нонсенс-мутации появляется преждевременный стоп-кодон, то трансляция преждевременно останавливается уже на нём, и в результате получается укороченный полипептид. Влияние нонсенс-мутации на фенотип может быть совершенно разным, в зависимости от множества характеристик, рассмотренных далее в данном обзоре. Существуют молекулярные механизмы, способствующие деградации транскриптов генов с нонсенс-мутацией и не допускающие её трансляцию. В настоящем обзоре обсуждаются дан-

ные молекулярные механизмы, а также характеристики нонсенс-мутаций, благодаря которым возможно избежать проявления мутаций в фенотипе. Стоит отметить, что и механизмы, и характеристики взаимосвязаны друг с другом в своём влиянии, и можно наблюдать, когда нонсенс-мутация не критична для организма, потому что срабатывает сразу несколько молекулярных «защит». Далее в обзоре будут рассмотрены конкретные примеры их сочетанного функционирования.

Нонсенс-мутации и их влияние на фенотип организма наиболее хорошо изучены для человека и модельных организмов (например, мыши, плодовой мушки), а также животных и растений, используемых в сельском хозяйстве. Поэтому в данном обзоре будут рассмотрены преимущественно примеры для перечисленных организмов, но, при наличии информации для других, она тоже будет представлена.

СТОП-КОДОНЫ У РАЗНЫХ ПРЕДСТАВИТЕЛЕЙ ЭУКАРИОТ

При анализе нонсенс-мутаций необходимо знать генетический код исследуемых организмов. Причина этому заключается в том, что, несмотря на высокую схожесть генетического

кода между представителями разных таксонов, некоторые его вариации всё-таки обнаруживаются, в том числе и для стоп-кодона, а соответственно, и того, что может считаться нонсенс-мутациями. Но, в отличие от прокариот, у которых эта вариация достаточно заметна [1, 2], у эукариот она слабее.

Например, известно, что кодоны UAA, UAG и UGA являются стоп-кодонами у человека и всех позвоночных; кодоны UAA и UAG кодируют глутамин у некоторых представителей амёб (рода *Tetrahymena*, *Paramecium*, *Stylonicia*, *Oxytricus*) [3, 4], диплоноад (например, *Hexamita inflata*) [5] и оксимонад [6]. Это было показано и для кодона UAA у кругоресничных инфузорий *Vorticella microstoma*, *Optisthonica henneguyi* и *O. matiensis*. У некоторых трипаносом можно наблюдать некоторый смешанный, либо переходный, вариант, когда кодоны UAA и UAG способны кодировать и глутамин, и глутаминовую кислоту, и непосредственно стоп-кодон, а UGA кодирует триптофан [7]. Встречается похожее явление и у представителей царства Растений: например, у представителей зелёных водорослей, в том числе *Acetabularia*, кодоны UAA и UAG кодируют глутамин [8, 9]. Причины того, почему чаще всего стоп-кодон начинает кодировать глутамин, обсуждаются в работе [5]. С другими примерами можно ознакомиться в статьях [10–14]. Исходя из перечисленных примеров, становится понятно, насколько важно при анализе нонсенс-мутаций учитывать генетический код изучаемого организма, а также насколько генетический код, касательно стоп-кодонов, может отличаться внутри группы эукариот.

ЧИСЛО НОНСЕНС-МУТАЦИЙ В ГЕНОМАХ ЭУКАРИОТ

Как показывают исследования, в геномах, а точнее, в кодирующих генах, может содержаться разное число нонсенс-мутаций. Зависит это от множества характеристик вида: и размера генома, и размера кодирующей части генома, и истории вида, и его популяционной структуры, и размера популяции [15], и того, живут ли организмы, геномы которых были секвенированы, в природных, либо лабораторных условиях [16], и некоторых других характеристик.

Имеются сведения о среднем числе нонсенс-мутаций в геномах различных видов, подсчитанные на популяционных выборках. Например, у одного человека в генах в среднем имеются 21–27 нонсенс-мутаций [15, 17, 18], у бонобо *Pan paniscus* – примерно 40 нонсенс-мутаций, у восточного шимпанзе *Pan troglodytes schweini*

furthii – 23, у гориллы *Gorilla gorilla gorilla* – 59, а у калимантанского орангутана *Pongo pygmaeus* – 26 нонсенс-мутаций [15]. Геном свиньи *Sus scrofa* содержит около 30 нонсенс-мутаций [19], геном водоросли хламидомонады *Chlamydomonas reinhardtii* – в среднем около 100 нонсенс-мутаций [16], у плодовой мушки *Drosophila melanogaster*, в зависимости от того, находится ли популяция на африканском континенте или североамериканском, 35 и 18 нонсенс-мутаций соответственно [20, 21], а каждое растение *Arabidopsis thaliana* в среднем несёт 215 нонсенс-мутаций [22]. Важным уточнением будет отметить, что один ген может нести несколько нонсенс-мутаций, поэтому не всегда число нонсенс-мутаций является равным числу затронутых генов. Подробный актуальный список числа различных мутаций, в том числе нонсенс-мутаций, в популяциях живых организмов представлен в работе [23].

Указанные числа нонсенс-мутаций поднимают логичный вопрос о том, насколько данные мутации оказывают влияние на фенотип организма. Далее в данном обзоре будет рассмотрено, почему не все из нонсенс-мутаций, присутствующих в геноме, проявляются в фенотипе и какие причины лежат в основе этого.

НОНСЕНС-МУТАЦИИ И ИХ ВЛИЯНИЕ НА ФЕНОТИПЫ

Нонсенс-мутации относятся к так называемым мутациям потери функции (LoF, loss-of-function mutations или loss-of-function variants). Кроме нонсенс-мутаций, к ним относятся инсерции и делеции, нарушающие рамку считывания; мутации в сайтах сплайсинга, а также более крупные мутации, которые удаляют более половины гена или влияют на первый экзон [16, 24]. Преждевременные стоп-кодоны могут появляться преимущественно в результате следующих мутаций: это может быть однонуклеотидная замена; делеция или инсерция, длина которой не кратна трём и, соответственно, приводящая к сдвигу рамки считывания и потенциальному появлению преждевременных стоп-кодонов; а также мутация в сайте сплайсинга, влияющая на интрон-экзонные границы.

Нонсенс-мутации могут по-разному влиять на проявление признаков и, в том числе, на развитие заболеваний. По подсчётам авторов работы [25], данные мутации у человека составляют примерно 20% от всех однонуклеотидных замен в кодирующих генах, которые связаны с развитием того или иного заболевания, и примерно 10% от мутаций, вызывающих моногенные за-

болевания. В работе [26] самыми вредными мутациями были показаны нонсенс-мутации, затем мутации в сайтах сплайсинга (48% от силы отрицательного отбора, воздействующего на нонсенс-мутации), потеря терминирующего кодона, в результате которой происходит удлинение белка (21% от силы отрицательного отбора, воздействующего на нонсенс-мутации), а также миссенс-мутации, при которых происходят замены на аминокислоту, кардинально отличающуюся по свойствам от исходной (12% от силы отрицательного отбора, воздействующего на нонсенс-мутации).

По частоте в популяции аллеля, который несёт нонсенс-мутацию, можно судить о вредности данной мутации. Как было показано на множестве вредных мутаций в исследовании [27], они встречаются в популяциях людей преимущественно с частотой, равной или меньшей 0,01, и лишь небольшая часть мутаций может наблюдаться с частотой между 0,01 и 0,05. Это является последствием воздействия отрицательного отбора и, например, для плодовой мушки *D. melanogaster* было показано его сильное воздействие на аллели с нонсенс-мутациями [28]. Если наблюдаемая частота мутаций выше, то можно предположить о потенциальном нейтральном или даже адаптивном воздействии этих мутаций на организм, когда на такие аллели воздействует положительный отбор (см. в подразделе «Адаптивные нонсенс-мутации»). При этом важно заметить, что такие случаи не являются частыми.

Тем не менее важно иметь в виду, что эффект данных мутаций на фенотип зависит от множества характеристик самой мутации, например, расположения в гене, уровня экспрессии этого гена в тканях, частоты использования экзона с нонсенс-мутацией в альтернативно сплайсируемых изоформах, и других причин (подробнее см. в разделе «Характеристики нонсенс-мутаций, влияющие на их патогенность»). Поэтому данные мутации могут быть как летальными, так и проявляться в фенотипе как, по всей вероятности, безвредный признак, например, влиять на цвет плодов или окраску перьев (см. примеры подробнее в подразделе «Вредные и нейтральные нонсенс-мутации»). Кроме этого, данные мутации могут быть адаптивными (см. в подразделе «Адаптивные нонсенс-мутации») и даже не проявляться в фенотипе каким-либо отклонением от нормы реакции – именно поэтому можно наблюдать у организмов десятки и даже сотни нонсенс-мутаций (см. в разделе «Число нонсенс-мутаций в геномах эукариот»).

Вредные и нейтральные нонсенс-мутации. Информация о нонсенс-мутациях, которые влияют

на развитие заболеваний человека, обычно появляется из публикуемых статей с описаниями клинических случаев. Так, было показано, что именно нонсенс-мутация в гене *GDF2*, кодирующем костный морфогенетический белок BMP9, была причиной развития у пациента системной красной волчанки [29]. Нонсенс-мутация в гене *PRNP*, судя по результатам секвенирования экзомов, связана с развитием болезни Альцгеймера [30]. Также была описана нонсенс-мутация в гене *TITF1*, которую обнаружили у семьи с доброкачественной семейной хореей [31], существуют и многие другие сходные по масштабу последствий примеры. Известны случаи, когда преждевременный стоп-кодон влияет на признак, но менее кардинально – например, нонсенс-мутация в гене *PAX9* оказалась причиной олигодонтии [32]. Есть данные для пациентов с синдромом удлиненного интервала QT 1 типа, который вызывается мутациями в гене *KCNQ1*, кодирующем ключевую субъединицу калиевого канала. Для исследованных пациентов было показано, что нонсенс-мутации могут быть менее вредными, чем мутации рамки считывания и миссенс-мутации [33], что, по всей видимости, является редким исключением из правила [26, 34]. Авторы данного исследования предполагают, что полипептид с нонсенс-мутацией всё равно остаётся функциональным, хоть и укороченным. В то же время белки с миссенс-мутациями и мутациями сдвига рамки считывания, согласно предположению авторов, функционируют сильно иначе из-за изменения структуры белка, которое отрицательно сказывается на работе калиевого канала.

Мутации, укорачивающие белок (PTV, protein truncating variants), среди которых главное место занимают нонсенс-мутации, изучаются не только на индивидуальных случаях, но и на целых популяциях, например, на данных почти 340 тысяч людей из базы UK Biobank [35], а также популяционных данных жителей Китая [36]. Следует заметить, что в обоих исследованиях некоторые из таких мутаций находились на высокой частоте в популяции, что означает их нейтральное или даже положительное влияние (подробнее см. в подразделе «Адаптивные нонсенс-мутации»). Так, в исследовании [36] в общей выборке из 8720 мутаций в 1320 генах было обнаружено всего 18 потенциально адаптивных мутаций в 14 генах [37].

Для того чтобы более детально изучить эффекты нонсенс-мутаций и найти потенциальные лекарства, которые могут помочь при вызванных ими заболеваниях, преимущественно используются исследования на клеточных культурах (например, [38]) и модельных организмах

(например, [39–41]), в том числе с применением метода CRISPR/Cas9 (например, [42]).

Сведения о влиянии нонсенс-мутаций на фенотип описаны и для других живых организмов — по большей части это модельные организмы и виды, используемые в сельском хозяйстве. Данная информация важна для более грамотной селекции, для понимания причин генетических заболеваний, причин ранней смертности животных и др.

Например, известны случаи, когда нонсенс-мутации являются летальными или влияют на фертильность и размер помёта у свиней [43, 44]; у крупного рогатого скота нонсенс-мутации приводят к снижению фертильности, самопроизвольным абортам [45], а также являются причиной рецессивно наследуемого заболевания, связанного с экспрессией дефектного тиреоглобулина, несущего нонсенс-мутацию в гене *Tg* [46]. Есть примеры, когда у линии кур с отсутствующим оперением, описанной ещё в 1950-х годах и активно используемой в качестве модельного объекта при изучении формирования перьев, удалось обнаружить ген *FGF20*, влияющий на отсутствие оперения и, более того, определить нонсенс-мутацию, которая и является причиной этого [47]. Известны примеры и схожих фенотипов при мутации в одном и том же гене, примерно в одном и том же домене, у разных видов. Так, именно нонсенс-мутация в гене *TYR*, кодирующем тирозинкиназу, была причиной развития кожного альбинизма у одной из пород азиатского буйвола *Bubalus arnee* [48]. Сходная по последствиям инсерция длиной 5 нуклеотидов в том же гене была обнаружена ранее у людей с альбинизмом [49].

При исследовании джерсейской породы коров было показано, что нонсенс-мутация в гене *SWC15* играет роль в снижении выживаемости [45]. Этот ген экспрессируется в 87 тканях коров, из чего можно заключить, что кодируемый им белок — жизненно важный для организма. Кроме того, ни одного организма из 749 изученных, который бы обладал двумя копиями дефектного аллеля, не было обнаружено. Вследствие мутации вместо белка длиной в 231 аминокислотный остаток в процессе трансляции получается полипептид длиной всего в 54 аминокислотных остатка, в котором отсутствует консервативный домен Swf_Cwc_15 (pfam04889).

Существуют и примеры, где преждевременные стоп-кодоны оказывают не столь масштабное воздействие на организм, но по своей сути остаются мутациями потери функции. В таком случае сила отрицательного отбора, который на данные мутации воздействует, слабее, чем в предыдущих примерах. Например, плоды жёлтой

малины имеют таковой цвет вследствие инсерции длиной 5 нуклеотидов в гене *Ans*, кодирующем антоцианидин синтазу [50]. Данная мутация вызывает сдвиг рамки считывания и появление преждевременного стоп-кодона.

Другой пример — нонсенс-мутация в гене *PMEL*, кодирующем белок, необходимый для морфогенеза меланосом, у него, или японского, перепела *Coturnix japonica*, по всей видимости, влияет на окраску перьев — она изменяется с коричневой на жёлтую [51]. Имеются сведения и о том, что нонсенс-мутация всего в одном гене способна влиять и на уменьшение размера зерна у риса *Oryza glaberrima* Steud. [52], и на потерю запаха цветков у растений рода Петуния [53], и на продолжительность жизни у нематоды *Caenorhabditis elegans* [54].

По всей видимости, некоторые из изученных в работе [55] нонсенс-мутаций генов мушки *D. pseudoobscura* тоже являются нейтральными, либо же их вредный эффект сильно снижается благодаря альтернативному сплайсингу, в результате чего не все изоформы содержат экзон с мутацией, а кроме того, его могут включать в себя только редко используемые изоформы (см. подробнее в подразделе «Включение экзона с нонсенс-мутацией в альтернативно сплайсируемые изоформы»).

В научных публикациях описано множество других примеров для различных видов, но тезис, что нонсенс-мутация может быть как летальной, так и некритичной для развития признака и даже практически не влиять на фенотип (такие случаи обычно не описываются ввиду отсутствия проявления мутации в фенотипе, см. раздел «Вредные и нейтральные нонсенс-мутации»), для них тоже сохраняется.

Адаптивные нонсенс-мутации. Описаны случаи, когда нонсенс-мутации в генах являлись адаптивными [56–61]. Получается, что в данных случаях поломка гена и отсутствие транслируемого белка помогают организму лучше приспособиться к условиям среды, а потому мутация фиксируется в популяции и не элиминируется под действием отрицательного отбора. Данная точка зрения называется «меньше значит больше» («less is more»), когда мутация потери функции является адаптивной, подробнее об этом можно прочитать в оригинальной работе [62]. Такие случаи не распространены, гораздо больше описанных примеров, когда нонсенс-мутация вызывает развитие заболевания или изменение признака. Кроме того, такие аллели могут находиться на довольно высокой по сравнению с наблюдаемой для вредных мутаций частоте [27], потому что работают механизмы, позволяющие снизить отрицательное влияние нонсенс-мута-

ций на организм (см. подробнее «Характеристики нонсенс-мутаций, влияющие на их патогенность» и «Механизмы, позволяющие нивелировать патогенный эффект нонсенс-мутаций»).

Например, частота аллеля гена *ACTN3* с нонсенс-мутацией в европейской популяции составляет около 0,5 [63], кроме того, было показано недавнее воздействие на него положительного отбора [56]. Моделирование этой мутации в гомозиготном состоянии у мышей [56], которые были нокаутными по гену *ACTN3*, показало, что нонсенс-мутация изменяет метаболизм в мышцах, при котором начинает превалировать медленный, но эффективный, аэробный путь синтеза АТФ. Кроме того, имеются исследования, где было показано, что у атлетов, которые занимаются теми видами спорта, в которых необходима выносливость, чаще в гомозиготном состоянии встречается вариант этого гена с нонсенс-мутацией [64]. В связи с этим было высказано предположение [56], что для некоторых популяций, как минимум европейцев и популяций восточноазиатского региона, этот вариант действительно является адаптивным.

Похожая история, связанная с положительным отбором, была отмечена и для варианта гена *CASP12*, несущего нонсенс-мутацию [58]. Этот ген связан с силой иммунного ответа через продукцию цитокинов, а аллель без нонсенс-мутации может привести к потенциальным рискам развития сепсиса и сверхактивации иммунного ответа. Авторы предполагают, что неактивная форма гена возникла в Африке примерно 100–500 тыс. лет назад и изначально была нейтральной или почти нейтральной. Примерно 60–100 тыс. лет назад на неё начал действовать положительный отбор, в результате чего сейчас этот аллель преобладает в популяциях человека. Подобная адаптивная потеря функции известна ещё для двух паралофов *MBL1* [64], как и *CASP12* [58, 65], связанных с рисками развития сепсиса. По всей видимости, положительный отбор в данном случае может быть обусловлен изменениями в окружающей среде, повлиявшими на риски развития сепсиса и его последствий.

Имеются сведения о том, что мутации потери функции, включая нонсенс-мутации, в гене *SLC30A8*, который кодирует цинковый транспортер ZnT8, снижают риск развития диабета второго типа [60, 61]. А нонсенс-мутации в гене *RDO5* у растения *A. thaliana* приводили к тому, что у семян уменьшался период покоя, что в некоторых регионах является адаптивным преимуществом [66]. Похожее наблюдение, связанное с преимуществом гетерозиготных особей, было сделано и для свиней, у которых один из аллелей гена *MSTN* несёт в себе нонсенс-мутацию [67].

В некоторых генах нонсенс-мутация может находиться на популяционной частоте выше ожидаемой для вредных мутаций [27], но предположить какое-либо функциональное объяснение, почему так произошло, не удаётся. Например, для варианта гена *CD36* с данной мутацией, который у некоторых африканских народов достигает частоты около 0,3, были показаны признаки действующего на него положительного отбора. Тем не менее функциональная связь этого варианта гена с защитой организма от малярии находится под вопросом [59]. Тому может быть ряд причин — не до конца изученная функция белка, кодируемого данным геном; возможно, что на самом деле в этом гене наблюдается след положительного отбора, действующего на соседний ген (так называемый «генетический автостоп», genetic hitchhiking), либо другие причины.

С другими примерами мутаций потери функции, в том числе нонсенс-мутациями, которые являются адаптивными, можно ознакомиться в обзоре [23].

Базы данных, хранящие сведения об эффекте нонсенс-мутаций. Информация о влиянии нонсенс-мутаций в конкретном гене на признаки организма полезна и необходима в прикладных целях, например, в скрининге и определении рисков развития того или иного заболевания; в определении генетической причины уже имеющегося заболевания; в понимании того, как мутации в генах влияют на организм, на котором моделируют заболевание человека; для животных и растений эта информация может быть также важна для селекции. Существуют базы данных, в которых агрегируются сведения, полученные из научных исследований, о влиянии различных мутаций в генах на признаки. Ввиду того, что лучше всего изучено проявление мутаций в фенотипе человека, модельных объектов и важных в сельском хозяйстве и животноводстве видов, информации о них имеется больше. Перечислим некоторые базы данных для человека: NCBI ClinVar [68], а также сведения в других базах NCBI (например, NCBI dbVar, NCBI dbSNP и NCBI Gene), gnomAD [69], HGMD [70], COSMIC [71], OMIM [72], LOVD [73]. Существуют похожие удобно организованные для работы базы данных и для других видов, например, для мышей [74], коров [75] и арабидопсиса [76].

РОЛЬ НОНСЕНС-МУТАЦИЙ В ЭВОЛЮЦИОННОМ ПРОЦЕССЕ

Отдельно стоит рассмотреть и то, что происходит с последовательностью гена, в котором

случилась не критичная для организма нонсенс-мутация. В случае, если она критична, организмы будут элиминироваться под действием отрицательного отбора, и практически ничего о мутантном гене не получится узнать по причине его крайней редкости или вообще отсутствия в популяции. В случае некритичного влияния мутантного гена на приспособленность организмов можно наблюдать за тем, как иначе эволюционирует ген в связи с изменением действия естественного отбора на его последовательность.

Нонсенс-мутации использовались и продолжают использоваться как один из идентификаторов псевдогенов – генов, которые вследствие мутации перестали кодировать функциональный белок [77]. Кстати, именно в этой классической работе под названием «Pseudogenes as a paradigm of neutral evolution» уже указывается на то, что данные мутации являются псевдогенизирующими. Так как нонсенс-мутация делает ген нефункциональным, то на него перестаёт воздействовать отбор – скорость накопления миссенс-мутаций становится равна таковой для синонимичных мутаций. Это означает, что псевдоген эволюционирует нейтрально, то есть – согласно нейтральной теории эволюции [77]. Данному наблюдению есть целый ряд описанных доказательных примеров (например, [78–80]).

Тем не менее накапливаются доказательства того, что нонсенс-мутация не обязательно ведёт к псевдогенизации гена, то есть к одинаковой скорости накопления миссенс-мутаций и синонимичных (например, [81, 82]).

Например, если рассматривать гены плодовой мушки *D. melanogaster*, состоящие из одного экзона, то нонсенс-мутация, судя по всему, действительно является псевдогенизирующей [81]. С другой стороны, согласно аннотации генома [83], у плодовой мушки преобладают гены, содержащие в себе несколько экзонов: в количестве двух и более. И для таких генов оказывается, что в экзоне с нонсенс-мутацией отрицательный отбор настолько ослаблен, что можно предположить нейтральную эволюцию данного экзона. Но в соседних экзонах его действие уже становится сильнее. То есть можно предположить, что псевдогенизирующее воздействие нонсенс-мутации ограничивается всего лишь одним экзоном. В подтверждение этому можно привести факт, что изоформы с экзонами, в которых были обнаружены нонсенс-мутации, более чем в половину реже экспрессируются, чем изоформы, не включающие таковые экзоны.

Другим объяснением потенциально может быть рекомбинация. Здесь в простом случае нонсенс-мутация воздействует псевдогенизиру-

юще на весь ген и все экзоны, но наблюдаемый эффект изменения силы отбора в экзонах является последствием рекомбинации с геномами дрозофил, у которых нонсенс-мутации в данном гене нет. Соответственно, из-за рекомбинации фрагменты генома, которые не накопили в себе мутаций, произошедших вследствие псевдогенизации из-за нонсенс-мутации, оказываются среди фрагментов гена, которые уже успели накопить мутации. Данное объяснение имеет место быть, но не объясняет факта сильно ослабленного воздействия отрицательного отбора именно на экзон с нонсенс-мутацией.

Таким образом, концепция того, что нонсенс-мутации являются псевдогенизирующими, не распространяется на всё множество нонсенс-мутаций, и существуют альтернативные примеры. Далее в данном обзоре будут обсуждаться характеристики нонсенс-мутаций и механизмы, которые, в том числе, позволяют аллелям с нонсенс-мутациями избежать участи стать псевдогенами.

ХАРАКТЕРИСТИКИ НОНСЕНС-МУТАЦИЙ, ВЛИЯЮЩИЕ НА ИХ ПАТОГЕННОСТЬ

Расположение нонсенс-мутаций по длине гена.

При рассмотрении распределения частоты нонсенс-мутаций внутри генов отмечается два факта: преобладание данных мутаций в самом начале транскрипта, в первых 2–3 кодонах, и в самом конце транскрипта, особенно в предпоследнем кодоне, который предшествует настоящему стоп-кодону [16, 28, 34, 81, 84]. Данный факт объясняется довольно просто – если нонсенс-мутация локализована в самом начале, то ближайший метионин (кодон AUG) будет играть роль старт-кодона (см. рис. 2 в [85]) и, в случае если он находится близко к настоящему старт-кодону и важные белковые домены в белке не затронуты данной мутацией, то её можно считать безвредной. Если же нонсенс-мутация расположена в самом конце, перед терминирующим стоп-кодоном, то она не будет играть никакой роли, потому как в белковой последовательности окажется на один аминокислотный остаток меньше, что, исходя из наблюдаемых для разных организмов (человек, шимпанзе, плодовая мушка) распределений частот нонсенс-мутаций [28, 34, 81, 84], не повлияет на функцию белка. К тому же преобладание этих мутаций говорит и о том, что возле 5'- и 3'-концов гена воздействие отрицательного отбора на них ослаблено. Это предположение было подтверждено для гена *DMD* у человека, для которого показали, что нонсенс-мутации, расположен-

ные у концов гена, несли более мягкие последствия для фенотипа [86]. Важно заметить, что расположение нонсенс-мутаций возле 3'-конца гена касается только нескольких самых последних кодонов. В случае если мутация располагается в последнем экзоне, она чаще всего проявляется в фенотипе, потому как транскрипт не может быть деградирован системой NMD (см. в разделе «Механизмы, позволяющие нивелировать патогенный эффект нонсенс-мутаций»).

Включение экзона с нонсенс-мутацией в альтернативно сплайсируемые изоформы. Другим из возможных вариантов сглаживания эффекта данных мутаций является их влияние не на все изоформы [87]. В данном случае в общем приближении это можно рассматривать следующим образом: нонсенс-мутации, которые находятся в важных и часто включаемых в изоформы экзонах, вредны, и организмы с ними обладают низкой приспособленностью и подвергаются отрицательному отбору. С другой стороны, нонсенс-мутации в редко используемых экзонах не так существенно сказываются на фенотипе и не находятся под действием сильного отрицательного отбора. Именно поэтому мы их наблюдаем в живых организмах. Например, было показано, что у *D. pseudoobscura* некоторые нонсенс-мутации не приносят вреда организму благодаря механизму альтернативного сплайсинга [55]. Похожая идея включения не во все изоформы экзона с нонсенс-мутацией обсуждалась и была показана на данных в нескольких работах на *D. melanogaster* (например, [28, 81]), а также для шимпанзе [84].

Гаплонедостаточность гена с нонсенс-мутацией. Важную роль играет и способность, либо отсутствие таковой, организма нормально функционировать при наличии всего одного варианта аллеля без нонсенс-мутации. Например, для β -талассемии было показано, что нонсенс-мутации в первом и втором экзоне в аллеле гена, кодирующего β -глобин, даже при наличии второго аллеля без таковой мутации всё равно будут приводить к развитию заболевания вследствие гаплонедостаточности [88]. Существует множество похожих примеров и для других генов человека, среди них, например, мутации в генах *WDR26* [89] и *NFKB2* [90].

Уровень экспрессии гена с нонсенс-мутацией в различных тканях и на разных этапах развития организма. Из-за того, что нонсенс-мутации преимущественно отрицательно влияют на приспособленность организма, можно было бы ожидать, что гены, в которых они произошли и в которых они наблюдаются у живых существ, не будут критически жизненно важными, не будут экспрессироваться на ранних этапах эмбрио-

генеза и не будут экспрессироваться во всех тканях. К таким выводам приходили при изучении экспрессии генов с нонсенс-мутациями на плодовых мушках [45, 55]. В данных наблюдениях исследователи исходят обычно из следующей логики — если бы гены экспрессировались во всех или почти всех тканях, то эффект от нонсенс-мутации был бы сильнее и, соответственно, такие организмы обладали бы низкой приспособленностью и изымались бы под действием отрицательного отбора ещё на стадии эмбриона или в раннем возрасте [45].

Данное ожидание является логичным, но в значительной степени обобщающим, потому как экспрессия во всех тканях не обязательно связана с важностью функции гена, есть гены, экспрессирующиеся во всех тканях и не жизненно важные. А есть те, которые экспрессируются в конкретной ткани в определённый момент времени и являются важными. Например, известны гены, которые вызывают раннюю смерть эмбрионов и экспрессируются специфично в сердце [91]. Кроме того, важны и различные характеристики гена, например, возможности компенсации его функции в случае мутации в одном или обоих аллелях, и другие.

Некоторые из описанных общих предположений оказались верны — у мушек *D. pseudoobscura* гены, в которых содержатся нонсенс-мутации, преимущественно экспрессируются не во всех тканях [55]. Другое наблюдение было сделано на данных *D. melanogaster*, для которой было показано, что гены, несущие нонсенс-мутации, реже экспрессируются и, как заявляют авторы исследования, вовлечены в менее важные биологические функции [28]. Реже экспрессируются не только гены, несущие нонсенс-мутации у отдельного изучаемого вида, но это наблюдение распространяется и на ортологичные гены — это было проверено и показано для *D. pseudoobscura* и *D. melanogaster* [55], что даёт возможность ожидать наличие некоторых «кластеров» генов, в которых будут обнаружены нонсенс-мутации у близких видов.

Перечисленные выше примеры описывают основные характеристики, влияющие на патогенность нонсенс-мутаций, тем не менее существуют и иные, например, наличие паралогов и сходных по функциям генов, потенциально способных при определённых обстоятельствах дублировать ген с нонсенс-мутацией [92]; полиплоидия, также потенциально позволяющая в некоторых случаях «подменять» аллель с нонсенс-мутацией; «устойчивость» кодонов к мутации в стоп-кодонах, когда превращение кодона в стоп-кодон за один шаг, то есть одну мутацию, невозможно [93, 94], и некоторые другие.

МЕХАНИЗМЫ, ПОЗВОЛЯЮЩИЕ НИВЕЛИРОВАТЬ ПАТОГЕННЫЙ ЭФФЕКТ НОНСЕНС-МУТАЦИЙ

Несмотря на то что нонсенс-мутации присутствуют в генах живых организмов и есть гены, оба аллеля которых несут такие мутации, не всегда наблюдается их отрицательное влияние на фенотип. Тому есть множество причин, некоторые из которых уже были перечислены в данном обзоре в разделе «Характеристики нонсенс-мутаций, влияющие на их патогенность». Тем не менее существуют более глобальные молекулярные механизмы, которые позволяют нивелировать патогенный эффект аллелей с нонсенс-мутациями, которые *a priori* являются патогенными. В данном разделе перечислены молекулярные механизмы, которые наиболее хорошо изучены. Тем не менее есть вероятность, что не все возможные пути избежать патогенного воздействия нонсенс-мутации наблюдались, и некоторые ещё предстоит обнаружить и изучить.

Генетическая компенсация. Не так давно был обнаружен механизм генетической компенсации (genetic compensation response, GCR), который позволяет восполнять отсутствие транслируемого белка с гена, в котором произошла нонсенс-мутация, и является эволюционно консервативным для многоклеточных [95]. Для запуска механизма генетической компенсации необходимо наличие в клетке мРНК гена с нонсенс-мутацией. Генетическую компенсацию могут выполнять гены того же семейства, что и мутантный ген [96, 97], при этом их нуклеотидные последовательности должны быть схожи с мутантным геном. В результате экспрессии данных генов-компенсаторов повышается, и в фенотипе организма не проявляется ожидаемый эффект от нонсенс-мутации.

Данный механизм активно изучается и высказываются предположения, что генетическая компенсация может быть использована в лечении заболеваний, вызываемых нонсенс-мутациями [96]. Подробнее о данном явлении можно прочитать в обзорах [95, 97, 98]. Генетическая компенсация тесно связана с нонсенс-опосредованным распадом мРНК, который будет обсуждаться далее.

Дегградация мРНК, содержащей нонсенс-мутацию. Нонсенс-опосредованный распад мРНК (nonsense-mediated mRNA decay, NMD) – процесс, при котором транскрипты, содержащие в себе нонсенс-мутацию, подвергаются дегградации и, следовательно, не транслируются, и дефектный полипептид в клетке не присутствует. Этот важный процесс известен для всех изученных эукариотических организмов [99], в том

числе и растений [100]. Мутации в генах, которые кодируют белки, необходимые для работы NMD, у дрожжей и нематод не важны для жизни, но для плодовых мушек, мыши, рыбы данио-рерио таковые мутации летальны [100]. Подробно о NMD рассказано в обзорах, посвященных самому процессу [99, 101–103], его взаимосвязи с проявлением заболеваний у человека [104–106], а NMD и некоторые другие схожие механизмы (nonsense-associated alternative splicing – нонсенс-ассоциированный альтернативный сплайсинг, nonsense-mediated translational repression – нонсенс-опосредованная трансляционная репрессия, nonsense-mediated transcriptional gene silencing – нонсенс-опосредованное подавление экспрессии генов) рассмотрены в обзоре [107].

Насчёт эффективности NMD у человека сведения отличаются: так, известно, что либо около 10% [103], либо до 25% [108] или до 50% [34] транскриптов, содержащих нонсенс-мутации, подвергается данному процессу. Для дрожжей *S. cerevisiae* тоже были указаны значения примерно 10–15% [109]. Для *A. thaliana* были получены примерно похожие значения – 13% от числа генов, содержащих интроны (необходимые для функционирования NMD) [110].

Как было показано в работе [34], где авторы проанализировали все известные полиморфизмы в кодирующих генах человека, чаще всего подвергаются дегградации через NMD транскрипты мутантных генов, участвующих в фосфорилировании, взаимодействии между клетками, передаче сигнала и транспорте. Для мутантных генов, которые были рассмотрены как не попадающие под NMD, подобного смещения относительно участия в молекулярных процессах не было отмечено. Авторы предполагают, что видимо, для организма менее вредно совсем не иметь таковых белков, чем иметь укороченные их варианты, способные в данном случае принести больше вреда. Стоит отметить, что в данном исследовании остаётся не совсем ясным, почему именно гены, кодирующие белки с указанными функциями, чаще подвергаются воздействию NMD. Год публикации (2008), общий объём имеющихся на тот момент данных и то, что влияние или отсутствие влияния NMD на транскрипт предсказывалось, может заставить усомниться в полученных результатах. С другой стороны, подобных работ найти не получается, а значит вопрос остаётся открытым и ждёт дальнейших исследований для своего ответа.

У растений, на примере *A. thaliana*, поломка генов, кодирующих белки, которые участвуют в работе NMD, влияет не только на то, что такие транскрипты остаются не дегградированными,

но и на другие признаки [100, 111, 112], тем самым демонстрируя и множество функций, которые несут данные гены, и сложность взаимосвязей внутри организмов. Для плодовой мушки *D. melanogaster*, рыбы *Danio rerio*, мыши такие мутации летальны ещё на эмбриональной стадии [100].

Об эффективности NMD для различных клеток и тканей организма имеются противоречивые сведения. Например, при исследовании NMD в отдельных клетках было показано, что ответ на этот процесс и деградация мРНК с нонсенс-мутацией в двух генах, кодирующих β -глобины, в каждой из клеток отличается, то есть спектр эффективности NMD широк и зависит от множества деталей [113]. Подобное различие в эффективности NMD было ранее показано для разных тканей мышей [114]. Но совершенно противоположные результаты были получены в работе [115], где было показано, что во всех тканях человека NMD работает примерно одинаково.

В уже описанном ранее примере изменения окраски перьев у перепела *C. japonica* было предположено, что на деградацию мРНК с нонсенс-мутацией в гене *PMEL* может влиять NMD, так как нет никаких ограничений для работы данного процесса, которые будут описаны далее в обзоре – мутация находится в четвертом (не последнем и не предпоследнем) экзоне [51]. С другой стороны, авторы не исключают, что причина может быть ещё более простая – у организма может быть меньше меланоцитов, которые экспрессируют этот ген, как раз ввиду данной мутации.

Но у данного механизма есть свои ограничения, для которых, тем не менее, имеются и примеры-исключения. Основными ограничениями считаются следующие: если преждевременный стоп-кодон расположен либо в последнем экзоне, либо в предпоследнем экзоне менее чем за 50–55 нуклеотидов до его границы с интроном, то NMD не срабатывает и в результате происходит трансляция мутантной мРНК [116]. С одной стороны, как уже было отмечено выше (см. раздел «Характеристики нонсенс-мутаций, влияющие на их патогенность»), если нонсенс-мутация располагается прямо перед терминирующим стоп-кодоном или в двух-трёх позициях до него, то отрицательный отбор на неё не воздействует. Поэтому в том, что NMD для них не работает, нет проблемы – в белке не будет одного или нескольких аминокислотных остатков на конце, но его функция не пострадает. С другой стороны, есть примеры, когда нонсенс-мутации в последнем экзоне, будучи в гетерозиготном состоянии, влияют на развитие у человека забо-

левания β -талассемии [88]. А у одной из пород азиатских буйволов, которые стали альбиносами вследствие мутации в гене *Tyr*, кодирующем тирозинкиназу [48], по всей видимости, NMD не работает. Причина этому заключается в том, что мутация располагается в последнем экзоне, а NMD в них, как прежде было отмечено, не срабатывает.

Известны случаи, когда транскрипты с нонсенс-мутацией и в первом экзоне обходили NMD (например, [117–119]), а разнообразные способы избежать этот процесс для транскрипта рассмотрены подробно в работе [120].

Чтение сквозь стоп-кодон. Так называемое «чтение сквозь стоп-кодон» (stop codon readthrough, stop codon suppression, либо translational readthrough) – это явление, при котором стоп-кодон, в обсуждаемом случае – преждевременный, распознаётся не как стоп-кодон, а как кодирующий, и трансляция на нём не останавливается, а продолжается в той же рамке считывания. Данный процесс распространён не только у вирусов и бактерий, но и у эукариот [121]. Так, у дрожжей *S. cerevisiae* UAA и UAG могут кодировать серин и треонин, а UGA – тирозин и фенилаланин [122]. При этом важную роль играет контекст – сам стоп-кодон и нуклеотиды вокруг него [123, 124]. Например, кодон UGA (в генетическом коде человека) наиболее вероятно подвергается данному процессу при наличии после него динуклеотида CU [125], следующий за ним по «лёгкости» чтения сквозь стоп-кодон – UAG, а затем – кодон UAA [121]. Также для всех стоп-кодонов повышает вероятность данного процесса наличие вторичных структур после них [121].

Чтение сквозь стоп-кодон было обнаружено у видов рода *Drosophila* для 283 генов [121]. При этом, как было показано на *D. melanogaster*, эффективность процесса зависит от стадии жизненного цикла особи и отличается между тканями. Наиболее эффективно и быстро чтение сквозь стоп-кодон проходит у взрослых особей [126]. Кроме того, стоп-кодоны, которые подвергаются данному процессу, можно обнаружить при анализе популяционных данных, потому как они встречаются с частотой выше, чем наблюдается для вредных мутаций, то есть выше 0,05 [27]. Например, частота таких кодонов была выше 0,3 в североамериканской и замбийской популяциях плодовых мушек [81].

Имеются сведения о наличии данного механизма обхода патогенного эффекта нонсенс-мутаций и для нематоды *C. elegans*, и для различных мушек рода *Drosophila*, и для человека [122]. А для мушки *Drosophila sechellia* было показано [82], что несмотря на нонсенс-мутацию в локусе *Ir75a*, ко-

дирующем один из обонятельных рецепторов, этот локус продолжает экспрессироваться благодаря механизму чтения сквозь стоп-кодон.

Одним из своеобразных вариантов чтения сквозь стоп-кодон является определение стоп-кодона как кодирующего селеноцистеин [127]. Селеноцистеиновая тРНК может интерпретировать кодон UGA как селеноцистеин, если в 3'-UTR имеется специальный мотив, так называемый SECIS-элемент. Данный механизм был показан для многих эукариот, например, для видов рода *Drosophila* [122], млекопитающих, птиц, рыб.

Были предприняты попытки, в том числе успешные, для того чтобы использовать данный механизм в лечении пациентов, причина заболевания которых – нонсенс-мутация, например, при миодистрофии Дюшенна или муковисцидозе [128]. Так, вещество аталурен используется в лечении миодистрофии Дюшенна [129]. Если рассматривать механизм его работы в самом общем виде, то аталурен связывается с рибосомой и, по достижении мутантного стоп-кодона, позволяет не останавливать трансляцию, а использовать тРНК кодирующих аминокислот – для UAA и UAG это тРНК для глутамина, лизина и тирозина, а для UAG – тРНК триптофана, аргинина и цистеина [130]. Также гентамицин используется в лечении одного из гипотрихозов у человека, вызванного нонсенс-мутацией в гене *CDSN* [131], а для лечения муковисцидоза проходит вторую фазу клинических испытаний вещество ELX02 [132]. Подробнее об использовании данного метода в лечении заболеваний можно прочесть в обзорах (например, [128, 133, 134]).

Многие авторы сходятся во мнении, что благодаря наличию и NMD, и чтению сквозь стоп-кодон достигается больший контроль за качеством транслируемых транскриптов [126].

Методы геномного редактирования. Ещё одним потенциальным способом избежать вредного влияния нонсенс-мутаций может стать метод геномного редактирования CRISPR. Некоторые пациенты с диагностированным муковисцидозом являются гомозиготами по нонсенс-мутации в гене *CFTR*, либо же компаундными гетерозиготами. В работе [135] было показано, что использование метода CRISPR/

dCas13b позволяет редактировать мутантную мРНК в различных клеточных линиях (IB3-1, HeLa, FRT) и может быть хорошей альтернативой, например, аталурену, который позволяет осуществлять чтение сквозь стоп-кодон.

Нонсенс-мутации рассматривались на протяжении долгого времени в качестве патогенных, кардинально влияющих на организм и приводящих к синтезу белков, лишённых полноценной функциональности. В настоящее время нонсенс-мутации продолжают рассматриваться научным сообществом преимущественно в данном ключе, но появляется всё больше информации о том, что не всегда такие мутации приводят к полной потере функции гена: влияет и важность затрагиваемого мутацией гена для организма, и расположение мутации по длине гена, и статус гаплонедостаточности, и другие варианты. Кроме того, существует множество способов, которые позволяют клетке избежать накопления дефектных полипептидов, либо же дают возможность рибосоме не останавливаться на нонсенс-мутации, а продолжить синтез белка, развивается и терапия заболеваний, вызванных данными мутациями. При этом обсуждаемые характеристики нонсенс-мутаций, влияющие на их проявление в фенотипе, а также молекулярные механизмы, способные позволить избежать проявления в фенотипе, взаимосвязаны – и часто сразу несколько из них оказывают сочетанное влияние. В данном обзоре подробно освещаются перечисленные выше подходы к пониманию характеристик и влияния нонсенс-мутаций в геномах эукариот.

Благодарности. Автор выражает благодарность Игорю Игоревичу Адамейко, Ольге Владимировне Черченко, Екатерине Юрьевне Царёвой, Эвелине Ильиничне Никельшпарг, Ивану Владимировичу Кулаковскому, а также Борису Романовичу Петрову за ценные комментарии.

Конфликт интересов. Автор заявляет об отсутствии конфликта интересов.

Соблюдение этических норм. Настоящая статья не содержит описания выполненных автором исследований с участием людей или использованием животных в качестве объектов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Osawa, S., and Jukes, T.H. (1989) Codon reassignment (codon capture) in evolution, *J. Mol. Evol.*, **28**, 271-278, doi: 10.1007/BF02103422.
- Campbell, J. H., O'Donoghue, P., Campbell, A. G., Schwientek, P., Sczyrba, A., et al. (2013) UGA is an additional glycine codon in uncultured SR1 bacteria from the human microbiota, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **110**, 5540-5545, doi: 10.1073/pnas.1303090110.
- Sánchez-Silva, R., Villalobo, E., Morin, L., and Torres, A. (2003) A new noncanonical nuclear genetic code: Translation of UAA into glutamate, *Curr. Biol.*, **13**, 442-447, doi: 10.1016/S0960-9822(03)00126-X.

4. Ring, K. L., and Cavalcanti, A. R. (2007) Consequences of stop codon reassignment on protein evolution in ciliates with alternative genetic codes, *Mol. Biol. Evol.*, **25**, 179-186, doi: 10.1093/molbev/msm237.
5. Keeling, P. J., and Doolittle, W. F. (1996) A non-canonical genetic code in an early diverging eukaryotic lineage, *EMBO J.*, **15**, 2285-2290, doi: 10.1002/j.1460-2075.1996.tb00581.x.
6. Keeling, P. J., and Leander, B. S. (2003) Characterisation of a non-canonical genetic code in the oxymonad *Streblomastix strix*, *J. Mol. Biol.*, **326**, 1337-1349, doi: 10.1016/s0022-2836(03)00057-3.
7. Záhonová, K., Kostygov, A., Ševčíková, T., Yurchenko, V., and Eliáš, M. (2016) An unprecedented non-canonical nuclear genetic code with all three termination codons reassigned as sense codons, *Curr. Biol.*, **26**, 2364-2369, doi: 10.1016/j.cub.2016.06.064.
8. Ohama, T., Inagaki, Y., Bessho, Y., and Osawa, S. (2008) Evolving genetic code, *Proc. Jpn. Acad. Ser. B Phys. Biol. Sci.*, **84**, 58-74, doi: 10.2183/pjab.84.58.
9. Cocquyt, E., Gile, G. H., Leliaert, F., Verbruggen, H., Keeling, P. J., et al. (2010) Complex phylogenetic distribution of a non-canonical genetic code in green algae, *BMC Evol. Biol.*, **10**, 327, doi: 10.1186/1471-2148-10-327.
10. Swart, E. C., Serra, V., Petroni, G., and Nowacki, M. (2016) Genetic codes with no dedicated stop codon: Context-dependent translation termination, *Cell*, **166**, 691-702, doi: 10.1016/j.cell.2016.06.020.
11. Pánek, T., Žihala, D., Sokol, M., Derelle, R., Klimeš, V., et al. (2017) Nuclear genetic codes with a different meaning of the UAG and the UAA codon, *BMC Biol.*, **15**, 8, doi: 10.1186/s12915-017-0353-y.
12. Mukai, T., Lajoie, M. J., Englert, M., and Sull, D. (2017) Rewriting the genetic code, *Annu. Rev. Microbiol.*, **71**, 557-577, doi: 10.1146/annurev-micro-090816-093247.
13. Ling, J., O'Donoghue, P., and Söll, D. (2015) Genetic code flexibility in microorganisms: Novel mechanisms and impact on physiology, *Nat. Rev. Microbiol.*, **13**, 707-721, doi: 10.1038/nrmicro3568.
14. Bezerra, A., Guimarães, A., and Santos, M. (2015) Non-standard genetic codes define new concepts for protein engineering, *Life*, **5**, 1610-1628, doi: 10.3390/life5041610.
15. De Valles-Ibáñez, G., Hernandez-Rodriguez, J., Prado-Martinez, J., Luisi, P., Marqués-Bonet, T., et al. (2016) Genetic load of loss-of-function polymorphic variants in great apes, *Genome Biol. Evol.*, **8**, 871-877, doi: 10.1093/gbe/evw040.
16. Flowers, J. M., Hazzouri, K. M., Pham, G. M., Rosas, U., Bahmani, T., et al. (2015) Whole-genome resequencing reveals extensive natural variation in the model green alga *Chlamydomonas reinhardtii*, *Plant Cell*, **27**, 2353-2369, doi: 10.1105/tpc.15.00492.
17. MacArthur, D. G., Balasubramanian, S., Frankish, A., Huang, N., Morris, J., et al. (2012) A systematic survey of loss-of-function variants in human protein-coding genes, *Science*, **335**, 823-828, doi: 10.1126/science.1215040.
18. Li, A. H., Morrison, A. C., Kovar, C., Cupples, L. A., Brody, J. A., et al. (2015) Analysis of loss-of-function variants and 20 risk factor phenotypes in 8,554 individuals identifies loci influencing chronic disease, *Nat. Genet.*, **47**, 640-642, doi: 10.1038/ng.3270.
19. Groenen, M. A., Archibald, A. L., Uenishi, H., Tuggle, C. K., Takeuchi, Y., et al. (2012) Analyses of pig genomes provide insight into porcine demography and evolution, *Nature*, **491**, 393-398, doi: 10.1038/nature11622.
20. Lack, J. B., Cardeno, C. M., Crepeau, M. W., Taylor, W., Corbett-Detig, R. B., et al. (2015) The *Drosophila* genome nexus: a population genomic resource of 623 *Drosophila melanogaster* genomes, including 197 from a single ancestral range population, *Genetics*, **199**, 1229-1241, doi: 10.1534/genetics.115.174664.
21. Yang, H., He, B. Z., Ma, H., Tsaur, S. C., Ma, C., et al. (2015) Expression profile and gene age jointly shaped the genome-wide distribution of premature termination codons in a *Drosophila melanogaster* population, *Mol. Biol. Evol.*, **32**, 216-228, doi: 10.1093/molbev/msu299.
22. Xu, Y. C., Niu, X. M., Li, X. X., He, W., Chen, J. F., et al. (2019) Adaptation and phenotypic diversification in arabidopsis through loss-of-function mutations in protein-coding genes, *Plant Cell*, **31**, 1012-1025, doi: 10.1105/tpc.18.00791.
23. Monroe, J. G., McKay, J. K., Weigel, D., and Flood, P. J. (2021) The population genomics of adaptive loss of function, *Heredity*, **126**, 383-395, doi: 10.1038/s41437-021-00403-2.
24. MacArthur, D. G., and Tyler-Smith, C. (2010) Loss-of-function variants in the genomes of healthy humans, *Hum. Mol. Genet.*, **19**, R125-R130, doi: 10.1093/hmg/ddq365.
25. Mort, M., Ivanov, D., Cooper, D. N., and Chuzhanova, N. A. (2008) A meta-analysis of nonsense mutations causing human genetic disease, *Hum. Mutat.*, **29**, 1037-1047, doi: 10.1002/humu.20763.
26. Gorlov, I. P., Kimmel, M., and Amos, C. I. (2006) Strength of the purifying selection against different categories of the point mutations in the coding regions of the human genome, *Hum. Mol. Genet.*, **15**, 1143-1150, doi: 10.1093/hmg/ddl029.
27. Marth, G. T., Yu, F., Indap, A. R., Garimella, K., Gravel, S., et al. (2011) The functional spectrum of low-frequency coding variation, *Genome Biol.*, **12**, R84, doi: 10.1186/gb-2011-12-9-r84.
28. Lee, Y. C., and Reinhardt, J. A. (2012) Widespread polymorphism in the positions of stop codons in *Drosophila melanogaster*, *Genome Biol. Evol.*, **4**, 533-549, doi: 10.1093/gbe/evr113.
29. Hernandez-Gonzalez, I., Tenorio-Castano, J., Ochoa-Parra, N., Gallego, N., Pérez-Olivares, C., et al. (2021) Novel genetic and molecular pathways in pulmonary arterial hypertension associated with connective tissue disease, *Cells*, **10**, 1488, doi: 10.3390/cells10061488.
30. Guerreiro, R., Brás, J., Wojtas, A., Rademakers, R., Hardy, J., et al. (2014) Nonsense mutation in PRNP associated with clinical Alzheimer's disease, *Neurobiol. Aging*, **35**, 2656.e13-2656.e16, doi: 10.1016/j.neurobiolaging.2014.05.013.
31. Nakamura, K., Sekijima, Y., Nagamatsu, K., Yoshida, K., and Ikeda, S. (2012) A novel nonsense mutation in the *TITF-1* gene in a Japanese family with benign hereditary chorea, *J. Neurol. Sci.*, **313**, 189-192, doi: 10.1016/j.jns.2011.09.013.
32. Nieminen, P., Arte, S., Tanner, D., Paulin, L., Alaluusua, S., et al. (2001) Identification of a nonsense mutation in the *PAX9* gene in molar oligodontia, *Eur. J. Human Genet.*, **9**, 743-746, doi: 10.1038/sj.ejhg.5200715.
33. Ruwald, M. H., Xu Parks, X., Moss, A. J., Zareba, W., Baman, J., et al. (2016) Stop-codon and C-terminal nonsense mutations are associated with a lower risk of cardiac events in patients with long QT syndrome type 1, *Heart Rhythm*, **13**, 122-131, doi: 10.1016/j.hrthm.2015.08.033.
34. Yamaguchi-Kabata, Y., Shimada, M. K., Hayakawa, Y., Minoshima, S., et al. (2008) Distribution and effects of nonsense polymorphisms in human genes, *PLoS One*, **3**, e3393, doi: 10.1371/journal.pone.0003393.
35. DeBoever, C., Tanigawa, Y., Lindholm, M. E., McInnes, G., Lavertu, A., et al. (2018) Medical relevance

- of protein-truncating variants across 337,205 individuals in the UK Biobank study, *Nat. Commun.*, **9**, 1612, doi: 10.1038/s41467-018-03910-9.
36. Xu, H., Zhen, Q., Bai, M., Fang, L., Zhang, Y., et al. (2021) Deep sequencing of 1320 genes reveals the landscape of protein-truncating variants and their contribution to psoriasis in 19,973 Chinese individuals, *Genome Res.*, **31**, 1150-1158, doi: 10.1101/gr.267963.120.
 37. Xu, Y. C., and Guo, Y. L. (2020) Less is more, natural loss-of-function mutation is a strategy for adaptation, *Plant Commun.*, **1**, 100103, doi: 10.1016/j.xplc.2020.100103.
 38. Kaler, S. G., Tang, J., Donsante, A., and Kaneski, C. R. (2009) Translational read-through of a nonsense mutation in *ATP7A* impacts treatment outcome in Menkes disease, *Ann. Neurol.*, **65**, 108-113, doi: 10.1002/ana.21576.
 39. Roosing, S., Rosti, R. O., Rosti, B., de Vrieze, E., Silhavy, J. L., et al. (2016) Identification of a homozygous nonsense mutation in *KIAA0556* in a consanguineous family displaying Joubert syndrome, *Hum. Genet.*, **135**, 919-921, doi: 10.1007/s00439-016-1689-z.
 40. Perez, H., Abdallah, M. F., Chavira, J. I., Norris, A. S., Egeland, M. T., et al. (2021) A novel, ataxic mouse model of ataxia telangiectasia caused by a clinically relevant nonsense mutation, *eLife*, **10**, e64695, doi: 10.7554/eLife.64695.
 41. Yang, C., Feng, J., Song, W., Wang, J., Tsai, B., et al. (2007) A mouse model for nonsense mutation bypass therapy shows a dramatic multiday response to geneticin, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **104**, 15394-15399, doi: 10.1073/pnas.0610878104.
 42. McHugh, D. R., Steele, M. S., Valerio, D. M., Miron, A., Mann, R. J., et al. (2018) A G542X cystic fibrosis mouse model for examining nonsense mutation directed therapies, *PLoS One*, **13**, e0199573, doi: 10.1371/journal.pone.0199573.
 43. Flossmann, G., Wurmser, C., Pausch, H., Tenghe, A., Doddenhoff, J., et al. (2021) A nonsense mutation of bone morphogenetic protein-15 (BMP15) causes both infertility and increased litter size in pigs, *BMC Genomics*, **22**, 38, doi: 10.1186/s12864-020-07343-x.
 44. Derks, M., Gjuvsland, A. B., Bosse, M., Lopes, M. S., van Son, M., et al. (2019) Loss of function mutations in essential genes cause embryonic lethality in pigs, *PLoS Genet.*, **15**, e1008055, doi: 10.1371/journal.pgen.1008055.
 45. Sonstegard, T. S., Cole, J. B., VanRaden, P. M., Van Tassell, C. P., Null, D. J., et al. (2013) Identification of a nonsense mutation in *CWC15* associated with decreased reproductive efficiency in Jersey cattle, *PLoS One*, **8**, e54872, doi: 10.1371/journal.pone.0054872.
 46. Ricketts, M. H., Simons, M. J., Parma, J., Mercken, L., Dong, Q., et al. (1987) A nonsense mutation causes hereditary goitre in the Afrikaner cattle and unmasks alternative splicing of thyroglobulin transcripts, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **84**, 3181-3184, doi: 10.1073/pnas.84.10.3181.
 47. Wells, K. L., Hadad, Y., Ben-Avraham, D., Hillel, J., Cahaner, A., et al. (2012) Genome-wide SNP scan of pooled DNA reveals nonsense mutation in *FGF20* in the scaleless line of featherless chickens, *BMC Genomics*, **13**, 257, doi: 10.1186/1471-2164-13-257.
 48. Damé, M. C., Xavier, G. M., Oliveira-Filho, J. P., Borges, A. S., Oliveira, H. N., et al. (2012) A nonsense mutation in the tyrosinase gene causes albinism in water buffalo, *BMC Genetics*, **13**, 62, doi: 10.1186/1471-2164-13-62.
 49. Chintamaneni, C. D., Halaban, R., Kobayashi, Y., Witkop, C. J., Jr., and Kwon, B. S. (1991) A single base insertion in the putative transmembrane domain of the tyrosinase gene as a cause for tyrosinase-negative oculocutaneous albinism, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **88**, 5272-5276, doi: 10.1073/pnas.88.12.5272.
 50. Rafique, M. Z., Carvalho, E., Stracke, R., Palmieri, L., Herrera, L., et al. (2016) Nonsense mutation inside anthocyanidin synthase gene controls pigmentation in yellow raspberry (*Rubus idaeus* L.), *Front. Plant Sci.*, **7**, 1892, doi: 10.3389/fpls.2016.01892.
 51. Ishishita, S., Takahashi, M., Yamaguchi, K., Kinoshita, K., Nakano, M., et al. (2018) Nonsense mutation in *PMEL* is associated with yellowish plumage colour phenotype in Japanese quail, *Sci. Rep.*, **8**, 16732, doi: 10.1038/s41598-018-34827-4.
 52. Wu, W., Liu, X., Wang, M., Meyer, R. S., Luo, X., et al. (2017) A single-nucleotide polymorphism causes smaller grain size and loss of seed shattering during African rice domestication, *Nat. Plants*, **3**, 17064, doi: 10.1038/nplants.2017.64.
 53. Amrad, A., Moser, M., Mandel, T., de Vries, M., Schuurink, R. C., et al. (2016) Gain and loss of floral scent production through changes in structural genes during pollinator-mediated speciation, *Curr. Biol.*, **26**, 3303-3312, doi: 10.1016/j.cub.2016.10.023.
 54. Zhao, Y., Wang, H., Poole, R. J., and Gems, D. (2019) A fln-2 mutation affects lethal pathology and lifespan in *C. elegans*, *Nat. Commun.*, **10**, 5087, doi: 10.1038/s41467-019-13062-z.
 55. Hoehn, K. B., McGaugh, S. E., and Noor, M. A. (2012) Effects of premature termination codon polymorphisms in the *Drosophila pseudoobscura* subclade, *J. Mol. Evol.*, **75**, 141-150, doi: 10.1007/s00239-012-9528-x.
 56. MacArthur, D. G., Seto, J. T., Raftery, J. M., Quinlan, K. G., Huttley, G. A., et al. (2007) Loss of *ACTN3* gene function alters mouse muscle metabolism and shows evidence of positive selection in humans, *Nat. Genet.*, **39**, 1261-1265, doi: 10.1038/ng2122.
 57. North, K. N., Yang, N., Wattanasirichaigoon, D., Mills, M., Easteal, S., et al. (1999) A common nonsense mutation results in alpha-actinin-3 deficiency in the general population, *Nat. Genetics*, **21**, 353-354, doi: 10.1038/7675.
 58. Xue, Y., Daly, A., Yngvadottir, B., Liu, M., Coop, G., et al. (2006) Spread of an inactive form of *caspase-12* in humans is due to recent positive selection, *Am. J. Hum. Genet.*, **78**, 659-670, doi: 10.1086/503116.
 59. Fry, A. E., Ghansa, A., Small, K. S., Palma, A., Auburn, S., et al. (2009) Positive selection of a *CD36* nonsense variant in sub-Saharan Africa, but no association with severe malaria phenotypes, *Hum. Mol. Genet.*, **18**, 2683-2692, doi: 10.1093/hmg/ddp192.
 60. Flannick, J., Thorleifsson, G., Beer, N. L., Jacobs, S. B., Grarup, N., et al. (2014) Loss-of-function mutations in *SLC30A8* protect against type 2 diabetes, *Nat. Genet.*, **46**, 357-363, doi: 10.1038/ng.2915.
 61. Dwivedi, O. P., Lehtovirta, M., Hastoy, B., Chandra, V., Krentz, N., et al. (2019) Loss of ZnT8 function protects against diabetes by enhanced insulin secretion, *Nat. Genet.*, **51**, 1596-1606, doi: 10.1038/s41588-019-0513-9.
 62. Olson, M. V. (1999) When less is more: Gene loss as an engine of evolutionary change, *Am. J. Hum. Genet.*, **64**, 18-23, doi: 10.1086/302219.
 63. Mills, M., Yang, N., Weinberger, R., Vander Woude, D. L., Beggs, A. H., et al. (2001) Differential expression of the actin-binding proteins, alpha-actinin-2 and -3, in different species: implications for the evolution of functional redundancy, *Hum. Mol. Genet.*, **10**, 1335-1346, doi: 10.1093/hmg/10.13.1335.
 64. Niemi, A. K., and Majamaa, K. (2005) Mitochondrial DNA and ACTN3 genotypes in Finnish elite endurance and sprint athletes, *Eur. J. Hum. Genet.*, **13**, 965-969, doi: 10.1038/sj.ejhg.5201438.
 65. Wang, X., Grus, W. E., and Zhang, J. (2006) Gene losses during human origins, *PLoS Biol.*, **4**, e52, doi: 10.1371/journal.pbio.0040052.

66. Xiang, Y., Song, B., Née, G., Kramer, K., Finkemeier, I., et al. (2016) Sequence Polymorphisms at the reduced DORMANCY5 pseudophosphatase underlie natural variation in Arabidopsis dormancy, *Plant Physiol.*, **171**, 2659-2670, doi: 10.1104/pp.16.00525.
67. Matika, O., Robledo, D., Pong-Wong, R., Bishop, S. C., Riggio, V., et al. (2019) Balancing selection at a premature stop mutation in the myostatin gene underlies a recessive leg weakness syndrome in pigs, *PLoS Genet.*, **15**, e1007759, doi: 10.1371/journal.pgen.1007759.
68. Landrum, M. J., Lee, J. M., Benson, M., Brown, G. R., Chao, C., et al. (2018) ClinVar: improving access to variant interpretations and supporting evidence, *Nucleic Acids Res.*, **46**, D1062-D1067, doi: 10.1093/nar/gkx1153.
69. Karczewski, K. J., Francioli, L. C., Tiao, G., Cummings, B. B., Alföldi, J., et al. (2020) The mutational constraint spectrum quantified from variation in 141,456 humans, *Nature*, **581**, 434-443, doi: 10.1038/s41586-020-2308-7.
70. Stenson, P. D., Mort, M., Ball, E. V., Chapman, M., Evans, K., et al. (2020) The human gene mutation database (HGMD®): Optimizing its use in a clinical diagnostic or research setting, *Hum. Genet.*, **139**, 1197-1207, doi: 10.1007/s00439-020-02199-3.
71. Tate, J. G., Bamford, S., Jubb, H. C., Sondka, Z., Beare, D. M., et al. (2019) COSMIC: The catalogue of somatic mutations in cancer, *Nucleic Acids Res.*, **47**, D941-D947, doi: 10.1093/nar/gky1015.
72. McKusick, V. A. (1998) *Mendelian Inheritance in Man. A Catalog of Human Genes and Genetic Disorders* (12th edition) Baltimore: Johns Hopkins University Press.
73. Fokkema, I. F., Taschner, P. E., Schaafsma, G. C., Celli, J., Laros, J. F., et al. (2011) LOVD v.2.0: The next generation in gene variant databases, *Hum. Mutat.*, **32**, 557-563, doi: 10.1002/humu.21438.
74. Blake, J. A., Baldarelli, R., Kadin, J. A., Richardson, J. E., Smith, C. L., et al. (2021) Mouse Genome Database (MGD): Knowledgebase for mouse-human comparative biology, *Nucleic Acids Res.*, **49**, D981-D987, doi: 10.1093/nar/gkaa1083.
75. Chen, N., Fu, W., Zhao, J., Shen, J., Chen, Q., et al. (2020) BGVD: An integrated database for bovine sequencing variations and selective signatures, *Genom. Proteom. Bioinform.*, **18**, 186-193, doi: 10.1016/j.gpb.2019.03.007.
76. Rhee, S. Y., Beavis, W., Berardini, T. Z., Chen, G., Dixon, D., et al. (2003) The Arabidopsis Information Resource (TAIR): a model organism database providing a centralized, curated gateway to Arabidopsis biology, research materials and community, *Nucleic Acids Res.*, **31**, 224-228, doi: 10.1093/nar/gkg076.
77. Li, W. H., Gojobori, T., and Nei, M. (1981) Pseudogenes as a paradigm of neutral evolution, *Nature*, **292**, 237-239, doi: 10.1038/292237a0.
78. Li, W. H., Gojobori, T., and Nei, M. (1981) Evolution of pseudogenes and its relevance to the neutrality vs selection controversy, *Genetics*, **97**, 1.
79. Singleton, B. K., Green, C. A., Avent, N. D., Martin, P. G., Smart, E., et al. (2000) The presence of an RHD pseudogene containing a 37 base pair duplication and a nonsense mutation in africans with the Rh D-negative blood group phenotype, *Blood*, **95**, 12-18.
80. Harrison, P. M., Milburn, D., Zhang, Z., Bertone, P., and Gerstein, M. (2003) Identification of pseudogenes in the *Drosophila melanogaster* genome, *Nucleic Acids Res.*, **31**, 1033-1037, doi: 10.1093/nar/gkg169.
81. Potapova, N. A., Andrianova, M. A., Bazykin, G. A., and Kondrashov, A. S. (2018) Are nonsense alleles of *Drosophila melanogaster* genes under any selection? *Gen. Biol. Evol.*, **10**, 1012-1018, doi: 10.1093/gbe/evy032.
82. Prieto-Godino, L. L., Rytz, R., Bargeton, B., Abuin, L., Arguello, J. R., et al. (2016) Olfactory receptor pseudopseudogenes, *Nature*, **539**, 93-97, doi: 10.1038/nature19824.
83. Dos Santos, G., Schroeder, A. J., Goodman, J. L., Strelets, V. B., Crosby, M. A., et al. (2015) FlyBase: introduction of the *Drosophila melanogaster* Release 6 reference genome assembly and large-scale migration of genome annotations, *Nucleic Acids Res.*, **43**, D690-D697, doi: 10.1093/nar/gku1099.
84. Wetterbom, A., Gyllensten, U., Cavelier, L., and Bergström, T. F. (2009) Genome-wide analysis of chimpanzee genes with premature termination codons, *BMC Genom.*, **10**, 56, doi: 10.1186/1471-2164-10-56.
85. Xu, J., and Zhang, J. (2016) Are human translated pseudogenes functional? *Mol. Biol. Evol.*, **33**, 755-760, doi: 10.1093/molbev/msv268.
86. Torella, A., Zanobio, M., Zeuli, R., Del Vecchio Blanco, F., Savarese, M., et al. (2020) The position of nonsense mutations can predict the phenotype severity: A survey on the *DMD* gene, *PLoS One*, **15**, e0237803, doi: 10.1371/journal.pone.0237803.
87. Valentine, C. R. (1998) The association of nonsense codons with exon skipping, *Mutat. Res.*, **411**, 87-117, doi: 10.1016/s1383-5742(98)00010-6.
88. Thein, S. L. (2004) Genetic insights into the clinical diversity of beta thalassaemia, *Br. J. Haematol.*, **124**, 264-274, doi: 10.1046/j.1365-2141.2003.04769.x.
89. Skraban, C. M., Wells, C. F., Markose, P., Cho, M. T., Nesbitt, A. I., et al. (2017) *WDR26* haploinsufficiency causes a recognizable syndrome of intellectual disability, seizures, abnormal gait, and distinctive facial features, *Am. J. Hum. Genet.*, **101**, 139-148, doi: 10.1016/j.ajhg.2017.06.002.
90. Kuehn, H. S., Bernasconi, A., Niemela, J. E., Almejun, M. B., Gallego, W., et al. (2020) A nonsense N-terminus NFKB2 mutation leading to haploinsufficiency in a patient with a predominantly antibody deficiency, *J. Clin. Immunol.*, **40**, 1093-1101, doi: 10.1007/s10875-020-00842-2.
91. Zhang, X., Chai, J., Azhar, G., Sheridan, P., Borrás, A. M., et al. (2001) Early postnatal cardiac changes and premature death in transgenic mice overexpressing a mutant form of serum response factor, *J. Biol. Chem.*, **276**, 40033-40040, doi: 10.1074/jbc.M104934200.
92. Yngvadottir, B., Xue, Y., Searle, S., Hunt, S., Delgado, M., et al. (2009) A genome-wide survey of the prevalence and evolutionary forces acting on human nonsense SNPs, *Am. J. Hum. Genet.*, **84**, 224-234, doi: 10.1016/j.ajhg.2009.01.008.
93. Casci, T. (2011) Molecular evolution: Dealing with nonsense, *Nat. Rev. Genet.*, **12**, 805, doi: 10.1038/nrg3109.
94. Cusack, B. P., Arndt, P. F., Duret, L., and Roest Crollius, H. (2011) Preventing dangerous nonsense: Selection for robustness to transcriptional error in human genes, *PLoS Genet.*, **7**, e1002276, doi: 10.1371/journal.pgen.1002276.
95. Ma, Z., and Chen, J. (2020) Premature termination codon-bearing mRNA mediates genetic compensation response, *Zebrafish*, **17**, 157-162, doi: 10.1089/zeb.2019.1824.
96. Ma, Z., Zhu, P., Shi, H., Guo, L., Zhang, Q., et al. (2019) PTC-bearing mRNA elicits a genetic compensation response via Upf3a and COMPASS components, *Nature*, **568**, 259-263, doi: 10.1038/s41586-019-1057-y.
97. Ma, Z. P., and Chen, J. (2019) [Nonsense mutations and genetic compensation response], [Article in Chinese], *Hereditas*, **41**, 359-364, doi: 10.16288/j.ycz.19-101.
98. El-Brolosy, M. A., and Stainier, D. (2017) Genetic compensation: A phenomenon in search of mechanisms, *PLoS Genet.*, **13**, e1006780, doi: 10.1371/journal.pgen.1006780.

99. Chang, Y. F., Imam, J. S., and Wilkinson, M. F. (2007) The nonsense-mediated decay RNA surveillance pathway, *Annu. Rev. Biochem.*, **76**, 51-74, doi: 10.1146/annurev.biochem.76.050106.093909.
100. Riehs-Kearnan, N., Gloggnitzer, J., Dekrout, B., Jonak, C., and Riha, K. (2012) Aberrant growth and lethality of Arabidopsis deficient in nonsense-mediated RNA decay factors is caused by autoimmune-like response, *Nucleic Acids Res.*, **40**, 5615-5624, doi: 10.1093/nar/gks195.
101. Maquat, L. E. (2005) Nonsense-mediated mRNA decay in mammals, *J. Cell Sci.*, **118**, 1773-1776, doi: 10.1242/jcs.01701.
102. Kurosaki, T., Popp, M. W., and Maquat, L. E. (2019) Quality and quantity control of gene expression by nonsense-mediated mRNA decay, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, **20**, 406-420, doi: 10.1038/s41580-019-0126-2.
103. Stalder, L., and Mühlemann, O. (2008) The meaning of nonsense, *Trends Cell Biol.*, **18**, 315-321, doi: 10.1016/j.tcb.2008.04.005.
104. Khajavi, M., Inoue, K., and Lupski, J. R. (2006) Nonsense-mediated mRNA decay modulates clinical outcome of genetic disease, *Eur. J. Hum. Genet.*, **14**, 1074-1081, doi: 10.1038/sj.ejhg.5201649.
105. Holbrook, J. A., Neu-Yilik, G., Hentze, M. W., and Kulozik, A. E. (2004) Nonsense-mediated decay approaches the clinic, *Nat. Genet.*, **36**, 801-808, doi: 10.1038/ng1403.
106. Lindeboom, R. G., Supek, F., and Lehner, B. (2016) The rules and impact of nonsense-mediated mRNA decay in human cancers, *Nat. Genet.*, **48**, 1112-1118, doi: 10.1038/ng.3664.
107. Hwang, J., and Kim, Y. K. (2013) When a ribosome encounters a premature termination codon, *BMB Rep.*, **46**, 9-16, doi: 10.5483/bmbrep.2013.46.1.002.
108. Nickless, A., Bailis, J. M., and You, Z. (2017) Control of gene expression through the nonsense-mediated RNA decay pathway, *Cell Biosci.*, **7**, 26, doi: 10.1186/s13578-017-0153-7.
109. Kervestin, S., and Jacobson, A. (2012) NMD: A multifaceted response to premature translational termination, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, **13**, 700-712, doi: 10.1038/nrm3454.
110. Kalyna, M., Simpson, C. G., Syed, N. H., Lewandowska, D., Marquez, Y., et al. (2012) Alternative splicing and nonsense-mediated decay modulate expression of important regulatory genes in Arabidopsis, *Nucleic Acids Res.*, **40**, 2454-2469, doi: 10.1093/nar/gkr932.
111. Rayson, S., Arciga-Reyes, L., Wootton, L., De Torres Zabala, M., Truman, W., et al. (2012) A role for nonsense-mediated mRNA decay in plants: pathogen responses are induced in *Arabidopsis thaliana* NMD mutants, *PLoS One*, **7**, e31917, doi: 10.1371/journal.pone.0031917.
112. Shi, C., Baldwin, I. T., and Wu, J. (2012) Arabidopsis plants having defects in nonsense-mediated mRNA decay factors UPF1, UPF2, and UPF3 show photoperiod-dependent phenotypes in development and stress responses, *J. Integr. Plant Biol.*, **54**, 99-114, doi: 10.1111/j.1744-7909.2012.01093.x.
113. Sato, H., and Singer, R. H. (2021) Cellular variability of nonsense-mediated mRNA decay, *Nat. Commun.*, **12**, 7203, doi: 10.1038/s41467-021-27423-0.
114. Zetoune, A. B., Fontanière, S., Magnin, D., Anczuków, O., Buisson, M., et al. (2008) Comparison of nonsense-mediated mRNA decay efficiency in various murine tissues, *BMC Genet.*, **9**, 83, doi: 10.1186/1471-2156-9-83.
115. Teran, N. A., Nachun, D. C., Eulalio, T., Ferraro, N. M., Smail, C., et al. (2021) Nonsense-mediated decay is highly stable across individuals and tissues, *Am. J. Hum. Genet.*, **108**, 1401-1408, doi: 10.1016/j.ajhg.2021.06.008.
116. Nagy, E., and Maquat, L. E. (1998) A rule for termination-codon position within intron-containing genes: when nonsense affects RNA abundance, *Trends Biochem. Sci.*, **23**, 198-199, doi: 10.1016/s0968-0004(98)01208-0.
117. Neu-Yilik, G., Amthor, B., Gehring, N. H., Bahri, S., Paidassi, H., et al. (2011) Mechanism of escape from nonsense-mediated mRNA decay of human beta-globin transcripts with nonsense mutations in the first exon, *RNA*, **17**, 843-854, doi: 10.1261/rna.2401811.
118. Inácio, A., Silva, A. L., Pinto, J., Ji, X., Morgado, A., et al. (2004) Nonsense mutations in close proximity to the initiation codon fail to trigger full nonsense-mediated mRNA decay, *J. Biol. Chem.*, **279**, 32170-32180, doi: 10.1074/jbc.M405024200.
119. Perrin-Vidoz, L., Sinilnikova, O. M., Stoppa-Lyonnet, D., Lenoir, G. M., and Mazoyer, S. (2002) The nonsense-mediated mRNA decay pathway triggers degradation of most BRCA1 mRNAs bearing premature termination codons, *Hum. Mol. Genet.*, **11**, 2805-2814, doi: 10.1093/hmg/11.23.2805.
120. Dyle, M. C., Kolakada, D., Cortazar, M. A., and Jagannathan, S. (2020) How to get away with nonsense: Mechanisms and consequences of escape from nonsense-mediated RNA decay, *Wiley Interdiscip. Rev RNA*, **11**, e1560, doi: 10.1002/wrna.1560.
121. Jungreis, I., Lin, M. F., Spokony, R., Chan, C. S., Negre, N., et al. (2011) Evidence of abundant stop codon readthrough in *Drosophila* and other metazoa, *Genome Res.*, **21**, 2096-2113, doi: 10.1101/gr.119974.110.
122. Adachi, H., and Yu, Y. T. (2020) Pseudouridine-mediated stop codon readthrough in *S. cerevisiae* is sequence context-independent, *RNA*, **26**, 1247-1256, doi: 10.1261/rna.076042.120.
123. McCaughan, K. K., Brown, C. M., Dalphin, M. E., Berry, M. J., and Tate, W. P. (1995) Translational termination efficiency in mammals is influenced by the base following the stop codon, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **92**, 5431-5435, doi: 10.1073/pnas.92.12.5431.
124. Cassan, M., and Rousset, J. P. (2001) UAG readthrough in mammalian cells: Effect of upstream and downstream stop codon contexts reveal different signals, *BMC Mol. Biol.*, **2**, 3, doi: 10.1186/1471-2199-2-3.
125. Stiebler, A. C., Freitag, J., Schink, K. O., Stehlik, T., Tillmann, B. A., et al. (2014) Ribosomal readthrough at a short UGA stop codon context triggers dual localization of metabolic enzymes in Fungi and animals, *PLoS Genet.*, **10**, e1004685, doi: 10.1371/journal.pgen.1004685.
126. Chen, Y., Sun, T., Bi, Z., Ni, J. Q., Pastor-Pareja, J. C., et al. (2020) Premature termination codon readthrough in *Drosophila* varies in a developmental and tissue-specific manner, *Sci. Rep.*, **10**, 8485, doi: 10.1038/s41598-020-65348-8.
127. Böck, A., Forchhammer, K., Heider, J., Leinfelder, W., Sawers, G., et al. (1991) Selenocysteine: The 21st amino acid, *Mol. Microbiol.*, **5**, 515-520, doi: 10.1111/j.1365-2958.1991.tb00722.x.
128. Keeling, K. M., Xue, X., Gunn, G., and Bedwell, D. M. (2014) Therapeutics based on stop codon readthrough, *Annu. Rev. Genom. Hum. Genet.*, **15**, 371-394, doi: 10.1146/annurev-genom-091212-153527.
129. Peltz, S. W., Morsy, M., Welch, E. M., and Jacobson, A. (2013) Ataluren as an agent for therapeutic nonsense suppression, *Annu. Rev. Med.*, **64**, 407-425, doi: 10.1146/annurev-med-120611-144851.
130. Roy, B., Friesen, W. J., Tomizawa, Y., Leszyk, J. D., Zhuo, J., et al. (2016) Ataluren stimulates ribosomal selection of near-cognate tRNAs to promote nonsense suppression, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **113**, 12508-12513, doi: 10.1073/pnas.1605336113.
131. Peled, A., Samuelov, L., Sarig, O., Bochner, R., Malki, L., et al. (2020) Treatment of hereditary hypotrichosis simplex

- of the scalp with topical gentamicin, *Br. J. Dermatol.*, **183**, 114-120, doi: 10.1111/bjd.18718.
132. Leubitz, A., Vanhoutte, F., Hu, M. Y., Porter, K., Gordon, E., et al. (2021) A randomized, double-blind, placebo-controlled, multiple dose escalation study to evaluate the safety and pharmacokinetics of ELX-02 in healthy subjects, *Clin. Pharmacol. Drug Dev.*, **10**, 859-869, doi: 10.1002/cpdd.914.
133. Martins-Dias, P., and Romão, L. (2021) Nonsense suppression therapies in human genetic diseases, *Cell. Mol. Life Sci.*, **78**, 4677-4701, doi: 10.1007/s00018-021-03809-7.
134. Morais, P., Adachi, H., and Yu, Y. T. (2020) Suppression of nonsense mutations by new emerging technologies, *Int. J. Mol. Sci.*, **21**, 4394, doi: 10.3390/ijms21124394.
135. Melfi, R., Cancemi, P., Chiavetta, R., Barra, V., Lentini, L., et al. (2020) Investigating REPAIRv2 as a tool to edit CFTR mRNA with premature stop codons, *Int. J. Mol. Sci.*, **21**, 4781, doi: 10.3390/ijms21134781.

NONSENSE MUTATIONS IN EUKARYOTES

Review

Nadezhda A. Potapova

*Kharkevich Institute for Information Transmission Problems (IITP), Russian Academy of Sciences,
127051 Moscow, Russia; e-mail: nadezhdalpotapova@gmail.com*

Nonsense mutations are a type of mutations which result in a premature termination codon occurrence. In general, these mutations have been considered to be among the most harmful ones which lead to premature protein translation termination and result in shortened nonfunctional polypeptide. However, there is evidence that not all nonsense mutations are harmful as well as some molecular mechanisms exist which allow to avoid pathogenic effects of these mutations. This review addresses relevant information on nonsense mutations in eukaryotic genomes, characteristics of these mutations and different molecular mechanisms preventing or mitigating harmful effects thereof.

Keywords: nonsense mutation, stop codon, eukaryotes, negative selection, positive selection

УДК 577.122:615.357

МЕХАНИЗМЫ РЕГУЛЯЦИИ ФУНКЦИОНИРОВАНИЯ БЕЛКА-ТРАНСПОРТЁРА Р-ГЛИКОПРОТЕИНА ПОД ДЕЙСТВИЕМ ОКСИДА АЗОТА

© 2022 А.В. Шулькин*, Ю.В. Абаленихина, Е.А. Судакова,
П.Ю. Мыльников, Е.Н. Якушева

Рязанский государственный медицинский университет им. академика И.П. Павлова,
390026 Рязань, Россия; электронная почта: alekseishulkin@rambler.ru

Поступила в редакцию 01.02.2022

После доработки 21.03.2022

Принята к публикации 22.03.2022

В исследовании на клетках линии Сасо-2 изучены механизмы регуляции белка-транспортёра Р-гликопротеина (Pgp) под действием оксида азота (NO). В качестве донора NO использовали S-нитрозоглутатион (GSNO), который добавляли к клеткам в концентрациях 1, 10, 50, 100 и 500 мкМ и инкубировали в течение 3, 24 или 72 ч. Относительное количество Pgp анализировали методом вестерн-блот, активность – по транспорту его субстрата фексофенадина. В ходе исследования было показано, что кратковременное воздействие GSNO в течение 3 ч в концентрации 500 мкМ вызывало в клетках линии Сасо-2 повышение уровня пероксинитрита, что снижало активность, но не относительное количество Pgp. Увеличение длительности экспозиции до 24 ч повышало уровень и активность Pgp при концентрации GSNO 10 и 50 мкМ, увеличивало относительное количество без роста активности при концентрации 100 мкМ и снижало содержание белка-транспортёра при концентрации 500 мкМ. При длительности воздействия 72 ч GSNO в концентрации 10 мкМ повышал относительное количество и активность Pgp, а в концентрациях 100 и 500 мкМ снижал содержание белка-транспортёра. С помощью применения специфических ингибиторов было показано, что повышение относительного количества Pgp при воздействии низких концентраций GSNO реализовалось через NO-цГМФ-сигнальный путь, а при повышении концентрации GSNO, развитии нитрозативного стресса – через Nrf2 и конститутивный андростановый рецептор.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: Р-гликопротеин, ABCB1-белок, оксид азота, гуанилатциклаза, клеточная линия Сасо-2.

DOI: 10.31857/S0320972522040054, EDN: AQKXME

ВВЕДЕНИЕ

Р-гликопротеин (Pgp, ABCB1, MDR1) – АТФ-зависимый белок-транспортёр, относящийся к суперсемейству ABC-транспортёров и

Принятые сокращения: клетки линии Сасо-2 – клетки аденокарциномы ободочной кишки человека; МТТ – 3-(4,5-диметилтиазол-2-ил)-2,5-дифенил-2Н-тетразолий бромид; АЕМ1 – ингибитор транскрипционного фактора Nrf2 (N-(1,3-бензодиоксол-5-илметил)-5-(4-фторфенил)-тиено[2,3-d]пиримидин-4-амин); CAR – конститутивный андростановый рецептор; CINPA1 – ингибитор CAR (5-[(диэтиламино)ацетил]-10,11-дигидро-5Н-добензо[b,f]азепин-3-ил)этиловый эфир карбаминовой кислоты); GSNO – S-нитрозоглутатион; NO – оксид азота (II); NOx – метаболиты оксида азота; Nrf2 – транскрипционный фактор, NF-E2-related factor 2; ODQ – ингибитор растворимой гуанилатциклазы (1Н-[1,2,4]оксадиазоло-[4,3-а]хинокса-лин-1-он); Papp – коэффициент кажущейся проницаемости (apparent permeability coefficient); Pgp – Р-глико-протеин; PXR – прегнан Х рецептор; SNAP – S-нитрозо-N-ацетилпеницилламин.

* Адресат для корреспонденции.

обеспечивающий выведение субстратов из клеток во внеклеточное пространство и биологические жидкости. Pgp экспрессируется на апикальной поверхности энтероцитов кишечника, билиарной поверхности гепатоцитов, поверхности почечного эпителия, обращенной в просвет канальцев, эндотелии гистогематических барьеров, а также в опухолевых клетках [1]. Учитывая указанную локализацию, принято считать, что основными функциями данного белка-транспортёра являются: участие в фармакокинетике (всасывании, распределении и выведении) лекарственных веществ и развитии резистентности опухолей к химиотерапии [2].

Активность Pgp может изменяться под воздействием различных факторов и веществ. При этом индукторы (рифампицин, карбамазепин) повышают активность белка-транспортёра [3], а ингибиторы (кетоконазол, верапамил) её снижают [4].

Pgp обладает низкой субстратной специфичностью, то есть его субстратами является широ-

кий спектр лекарственных веществ: противоопухолевые препараты, новые пероральные антикоагулянты, сердечные гликозиды, блокаторы кальциевых каналов и т.д. [5]. Изменение активности Pgp может повлиять на эффективность и безопасность терапии данными веществами.

NO (оксид азота II) — сигнальная молекула, обладающая разнообразными физиологическими эффектами. В многочисленных исследованиях было показано, что NO играет важную роль в межклеточных коммуникациях, регуляции сосудистого тонуса, синаптической пластичности, в развитии воспаления и повреждении клеток [6].

Данные научной литературы показывают, что NO также может влиять и на активность Pgp. На изолированных мембранах клеток, содержащих Pgp, донор NO пропиламин-пропиламина ноноат (propylamine propylamine nonoate, PPNO) в концентрациях 0,02–200 мкМ при длительности воздействия 30 мин снижал АТФазную активность Pgp. На клетках рака яичника NCI/ADR-RES, обладающих множественной лекарственной устойчивостью, PPNO в концентрациях 50, 100 и 200 мкМ и экспозиции 1 ч вызывал увеличение накопления в клетках субстрата Pgp адриамицина (Adriamycin), что свидетельствует об ингибировании белка-транспортёра [7]. Аналогичные результаты были получены и с другим донором NO — [O₂-(2,4-динитрофенил)-1-[4-этоксикарбонил]-пиперазин-1ил]-диазен-1-иум-1-2-диолат] (JS-K) [8].

На клетках аденокарциномы ободочной кишки человека Caco-2 было показано, что донор NO S-нитрозо-N-ацетилпеницилламин (SNAP) в концентрациях 0,1–5 мМ с длительностью воздействия 6 ч снижал накопление циклоспорина А (субстрата Pgp) не менее чем на 30% ($p = 0,05$), что свидетельствует о повышении активности белка-транспортёра. При концентрации SNAP 1 мМ также отмечалось и повышение количества Pgp, оценённое методом вестерн-блот [9].

На клеточной линии GPNT, представляющей собой иммортализованную линию эндотелиальных клеток головного мозга крысы, было выявлено, что донор NO SNAP в концентрации 1 мМ повышал уровни мРНК генов *mdr1a* и *mdr1b*, кодирующих Pgp у грызунов, а также количество самого белка через 24 ч воздействия [10].

В исследовании на клетках линии Caco-2 было выявлено, что нитропруссид натрия — донор NO, в концентрациях 0,1 или 2 ммоль/литр при краткосрочном воздействии (4 ч) снижал активность и количество Pgp, а 24-часовая экспозиция, напротив, повышала активность и ко-

личество белка-транспортёра. В данном исследовании также было высказано предположение, что повышение активности Pgp (количество при этом не оценивалось) связано с влиянием NO на протеинкиназу С (PKC), фосфоинозитид-3-киназу/протеинкиназу В (PI3K/Akt), митоген-активируемую протеинкиназу p38 (p38 MAPK) [11].

Таким образом, на данный момент полученные результаты о влиянии NO на количество и активность Pgp носят противоречивый характер и механизм данного влияния не установлен, что и послужило целью настоящего исследования.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Культивирование клеток. Исследование выполнено на линии клеток аденокарциномы ободочной кишки человека Caco-2 (ЦКП «Коллекция культур клеток позвоночных», Санкт-Петербург, Россия). Клетки культивировали при 37 °С, в атмосфере 5% CO₂ в инкубаторе WS-189C («World Science», Корея), в модифицированной по способу Дульбекко среде Игла (DMEM) с высоким содержанием глюкозы (4500 мг/л), с добавлением L-глутамин (4 мМ), 15% эмбриональной бычьей сыворотки, 100 Ед./мл и 100 мкг/мл пенициллина и стрептомицина (все составляющие производства «Sigma-Aldrich», Германия) соответственно. Клетки культивировали в течение 21 сут., поскольку при данном сроке происходит их спонтанная дифференцировка в энтероцитоподобные клетки, гиперэкспрессирующие Pgp [12].

В качестве донора NO использовали S-нитрозоглутатион (GSNO, «Sigma Aldrich»), который добавляли к клеткам до получения конечной концентрации 1, 10, 50, 100 и 500 мкМ и инкубировали в течение 3, 24 или 72 ч ($n = 3$ для каждой концентрации и временной точки). К контрольным клеткам в эквивалентном объёме прибавляли воду для инъекций (растворитель GSNO).

При оценке механизма индукции Pgp под действием GSNO в питательную среду за 30 мин до добавления донора NO вносили: ингибитор растворимой гуанилатциклазы — 1Н-[1,2,4]оксадиазоло-[4,3-а]хиноксалин-1-он (ODQ, «Sigma Aldrich») в концентрации 10 мкМ [13], ингибитор ядерного фактора эритроидного происхождения 2 (Nrf2) — N-(1,3-бензодиоксол-5-илметил)-5-(4-фторфенил)-тиено[2,3-d]пиримидин-4-амин (AEM1, «Sigma Aldrich», Германия) в концентрации 5 мкМ [14], ингибитор прегнан X рецептора (PXR) — кетоконазол, 10 мкМ («Sigma Aldrich») [15], ингибитор конс-

титутивного андростанового рецептора (CAR) – 5-[(диэтиламино)ацетил]-10,11-дигидро-5H-дибензо[b,f]азепин-3-ил]этиловый эфир карбаминной кислоты (CINPA 1, «TOCRIS», Великобритания) в концентрации 10 мкМ [16]. GSNO использовался в концентрациях, которые вызывали повышение относительного количества Pgp.

Для исследования цитотоксичности GSNO клетки высевали в 96-луночный планшет («Corning», США); для изучения влияния GSNO на относительное количество Pgp, концентрацию метаболитов оксида азота (суммарная концентрация нитратов и нитритов, NOx), пероксинитрита и битирозина клетки культивировали в 6-луночных планшетах («Corning»), а для оценки действия донора NO на активность Pgp – в специальной трансвелл-системе (12 mm Transwell® with 0,4 µm Pore Polycarbonate Membrane Insert, Sterile, «Corning») [17].

Цитотоксический тест (МТТ-тест). Клетки засевали в 96-луночный планшет из расчета 10⁴ клеток на каждую лунку и культивировали в течение 21 сут., затем добавляли питательную среду с GSNO. После окончания инкубации в каждую лунку добавляли по 20 мкл 0,5%-ного раствора 3-(4,5-диметилтиазол-2-ил)-2,5-дифенил-2Н-тетразолий бромид (МТТ) и инкубировали в течение 2 ч, затем раствор МТТ удаляли и добавляли 200 мкл 1%-ного раствора диметилсульфоксида («ПанЭко», Россия) [18]. Поглощение измеряли через 10 мин при 530 нм на спектрофотометре для планшетов Stat Fax 2100 («Awareness Technology», США).

Жизнеспособность клеток Caco-2 в присутствии GSNO рассчитывали по формуле:

$$\text{Жизнеспособность} = \frac{\text{ОП опытных лунок} - \text{ОП среды}}{\text{ОП контрольных лунок} - \text{ОП среды}} \times 100\%, \quad (1)$$

где ОП – оптическая плотность.

Получение тотальных клеточных лизатов. После окончания экспозиции с GSNO клетки снимали с лунок 6-луночных планшетов раствором трипсин-ЭДТА (0,25% трипсина и 0,2% ЭДТА, «Sigma-Aldrich»), трижды промывали раствором фосфатного буфера («BioRad», США) и лизировали в NP40 Cell Lysis Buffer Thermo («Thermo Fisher Scientific», США) с добавлением смеси ингибиторов протеиназ: 2 мМ (4-(2-аминоэтил)бензенсульфонил флуорида гидрохлорида (AEBSF), 0,3 мкМ апротинина, 130 мкМ бестатина, 1 мМ ЭДТА, 14 мкМ транс-эпоксисукцинил-L-лейциламидо(4гуанидино)бутана (E-64), 1 мкМ лейпептина, («Sigma-Aldrich») в течение 30 мин при +4 °С и постоянном перемешивании из расчета 10⁷ клеток на 100 мкл буфера. Полу-

ченный лизат центрифугировали при 5000 g (СМ-50, «Eppendorf», Германия). Супернатант использовали для выполнения биохимических анализов.

Количество белка в пробах анализировали методом Бредфорда (Pierce Coomassie Plus (Bradford) Assay Kit, «Thermo Fisher Scientific») [19].

Определение относительного количества Pgp в клетках линии Caco-2 проводили методом вестерн-блот. 20 мкг белков супернатанта подвергали электрофорезу с использованием 7,5%-ного TGX Stain-Free FastCast Acrylamide Kit («Bio-Rad», США) в буферной системе Laemmli («BioRad»). Образцы смешивали с буфером Laemmli («Bio-Rad»), содержащим 50 мМ β-меркаптоэтанола («Bio-Rad») в соотношении 1 : 3, инкубировали 10 мин при температуре 70 °С. Гели прогоняли при 100 В в течение 90 мин.

Белки переносили на нитроцеллюлозную мембрану «Trans-Blot Turbo Mini-Size nitrocellulose» («Bio-Rad») с использованием Mini Trans-Blot («Bio-Rad») в течение 10 мин при 25 В и 1,3 А.

Белки на мембране блокировали 1%-ным раствором Casein Blocker («Bio-Rad»), содержащим 0,1% (v/v) Tween 20 («Sigma-Aldrich»), при инкубации в течение 1 ч и комнатной температуре.

Детекцию белка Pgp проводили с использованием первичных мышинных моноклональных антител (P-Glycoprotein Antibody MA5-13854, «Invitrogen», США) в разведении 1 : 200 в блокирующем растворе Casein blocker («Bio-Rad») в течение 2 ч при 37 °С. Визуализацию первичных антител осуществляли с использованием вторичных кроличьих антител (Rabbit-anti-Mouse IgG (H + L) Secondary Antibody, HRP, «Invitrogen») в разведении 1 : 4000 и инкубацией в течение 1 ч при комнатной температуре. Хемилюминесценцию фиксировали с помощью ChemiDocXRS+ («Bio-Rad»). Интенсивность полученных полос (бэндов) анализировали денситометрически с помощью программного обеспечения ImageLab («Bio-Rad»).

Молекулярная масса Pgp была подтверждена путём сравнения с маркерами молекулярной массы (Precision plus protein standards Dual Color, «Bio-Rad»).

Содержание Pgp оценивали относительно уровня белка домашнего хозяйства GAPDH (первичные антитела GAPDH Loading Control Monoclonal Antibody (GA1R), DyLight 68 («Invitrogen»), разведение 1 : 1000, вторичные антитела – вторичные кроличьи антитела к первичным антителам GAPDH – Rabbit-anti-Mouse IgG (H+L) Secondary Antibody, HRP («Invitrogen»), разведение 1 : 4000).

Определение концентрации битирозина. Образование битирозина регистрировали по интенсивности флуоресценции в фосфатном буфере (рН 7,4) при длине волны возбуждения (λ_{Ext}) 325 нм и длине волны испускания (λ_{Em}) 415 нм на спектрофлуориметре Shimadzu RF-6000 («Shimadzu Corporation», Япония) [20].

Определение концентрации пероксинитрита. Уровень пероксинитрита анализировали по интенсивности светопоглощения при 302 нм (СФ 2000, «ОКБ Спектр», Россия). Концентрацию рассчитывали с использованием молярного коэффициента $1670 \text{ M}^{-1} \times \text{см}^{-1}$ [21].

Определение уровня метаболитов оксида азота (суммарная концентрация нитратов и нитритов NO_x) проводили спектрофотометрическим методом по окраске в реакции диазотирования нитритом сульфаниламида, входящего в состав реактива Грисса («Нева Реактив», Россия). Интенсивность окраски определяли в видимой области спектра на микропланшетном анализаторе Stat Fax 2100 («Awareness Technology», США) при длине волны 540 нм [22].

Концентрацию битирозина, пероксинитрита и NO_x выражали в нмоль на мг белка.

Оценка активности Pgp. Активность Pgp оценивали по транспорту субстрата белка-транспортёра H1-гистаминолитика – фексофенадина («Sigma-Aldrich») через монослой клеток линии Caco-2 в специальных трансвелл-системах [23].

Трансвелл-система представлена двумя камерами: апикальной и базолатеральной. Дно апикальной камеры является полупроницаемой мембраной, на которую высевали клетки линии Caco-2 с плотностью $10^5/\text{см}^2$ и культивировали в течение 21 сут.

Целостность клеточного монослоя оценивали по величине трансэпителиального сопротивления, которое определяли с помощью вольтметра Millicell ERS-2 («Millipore», США). При его значении выше $500 \text{ мОм} \times \text{см}^2$ к клеткам добавляли тестируемые концентрации GSNO в питательной среде. После окончания инкубации питательную среду заменяли на транспортную среду, представляющую собой раствор Хэнкса («Sigma-Aldrich») с 25 мМ Heps («Sigma-Aldrich») и 1% диметилсульфоксида. Затем добавляли субстрат Pgp – фексофенадин, в базолатеральную камеру в концентрации 150 мкМ [24]. Через 1, 2 и 3 ч забирали образцы из апикальной камеры-реципиента для определения концентрации субстрата (b – a -транспорт, обусловленный работой транспортёра).

Транспорт фексофенадина рассчитывали по формуле, предложенной Elsbj et al. [25]:

$$P_{app} = \frac{dQ}{dt} \times \frac{1}{A \times C_0}, \quad (2)$$

где P_{app} – коэффициент кажущейся проницаемости (apparent permeability coefficient, см/с), dQ/dt – изменение количества субстрата в камере реципиента за время инкубации (мкМ \times мл/с), A – площадь полупроницаемой мембраны лунки в трансвелл-системе (см^2), C_0 – начальная концентрация субстрата в камере-доноре (мкМ).

Концентрации фексофенадина в транспортной среде определяли методом высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ) с УФ-детектированием при длине волны 220 нм. Исследование выполняли на хроматографе «Стайер» («Аквилон», Россия) по оригинальной методике [26]. Полученную пробу транспортной среды (50 мкл), содержащую фексофенадин, разводили в 150 мкл подвижной фазы, и 100 мкл полученного раствора вводили в хроматограф.

При анализе использовали хроматографическую колонку Phenomenex Synergi 4u Polar-RP 80A ($250 \times 4,6$) («Phenomenex», США) с зернением 4 мкм. Температура разделения – 45°C . Скорость потока – 1 мл/мин. Состав подвижной фазы: 128 мл ацетонитрила, 267,4 мл деионизированной воды, 6,33 мл ледяной уксусной кислоты, с добавлением триэтиламина до рН 6,7 (все составляющие производства «PanReac AppliChem», Испания). Время удерживания фексофенадина в данных условиях составляло 12,8 мин. Количественное определение проводили методом абсолютной калибровки по площади пиков. Аналитический диапазон методики составлял 1,2–57,4 мкМ.

Статистический анализ. Полученные результаты анализировали с помощью программ «StatSoft Statistica 13.0» и Microsoft Excel. Результаты представлены в виде среднего значения \pm стандартное отклонение ($M \pm SD$). Для оценки статистической значимости различий использовали дисперсионный анализ (ANOVA), попарные сравнения выполняли с помощью критерия Ньюмена–Кейлса. Статистически значимыми считали различия при $p < 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

Развитие нитрозативного стресса под действием GSNO в клетках линии Caco-2. Уровень метаболитов оксида азота возрастал при всех концентрациях GSNO (1–500 мкМ) и всех сроках эксперимента, максимально – при концентрации 500 мкМ: на 51,8% ($p = 0,0002$) при инкубации

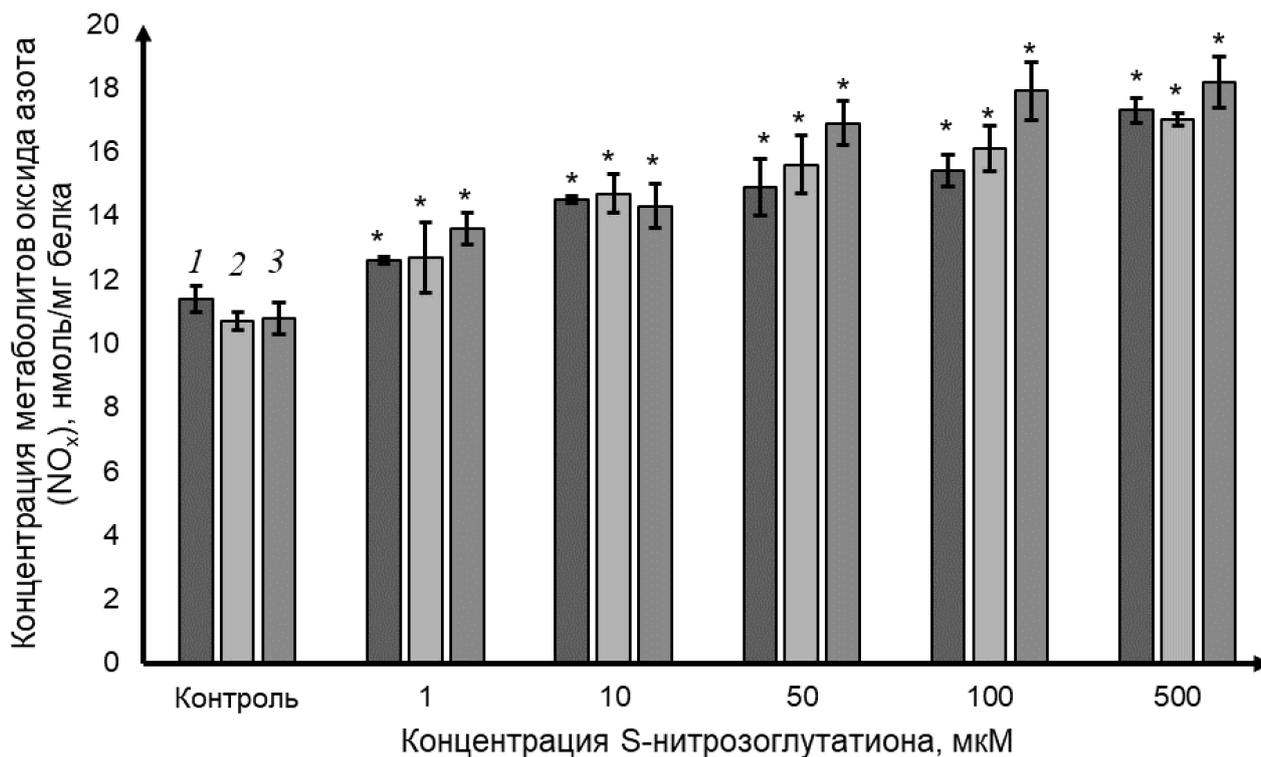


Рис. 1. Изменение концентрации метаболитов оксида азота (NO_x , $M \pm SD$, $n = 3$) при воздействии S-нитроглютамина в течение 3 (1), 24 (2) и 72 (3) ч. Определение метаболитов оксида азота проводили в лизате клеток линии Сасо-2 фотометрическим методом. * $p < 0,05$ (достоверное отличие от контроля)

3 ч; на 58,9% ($p = 0,0002$) при инкубации 24 ч и на 68,5% ($p = 0,0002$) при инкубации 72 ч (рис. 1).

Выраженность нитрозативного стресса оценивали по уровню битирозина и пероксинитрита (рис. 2). Концентрация битирозина не изменялась при воздействии GSNO в концентрациях 1–500 мкМ в течение 3 ч, а также при концентрации 1 мкМ и длительности экспозиции 24 и 72 ч по сравнению с контролем.

Содержание битирозина статистически значимо возрастало при действии GSNO в концентрациях 10–500 мкМ и сроках инкубации 24 и 72 ч. При концентрации 10 мкМ увеличение отмечалось на 18,3% ($p = 0,006$) и 30,3% ($p = 0,001$); при 50 мкМ – на 22,1% ($p = 0,003$) и 27,3% ($p = 0,007$), при 100 мкМ – на 29,4% ($p = 0,001$) и 32,6% ($p = 0,005$) по сравнению с контролем соответственно. При этом максимальное возрастание уровня битирозина отмечалось при концентрации 500 мкМ – на 34,9% ($p = 0,0002$) при инкубации 24 ч и на 38,3% ($p = 0,0003$) при инкубации 72 ч (рис. 2, а).

При длительности эксперимента 3 и 24 ч и концентрации GSNO 100 мкМ содержание пероксинитрита увеличивалось на 68,1% ($p = 0,001$) и 92,6% ($p = 0,0002$) по сравнению с контролем, а

при концентрации 500 мкМ – на 34,0% ($p = 0,01$) и 53,6% ($p = 0,001$) соответственно.

При увеличении длительности экспозиции до 72 ч содержание пероксинитрита возрастало при концентрациях GSNO 1–500 мкМ, максимально – на 84,4% ($p = 0,0002$) при концентрации 500 мкМ (рис. 2, б).

Цитотоксическое действие GSNO оценивалось по результатам МТТ-теста. В контрольной группе жизнеспособность клеток составила 100%. GSNO в концентрациях 1–500 мкМ и длительности инкубации 3 ч достоверно не влиял на жизнеспособность клеток. Данный показатель составил в среднем $102,4 \pm 5,6\%$. При воздействии GSNO в концентрациях 1–50 мкМ и длительности экспозиции 24 ч жизнеспособность клеток также не изменялась, а при концентрациях 100 и 500 мкМ – снижалась до $79,9 \pm 6,7\%$ ($p = 0,02$) и $78,8 \pm 7,2\%$ ($p = 0,03$) соответственно. Увеличение длительности экспозиции до 72 ч приводило к снижению жизнеспособности клеток до $68,4 \pm 11,4\%$ ($p = 0,0004$), $69,5 \pm 6,1\%$ ($p = 0,0004$) и $50,9 \pm 7,5\%$ ($p = 0,0003$) при концентрации GSNO 50, 100 и 500 мкМ соответственно и не влияло на данный показатель при концентрациях GSNO 1–10 мкМ (рис. 3).

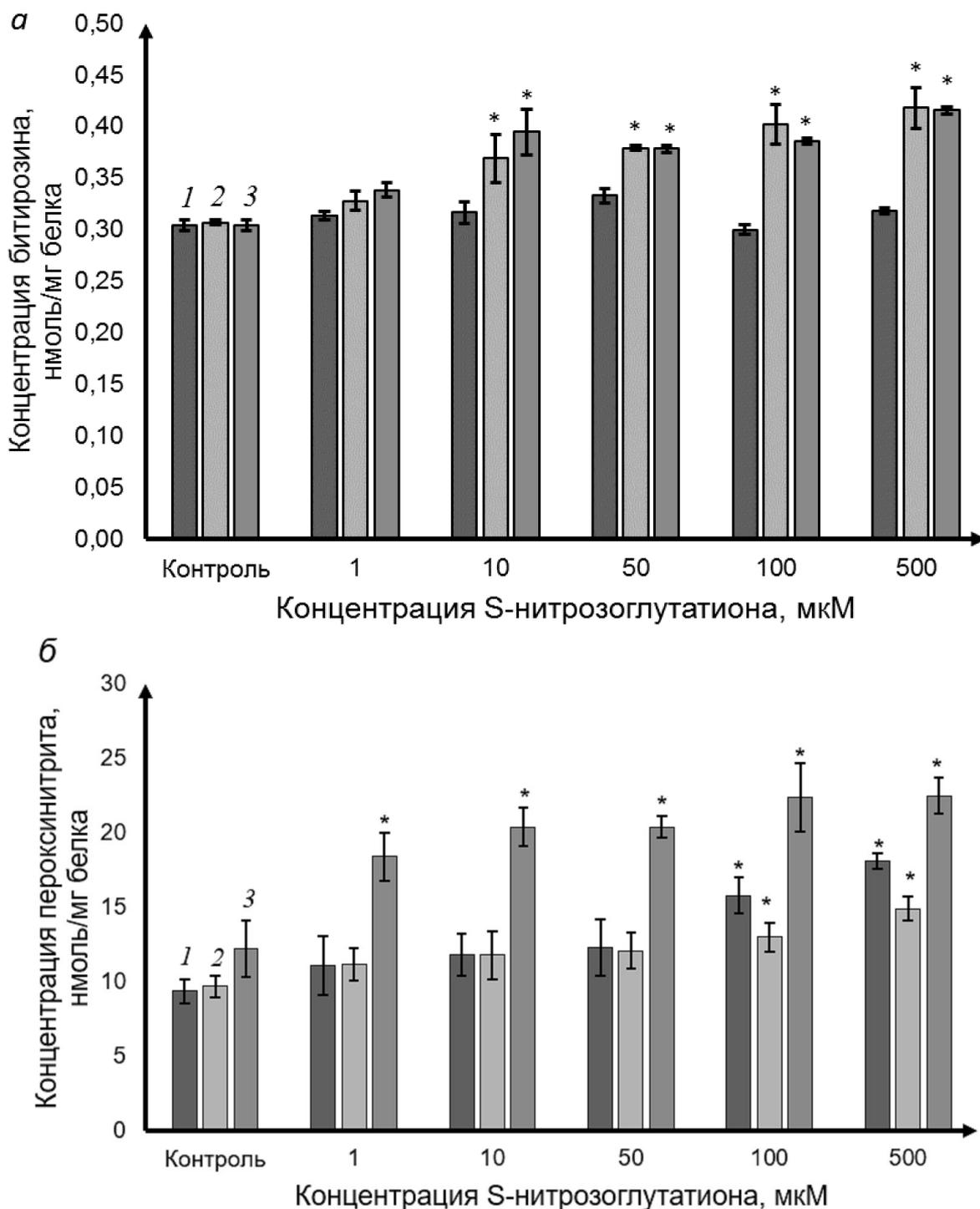


Рис. 2. Изменение показателей нитрозативного стресса: *а* – битирозина ($M \pm SD$, $n = 3$), *б* – пероксинитрита ($M \pm SD$, $n = 3$) при воздействии S-нитрозоглутатиона в течение 3 (1), 24 (2) и 72 (3) ч. Определение битирозина проводили в лизате клеток линии Сасо-2 флуориметрическим методом. Определение пероксинитрита проводили в лизате клеток линии Сасо-2 фотометрическим методом. * $p < 0,05$ (достоверное отличие от контроля)

Таким образом, полученные данные свидетельствуют о том, что GSNO является донором NO, причём концентрации 100 и 500 мкМ с длительностью экспозиции 24 ч и 50, 100,

500 мкМ с длительностью воздействия 72 ч вызывают развитие нитрозативного стресса и являются токсичными для клеток линии Сасо-2.

Влияние GSNO на относительное количество Pgp в клетках линии Сасо-2. При воздействии GSNO во всех изученных концентрациях на клетки линии Сасо-2 в течение 3 ч относительное количество Pgp достоверно по сравнению с контролем не изменялось (рис. 4, а).

При увеличении длительности эксперимента до 24 ч относительное количество Pgp увеличивалось при концентрациях GSNO 10, 50 и 100 мкМ на 46,2% ($p = 0,01$), 38,1% ($p = 0,02$) и 25,8% ($p = 0,045$) соответственно по сравнению с контролем. При повышении концентрации GSNO до 500 мкМ отмечалось снижение уровня Pgp на 54,9% ($p = 0,002$) (рис. 4, б).

При длительности воздействия 72 ч GSNO в концентрации 10 мкМ повышал относительное количество Pgp на 23,1% ($p = 0,0002$), в концентрациях 1 и 50 мкМ – не влиял на его уровень, а в концентрациях 100 и 500 мкМ – вызывал его снижение на 37,0% ($p = 0,0002$) и 47,1% ($p = 0,0002$) соответственно (рис. 4, в).

Влияние GSNO на активность Pgp в клетках линии Сасо-2. Активность Pgp оценивали по транспорту его маркёрного субстрата через мембрану клеток Сасо-2.

GSNO при воздействии в течение 3 ч в концентрациях 1–100 мкМ достоверно не влиял на активность Pgp, а в концентрации 500 мкМ – вызывал её уменьшение, о чем свидетельствует снижение коэффициента кажущейся проницаемости Pgp $b-a$ фексофенадина на 30,4% ($p = 0,05$) по сравнению с контролем.

При длительности эксперимента 24 ч GSNO в концентрациях 10 и 50 мкМ повышал коэффициент кажущейся проницаемости Pgp $b-a$ фексофенадина на 429,4% ($p = 0,0009$) и 266,9% ($p = 0,02$) соответственно по сравнению с показателями контроля (таблица). Данные результаты свидетельствуют о повышении активности Pgp. Увеличение концентрации GSNO до 100 и 500 мкМ приводило к нормализации коэффициента кажущейся проницаемости Pgp $b-a$ фексофенадина (он достоверно не отличался от значений контроля) (таблица).

Инкубация клеток линии Сасо-2 с GSNO в течение 72 ч приводила к повышению коэффициента кажущейся проницаемости Pgp $b-a$ фексофенадина при концентрации донора оксида азота 10 мкМ на 138,9% ($p = 0,014$) по сравнению со значением контроля, а в остальных концентрациях достоверного эффекта не оказывала.

Изучение механизмов повышения относительного количества Pgp под действием GSNO. Для изучения механизмов повышения содержания Pgp под действием GSNO выполнены эксперименты с ингибитором растворимой гуанилатциклазы – ODQ, ингибитором транскрипционного фактора Nrf2 – AEM1, с ингибиторами транскрипционных факторов PXR – кетоконазолом и CAR – CINPA1, стимулирующих экспрессию гена *MDR1*, кодирующего Pgp.

Ингибитор растворимой гуанилатциклазы ODQ при совместном инкубировании с

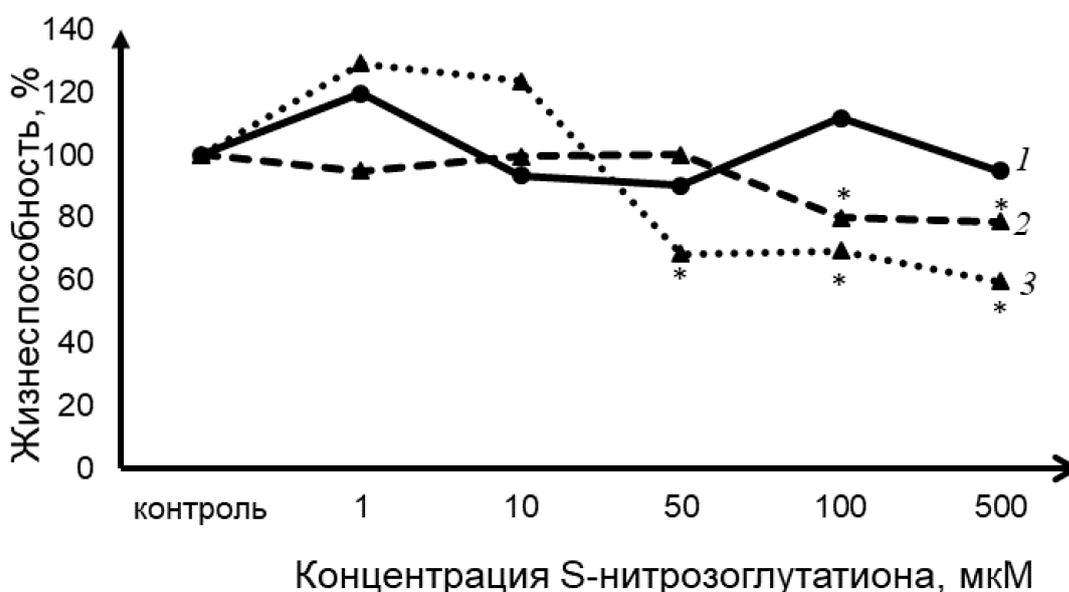


Рис. 3. Жизнеспособность клеток линии Сасо-2 (%) в зависимости от концентрации S-нитрозоглутатиона при инкубации 3 (1), 24 (2) и 72 (3) ч. Определение жизнеспособности клеток проводили по МТТ-тесту ($n = 3$). * $p < 0,05$ (достоверное отличие от контроля)

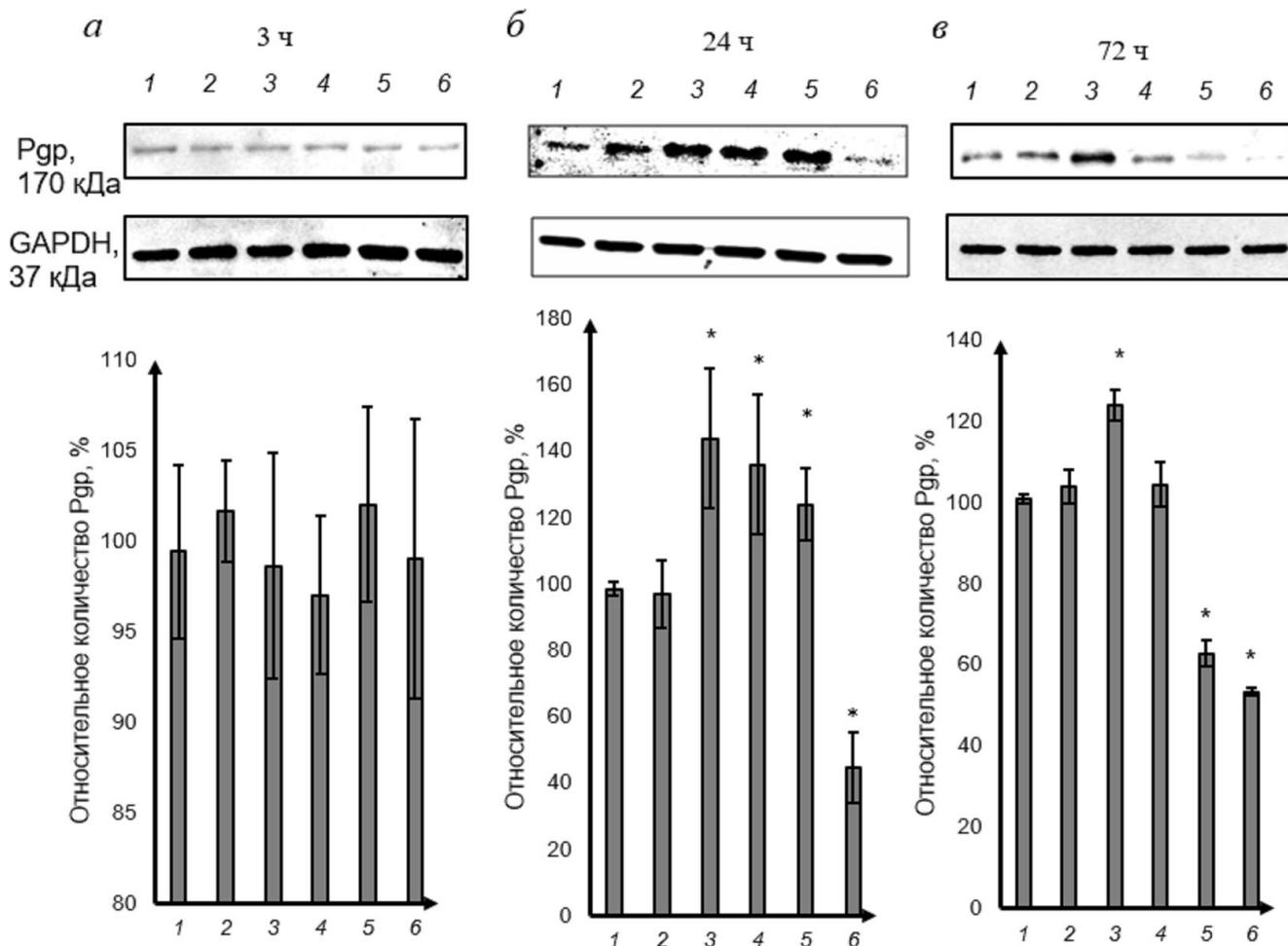


Рис. 4. Относительное количество Р-гликопротеина в клетках линии Сасо-2 при воздействии S-нитрозоглутатиона в течение 3 (а), 24 (б) и 72 (в) ч ($M \pm SD$, $n = 3$). Относительное количество Pgp определяли методом вестерн-блот с последующим денситометрическим анализом с помощью программного обеспечения ImageLab. 1 – контроль, 2–6 – S-нитрозоглутатион в концентрациях 1, 10, 50, 100 и 500 мкМ; * $p < 0,05$ (достоверное отличие от контроля)

GSNO в течение 24 ч предотвращал повышение относительного количества Pgp при концентрации донора NO 10–50 мкМ и не оказывал влияния при концентрации GSNO 100 мкМ (рис. 5, а), относительное количество Pgp превышало показатели контроля на 24,9% ($p = 0,03$).

При длительности эксперимента 72 ч ODQ также предотвращал повышение уровня Pgp при концентрации GSNO 10 мкМ, данный показатель не отличался от значений контроля (рис. 5, б).

Ингибитор Nrf2 – AEM1, не оказывал влияния на уровень Pgp при воздействии GSNO в концентрации 10 мкМ и экспозиции 24 ч (рис. 6, а) и 72 ч (рис. 6, б), относительное количество Pgp превышало показатели контроля на 41,5% ($p = 0,001$) и 19,5% ($p = 0,0004$) соответственно.

В то же время AEM1 предотвращал повышение относительного количества Pgp при воздействии GSNO в концентрациях 50 и 100 мкМ и длительности инкубации 24 ч (рис. 6, а).

Кетоконазол – ингибитор PXR, не предотвращал повышения относительного количества Pgp под действием GSNO во всех концентрациях и длительности инкубации 24 ч (рис. 7, а) и 72 ч (рис. 7, б). Так, относительное количество Pgp при воздействии GSNO в концентрации 10, 50 и 100 мкМ при инкубации 24 ч возрастало на 17,5% ($p = 0,02$), 22,9% ($p = 0,009$) и 25,6% ($p = 0,008$) соответственно относительно значений контроля и на 22,9% – при инкубации 72 ч и концентрации GSNO 10 мкМ ($p = 0,03$).

CINPA1 – ингибитор CAR, не влиял на изменение относительного количества Pgp при воздействии GSNO в концентрациях 50–100 мкМ в течение 24 ч, которое превышало

Влияние GSNO на активность Pgr (Parr $b-a$, $\times 10^{-6}$ см/с фексофенадина) в клетках линии Сасо-2 ($M \pm SD$, $n = 3$)

Серии эксперимента	Parr $b-a$, $\times 10^{-6}$ см/с фексофенадина		
	3 ч	24 ч	72 ч
Контроль	1,25 \pm 0,12	1,09 \pm 0,08	1,18 \pm 0,66
1 мкМ GSNO	0,98 \pm 0,27	1,77 \pm 0,38	1,07 \pm 0,13
10 мкМ GSNO	1,19 \pm 2,24	5,77 \pm 0,69*	2,82 \pm 0,91*
50 мкМ GSNO	1,27 \pm 0,23	4,00 \pm 0,21*	2,24 \pm 0,48
100 мкМ GSNO	0,98 \pm 0,15	2,43 \pm 1,64	1,50 \pm 0,20
500 мкМ GSNO	0,87 \pm 0,22*	2,55 \pm 1,53	1,30 \pm 0,19

Примечание: * $p \leq 0,05$ по сравнению с контролем (критерий Ньюмена–Кейлса).

значения контроля на 23,6% ($p = 0,03$) и на 25,4% ($p = 0,03$) соответственно (рис. 8, а). При концентрации GSNO 10 мкМ и экспозиции 24 и 72 ч CINPA1 предотвращал повышение уровня Pgr (рис. 8, а и б).

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

В ходе настоящего исследования оценивалось влияние NO на функционирование белка-транспортёра Pgr. В качестве источника NO использовали GSNO, который представляет собой S-нитрозированное производное глутатиона и считается важным медиатором последующих

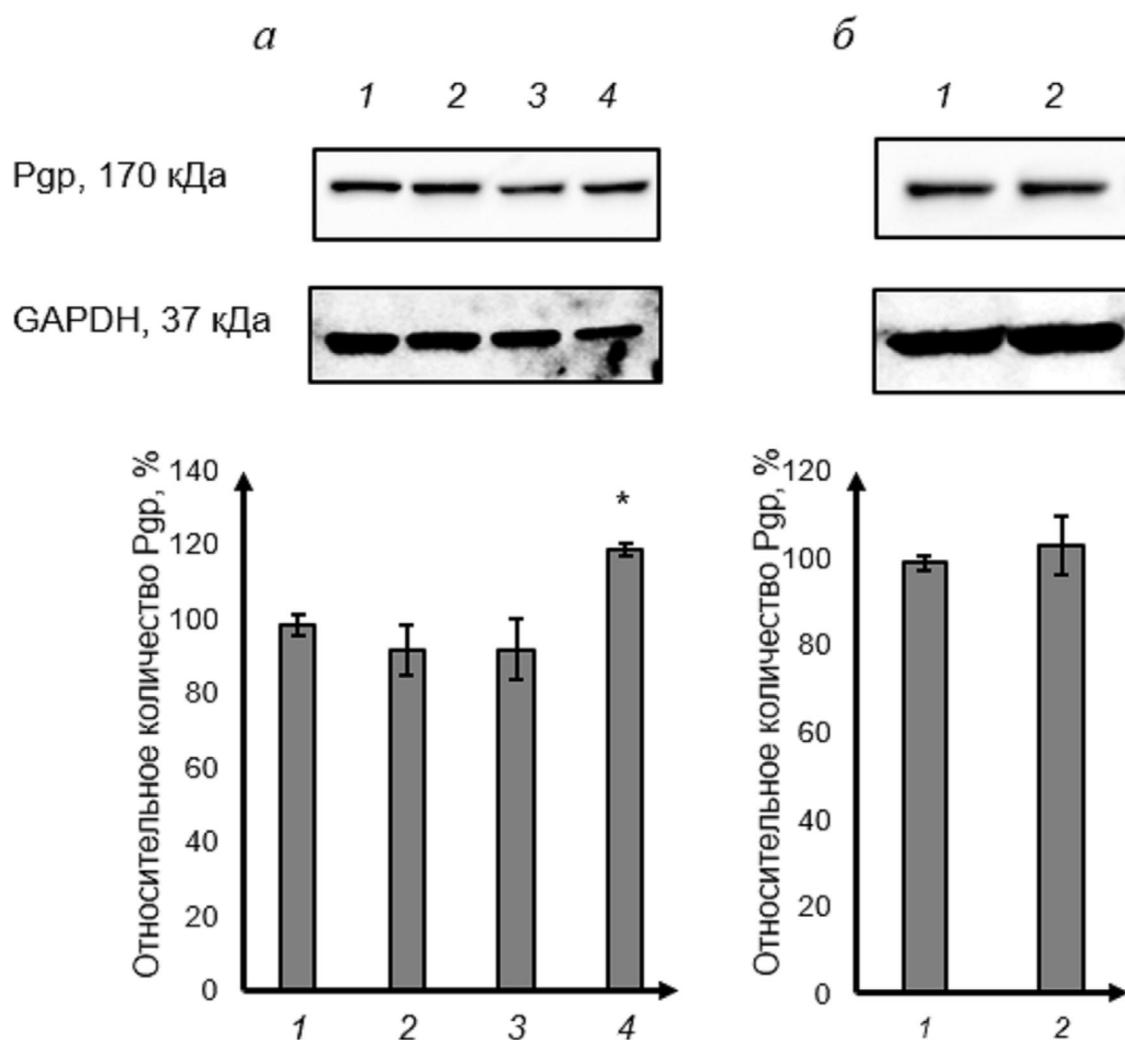


Рис. 5. Относительное количество Р-гликопротеина в клетках линии Сасо-2 при воздействии S-нитрозоглутатиона в сочетании с ингибированием растворимой гуанилатциклазы (ODQ, 10 мкМ) в течение 24 (а) и 72 (б) ч. Относительное количество Pgr определяли методом вестерн-блот с последующим денситометрическим анализом с использованием программного обеспечения ImageLab. 1 – контроль (без добавления тестируемых веществ), 2, 3 и 4 – S-нитрозоглутатион в концентрациях 10, 50 и 100 мкМ соответственно в сочетании с ODQ в концентрации 10 мкМ; * $p < 0,05$ (достоверное отличие от контроля)

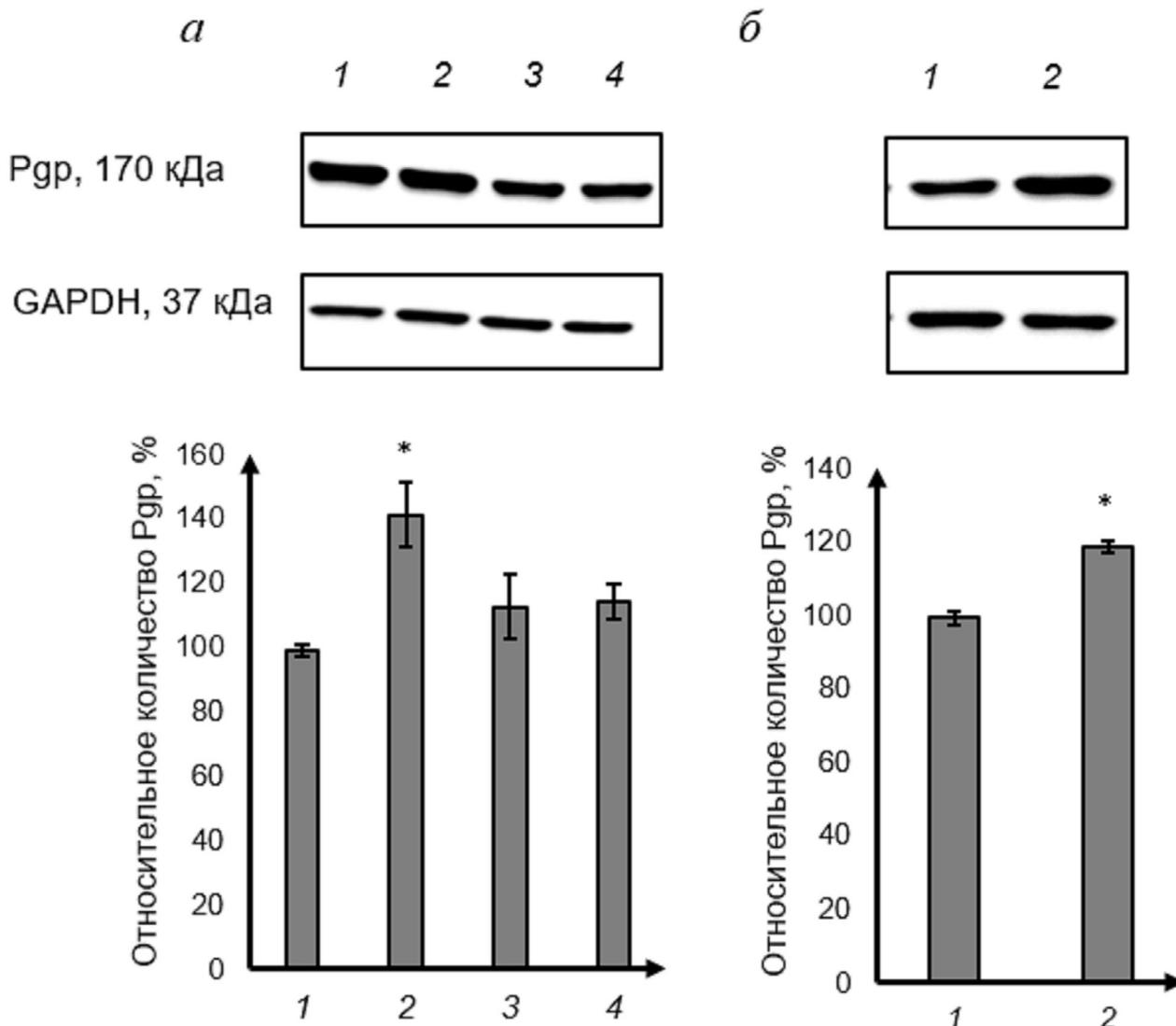


Рис. 6. Относительное количество Р-гликопротеина в клетках линии Сасо-2 при воздействии нитрозоглутатиона в сочетании с ингибированием транскрипционного фактора Nrf2 (АЕМ1, 5 мкМ) в течение 24 (а) и 72 (б) ч. Относительное количество Рgp определяли методом вестерн-блот с последующим денситометрическим анализом с использованием программного обеспечения ImageLab. 1 – контроль (без добавления тестируемых веществ), 2, 3 и 4 – S-нитрозоглутатион в концентрациях 10, 50 и 100 мкМ соответственно в сочетании с АЕМ1 в концентрации 5 мкМ; * $p < 0,05$ (достоверное отличие от контроля)

сигнальных эффектов оксида азота [27]. Сам GSNO напрямую в клетки не проникает, однако его добавление в культуральную среду вызывает повышение внутриклеточных уровней S-нитрозотиолов. Предполагается, что GSNO разлагается во внеклеточном пространстве с высвобождением NO, который затем может диффундировать через клеточную мембрану и нитрозилировать белки-мишени [28].

Кроме того, описан NO-независимый механизм проникновения GSNO внутрь клеток. При этом нитрозогруппа от GSNO переносится на другую тиолсодержащую аминокислоту – цис-

теин. Образующийся в ходе данной реакции S-нитрозо-1-цистеин проникает внутрь клеток через систему транспортера аминокислот [29]. S-нитрозо-1-цистеин внутри клеток может либо нитрозировать глутатион с образованием GSNO, либо непосредственно взаимодействовать с сульфгидрильными группами белков и запускать сигнальные каскады.

Нами было показано, что добавление GSNO к клеткам линии Сасо-2 вызывает повышение содержания метаболитов оксида азота в лизате клеток, что свидетельствует об адекватности используемой модели.

Концентрации GSNO 1–10 мкМ оказались безопасными для клеток, в то время как 100 и 500 мкМ при длительности экспозиции 24 ч и 50, 100, 500 мкМ при экспозиции 72 ч снижали выживаемость клеток, определяемую в ходе МТТ-теста.

Токсическое действие GSNO может быть связано с образованием пероксинитрита в результате реакции между оксидом азота и супероксидным анион-радикалом ($O_2^{\cdot-}$), что было показано в данном исследовании. Пероксинитрит, взаимодействуя с биомолекулами, может вызывать их повреждение и развитие нитрозативного стресса [30], что подтверждалось увеличением уровня битирозина. В условиях действия

активных форм азота (АФА) нитрозилирование тирозина представляет собой наиболее специфичную окислительную модификацию. Нитротирозин частично диссоциирует до фенолята, но основное его количество конденсируется до 3,3-дитирозина (битирозина) [31]. Доказано, что образование битирозина превалирует над нитротирозином при длительном воздействии и/или более высоким уровне АФА, что позволяет рассматривать его в качестве маркера нитрозативного стресса [32].

Относительное количество и активность Pgr под действием донора NO изменялись следующим образом. При воздействии GSNO на клетки линии Caco-2 в течение 3 ч относительное

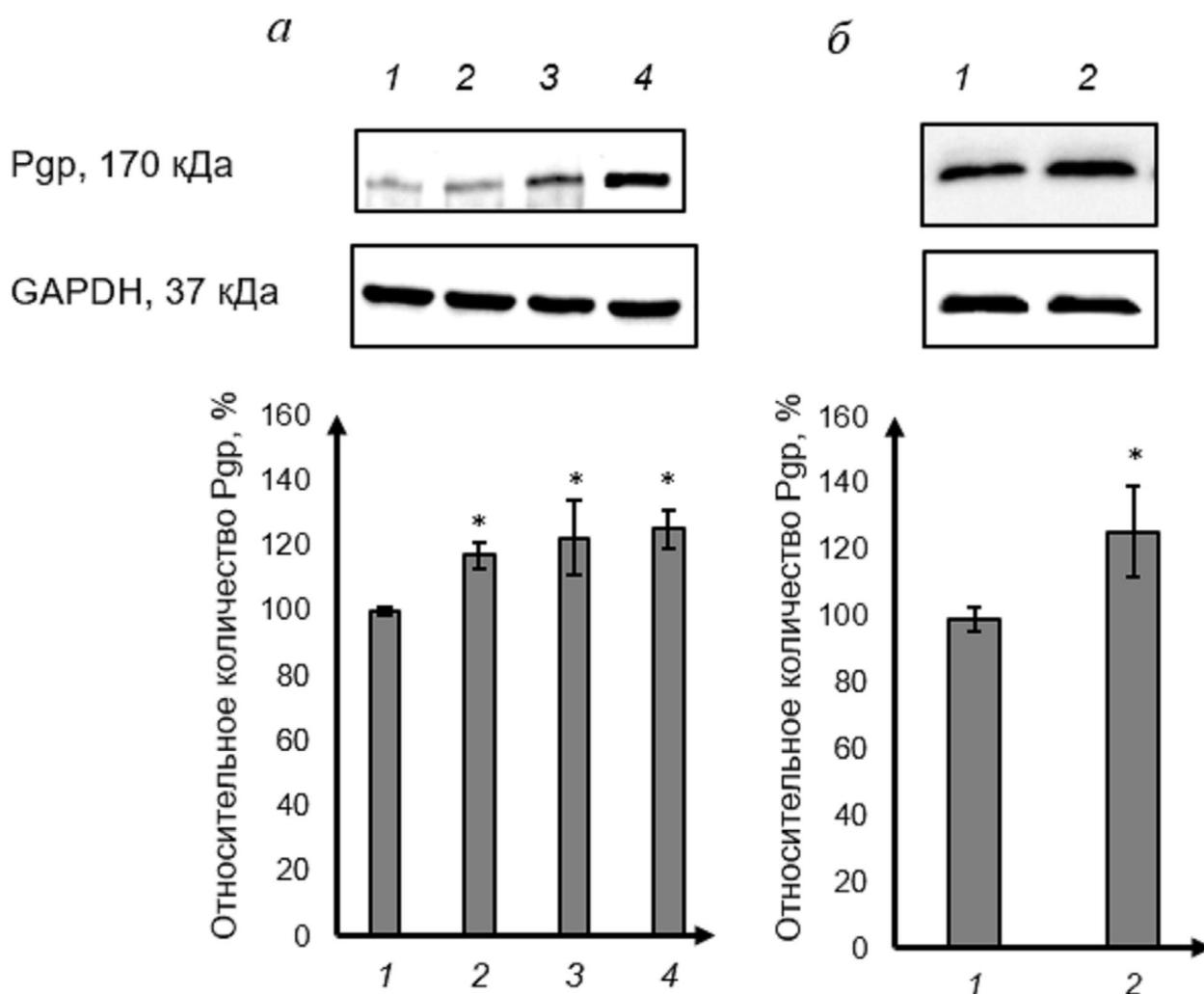


Рис. 7. Относительное количество Р-гликопротеина в клетках линии Caco-2 при воздействии S-нитрозоглутатиона в сочетании с ингибированием прегнан X рецептора (кетоконазол, 10 мкМ) в течение 24 (а) и 72 (б) ч. Относительное количество Pgr определяли методом вестерн-блот с последующим денситометрическим анализом с использованием программного обеспечения ImageLab. 1 – контроль (без добавления тестируемых веществ), 2, 3 и 4 – S-нитрозоглутатион в концентрациях 10, 50 и 100 мкМ соответственно в сочетании с кетоконазолом в концентрации 10 мкМ; * $p < 0,05$ (достоверное отличие от контроля)

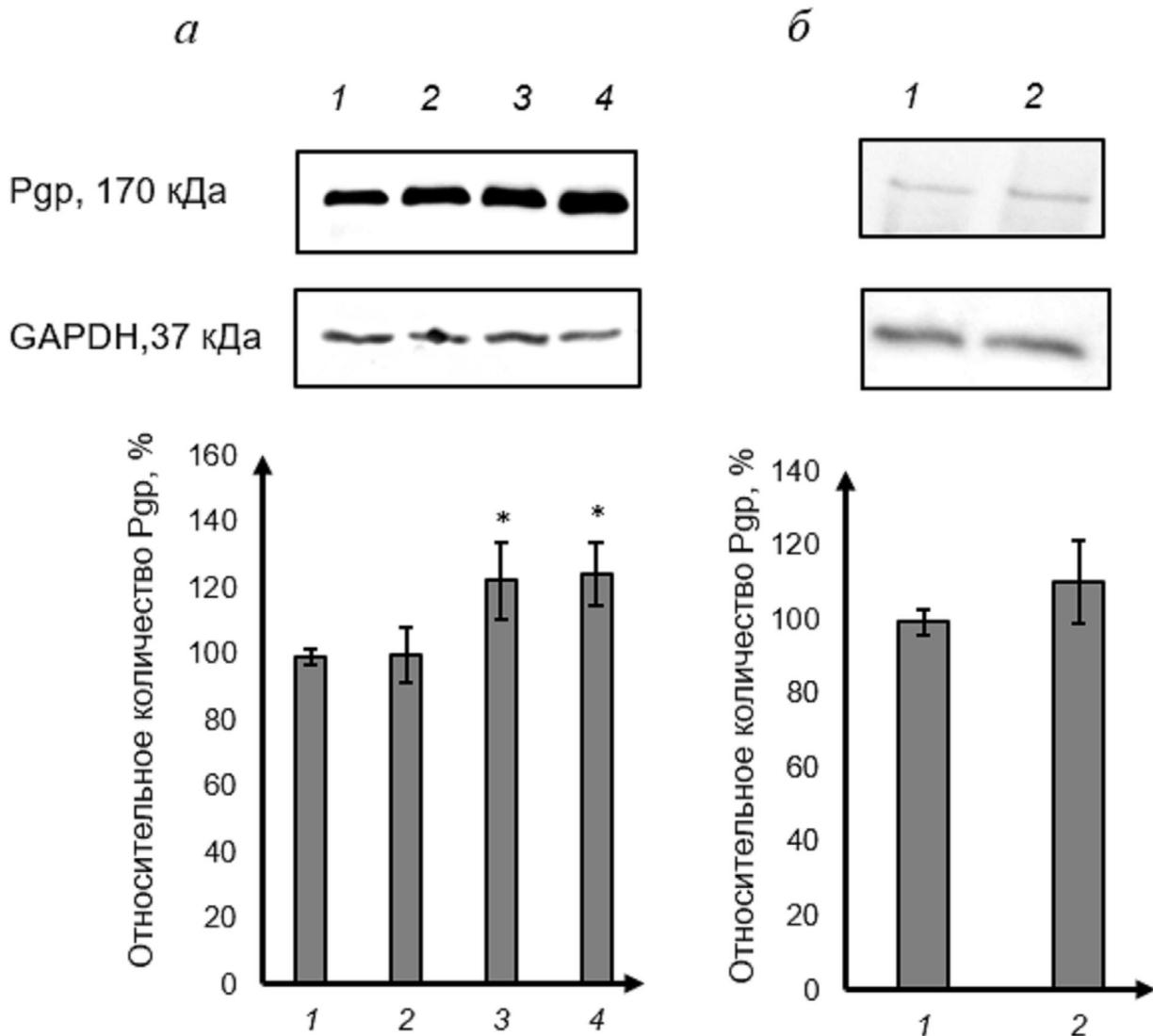


Рис. 8. Относительное количество Р-гликопротеина в клетках линии Caco-2 при воздействии S-нитрозоглутатиона в сочетании с ингибированием конститутивного андростанового рецептора (CINPA1, 10 мкМ) в течение 24 (а) и 72 (б) ч. Относительное количество Рgp определяли методом вестерн-блот с последующим денситометрическим анализом с использованием программного обеспечения ImageLab. 1 – контроль (без добавления тестируемых веществ), 2, 3 и 4 – S-нитрозоглутатион в концентрациях 10, 50 и 100 мкМ соответственно в сочетании с CINPA1 в концентрации 10 мкМ; * $p < 0,05$ (достоверное отличие от контроля)

количество Рgp достоверно не изменялось, однако в то же время отмечалось снижение его активности. Полученные результаты согласуются с данными литературы, в которых установлено, что NO может снижать АТФазную активность Рgp [7], что, в свою очередь, приводит к снижению транспортной функции данного белка.

При повышении длительности эксперимента до 24 ч относительное количество и активность Рgp увеличивались при концентрациях GSNO 10 и 50 мкМ, при концентрации 100 мкМ рос уровень белка-транспортёра, но активность не изменялась, а при повышении концентрации

GSNO до 500 мкМ отмечалось снижение содержания Рgp.

При длительности воздействия 72 ч GSNO в концентрации 10 мкМ повышал относительное количество и активность Рgp, а в концентрациях 100 и 500 мкМ он вызывал снижение уровня белка-транспортёра. Уменьшение относительного количества Рgp наблюдалось при максимальных концентрациях GSNO и совпадало с максимальной степенью выраженности нитрозативного стресса, поэтому можно предположить, что снижение уровня белка-транспортёра связано с повреждением его молекулы. Сниже-

ние относительного количества Pgp, в свою очередь, приводило к уменьшению его активности. Помимо этого, активность Pgp может снижаться в результате нитрозилирования его молекулы по тиоловым группам в остатках цистеина. Указанные реакции обычно протекают при повышении концентрации NO выше физиологических [33]. По данным литературы, молекула Pgp богата SH-группами [34].

На заключительном этапе исследования были изучены механизмы повышения относительного количества и активности Pgp под действием NO.

На настоящий момент описаны следующие механизмы регуляции функционирования Pgp: изменение экспрессии гена *MDR1*, кодирующего белок-транспортёр, посредством влияния на его промотор; полиморфизм гена *MDR1*; увеличение дозы гена – амплификация участка генома, содержащего ген *MDR1*; стабилизация мРНК гена *MDR1*; влияние микроРНК на экспрессию Pgp; передача Pgp между клетками; изменение активности синтезированного белка-транспортёра; влияние на гидролиз АТФ; изменение свойств цитоплазматических мембран. При этом основную роль играет регуляция экспрессии гена *MDR1* [35].

В ходе настоящего исследования с помощью специфических ингибиторов был изучен вклад NO-цГМФ-сигнального пути, транскрипционных факторов Nrf2, PXR и CAR в повышение относительного количества Pgp под действием GSNO.

Ингибиторы использовались в дозах, в которых они, согласно данным литературы, проявляли свою активность в аналогичных экспериментах [13–16].

NO-цГМФ-сигнальный путь является основным механизмом реализации физиологических эффектов NO. NO активирует растворимую гуанилатциклазу, которая превращает ГТФ в цГМФ. цГМФ, в свою очередь, активирует нижестоящие элементы сигнального пути, включая протеинкиназу G (PKG I и II), цГМФ-управляемые катионные каналы и фосфодиэстеразы, регулируемые цГМФ. Данный физиологический путь реализуется при низких, наномолярных концентрациях NO [36]. В качестве ингибитора NO-цГМФ-сигнального пути применялся специфический блокатор растворимой гуанилатциклазы – ODQ. Показано, что ODQ окисляет молекулу гема в гуанилатциклазе без влияния на каталитический домен, тем самым снижая её активность [37].

В ходе исследования было установлено, что ODQ при совместном инкубировании с GSNO (концентрации 10–50 мкМ при экспозиции 24 ч

и концентрация 10 мкМ при экспозиции 72 ч) предотвращал повышение относительного количества Pgp.

Nrf2 – редокс-чувствительный транскрипционный фактор. Его экспрессия повышается при развитии окислительного и нитрозативного стресса и направлена на защиту клетки от воздействия свободных радикалов [38]. В условиях нормы данный транскрипционный фактор находится в комплексе с белком-репрессором Keap 1 (их связывание регулируется рядом протеинкиназ), который, с одной стороны, способствует убиквитированию и протеосомальной деградации Nrf2 (необходимым условием для этого процесса является наличие двух остатков цистеина в молекуле Keap 1), а с другой – предотвращает его проникновение из цитоплазмы в ядро. После активации комплекс Keap 1–Nrf2 диссоциирует, и Nrf2 транслоцируется в ядро, где связывается с антиоксидантными элементами (antioxidant-response elements, ARE) и активирует транскрипцию защитных ферментов [39].

Ранее нами было показано, что Nrf2 принимает участие в повышении активности и количества Pgp при развитии окислительного стресса [40].

Для ингибирования Nrf2 применялся АЕМ1, блокирующий взаимодействие Nrf2 с ARE и подавляющий экспрессию генов, контролируемых данным транскрипционным фактором [14].

Нами показано, что АЕМ1 предотвращал повышение относительного количества Pgp при воздействии GSNO в концентрации 50 и 100 мкМ и длительности инкубации 24 ч.

PXR (ядерный рецептор подсемейство 1, группа I, член 2) и CAR (ядерный рецептор подсемейство 1, группа I, член 3) – члены суперсемейства ядерных рецепторов, которое в основном включает факторы транскрипции [41, 42].

Данные рецепторы локализуются преимущественно в печени и кишечнике и регулируют экспрессию ферментов I-фазы биотрансформации, таких как изоферменты цитохрома P450 CYP3A и CYP2B, а также белков-транспортёров, в частности Pgp.

Показано, что накопление продуктов окислительного и нитрозативного стресса приводит к повышению количества PXR [43, 44] и CAR [45].

Ингибирование PXR и CAR осуществляли с помощью кетоконазола и CINPA1 соответственно. Кетоконазол (противогрибковый препарат группы азолов) связывается с областью AF-2 лиганд-связывающего домена PXR и таким образом подавляет его активацию [46]. CINPA1 блокирует лиганд связывающий до-

мен CAR, а также подавляет его взаимодействие с коактиваторами [16].

В настоящей работе CINPA1 предотвращал повышение уровня Pgp при концентрации GSNO 10 мкМ и экспозиции 24 и 72 ч, а кетоконазол — не влиял на действие GSNO.

Полученные данные свидетельствуют о том, что GSNO в низких концентрациях повышает относительное количество Pgp через NO-цГМФ-сигнальный путь, при развитии нитрозативного стресса — через Nrf2, при накоплении продуктов нитрозативного стресса — через транскрипционный фактор (CAR).

Таким образом, нами показано, что кратковременное воздействие донора NO GSNO в течение 3 ч в концентрации 500 мкМ вызывает повышение в клетках линии Caco-2 метаболитов оксида азота и пероксинитрита, что приводит к снижению активности, но не содержания Pgp. Увеличение длительности экспозиции до 24 ч приводит к увеличению относительного количества и активности Pgp при концентрации GSNO 10 и 50 мкМ, повышению содержания без увеличения активности транспортера в концентрации 100 мкМ и снижению относительного количества изучаемого белка при 500 мкМ. При длительности воздействия 72 ч GSNO в концентрации 10 мкМ повышает содержание и активность Pgp, а в концентрациях 100 и 500 мкМ он вызывает

снижение относительного количества белка-транспортера.

При этом повышении относительного количества Pgp при воздействии низких концентраций GSNO реализуется через NO-цГМФ-сигнальный путь, а при увеличении концентрации GSNO, развитии и прогрессировании нитрозативного стресса — через Nrf2 и конститутивный андростановый рецептор.

Полученные данные объясняют разнонаправленные и потому противоречивые результаты предшествующих исследований других авторов и раскрывают механизмы регуляции Pgp под действием NO.

Финансирование. Исследование выполнено при финансовой поддержке гранта Президента Российской Федерации для государственной поддержки молодых российских учёных — кандидатов наук МК-1856.2020.7.

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

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

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Fojo, A. T., Ueda, K., Slamon, D. J., Poplack, D. G., Gottesman, M. M., et al. (1987) Expression of a multidrug-resistance gene in human tumors and tissues, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **84**, 265-269.
2. Borst, P., and Schinkel, A. H. (2013) P-glycoprotein ABCB1: A major player in drug handling by mammals, *Clin. Invest.*, **123**, 4131-4133.
3. Brueck, S., Bruckmueller, H., Wegner, D., Busch, D., Martin, P., et al. (2019) Transcriptional and post-transcriptional regulation of duodenal P-glycoprotein and MRP2 in healthy human subjects after chronic treatment with rifampin and carbamazepine, *Mol. Pharm.*, **16**, 3823-3830, doi: 10.1021/acs.molpharmaceut.9b00458.
4. Mollazadeh, S., Sahebkar, A., Hadizadeh, F., Behravan, J., and Arabzadeh, S. (2018) Structural and functional aspects of P-glycoprotein and its inhibitors, *Life Sci.*, **214**, 118-123, doi: 10.1016/j.lfs.2018.10.048.
5. Wessler, J. D., Grip, L. T., Mendell, J., and Giugliano, R. P. (2013) The P-glycoprotein transport system and cardiovascular drugs, *J. Am. Coll. Cardiol.*, **61**, 2495-2502, doi: 10.1016/j.jacc.2013.02.058.
6. Socco, S., Bovee, R. C., Palczewski, M. B., Hickok, J. R., and Thomas, D. D. (2017) Epigenetics: The third pillar of nitric oxide signaling, *Pharmacol. Res.*, **121**, 52-58, doi: 10.1016/j.phrs.2017.04.011.
7. Sinha, B. K., Bortner, C. D., Mason, R. P., and Cannon, R. E., (2018) Nitric oxide reverses drug resistance by inhibiting ATPase activity of p-glycoprotein in human multi-drug resistant cancer cells, *Biochim. Biophys. Acta Gen. Subj.*, **1862**, 2806-2814, doi: 10.1016/j.bbagen.2018.08.021.
8. Sinha, B. K., Perera, L., and Cannon, R. E. (2019) Reversal of drug resistance by JS-K and nitric oxide in ABCB1- and ABCG2-expressing multi-drug resistant human tumor cells, *Biomed. Pharmacother.*, **120**, 109468, doi: 10.1016/j.biopha.2019.109468.
9. Dixit, S. G., Zingarelli, B., Buckley, D. J., Buckley, A. R., and Pauletti, G. M. (2005) Nitric oxide mediates increased P-glycoprotein activity in interferon- γ -stimulated human intestinal cells, *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.*, **288**, 533-540, doi: 10.1152/ajpgi.00248.2004.
10. Robertson, S. J., Mookgong, R., Kania, K. D., Guedj, A. S., Hladky, S. B., et al. (2011) Nitric oxide contributes to hypoxia-reoxygenation-induced P-glycoprotein expression in rat brain endothelial cells, *Cell. Mol. Neurobiol.*, **31**, 1103-1111, doi: 10.1007/s10571-011-9711-4.
11. Duan, R., Hu, N., Liu, H. Y., Li, J., Guo, H., et al. (2012) Biphasic regulation of P-glycoprotein function and expression by NO donors in Caco-2 cells, *Acta Pharmacol. Sin.*, **33**, 767-774, doi: 10.1038/aps.2012.25.
12. Hilgers, A. R., Conradi, R. A., and Burton, P. S. (1990) Caco-2 cell monolayers as a model for drug transport across the intestinal mucosa, *Pharm. Res.*, **7**, 902-910, doi: 10.1023/A:1015937605100.
13. Hwang, T. L., Wu, C. C., and Teng, C. M. (1998) Comparison of two soluble guanylyl cyclase inhibitors, methylene blue and ODQ, on sodium nitroprusside-induced relaxation in guinea-pig trachea, *Br. J. Pharmacol.*, **125**, 1158-1163, doi: 10.1038/sj.bjp.0702181.
14. Bollong, M. J., Yun, H., Sherwood, L., Woods, A. K., Lairson, L. L., et al. (2015) A small molecule inhibits

- deregulated NRF2 transcriptional activity in cancer, *ACS Chem. Biol.*, **10**, 2193-2198.
15. Kota, B. P., Tran, V. H., Allen, J., Bebawy, M., and Roufogalis, B. D. (2010) Characterization of PXR mediated P-glycoprotein regulation in intestinal LS174T cells, *Pharm. Res.*, **62**, 426-431, doi: 10.1016/j.phrs.2010.07.001.
 16. Cherian, M. T., Lin, W., Wu, J., and Chen, T. (2015) CINPA1 is an inhibitor of constitutive androstane receptor that does not activate pregnane X receptor, *Mol. Pharmacol.*, **87**, 878-889, doi: 10.1124/mol.115.097782.
 17. Якушева Е. Н., Шулькин А. В., Черных И. В., Попова Н. М., Котлярова А. А., и др. (2019) Метод анализа принадлежности лекарственных веществ к субстратам и ингибиторам белка-транспортера гликопротеина-P *in vitro*, *Обзоры по клинической фармакологии и лекарственной терапии*, **17**, 71-78, doi: 10.17816/RCF17171-78.
 18. Tolosa, L., Donato, M. T., and Gómez-Lechón, M. J. (2015) General cytotoxicity assessment by means of the MTT assay, *Methods Mol. Biol.*, **1250**, 333-348, doi: 10.1007/978-1-4939-2074-7_26.
 19. Bradford, M. M. (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding, *Anal. Biochem.*, **7**, 248-254, doi: 10.1006/abio.1976.9999.
 20. Amado, R., Aeschbach, R., and Neukom, H. (1984) Dityrosine: *in vitro* production and characterization, *Methods Enzymol.*, **107**, 377-388.
 21. Лобышева И. И., Сереженков В. А., Ванин А. Ф. (1999) Взаимодействие динитрозильных тиолсодержащих комплексов железа с пероксинитритом и перекисью водорода *in vitro*, *Биохимия*, **64**, 194-200.
 22. Метельская В. А., Гуманова Н. Г. (2005) Скрининг – метод определения уровня метаболитов оксида азота сыворотке человека, *Клиническая лабораторная диагностика*, **6**, 15-18.
 23. Bronsky, E. A., Falliers, C. J., Kaiser, H. B., Ahlbrandt, R., and Mason, J. M. (1998) Effectiveness and safety of fexofenadine, a new non-sedating H1-receptor antagonist in the treatment of fall allergies, *Allergy Asthma Proc.*, **19**, 135-141, doi: 10.2500/108854198778604112.
 24. Petri, N., Tannergren, C., Rungstad, D., and Lennernäs, H. (2004) Transport characteristics of fexofenadine in the Caco-2 cell model, *Pharm. Res.*, **21**, 1398-1404, doi: 10.1023/B:PHAM.0000036913.90332.b1.
 25. Elsby, R., Surry, D. D., Smith, V. N., and Gray, A. J. (2008) Validation and application of Caco-2 assays for the *in vitro* evaluation of development candidate drugs as substrates or inhibitors of P-glycoprotein to support regulatory submissions, *Xenobiotica*, **38**, 1140-1164, doi: 10.1080/00498250802050880.
 26. Ерохина П. Д., Абаленихина Ю. В., Шулькин А. В., Черных И. В., Попова Н. М., и др. (2020) Изучение влияния прогестерона на активность гликопротеина-P *in vitro*, *Росс. Мед. Биол. Вестник им. Акад. И.П. Павлова*, **28**, 135-142, doi: 10.23888/PAVLOVJ2020282135-142.
 27. Broniowska, K. A., Diers, A. R., and Hogg, N. (2013) S-Nitrosoglutathione, *Biochim. Biophys. Acta*, **1830**, 3173-3181, doi: 10.1016/j.bbagen.2013.02.004.
 28. Ramachandran, N., Root, P., Jiang, X.-M., Hogg, P. J., and Mutus, B. (2001) Mechanism of transfer of NO from extracellular S-nitrosothiols into the cytosol by cell-surface protein disulfide isomerase, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **98**, 9539-9544, doi: 10.1073/pnas.171180998.
 29. Zhang, Y., and Hogg, N. (2004) The mechanism of transmembrane S-nitrosothiol transport, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **101**, 7891-7896, doi: 10.1073/pnas.0401167101.
 30. Abalenikhina, Yu. V., Kosmachevskaya, O. V., and Topunov, A. F. (2020) Peroxynitrite: Toxic agent and signaling molecule (review), *Appl. Biochem. Microbiol.*, **56**, 611-623, doi: 10.1134/S0003683820060022.
 31. Ferrer-Sueta, G., Campolo, N., Trujillo, M., Bartesaghi, S., Carballeda, S., et al. (2018) Biochemistry of peroxynitrite and protein tyrosine nitration, *Chem. Rev.*, **118**, 1338-1408, doi: 10.1021/acs.chemrev.7b00568.
 32. Boer, T. R., Palomino, R. I., and Mascharak, P. K. (2019) Peroxynitrite-mediated dimerization of 3-nitrotyrosine: Unique chemistry along the spectrum of peroxynitrite-mediated nitration of tyrosine, *Med One*, **4**, e190003, doi: 10.20900/mo.20190003.
 33. Heinrich, T. A., da Silva, R. S., Miranda, K. M., Switzer, C. H., Wink, D. A., et al. (2013) Biological nitric oxide signalling: chemistry and terminology, *Br. J. Pharmacol.*, **169**, 1417-1429, doi: 10.1111/bph.12217.
 34. Sim, H. M., Bhatnagar, J., Chufan, E. E., Kapoor, K., and Ambudkar, S. V. (2013) Share conserved walker A cysteines 431 and 1074 in human P-glycoprotein are accessible to thiol-specific agents in the apo and ADP-vanadate trapped conformations, *Biochemistry*, **52**, 7327-7338, doi: 10.1021/bi4007786.
 35. Якушева Е. Н., Черных И. В., Шулькин А. В., Попова Н. М. (2014) Гликопротеин-P: структура, физиологическая роль и молекулярные механизмы модуляции функциональной активности, *Успехи Физиол. Наук*, **45**, 89-98.
 36. Gantner, B. N., LaFond, K. M., and Bonini, M. G. (2020) Nitric oxide in cellular adaptation and disease, *Redox Biol.*, **34**, 101550, doi: 10.1016/j.redox.2020.101550.
 37. Zhao, Y., Brandish, P. E., Di Valentin, M., Schelvis, J. P., Babcock, G. T., et al. (2000) Inhibition of soluble guanylate cyclase by ODQ, *Biochemistry*, **39**, 10848-10854, doi: 10.1021/bi9929296.
 38. Moldogazieva, N. T., Mokhosoev, I. M., Feldman, N. B., and Lutsenko, S. V. (2018) ROS and RNS signalling: adaptive redox switches through oxidative/nitrosative protein modifications, *Free Radic. Res.*, **52**, 507-543, doi: 10.1080/10715762.2018.1457217.
 39. Wen, Zh., Liu, W., Li, X., Chen, W., Liu, J., et al. (2019) A protective role of the NRF2-Keap1 pathway in maintaining intestinal barrier function, *Oxid. Med. Cell Longev.*, **2019**, e1759149, doi: 10.1155/2019/1759149.
 40. Shchul'kin, A. V., Abalenikhina, Y. V., Erokhina, P.D., Chernykh, I. V., and Yakusheva, E. N. (2021) The role of P-glycoprotein in decreasing cell membranes permeability during oxidative stress, *Biochemistry (Moscow)*, **86**, 197-206, doi: 10.1134/S0006297921020085.
 41. Inouye, Y. (2016) Structure and function of the nuclear receptor constitutive androstane receptor, *Yakugaku Zasshi*, **136**, 297-308, doi: 10.1248/yakushi.15-00215.
 42. Yan, J., and Xie, W. (2016) A brief history of the discovery of PXR and CAR as xenobiotic receptors, *Acta Pharm. Sin. B*, **6**, 450-452, doi: 10.1016/j.apsb.2016.06.011.
 43. Абаленихина Ю. В., Судакова Е. А., Слепнев А. А., Сеидкулиева А. А., Ерохина П. Д., и др. (2022) Функционирование прегнан X рецептора в условиях окислительного стресса, *Биол. Мембр.*, **39**, 1-9, doi: 10.31857/S0233475522010030.
 44. Abalenikhina, Y. V., Sudakova, E. A., Seidkulieva, A. A., Shchul'kin, A. V., and Yakusheva, E. N. (2021) Functioning of pregnan X receptor under conditions of nitrosative stress, *Biomed. Khim.*, **67**, 394-401, doi: 10.18097/PBMC20216705394.
 45. Shchul'kin, A. V., Abalenikhina, Y. V., Seidkulieva, A. A., Ryabkov, A. N., and Yakusheva, E. N. (2021) Induction of constitutive androstane receptor during the development of oxidative stress, *Bull. Exp. Biol. Med.*, **171**, 615-618, doi: 10.1007/s10517-021-05280-7.
 46. Wang, H., Huang, H., Li, H., Teotico, D. G., Sinz, M., et al. (2007) Activated pregnenolone X-receptor is a target for ketoconazole and its analogs, *Clin. Cancer Res.*, **13**, 2488-2495, doi: 10.1158/1078-0432.CCR-06-1592.

MECHANISMS OF REGULATION OF THE FUNCTIONING OF THE P-GLYCOPROTEIN TRANSPORTER PROTEIN UNDER THE ACTION OF NITRIC OXIDE

A. V. Shchulkin*, Yu. V. Abalenikhina, E. A. Sudakova, P. Yu. Mylnikov, and E. N. Yakusheva

Ryazan State Medical University, 390026 Ryazan, Russia; e-mail: alekseychulkin@rambler.ru

In a study on Caco-2 cells, the mechanisms of regulation of the transport protein P-glycoprotein (Pgp) under the action of nitric oxide (NO) were studied. The NO donor was S-nitrosoglutathione (GSNO), which was added to cells at concentrations of 1; 10; 50; 100 and 500 μM and incubated for 3, 24, or 72 h. The amount of Pgp was analyzed by Western blot, activity was determined by the transport of its substrate fexofenadine. The study showed that a short-term exposure to GSNO for 3 hours at a concentration of 500 μM caused an increase in the concentration of peroxynitrite in Caco-2 cells, which reduced the activity, but not the amount of Pgp. An increase in the duration of exposure to 24 h increased the amount and activity of Pgp at GSNO concentrations of 10 and 50 μM , increased the amount without increasing activity at a concentration of 100 μM , and decreased the amount of the transporter protein at 500 μM . At an exposure duration of 72 h, GSNO at a concentration of 10 μM increased the amount and activity of Pgp, while at a concentration of 100 and 500 μM , it decreased the amount of the transporter protein. At the same time, using specific inhibitors, it was shown that an increase in the amount of Pgp under the influence of low concentrations of GSNO was realized through the NO-cGMP signaling pathway, and with an increase in the concentration of GSNO, the development of nitrosative stress, through Nrf2 and the constitutive androstane receptor.

Keywords: P-glycoprotein, ABCB1-protein, nitric oxide, guanylate cyclase, Caco-2 cell line

УДК 577.12

2-АМИНО-ПИРРОЛ-КАРБОКСИЛАТ ОСЛАБЛЯЕТ ПРОЦЕССЫ ГОМОЛОГИЧНОЙ РЕКОМБИНАЦИИ ДНК И ВЫЗЫВАЕТ СЕНСИТИЗАЦИЮ ОПУХОЛЕВЫХ КЛЕТОК К ДОКСОРУБИЦИНУ

© 2022 С.В. Бойчук^{1,2*}, Ф.Ф. Бикиниева¹, И.Г. Мустафин¹,
С.С. Зыкова³, С.А. Рыжкин², А.Р. Галембикова¹

¹ Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Казанский государственный медицинский университет» Минздрава России, 420012 Казань, Россия; электронная почта: boichuksergei@mail.ru

² Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение дополнительного профессионального образования «Российская медицинская академия непрерывного профессионального образования» Минздрава России, 125993 Москва, Россия

³ Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Пермская государственная фармацевтическая академия» Минздрава России, 614990 Пермь, Россия

Поступила в редакцию 22.03.2022

После доработки 25.03.2022

Принята к публикации 25.03.2022

Несмотря на высокую эффективность химиотерапии в современной онкологии, быстрое развитие резистентности опухолей к большинству химиопрепаратов и высокая частота системных побочных эффектов от проводимой химиотерапии являются основными факторами неблагоприятного прогноза для большинства пациентов с неоперабельными, метастатическими и рецидивирующими формами злокачественных новообразований. Следовательно, поиск новых молекулярных мишеней в опухолях и разработка подходов к усилению действия уже имеющихся химиопрепаратов являются чрезвычайно актуальными для практической онкологии. Целью исследования явилось изучение способности синтезированного нами пиррол-содержащего гетероциклического соединения, именуемого в дальнейшем как 2-АПК, вызывать сенситизацию опухолевых клеток к действию химиопрепарата доксорубицина, являющегося ингибитором ДНК-топоизомеразы типа II. Исследования проводились на опухолевых клеточных линиях, культивируемых в присутствии 2-АПК, паклитаксела и доксорубицина. Уровень экспрессии белков репарации повреждений ДНК, а также апоптоза оценивали методом иммуноблоттинга, а белковые взаимодействия – методом коиммунопреципитации. Синергизм действия химиопрепаратов оценивался с помощью компьютерной программы Synergy Finder. Было установлено, что доксорубин оказывал умеренное цитотоксическое действие в отношении опухолевых клеток (например, остеосарком), в то время как его использование в комбинации с 2-АПК (в нетоксичных концентрациях) приводило к значимому усилению цитотоксического эффекта доксорубицина и вызывало гибель опухолевых клеток по механизму апоптоза. Молекулярным механизмом 2-АПК-индуцированной сенситизации к доксорубину явилось ослабление процессов репарации повреждений ДНК по механизму гомологичной рекомбинации, что подтверждалось снижением уровня экспрессии рекомбиназы Rad51 за счёт усиления скорости её протеасом-зависимой деградации. Помимо 2-АПК данная способность была также отмечена в отношении паклитаксела, также влияющего на процессы полимеризации тубулина. Таким образом, лекарственные химиопрепараты и химические соединения, влияющие на динамическое состояние микротрубочек веретена деления, способны усиливать цитотоксическое действие ДНК-повреждающих химиопрепаратов за счёт ослабления процессов репарации повреждений ДНК в опухолевых клетках.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: пиррол-содержащие гетероциклические соединения, полимеризация тубулина, паклитаксел, доксорубин, сенситизация, апоптоз.

DOI: 10.31857/S0320972522040066, **EDN:** AQSSMH

ВВЕДЕНИЕ

Несмотря на успехи химиотерапии в лечении пациентов с онкологическими заболеваниями,

неуклонное развитие резистентности злокачественных новообразований к большинству современных химиопрепаратов, а также большое количество системных побочных эффектов про-

Принятые сокращения: 2-АПК – 2-амино-пиррол-карбоксилат; ДМСО – диметилсульфоксид; клетки линии HeLa – клетки аденокарциномы шейки матки человека; клетки линии U-2 OS и U-2 OS DR GFP – клетки остеосаркомы человека; ПАРП – поли-(АДФ-рибоза)-полимераза; GFP – зелёный флуоресцентный белок; MG-132 – ингибитор протеасом.

* Адресат для корреспонденции.

должают оставаться одними из главных вызовов в современной онкологии [1–3]. Эти факторы диктуют необходимость поиска новых терапевтических мишеней, направленных на увеличение терапевтического индекса химиопрепаратов и снижение токсичности от проводимой химиотерапии [4–8]. Одним из таких подходов является снижение способности опухолевых клеток репарировать повреждения ДНК, возникающие вследствие воздействия ДНК-повреждающих факторов (химиопрепараты и лучевая терапия).

Результаты настоящего исследования иллюстрируют способность синтезированного нами пиррол-содержащего гетероциклического соединения, 2-амино-пиррол-карбоксилата (2-АПК), повышать чувствительность опухолевых клеток (например, остеосарком) к ингибитору ДНК-топоизомеразы II типа, доксорубину. Данный эффект был обусловлен способностью 2-АПК снижать уровень экспрессии рекомбиназы Rad51 в опухолевых клетках путём усиления процессов её протеасом-зависимой деградации, что приводило к снижению эффективности репарации повреждений ДНК по механизму гомологичной рекомбинации. Полученные данные свидетельствуют о перспективности комбинированного использования ингибиторов ДНК топоизомеразы типа II в комбинации с лекарственными препаратами, влияющими на процессы репарации повреждений ДНК.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Химические соединения. Синтез и цитостатическая активность (E)-этил-2-амино-5-(3,3-диметил-4-оксобутилен)-4-оксо-1-(2-фениламинобензамидо)-4,5-дигидро-1H-пиррол-3-карбоксилата были описаны ранее [9, 10]. Условное обозначение данного соединения – 2-АПК (2-амино-пиррол-карбоксилат). Для исследований были также использованы химиопрепараты доксорубин («Selleck Chem», США), паклитаксел («Sigma», США), а также ингибиторы белкового синтеза циклогексимид и ингибитор протеасом MG-132 («Sigma»). Все исследуемые соединения и препараты растворяли в диметилсульфоксиде (ДМСО) в соответствии с рекомендациями производителя.

Клеточные линии и условия культивирования. Исследования были проведены на опухолевых клеточных линиях аденокарциномы шейки матки HeLa и остеосаркомы U-2 OS, которые были получены из Американской коллекции типовых культур («ATCC», США). Клеточная линия U-2 OS DR GFP, содержащая зелёный флуоресцентный белок (GFP), была любезно предостав-

лена доктором Maria Jasin из Ракового Центра Memorial Sloan-Kettering, Нью-Йорк, США. Клеточные линии культивировали в среде RPMI-1640 с добавлением 15% эмбриональной бычьей сыворотки, 1% L-глутамин, 50 Ед/мл пенициллина, 50 мкг/мл стрептомицина и в стандартных условиях инкубатора (5% CO₂, 37 °С, «ЛамСистемс», Россия).

Антитела. Первичные антитела (АТ), используемые для вестерн-блоттинга, были следующими: актин («Gene Script», США), Rad51 («Cell Signaling», США), γ -H2AX (Ser139) («Cell Signaling»), убиквитин («Santa Cruz Biotechnology», США), расщеплённые формы каспазы-3 («Cell Signaling») и поли-(АДФ-рибоза)-полимеразы (ПАРП) («Life Technologies», США). В качестве вторичных антител использовали АТ, конъюгированные с пероксидазой (HRP) («Santa Cruz Biotechnology»).

Вестерн-блоттинг. Для вестерн-блоттинга клетки подвергали лизису с помощью буфера RIPA (1% NP-40, 50 mM Tris-HCl (pH 8,0), с добавлением ингибиторов протеаз и фосфатаз). Полученную суспензию инкубировали в течение 1 ч при 4 °С, а затем центрифугировали («Eppendorf», Германия) в течение 30 мин при 13 000 об./мин при 4 °С. Концентрацию белка в суспензии измеряли с помощью BCA Protein Assay Kit («Thermo Fisher», США). В лунки 4–12%-ного градиентного Tris-ацетатного геля NuPAGE («Invitrogen», США) добавляли по 30 мкг белковой суспензии, затем осуществляли перенос разделённых электрофорезом белков на нитроцеллюлозную мембрану («Bio-Rad», США). Далее мембрану последовательно инкубировали с первичными, затем вторичными АТ в растворе 5%-ного обезжиренного молока. Детекцию проводили с помощью усиленной хемилюминесценции (реагент Western Lightning Plus-ECL, «Perkin Elmer», США) в геле-документирующей системе FUSION Solo («Vilber», Франция). Программное обеспечение NIH ImageJ («Bethesda», США) использовали для денситометрического анализа полученных изображений.

Для коиммунопреципитации клетки подвергали лизису в ТЕВ-буфере (50 mM Tris-HCl (pH 7,5), 150 mM NaCl, 1% NP-40, 10% глицерина) в присутствии коктейля ингибиторов протеаз и фосфатаз («Sigma»). Лизаты были инкубированы со специфическими АТ в течение 12 ч при 4 °С на орбитальном шейкере («BioSan», Латвия). Далее к исследуемым образцам добавляли сефарозу А/Г («Santa Cruz Biotechnology») и инкубировали в течение 1 ч при 4 °С на орбитальном шейкере. После 5-кратного отмыва образцов ТЕВ-буфером осуществляли детекцию сигнала методом вестерн-блоттинга, как указано выше.

Анализ клеточной выживаемости. Опухолевые клетки засеивали в 96-луночные плоскодонные планшеты («Corning Inc.», США) и культивировали в присутствии исследуемых соединений или ДМСО (контроль) в течение 72 ч. Для оценки жизнеспособности клеточных культур вносили реагент (MTS) 3-(4,5-диметилтиазол-2-ил)-5-(3-карбоксиметоксифенил)-2-(4-сульфопенил)-2Н-тетразолий («Promega», США). Спустя 1 ч проводили анализ жизнеспособности клеточных культур на планшетном спектрофотометре MultiScan FC («Thermo Fisher Scientific», США) при длине волны 492 нм.

Анализ эффективности гомологичной рекомбинации ДНК. Оценку способности 2-АПК влиять на процессы гомологичной рекомбинации оценивали методом проточной цитофлуориметрии с использованием репортёрной клеточной линии остеосаркомы U-2 OS DR GFP. Трансфекцию pCba SceI-содержащей плазмиды в «индикаторную» клеточную линию U-2 OS DR GFP осуществляли с использованием набора для трансфекции Lipofectamine RNAiMAX Reagent («Invitrogen») в соответствии с протоколом производителя. Плазида pCba SceI была любезно предоставлена Maria Jasin. Трансфекция в клетки pCba SceI-содержащей плазмиды приводит к образованию двунитевых разрывов ДНК, репарация которых приводит к восстановлению функциональной активности гена *GFP* (green fluorescent protein). Соответственно, количество GFP-положительных клеток после трансфекции отражает эффективность процессов гомологичной рекомбинации ДНК. Количество GFP-положительных клеток подсчитывали на проточном цитофлуориметре («FACS Canto», США). Для каждой выборки было зарегистрировано не менее 10 000 событий.

Статистический анализ проводили с использованием *t*-критерия Стьюдента. Результаты представлены как среднее значение \pm стандартное отклонение ($M \pm SD$) для каждой группы. Показатель синергизма оценивали количественно с помощью R-пакета программы Synergy Finder. Модель HSA (highest single agent) была использована для расчёта синергизма [11]. Значения HSA > 10 свидетельствуют о синергизме действия исследуемых препаратов, значения HSA в диапазоне от -10 до 10 иллюстрируют их аддитивный эффект, а значения HSA < -10 указывают на антагонизм исследуемых соединений.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

На начальном этапе исследований нами было показано, что химиопрепарат доксорубин в

субтоксичных концентрациях ингибирует скорость пролиферации опухолевых клеток линии остеосаркомы U-2 OS. Аналогичная способность была обнаружена у синтезированного нами пиррол-содержащего гетероциклического соединения 2-АПК. Использование данных соединений в комбинации друг с другом приводило к выраженному цитотоксическому эффекту и значительному снижению степени конfluэнтности опухолевой культуры (рис. 1). Аналогичные данные были получены с использованием других опухолевых клеточных линий, например HeLa. Дальнейшие исследования показали, что основным механизмом гибели опухолевых клеток при сочетанном влиянии доксорубина и 2-АПК являлся апоптоз. В пользу этого свидетельствовало значительное повышение уровней экспрессии расщеплённых форм ПАРП и каспазы-3 (рис. 2).

На основании вышеизложенного было выдвинуто предположение о синергизме действия вышеуказанных соединений, для подтверждения которого были проведены расчёты показателей синергизма в опухолевых клетках линии U-2 OS, культивированных с различными концентрациями доксорубина (0,125; 0,25; 0,5 мкМ) и 2-АПК (0,625; 1,25; 2,5; 5 мкМ). Результаты исследования, представленные на рис. 3, показывают наличие синергизма между данными веществами (показатель синергии составлял 12,523 (>10)).

Одним из механизмов, обуславливающих способность 2-АПК усиливать цитотоксическую активность доксорубина, могло явиться ослабление в опухолевых клетках процессов репарации повреждений ДНК, индуцируемых данным химиопрепаратом. Анализ уровня экспрессии белков, участвующих в процессах репарации двунитевых разрывов ДНК, выявил значительное повышение уровня экспрессии рекомбиназы Rad51 в опухолевых клетках, подвергнутых воздействию доксорубина (рис. 2). Этот факт свидетельствовал об активации спасательных путей репарации повреждений ДНК, что могло обуславливать низкую эффективность данного химиопрепарата. В то же время культивирование опухолевых клеток с доксорубином в комбинации с 2-АПК приводило к значительному снижению уровня экспрессии Rad51. Данный факт коррелировал с повышением уровней экспрессии маркёров апоптоза (рис. 2), что свидетельствовало о запуске процессов программированной клеточной гибели в опухолевых клетках вследствие несостоятельности процессов репарации повреждений ДНК, индуцированных доксорубином.

Данный факт мог быть обусловлен способностью 2-АПК влиять на уровень экспрес-

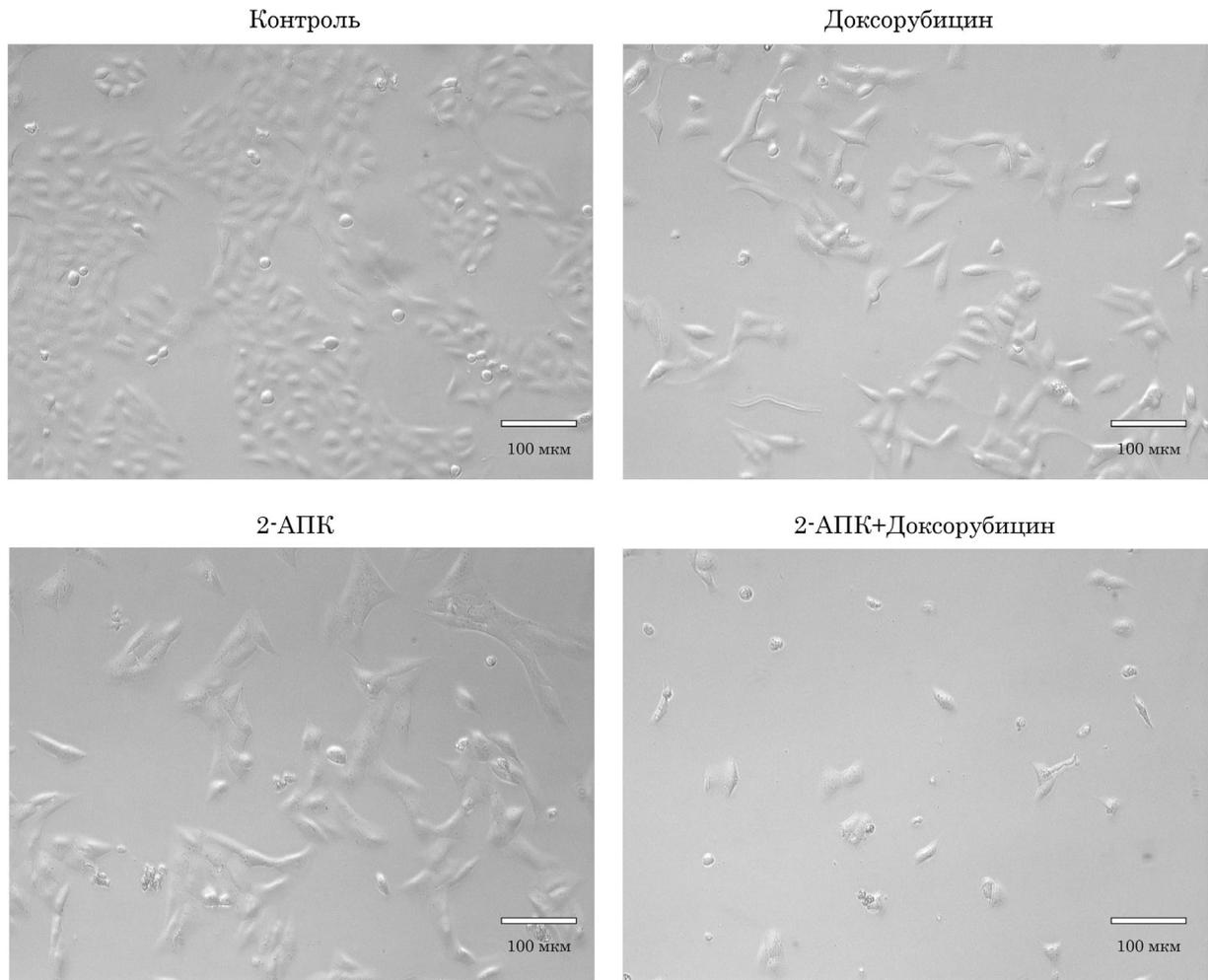


Рис. 1. Микроскопия (10×) клеток U-2 OS под влиянием доксорубина (0,5 мкМ), 2-АПК (10 мкМ), а также их комбинации в течение 48 ч

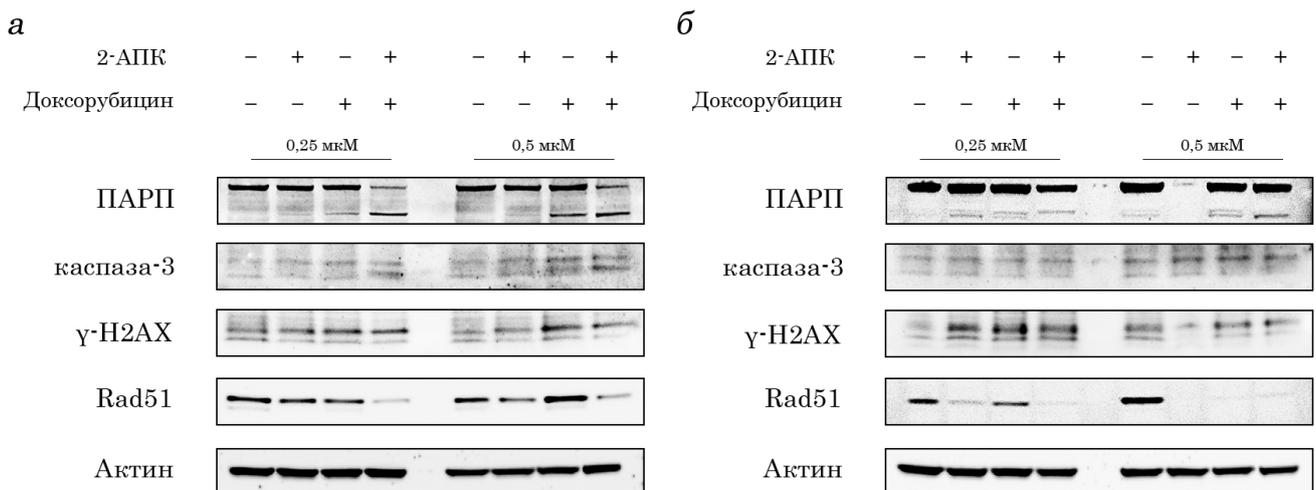


Рис. 2. Уровень экспрессии расщеплённых форм ПАРП, каспазы-3, а также γ -H2AX (Ser139) и рекомбиназы Rad51 в клетках HeLa (а) и U-2 OS (б). Актин использовали в качестве контроля белковой нагрузки в образцах

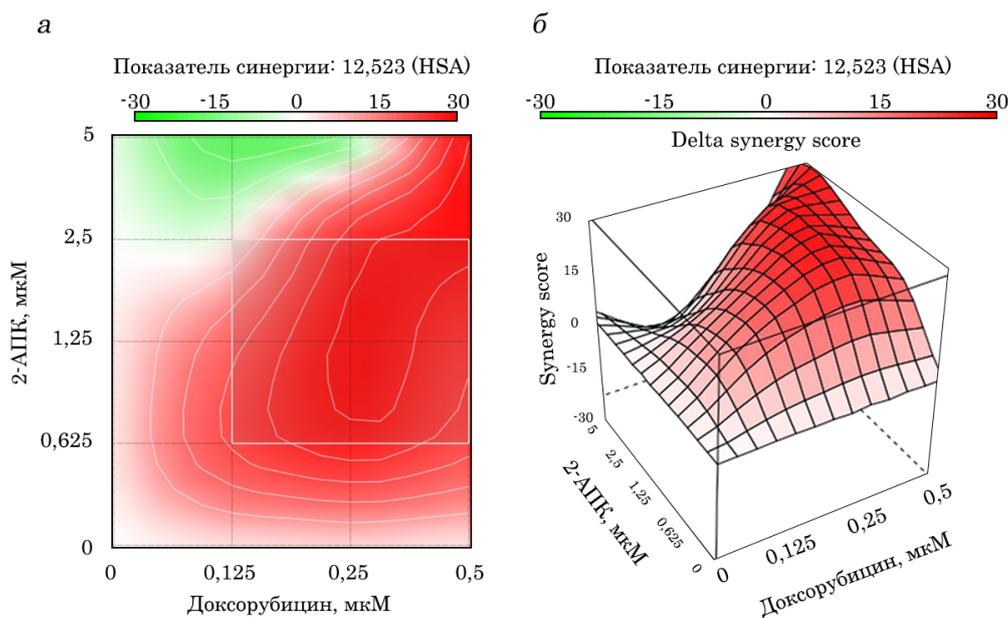


Рис. 3. Двухмерный (а) и трёхмерный (б) графики (surface-plots), отражающие оптимальные дозы доксорубицина и 2-АПК, которые обуславливают наибольший синергизм у клеток U-2 OS. Синергия доксорубицина и 2-АПК получена с помощью программы Synergy Finder. Показатель синергии доксорубицина и 2-АПК составил 12,523

сии Rad51 как на транскрипционном, так и на посттрансляционном уровнях. Поэтому на первом этапе исследований был проведён анализ уровня экспрессии Rad51 в опухолевых клетках, культивируемых с 2-АПК в присутствии циклогексимида, блокирующего синтез белка. Результаты, представленные на рис. 4, а, не выявили различий в уровне экспрессии Rad51 в опухолевых клетках U-2 OS в присутствии циклогексимида и без него. Аналогичные результаты были получены и на другой опухолевой клеточной линии HeLa (рис. 4, б). Эти данные свидетельствовали об отсутствии способности 2-АПК влиять на уровень экспрессии Rad51 на транскрипционном уровне.

На следующем этапе исследований была изучена способность данного соединения влиять на процессы протеасом-зависимой деградации рекомбиназы Rad51. С этой целью был использован препарат MG-132, являющийся ингибитором протеасом. Результаты, представленные на рис. 4, в, убедительно показывают повышение уровня экспрессии Rad51 в опухолевых клетках U-2 OS на фоне действия данного ингибитора. Аналогичные данные были получены с использованием клеточной линии HeLa (рис. 4, г). Результаты денситометрического анализа полученных данных показывают способность MG-132 статистически значимо повышать уровень экспрессии Rad51 в данных опухолевых клеточных линиях практически на всех сроках культивирования с 2-АПК (рис. 4, д и е).

Способность 2-АПК усиливать процессы протеасом-зависимой деградации в обеих опухолевых клеточных линиях была подтверждена результатами коиммунопреципитации рекомбиназы Rad51 с убиквитином (рис. 5). Важно отметить, что химиопрепарат паклитаксел также повышал уровень экспрессии убиквитинированной формы Rad51, что свидетельствовало о способности препаратов, влияющих на динамическое состояние микротрубочек веретена деления, влиять на уровень экспрессии Rad51 на посттрансляционном уровне, усиливая процессы их протеасом-зависимой деградации.

На заключительном этапе исследований была изучена способность 2-АПК непосредственно влиять на процессы гомологичной рекомбинации ДНК в клетках остеосаркомы U-2 OS (рис. 6). С этой целью нами была использована репортёрная клеточная линия, содержащая интегрированную в геном единичную копию гена *GFP*. Важно отметить, что GFP приобретает свою функциональную активность только в результате успешной репарации двунитевых разрывов ДНК, индуцированных в результате трансфекции в клетки рCba SceI-содержащей плазмиды. Следовательно, уменьшение или увеличение количеств GFP-положительных клеток после образования в них SceI-индуцированных двунитевых разрывов ДНК являлось свидетельством ослабления или усиления процессов гомологичной рекомбинации ДНК. Трансфекция в опухолевые клетки SceI-содержащей плазми-

ды приводила к появлению GFP-положительных клеток, что свидетельствовало о восстановлении последовательности *GFP* в результате активации процессов гомологичной рекомбинации (рис. 6, б). Было обнаружено значительное (почти 6-кратное) снижение количества GFP-позитивных клеток, культивируемых с 2-АПК в течение 24 ч после индукции двунитевых разрывов ДНК в результате трансфекции в данные клетки *SceI*-содержащей плазмиды (рис. 6, з).

Таким образом, основной механизм 2-АПК-индуцированной сенситизации опухолевых клеток к химиопрепарату доксорубину был обусловлен способностью данного соединения вли-

ять на уровень экспрессии рекомбиназы Rad51, снижая тем самым эффективность процессов гомологичной рекомбинации ДНК и запуская процессы апоптоза вследствие несостоятельности вышеуказанных репаративных процессов.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Химиотерапия является одним из общепризнанных методов лечения пациентов со многими злокачественными новообразованиями, в том числе, остеосарком [12–14] и некоторых опухолей эпителиального происхождения [15, 16]. Несмотря на эффективность большинства со-

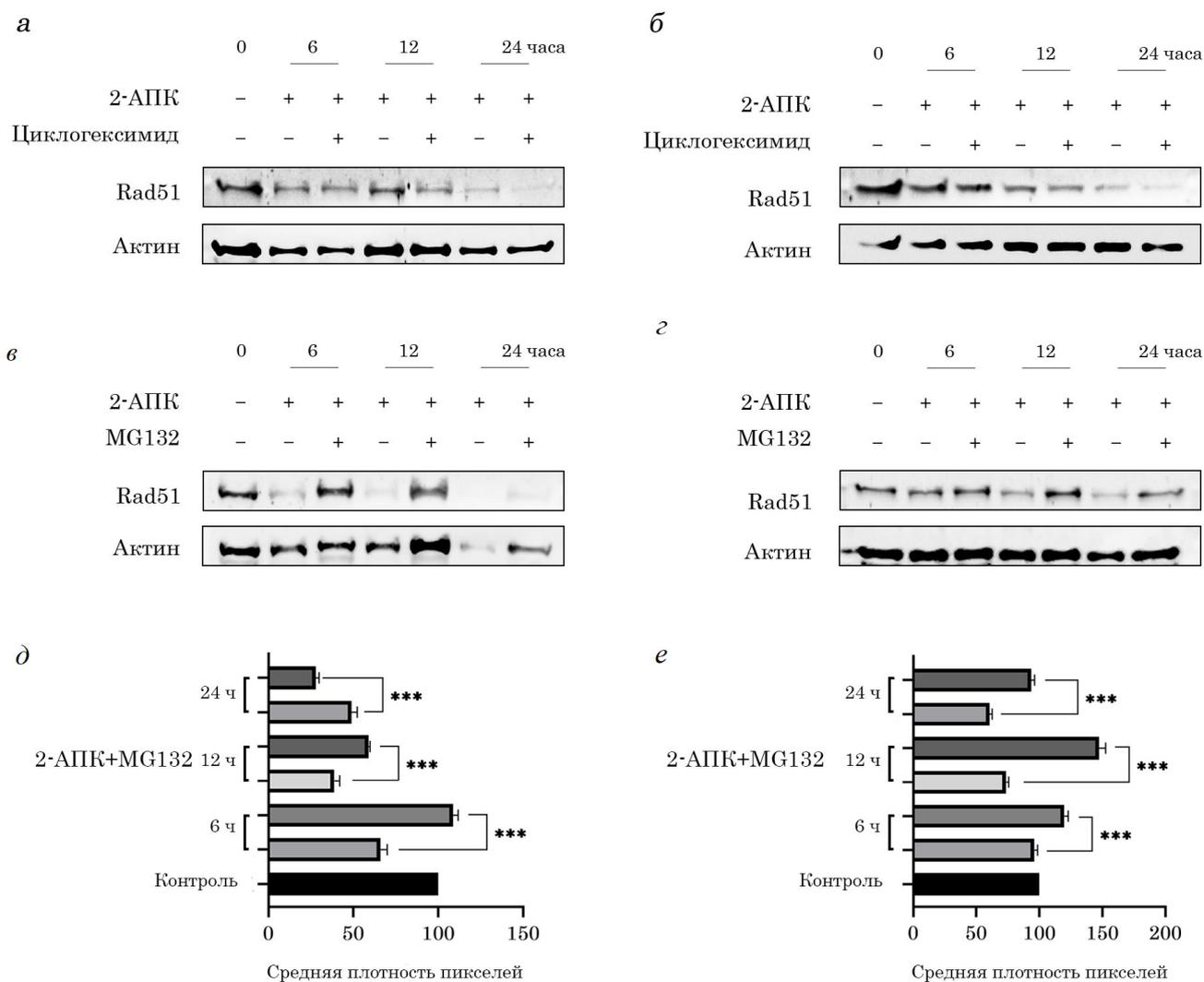


Рис. 4. Уровень экспрессии рекомбиназы Rad51 в клетках HeLa (а) и U-2 OS (б) под влиянием 2-АПК в сочетании с ингибитором белкового синтеза циклогексимидом и без него в динамике (0, 6, 12 и 24 ч). Уровень экспрессии рекомбиназы Rad51 в клетках HeLa (в) и U-2 OS (г) под влиянием 2-АПК в сочетании с MG-132 и без него в динамике (0, 6, 12 и 24 ч). Актин использовали в качестве контроля белковой нагрузки в образцах. Денситометрический анализ уровня экспрессии рекомбиназы Rad51 под влиянием 2-АПК в сочетании с MG-132 и без него в динамике (0, 6, 12 и 24 ч) в клеточных линиях HeLa (д) и U-2 OS (е). М ± SD, *** $p < 0,001$

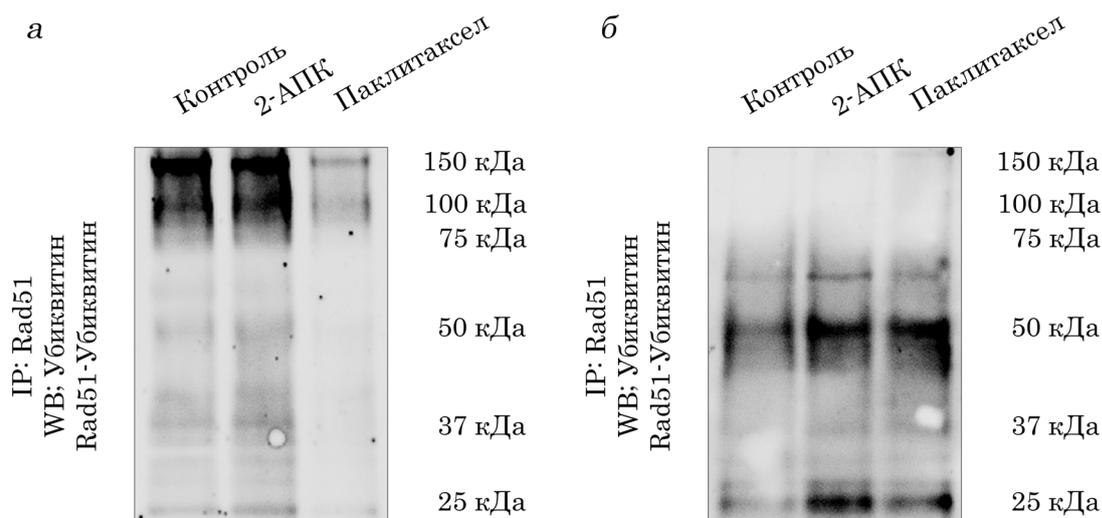


Рис. 5. Лизаты клеток HeLa (а) и U-2 OS (б) иммунопреципитировали с помощью антител к Rad51 и детектировали убиквитин с помощью иммуноблоттинга, чтобы продемонстрировать образование эндогенного комплекса. Для экспериментов по коиммунопреципитации клетки обрабатывали 2-АПК (10 мкМ) и паклитакселом (1 мкМ)

временных химиопрепаратов, наличие большого количества системных побочных эффектов от проводимой химиотерапии и быстрое развитие химиорезистентности опухоли являются основными факторами, оказывающими негативное влияние на прогноз заболевания у пациентов с неоперабельными, рецидивирующими и метастатическими формами заболевания [17–19]. Разработка и внедрение в практическую онкологию протоколов комбинированной химиотерапии, безусловно, повышает эффективность используемых химиопрепаратов, влияющих на большее количество опухолевых клеток, различающихся друг от друга по своей способности репарировать повреждения ДНК, индуцируемые химиопрепаратами. Очевидно, что эффективность комбинированной химиотерапии может быть обусловлена как синергическими, так и аддитивными эффектами противоопухолевых препаратов [20, 21]. Используемые в настоящее время схемы полихимиотерапии довольно часто включают в себя химиопрепараты антрациклинового ряда, алкилирующие агенты, препараты платины, а также митотические препараты [20–24]. Несмотря на очевидные клинические преимущества современных схем комбинированной химиотерапии по сравнению со схемами терапии, основанными на использовании этих же химиопрепаратов в монорежиме, молекулярные механизмы их комбинированного взаимодействия являются не изученными.

Предыдущие исследования нашей научной группы были посвящены синтезу и изучению механизма противоопухолевого действия пирро-

рол-содержащих гетероциклических соединений [9, 10, 25–35]. Был установлен молекулярный механизм их действия, который обусловлен способностью этих соединений влиять на процессы полимеризации тубулина, что, в свою очередь, приводило к их гибели по механизму апоптоза.

Исходя из вышеизложенного, было предпринято настоящее исследование, посвящённое изучению способности ранее синтезированного нами пиррол-содержащего гетероциклического соединения 2-АПК [9, 10] влиять на чувствительность опухолевых клеток к ДНК-повреждающим агентам, например доксорубину.

Было показано, что использование 2-АПК в комбинации с доксорубином приводило к выраженному цитотоксическому эффекту и значительному снижению степени конfluэнтности опухолевой культуры (рис. 1). Уровень экспрессии маркёров апоптоза (расщеплённых форм PARP и каспазы-3) в опухолевых клетках был значительно выше при сочетанном применении доксорубина и 2-АПК по сравнению с использованием этих соединений по отдельности (рис. 2). На следующем этапе было обнаружено, что данный эффект обусловлен синергическим влиянием 2-АПК и доксорубина (рис. 3).

Способность пиррол-содержащего гетероциклического соединения усиливать цитотоксичность ДНК-повреждающего агента могла быть обусловлена влиянием 2-АПК на репарацию двунитевых повреждений ДНК, вызванных доксорубином. Это предположение основны-

валось на результатах иммуноблоттинга, иллюстрировавших значительные колебания уровня экспрессии рекомбиназы Rad51 в опухолевых клетках (рис. 2). Действительно, доксорубин индуцировал повреждения ДНК в опухолевых клетках, о чём свидетельствовало повышение уровня экспрессии маркера двунитевых разрывов – γ -H2AX (Ser139). Это, в свою очередь, сопровождалось активацией процессов репарации

данных повреждений ДНК, проявлявшейся в усилении уровня экспрессии рекомбиназы Rad51. Тем не менее мы наблюдали значительное снижение экспрессии данного фактора репарации поврежденных ДНК в опухолевых клетках, культивируемых с доксорубицином в присутствии 2-АПК (рис. 2).

Способность 2-АПК ингибировать экспрессию Rad51 могла быть реализована как на тран-

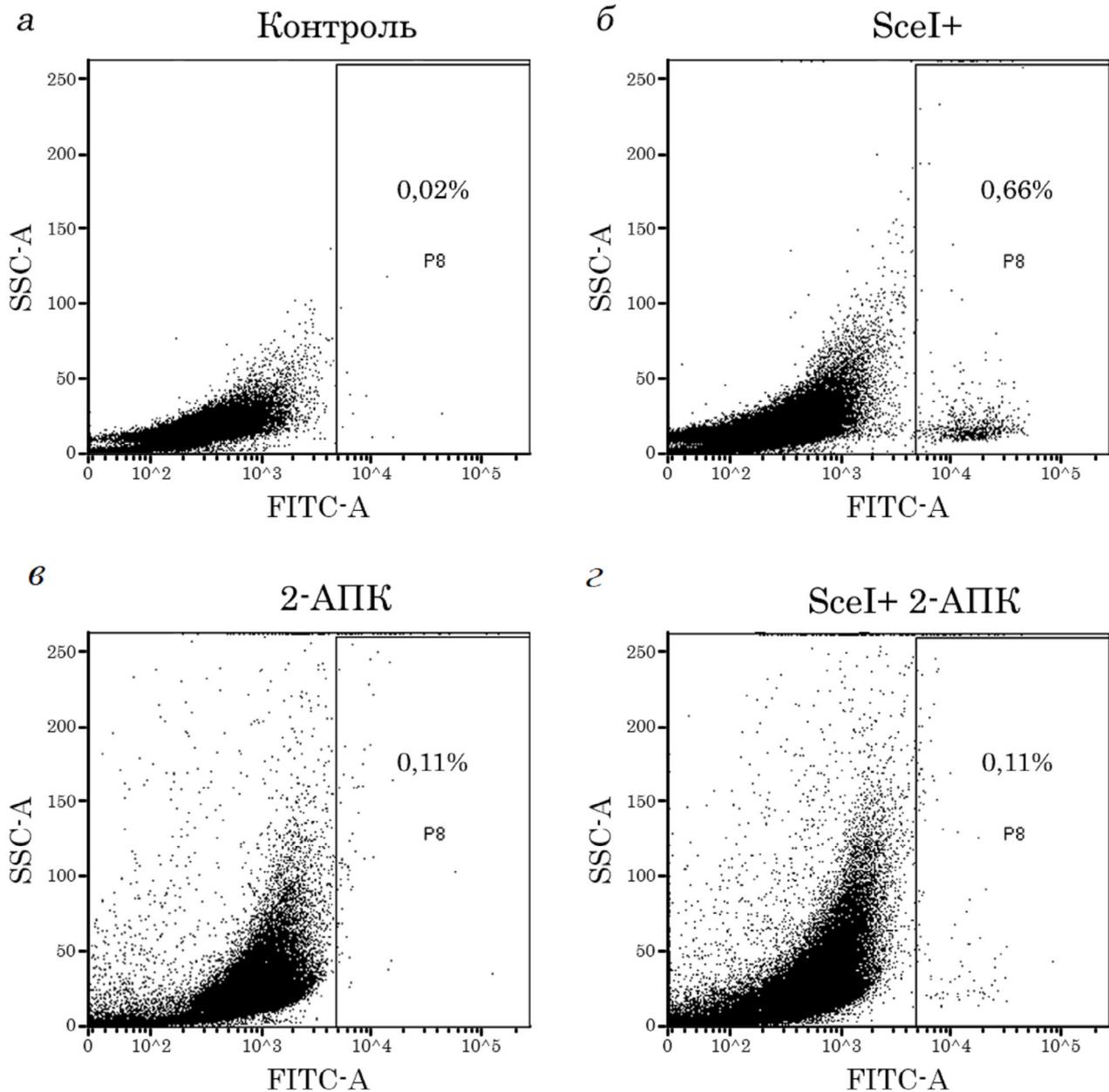


Рис. 6. Точечная (dot-plot) гистограмма клеточной линии U-2 OS DR GFP. По вертикали отображен параметр бокового светорассеяния (side scattering или SSC-A); по горизонтали – интенсивность флуоресценции GFP (Fluorescein isothiocyanate или FITC-A), которая отражает долю GFP-положительных клеток в процентах (выделено прямоугольником – P8). Клетки подвергали трансфекции контрольной (а и в) и SceI-содержащей (б и г) плазмидой и по истечении 12 ч инкубировали с 2-АПК (в и г) в течение 72 ч

скрипционном, так и на посттрансляционном уровнях. В уровнях экспрессии Rad51 опухолевыми клетками, культивированных в присутствии ингибитора белкового синтеза — циклогексемида и без него, не было обнаружено различий (рис. 4, а), что свидетельствовало об отсутствии способности данного соединения влиять на экспрессию Rad51 на транскрипционном уровне. В свою очередь, результаты, полученные при сочетанном использовании ингибитора протеасом — MG-132 и 2-АПК (рис. 4, в–е), а также коиммунопреципитации рекомбиназы Rad51 с убиквитином (рис. 5) свидетельствовали о способности 2-АПК влиять на уровень экспрессии Rad51 на посттрансляционном уровне, усиливая процессы протеасом-зависимой деградации рекомбиназы Rad51.

На заключительном этапе исследований была подтверждена способность 2-АПК ингибировать эффективность процессов гомологичной рекомбинации ДНК с помощью репортёрной клеточной линии U-2 OS DR, имеющую единичную копию гена *GFP*. Данная клеточная линия могла экспрессировать GFP (зелёный флуоресцентный белок) только при успешной репарации двунитевых разрывов ДНК, вызванных трансфекцией в клетки Scel-содержащей плазмиды. Таким образом, количество GFP-положительных клеток отражало эффективность гомологичной рекомбинации ДНК, в частности, 2-АПК почти 6-кратно снижало количество клеток, позитивных по уровню экспрессии GFP (рис. 6, з), относительно положительного контроля — индукция Scel-индуцированных разрывов

ДНК в клетках, культивированных с ДМСО (рис. 6, б).

Таким образом, результаты проведённого исследования свидетельствуют о способности пиррол-содержащего гетероциклического соединения — 2-АПК, ослаблять процессы гомологичной рекомбинации ДНК и вызывать сенситизацию опухолевых клеток к ингибитору ДНК-топоизомеразы типа II, доксорубину. Эти данные коррелируют с результатами исследований, показавших способность ингибиторов полимеризации тубулина влиять на транспорт белков репарации повреждений ДНК к месту повреждений, вызванных как ДНК-повреждающими химиопрепаратами [36], так и ионизирующим излучением [37], что раскрывает механизмы химио- и радиосенситизации опухолевых клеток под действием уже известных химиопрепаратов, а также соединений, обладающих способностью влиять на динамическое состояние микротрубочек веретена деления посредством нарушения процессов полимеризации/деполимеризации тубулина.

Финансирование. Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда (грант № 20-15-00001).

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

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

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Benjamin, R. S. (2020) Adjuvant and neoadjuvant chemotherapy for osteosarcoma: a historical perspective, *Adv. Exp. Med. Biol.*, **1257**, 1-10, doi: 10.1007/978-3-030-43032-0_1.
- Marina, N. M., Smeland, S., Bielack, S. S., Bernstein, M., Jovic, G., et al. (2016) Comparison of MAP1E versus MAP in patients with a poor response to preoperative chemotherapy for newly diagnosed high-grade osteosarcoma (EURAMOS-1): an open-label, international, randomised controlled trial, *Lancet Oncol.*, **17**, 1396-1408, doi: 10.1016/S1470-2045(16)30214-5.
- Li, H., Wu, X., and Cheng, X. (2016) Advances in diagnosis and treatment of metastatic cervical cancer, *J. Gynecol. Oncol.*, **27**, e43, doi: 10.3802/jgo.2016.27.e43.
- Xu, J., Pan, Q., and Ju, W. (2019) Ras inhibition by zoledronic acid effectively sensitizes cervical cancer to chemotherapy, *Anticancer Drugs*, **30**, 821-827, doi: 10.1097/CAD.0000000000000779.
- Galembikova, A., and Boichuk, S. V. (2021) Tyrosine kinase signaling profile in osteosarcomas: A potential therapeutic target for sensitization to doxorubicin, *Ann. Oncol.*, **32** (Suppl 6), S1365, doi: 10.1016/j.annonc.2021.08.2060.
- Boichuk, S., Bikinieva, F., Nurgatina, I., Dunaev, P., Valeeva, E., et al. (2020) Inhibition of AKT-signaling sensitizes soft tissue sarcomas (STS) and gastrointestinal stromal tumors (GIST) to doxorubicin via targeting of homology-mediated DNA repair, *Int. J. Mol. Sci.*, **21**, 8842, doi: 10.3390/ijms21228842.
- Galembikova, A., and Boichuk, S. (2021) Targeting of AKT-signaling pathway potentiates the anti-cancer efficacy of doxorubicin in A673 Ewing sarcoma cell line, *BioNanoSci.*, **11**, 1070-1082, doi: 10.1007/s12668-021-00901-x.
- Бойчук С. В., Дунаев П. Д., Галембикова А. Р. (2021) Ингибирование АКТ-сигнального пути в саркомах мягких тканей — новый подход к их сенситизации к ингибиторам ДНК-топоизомеразы II типа, *Клин. Патифизиол.*, **27**, 75-87.
- Зыкова С. С., Кизимова И. А., Сюткина А. И., Токсарова Ю. С., Игидов Н. М., и др. (2019) Синтез и цитотатическая активность (Е)-этил-2-амино-5-(3,3-диметил-4-оксобутилен)-4-оксо-1-(2-фениламинобензамидо)-4,5-дигидро-1Н-пиррол-3-карбоксилата, *Хим. Фармацевт. Журн.*, **53**, 15-18, doi: 10.30906/0023-1134-2019-53-10-15-18.

10. Boichuk, S., Galembikova, A., Bikinieva, F., Dunaev, P., Aukhadieva, A., et al. (2021) 2-APCAs, the novel microtubule targeting agents active against distinct cancer cell lines, *Molecules*, **26**, 616, doi: 10.3390/molecules26030616.
11. Tomita, Y., Morooka, T., Hoshida, Y., Zhang, B., Qiu, Y., et al. (2006) Prognostic significance of activated AKT expression in soft-tissue sarcoma, *Clin. Cancer Res.*, **12**, 3070-3077, doi: 10.1158/1078-0432.CCR-05-1732.
12. Verschoor, A. J., Speetjens, F. M., Dijkstra, P. D. S., Fiocco, M., van de Sande, M. A. J., et al. (2020) Single-center experience with ifosfamide monotherapy as second-line treatment of recurrent/metastatic osteosarcoma, *Oncologist*, **25**, e716-e721, doi: 10.1634/theoncologist.2019-0528.
13. Amoroso, L., Castel, V., Bisogno, G., Casanova, M., Marquez-Vega, C., et al. (2020) Phase II results from a phase I/II study to assess the safety and efficacy of weekly nab-paclitaxel in paediatric patients with recurrent or refractory solid tumours: A collaboration with the European Innovative Therapies for Children with Cancer Network, *Eur. J. Cancer*, **135**, 89-97, doi: 10.1016/j.ejca.2020.04.031.
14. Breithaupt, H., and Küenzlen, E. (1983) High-dose methotrexate for osteosarcoma: toxicity and clinical results, *Oncology*, **40**, 85-89.
15. Wiseman, L. R., and Spencer, C. M. (1998) Paclitaxel. An update of its use in the treatment of metastatic breast cancer and ovarian and other gynaecological cancers, *Drugs Aging*, **12**, 305-334, doi: 10.2165/00002512-199812040-00005.
16. Goa, K. L., and Faulds, D. (1994) Vinorelbine. A review of its pharmacological properties and clinical use in cancer chemotherapy, *Drugs Aging*, **5**, 200-234, doi: 10.2165/00002512-199405030-00006.
17. Qin, S. Y., Cheng, Y. J., Lei, Q., Zhang, A. Q., and Zhang, X. Z. (2018) Combinational strategy for high-performance cancer chemotherapy, *Biomaterials*, **171**, 178-197, doi: 10.1016/j.biomaterials.2018.04.027.
18. Partridge, A. H., Burstein, H. J., and Winer, E. P. (2001) Side effects of chemotherapy and combined chemohormonal therapy in women with early-stage breast cancer, *J. Natl. Cancer Inst. Monogr.*, **30**, 135-142, doi: 10.1093/oxfordjournals.jncimonographs.a003451.
19. LeBaron, S., Zeltzer, L. K., LeBaron, C., Scott, S. E., Zeltzer, P. M., et al. (1988) Chemotherapy side effects in pediatric oncology patients: drugs, age, and sex as risk factors, *Med. Pediatr. Oncol.*, **16**, 263-268, doi: 10.1002/mpo.2950160408.
20. Albain, K. S., Nag, S. M., Calderillo-Ruiz, G., Jordaan, J. P., Llombart, A. C., et al. (2008) Gemcitabine plus Paclitaxel versus Paclitaxel monotherapy in patients with metastatic breast cancer and prior anthracycline treatment, *J. Clin. Oncol.*, **26**, 3950-3957, doi: 10.1200/JCO.2007.11.9362.
21. Mokhtari, R. B., Kumar, S., Islam, S. S., Yazdanpanah, M., Adeli, K., et al. (2013) Combination of carbonic anhydrase inhibitor, acetazolamide, and sulforaphane, reduces the viability and growth of bronchial carcinoid cell lines, *BMC Cancer*, **13**, 378, doi: 10.1186/1471-2407-13-378.
22. Juergens, C., Weston, C., Lewis, I., Whelan, J., Paulussen, M., et al. (2006) Safety assessment of intensive induction with vincristine, ifosfamide, doxorubicin, and etoposide (VIDE) in the treatment of Ewing tumors in the EURO-E.W.I.N.G. 99 clinical trial, *Pediatr. Blood Cancer*, **47**, 22-29.
23. Paulussen, M., Craft, A. W., Lewis, I., Hackshaw, A., Douglas, C., et al. (2008) European Intergroup Cooperative Ewing's Sarcoma Study-92. Results of the EICESS-92 Study: two randomized trials of Ewing's sarcoma treatment-cyclophosphamide compared with ifosfamide in standard-risk patients and assessment of benefit of etoposide added to standard treatment in high-risk patients, *J. Clin. Oncol.*, **26**, 4385-4393, doi: 10.1200/JCO.2008.16.5720.
24. Le Chevalier, T., Pujol, J. L., Douillard, J. Y., Alberola, V., Monnier, A., et al. (1994) A three-arm trial of vinorelbine (Navelbine) plus cisplatin, vindesine plus cisplatin, and single-agent vinorelbine in the treatment of non-small cell lung cancer: an expanded analysis, *Semin. Oncol.*, **21** (Suppl 10), 28-34.
25. Зыкова С. С., Бойчук С. В., Галембикова А. Р., Рамазанов Б. Р., Мустафин И. Г., и др. (2014) 3-Гидрокси-1,5-диарил-4-пивалоил-2,5-дигидро-2-пирролоны нарушают процессы митоза и индуцируют гибель опухолевых клеток *in vitro*, *Цитология*, **56**, 439-442.
26. Зыкова С. С., Одегова Т. Ф., Бойчук С. В. Галембикова А. Р. (2014) Синтез и фармако-токсикологические характеристики 3-замещенных 3-гидрокси-6-фенил-3,4-дигидро-2Н-1,3-оксазинов, *Хим. Фарм. Журн.*, **11**, 10-14.
27. Бойчук С. В., Галембикова А. Р., Зыкова С. С., Хуснутдинов Р. Р. (2015) Нарушения регуляции клеточного цикла и репарации повреждений ДНК в опухолевых клетках под действием замещенного этилового эфира 2-амино-1Н-пиррол-3-карбоновой кислоты, *Совр. Пробл. Науки Образ.*, **5**, 116.
28. Зыкова С. С., Галембикова А. Р., Рамазанов Б. Р., Одегова Т. Ф., Игидов Н. М., и др. (2015) Цитотоксическая активность этиловых эфиров 2-амино-1-бензоил-амино-4-оксо-5-(2-оксо-2-арилэтилиден)-4,5-дигидро-1Н-пиррол-3-карбоновых кислот, *Хим. Фарм. Журн.*, **12**, 19-23.
29. Boichuk, S., Galembikova, A., Zykova, S., Ramazanov, B., Khusnutdinov, R., et al. (2016) Ethyl-2-amino-pyrrole-3-carboxylates are novel potent anticancer agents that affect tubulin polymerization, induce G2/M cell-cycle arrest, and effectively inhibit soft tissue cancer cell growth *in vitro*, *AntiCancer Drugs*, **27**, 620-634, doi: 10.1097/CAD.0000000000000372.
30. Зыкова С. С., Игидов Н. М., Киселев М. А., Бойчук С. В., Галембикова А. Р., и др. (2016) Экспериментальное обоснование создания противоопухолевых средств на основе пирролсодержащих гетероциклов, *Журн. Науч. Статей «Здоровье и образование в XXI веке»*, **7**, 121-127.
31. Галембикова А. Р., Бойчук С. В., Зыкова С. С., Хуснутдинов Р. Р., Дунаев П. Д. (2017) Пивалоил-замещенные 2-пирролоны индуцируют гибель гастроинтестинальных стромальных опухолей, резистентных к иматинибу и химиопрепаратам, *Вопр. Онкол.*, **1**, 135-140.
32. Галембикова А. Р., Бойчук С. В., Дунаев П. Д., Хуснутдинов Р. Р., Зыкова С. С. (2018) Влияние пивалоил-замещенных пиррол-содержащих гетероциклических соединений на механизмы репарации повреждений ДНК клеток саркомы Юинга, *Казан. Мед. Журн.*, **2**, 245-248, doi: 10.17816/KMJ2018-245.
33. Зыкова С. С., Игидов Н. М., Захматов А. В., Киселев М. А., Галембикова А. Р., и др. (2018) Синтез и биологическая активность 2-амино-1-арил-5-(3,3-диметил-2-оксобутилиден)-4-оксо-N-(тиазол-5-ил)-4,5-дигидро-1Н-пиррол-3-карбоксамидов, *Хим. Фарм. Журн.*, **3**, 10-16.
34. Boichuk, S., Galembikova, A., Dunaev, P., Mischeeva, E., Novikova, M., et al. (2019) Ethyl-amino-pyrrole-3-carboxylates are active against imatinib-resistant gastrointestinal stromal tumors *in vitro*, *AntiCancer Drugs*, **30**, 475-484, doi: 10.1097/CAD.0000000000000753.
35. Boichuk, S., Galembikova, A., Syuzov, K., Dunaev, P., Bikinieva, F., et al. (2021) The design, synthesis, and bio-

- logical activities of pyrrole-based carboxamides: the novel tubulin inhibitors targeting the colchicine-binding site, *Molecules*, **26**, 5780, doi: 10.3390/molecules26195780.
36. Poruchynsky, M. S., Komlodi-Pasztor, E., Trostel, S., Wilkerson, J., Regairaz, M., et al. (2015) Microtubule-targeting agents augment the toxicity of DNA-damaging agents by disrupting intracellular trafficking of DNA repair proteins, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **112**, 1571-1576, doi: 10.1073/pnas.1416418112.
37. Markowitz, D., Ha, G., Ruggieri, R., and Symons, M. (2017) Microtubule-targeting agents can sensitize cancer cells to ionizing radiation by an interphase-based mechanism, *Onco Targets Ther.*, **10**, 5633-5642, doi: 10.2147/OTT.S143096.

2-APC ATTENUATES HOMOLOGY-MEDIATED DNA REPAIR AND SENSITIZES CANCER CELLS TO DOXORUBICIN

S. V. Boichuk^{1,2*}, F. F. Bikinieva¹, I. G. Mustafin¹,
S. S. Zyкова³, S. A. Ryzkin², and A. R. Galembikova¹

¹ Kazan State Medical University, 420012 Kazan, Russia; E-mail: boichuksergei@mail.ru

² Russian Medical Academy of Continuous Professional Education, 125993 Moscow, Russia

³ Perm State Academy of Pharmacy, 614990 Perm, Russia

Besides high efficiency of the chemotherapeutic agents in cancer therapy, rapid development of tumor resistance and systemic adverse effects are considered as the major negative prognostic factors, especially for the patients with metastatic, unresectable and recurrent malignancies. Thus, identification of the novel molecular targets and development of the approaches to sensitize the tumors to the current chemotherapeutic regimens are important. The study was aimed to determine the ability of the pyrrole-based heterocyclic compound 2-APC that was synthesized in our lab, to sensitize cancer cells to the chemotherapeutic agent doxorubicin, a well-known topoisomerase II inhibitor. The experiments were performed on tumor cell lines, cultured with 2-APC, doxorubicin and paclitaxel. Expression of DNA repair proteins and markers of apoptosis was examined by western blotting. Protein-protein interactions were examined by co-immunoprecipitation. Synergism between the chemotherapeutic agents was assessed by using the computer program Synergy Finder. Results. Doxorubicin (Dox) exhibited the moderate cytotoxic activities against tumor cells in vitro, whereas combination of Dox and 2-APC significantly potentiated cytotoxic activity of Dox and induced apoptosis of cancer cells. This was due to 2-APC's ability to impair DNA damage repair mechanisms in cancer cells, which was evidenced by decreased expression of Rad51 recombinase as an outcome of its proteasome-based degradation. Besides 2-APC, similar activity was observed for paclitaxel, a well-known tubulin-binding agent. Chemotherapeutic agents and chemical compounds interfering with the microtubules dynamic state might potentiate cytotoxic activity of DNA-damaging chemotherapeutic agents in cancer cells due to the impairment of DNA repair mechanisms.

Keywords: pyrrole-based heterocycles compounds, tubulin polymerization, paclitaxel, doxorubicin, sensitization, apoptosis

УДК 547.857.7; 577.151.042; 577.152.242

МОДЕЛИРОВАНИЕ СТРУКТУРЫ КОМПЛЕКСА тРНК-ГУАНИНТРАНСГЛИКОЗИЛАЗЫ ЧЕЛОВЕКА С 7-МЕТИЛГУАНИНОМ И ВЫЯВЛЕНИЕ ФАКТОРОВ, ОПРЕДЕЛЯЮЩИХ ВЗАИМОДЕЙСТВИЕ ФЕРМЕНТА С ИНГИБИТОРАМИ*

© 2022 С.В. Пушкарев¹, В.А. Винник², И.В. Шаповалова¹,
В.К. Швядас^{1,3}, Д.К. Нилов^{3**}

¹ Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова,
факультет биоинженерии и биоинформатики, 119991 Москва, Россия

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

³ Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова,
Научно-исследовательский институт физико-химической биологии имени А.Н. Белозерского,
119991 Москва, Россия; электронная почта: nilovdm@gmail.com

Поступила в редакцию 21.02.2022

После доработки 22.03.2022

Принята к публикации 23.03.2022

тРНК-Гуанинтрансгликозилаза, катализирующая замену гуанина на кьюин в тРНК человека и участвующая в механизме трансляции, вовлечена в развитие рака, однако информация о низкомолекулярных ингибиторах, способных подавлять активность данного фермента, весьма ограничена. С помощью молекулярно-динамических симуляций определены аминокислотные остатки, обеспечивающие эффективное связывание ингибиторов в активном центре тРНК-гуанинтрансгликозилазы. На примере молекулы 7-метилгуанина продемонстрировано, что ключевую роль в комплексообразовании играет способность ингибитора переходить в заряженную форму в окружении остатков Asp105 и Asp159, являющихся акцепторами водородных связей. Также имеет значение формирование водородных связей и гидрофобных контактов с остатками Gln202, Gly229, Phe109 и Met259. Предсказано, что введение заместителей будет по-разному влиять на способность ингибировать тРНК-гуанинтрансгликозилазу, а также белок репарации ДНК поли(ADP-рибозо)полимеразу 1, что может способствовать созданию более эффективных и селективных соединений.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: тРНК-гуанинтрансгликозилаза, кьюин, ингибитор, 7-метилгуанин, молекулярная динамика, докинг.

DOI: 10.31857/S0320972522040078, **EDN:** AQVMIM

ВВЕДЕНИЕ

тРНК-Гуанинтрансгликозилаза (ТГТ) катализирует замену гуанина на кьюин (производное 7-деазагуанина, рис. 1) в тРНК^{Asn}, тРНК^{Asp}, тРНК^{His} и тРНК^{Tyr} в позиции 34 (первый нуклеотид антикодона) [1–4]. Данная модификация, предположительно, оказывает влияние на эффективность аминоацилирования тРНК, рас-

познавание кодон–антикодон, скорость и точность трансляции [5–7]. Эукариотический белок ТГТ представляет собой гетеродимер, состоящий из каталитической субъединицы QTRT1 и некаталитической субъединицы QTRT2 [8]. Для QTRT1 была определена кристаллическая структура комплекса с субстратом кьюином [4]. Согласно предложенной кинетической схеме действия эукариотического фермента, первой в активном центре ТГТ связывается молекула кьюина, второй – тРНК, и затем происходит отщепление гуанина с образованием интермедиата, в котором тРНК ковалентно связана с остатком Asp279. Дальнейшее превращение интермедиата приводит к образованию конечного продукта реакции – модифицированной кьюином тРНК [9].

Принятые сокращения: 7-МГ – 7-метилгуанин; МД – молекулярная динамика; ПАРП-1 – поли(ADP-рибозо)полимераза 1; ТГТ – тРНК-гуанинтрансгликозилаза.

* Приложение к статье опубликовано на сайте журнала «Биохимия».

** Адресат для корреспонденции.

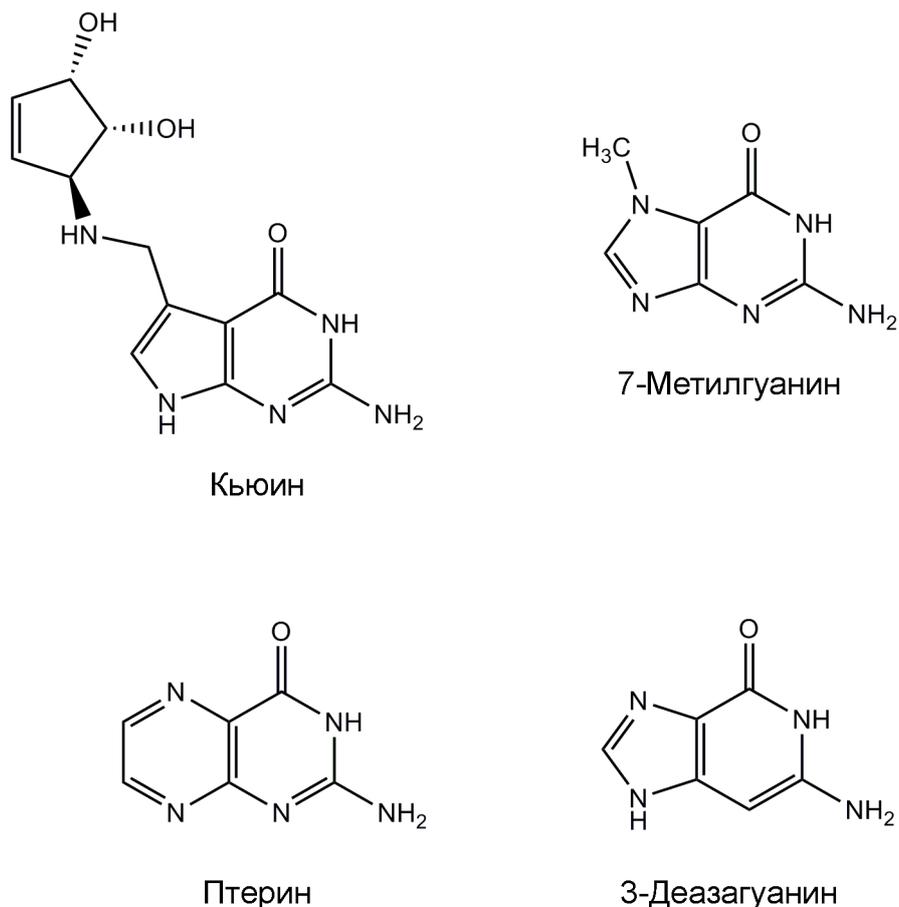


Рис. 1. Химические структуры субстрата и известных ингибиторов ТГТ

В недавних экспериментах была продемонстрирована важная роль ТГТ в развитии рака молочной железы [10, 11]. Оказалось, что при недостатке ТГТ существенно снижается пролиферация и миграция опухолевых клеток *in vitro* (линии MCF7 и MDA-MB-231) и *in vivo* (голые мыши BALB/c с соответствующими перевитыми опухолями). В частности, нокаут/нокдаун гена ТГТ в раковых клетках приводит к уменьшению числа и объема опухолей в ксенографтной модели заболевания. Также следует упомянуть, что повышенная экспрессия ТГТ была обнаружена у пациентов с диагностированным раком легких, причем уровень экспрессии коррелирует с выживаемостью [12, 13]. Вовлеченность ТГТ человека в патологические процессы свидетельствует о необходимости разработки и тестирования селективных ингибиторов данного белка.

Подавление активности ТГТ человека с помощью низкомолекулярных соединений на данный момент мало изучено. Основным источником информации о потенциальных ингибиторах является работа, посвященная исследованию

структурных аналогов субстрата с использованием ТГТ из ретикулоцитов кролика [14]. 7-Метилгуанин (7-МГ, природное азотистое основание) оказался одним из наиболее эффективных ингибиторов, конкурентным в отношении кьюина (рис. 1, $K_i = 1$ мкМ) [14, 15]. В ряде других работ было показано, что 7-МГ также способен подавлять активность бактериальной ТГТ [16, 17]. Выравнивание последовательностей ТГТ различных организмов, демонстрирующее консервативность аминокислотных остатков активного центра, представлено на рис. S1 в Приложении. Интересно, что 7-МГ подавляет активность белка человека поли(ADP-рибозо)полимеразы 1 (ПАРП-1, $K_i = 60$ мкМ) [18–21], играющего важную роль в патологиях сердечно-сосудистой, нервной, дыхательной систем, а также в онкологических заболеваниях [22–25]. Для клинического применения ингибиторов ТГТ может требоваться более селективное воздействие на мишень, поэтому большой интерес представляет структурная оптимизация 7-МГ и его аналогов.

В представленной работе осуществлено моделирование взаимодействия ТГТ человека с ингибитором 7-МГ и даны рекомендации по дальнейшей разработке более эффективных и селективных ингибиторов.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Для молекулярно-механического описания 7-МГ в заряженной форме использовали параметры Amber-совместимого поля *ff99* [26] за исключением частичных зарядов. Подбор зарядов на атомах осуществляли методом RESP (рис. S2) [27, 28]. Для этого предварительно рассчитывали молекулярный электростатический потенциал на HF/6-31G* уровне теории с помощью GAMESS [29]. Параметры незаряженной молекулы 7-МГ были получены аналогичным образом в нашей предыдущей работе [18]. Для описания аминокислотных остатков белка использовали силовое поле *ff14SB* с улучшенными торсионными параметрами [30].

Молекулярную модель ТГТ человека конструировали на основе кристаллической структуры фермент-субстратного комплекса, содержащего молекулу кьюина (PDB ID 6h45, цепь A) [4]. Координаты участков структуры Arg68–His93 и Asn101–Asp105 перенесли из структуры 7nq4 [31]. Координаты ингибитора 7-МГ в активном центре получили путем наложения конденсированных колец 7-МГ и кьюина. Далее структуру фермент-ингибиторного комплекса оптимизировали и исследовали методом молекулярной динамики (МД) с помощью AmberTools 20 и Amber 20 [32–34]. Атомы водорода добавляли с учетом ионизационных свойств аминокислотных остатков, при протонировании боковых цепей гистидинов рассматривали их молекулярное окружение. Структуру помещали в усеченную октаэдрическую ячейку воды TIP3P (минимальное расстояние от белка до грани ячейки составляло 12 Å), для нейтрализации суммарного заряда добавляли ионы Cl⁻.

На первой стадии минимизации энергии полученной системы (2500 шагов по методу наискорейшего спуска + 2500 шагов по методу сопряженных градиентов) координаты белка и 7-МГ фиксировали позиционными ограничениями 2 ккал/(моль·Å²) на тяжелых атомах. Вторую стадию минимизации (5000 шагов наискорейшего спуска + 5000 шагов по методу сопряженных градиентов) проводили без каких-либо ограничений. Затем систему разогревали от 0 до 300 К с использованием позиционных ограничений 1 ккал/(моль·Å²) на атомах белка и 7-МГ (250 пс, постоянный объем) и уравнивали

при 300 К (25 нс, постоянное давление). Достижение равновесной конформации комплекса подтверждали путем анализа среднего квадратичного отклонения атомов остова белка от начального положения (подвижные петли и концевые остатки белка при этом не рассматривались). Далее рассчитывали и анализировали траекторию равновесной симуляции МД длиной 100 нс. Более подробные протоколы симуляций приведены в табл. S1 в Приложении. Расчеты проводили на суперкомпьютере «Ломоносов-2» с использованием графических ускорителей Nvidia Tesla K40M.

Докинг молекулы 7-МГ в активный центр ТГТ осуществляли с помощью программы Lead Finder 1708 в режиме «extra precision» [35, 36], потенциальная решетка охватывала участок связывания молекулы кьюина. Для визуализации полученных структур использовали программу VMD 1.9 [37].

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Модель ТГТ человека была сконструирована на основе кристаллической структуры 6h45, описывающей взаимодействие каталитической субъединицы QTRT1 с субстратом кьюином. В целом данный комплекс с разрешением 2,4 Å хорошо подходил для подготовки стартовой модели, однако некоторые участки белковой цепи было решено заимствовать из структуры 7nq4, полученной теми же авторами. Первый участок, Arg68–His93, менее упорядочен в 6h45 по сравнению с другими структурами ТГТ, что может быть связано с условиями кристаллизации. Через сеть водородных связей остатки Arg68–His93 оказывают влияние на конформацию еще одного участка, Asn101–Asp105, который был также взят из структуры 7nq4.

При моделировании связывания 7-МГ в активном центре ТГТ учитывали ионизационные свойства данного ингибитора. Ранее исследовалось взаимодействие структурно похожих соединений с бактериальной ТГТ с применением методов изотермической калориметрии, сайт-направленного мутагенеза и рентгеноструктурного анализа. Было сделано предположение о том, что наличие в активном центре двух отрицательно заряженных остатков аспартата, Asp105 и Asp159 (нумерация ТГТ человека), способствует переходу ингибиторов в положительно заряженную форму при связывании [38, 39]. Соответствующий переход для 7-МГ (протонирование атома N3) представлен на рис. 2. Положительно заряженный ингибитор способен более эффективно взаимодействовать с Asp105 и

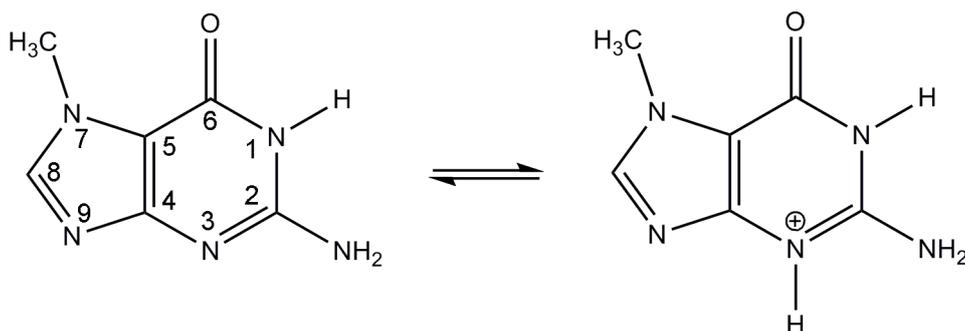


Рис. 2. Предполагаемый переход 7-МГ в заряженную форму при связывании в активном центре ТГТ

Asp159, поэтому 7-МГ было решено моделировать как в заряженной форме, так и нейтральной форме (в качестве контроля).

7-МГ является конкурентным ингибитором ТГТ и структурным аналогом субстрата кьюина, поэтому его связывание должно происходить схожим образом. Стартовое положение 7-МГ в активном центре модели ТГТ соответствовало координатам 7-деазагуанинового фрагмента кьюина. Далее осуществили уравнивание фермент-ингибиторного комплекса и расчет 100 нс траектории симуляции МД, анализ которой позволил охарактеризовать межмолекулярные взаимодействия (таблица, рис. 3). Прежде всего следует упомянуть образование водородных связей 7-МГ с Asp159 и Asp105, поскольку взаимодействие делокализованного положительного заряда ингибитора с отрицательно заряженными карбоксильными группами может вносить существенный вклад в энергию связывания. При этом одна из связей с Asp105 реализуется

через протонированный атом азота N3. Дополнительные водородные связи формируются с остатками Gln202 и Gly229. Пуриновые кольца 7-МГ образуют π -стэкинг с Phe109, а также гидрофобный контакт с боковой цепью Met259. Метильная группа 7-МГ контактирует с бензольным кольцом Phe109.

Моделирование комплексообразования ТГТ с нейтральной формой 7-МГ показало существенное снижение устойчивости взаимодействий с остатками активного центра по сравнению с заряженной формой. Водородные связи с остатками Asp159 и Gly229 носили эпизодический характер, что сказалось на среднем расстоянии между атомами, а связи с Asp105 и Gln202 фактически были утрачены (табл. S2 в Приложении). При этом боковая цепь Asp105 оказалась отвернутой от молекулы ингибитора (рис. S3 и S4 в Приложении), что, очевидно, связано с отсутствием протона на N3-атоме. Примечательно, что у родственного соединения 3-деазагуанина, в котором N3-атом заменен на углерод (рис. 1), ингибиторная активность на два порядка ниже, чем у 7-МГ [14]. Таким образом, можно заключить, что эффективное связывание молекулы 7-МГ в активном центре ТГТ возможно благодаря ее переходу в положительно заряженную форму.

Поскольку 7-МГ ингибирует также белок репарации ДНК ПАРП-1, который не обладает сходством с ТГТ по последовательности, необходимо определить структурные факторы, обуславливающие возможность его связывания с двумя разными мишенями, а также возможные пути модификации ингибитора для более селективного действия. Ранее было экспериментально показано, что важным условием для эффективного связывания пуриновых производных и аналогов с ТГТ и ПАРП-1 является наличие аминогруппы в положении 2 и оксогруппы в положении 6 [14, 18]. В случае ТГТ аминогруппа образует упомянутые выше водородные связи с Asp105 и Asp159 (рис. 3), а в случае ПАРП-1 –

Взаимодействия заряженной формы 7-МГ в активном центре ТГТ человека, обнаруженные в результате 100 нс симуляции МД. Приведены средние значения расстояний вместе со стандартным отклонением

Взаимодействие	Расстояние, Å
7-МГ:N1:H ... Asp159:OD2	$1,8 \pm 0,1$
7-МГ:N2:H ... Asp159:OD1	$1,8 \pm 0,1$
7-МГ:N2:H ... Asp105:OD1	$1,9 \pm 0,1$
7-МГ:N3:H ... Asp105:OD2	$1,9 \pm 0,1$
7-МГ:O6 ... Gln202:NE2:H	$2,7 \pm 0,7$
7-МГ:O6 ... Gly229:N:H	$2,5 \pm 0,5$
C(7-МГ конд. кольца)* ... C(Phe109 бенз. кольцо)**	$3,8 \pm 0,2$
C(7-МГ конд. кольца) ... Met259:SD	$3,7 \pm 0,3$

* Геометрический центр конденсированных колец 7-МГ.

** Геометрический центр бензольного кольца Phe109.

взаимодействует с ключевым остатком Gly863 (рис. 4). Оксогруппа образует водородные связи с остатками Gln202 и Gly229 ТГТ и с остатками Gly863 и Ser904 ПАРП-1. Отдельно следует обратить внимание на высокое сходство взаимодействия типа π -стэкинг: в случае ТГТ оно реализуется боковой цепью Phe109, а в случае ПАРП-1 – боковой цепью Tyr907. Совокупность данных взаимодействий обуславливает возможность связывания ингибиторов как с ТГТ, так и с ПАРП-1.

Подходящими путями для оптимизации структуры 7-МГ и его аналогов является модификация аминогруппы в положении 2 или метильной группы в положении 7. Первый вариант подходит для конструирования ингибиторов ПАРП-1, поскольку введенный заместитель ориентируется в направлении дополнительного участка связывания адениновой группы NAD^+ (рис. 4, а). В случае ТГТ аминогруппа образует водородные связи с Asp105 и Asp159, поэтому любая ее модификация приведет к нарушению данных взаимодействий [40]. Второй вариант (модификация метильной группы), напротив, не подходит для ПАРП-1, поскольку соответствующий связывающий карман, образованный с участием остатка Ala898 (рис. 4, б), весьма ограничен по размеру. В случае ТГТ метильная группа 7-МГ направлена в сторону участка связывания циклопентенового фрагмента кьюина,

образованного остатками Val161–Ser164 и Gly229–Gly232. Данный участок способен взаимодействовать с разнообразными группами атомов, что подтверждается широкой субстратной специфичностью ТГТ человека, продемонстрированной с использованием синтетических производных 7-деазагуанина [41].

Молекулярная модель ТГТ человека позволяет осуществлять поиск ингибиторов с использованием методов докинга и компьютерного скрининга. Наиболее перспективные соединения могут быть отобраны из обширной библиотеки в результате оценки энергии связывания и анализа взаимодействий с наиболее важными аминокислотными остатками [42–44]. В качестве иллюстративного примера нами был осуществлен докинг молекулы 7-МГ в отношении ансамбля структур ТГТ, полученного в результате МД-симуляции. Для этой цели из 100 нс траектории равновесной симуляции ТГТ извлекли структуры с шагом 10 нс и удалили из них молекулы воды и ингибитора. Далее 7-МГ докировали в область, охватывающую участок связывания субстрата кьюина, и таким образом получили ансамбль фермент-ингибиторных комплексов (рис. S5 в Приложении). Анализ полученных моделей показал, что докинг хорошо воспроизводит описанные выше взаимодействия 7-МГ с аминокислотными остатками ТГТ. Среднее по ансамблю значение свободной энергии

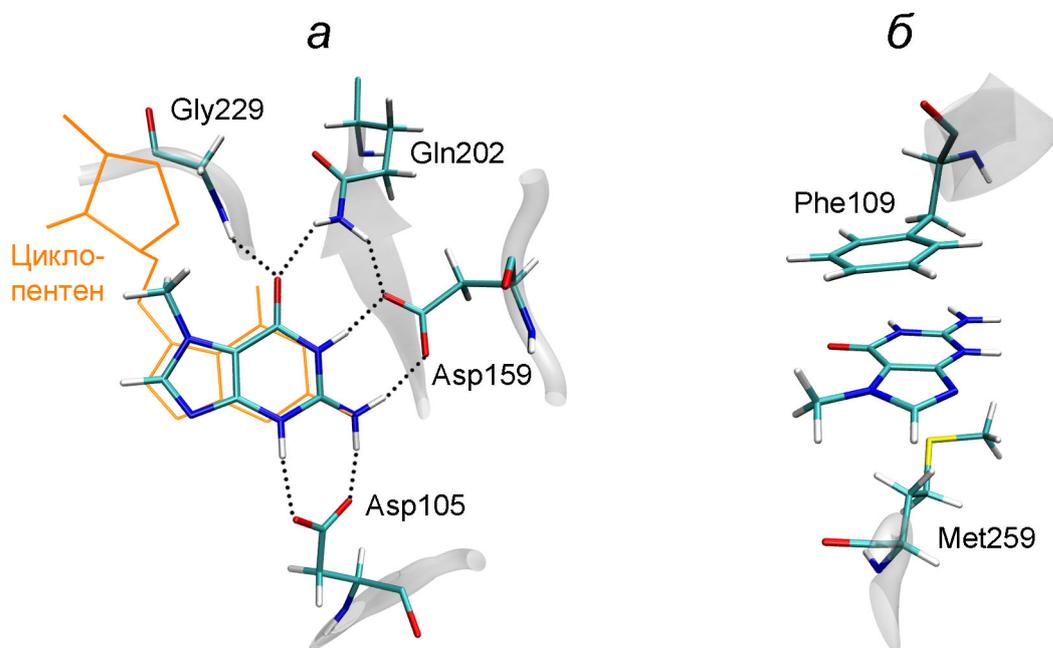


Рис. 3. Позиция 7-МГ в активном центре ТГТ человека, определенная с помощью МД-моделирования. *а* – Взаимодействие с полярными остатками; *б* – взаимодействие с гидрофобными остатками. Оранжевым цветом показана молекула кьюина, перенесенная из структуры bh45 после наложения по α -атомам

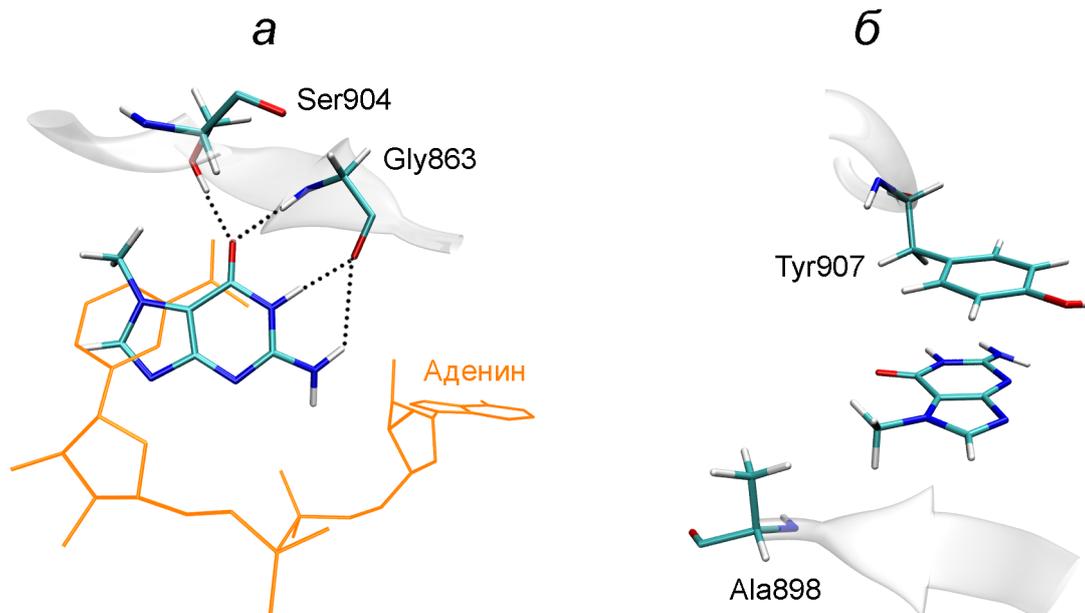


Рис. 4. Позиция 7-МГ в активном центре ПАРП-1 человека, определенная в предыдущей работе [19]. *a* – Взаимодействие с полярными остатками; *б* – взаимодействие с гидрофобными остатками. Оранжевым цветом показана молекула NAD⁺, перенесенная из структуры 6bhv после наложения по C α -атомам

связывания ΔG^{calc} составило $-7,4$ ккал/моль. Согласно формуле $\Delta G = RT \ln(K_i)$, такое значение энергии соответствует константе ингибирования 4 мкМ, что хорошо согласуется с экспериментальными данными ($K_i = 1$ мкМ) [14].

Проведенное исследование позволило сделать ряд выводов, важных для разработки ингибиторов ТГТ человека – перспективной мишени для лечения онкологических заболеваний. (1) Ингибитор может переходить в заряженную форму при связывании в активном центре ТГТ в окружении Asp105 и Asp159, что приводит к образованию более устойчивых водородных связей с этими остатками. Данная особенность важна с точки зрения эффективного транспорта через мембрану, поскольку ингибитор приобретает положительный заряд лишь при связывании с белком-мишенью внутри клетки. (2) При конструировании ингибитора следует также учитывать возможность образования водородных связей и гидрофобных контактов с остатка-

ми Gln202, Gly229, Phe109 и Met259. (3) Более селективное взаимодействие ингибитора с ТГТ может быть достигнуто путем наращивания структуры в сторону участка связывания циклопентеновой группы субстрата, образованного остатками Val161–Ser164 и Gly229–Gly232.

Финансирование. Исследование выполнено при финансовой поддержке Российского научного фонда (грант № 19-74-10072).

Благодарности. Работа выполнена с использованием оборудования Центра коллективного пользования сверхвысокопроизводительными вычислительными ресурсами МГУ имени М.В. Ломоносова.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Соблюдение этических норм. Настоящая статья не содержит описания выполненных авторами исследований с участием людей или использованием животных в качестве объектов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Nishimura, S. (1983) Structure, biosynthesis, and function of queuosine in transfer RNA, *Prog. Nucleic Acid Res. Mol. Biol.*, **28**, 49-73.
2. Morris, R. C., and Elliott, M. S. (2001) Queuosine modification of tRNA: a case for convergent evolution, *Mol. Genet. Metab.*, **74**, 147-159.
3. Eric Thomas, C., Chen, Y. C., and Garcia, G. A. (2011) Differential heterocyclic substrate recognition by, and pteridine inhibition of *E. coli* and human tRNA-guanine transglycosylases, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **410**, 34-39.
4. Johannsson, S., Neumann, P., and Ficner, R. (2018) Crystal structure of the human tRNA guanine transglycosylase catalytic subunit QTRT1, *Biomolecules*, **8**, 81.
5. Fergus, C., Barnes, D., Alqasem, M. A., Kelly, V. P. (2015) The queuine micronutrient: charting a course from microbe to man, *Nutrients*, **7**, 2897-2929.

6. Tuorto, F., Legrand, C., Cirzi, C., Federico, G., Liebers, R., et al. (2018) Queuosine-modified tRNAs confer nutritional control of protein translation, *EMBO J.*, **37**, e99777.
7. Müller, M., Legrand, C., Tuorto, F., Kelly, V. P., Atlasi, Y., et al. (2019) Queuine links translational control in eukaryotes to a micronutrient from bacteria, *Nucleic Acids Res.*, **47**, 3711-3727.
8. Chen, Y. C., Kelly, V. P., Stachura, S. V., and Garcia, G. A. (2010) Characterization of the human tRNA-guanine transglycosylase: Confirmation of the heterodimeric subunit structure, *RNA*, **16**, 958-968.
9. Alqasem, M. A., Fergus, C., Southern, J. M., Connon, S. J., and Kelly, V. P. (2020) The eukaryotic tRNA-guanine transglycosylase enzyme inserts queuine into tRNA via a sequential bi-bi mechanism, *Chem. Commun. (Camb.)*, **56**, 3915-3918.
10. Zhang, J., Lu, R., Zhang, Y., Matuszek, Z., Zhang, W., Xia, Y., et al. (2020) tRNA queuosine modification enzyme modulates the growth and microbiome recruitment to breast tumors, *Cancers (Basel)*, **12**, 628.
11. Kumari, K., Groza, P., and Aguilo, F. (2021) Regulatory roles of RNA modifications in breast cancer, *NAR Cancer*, **3**, zcab036.
12. Ma, Q., and He, J. (2020) Enhanced expression of queuine tRNA-ribosyltransferase 1 (QTRT1) predicts poor prognosis in lung adenocarcinoma, *Ann. Transl. Med.*, **8**, 1658.
13. Bian, M., Huang, S., Yu, D., and Zhou, Z. (2021) tRNA metabolism and lung cancer: beyond translation, *Front. Mol. Biosci.*, **8**, 659388.
14. Farkas, W. R., Jacobson, K. B., and Katze, J. R. (1984) Substrate and inhibitor specificity of tRNA-guanine ribosyltransferase, *Biochim. Biophys. Acta*, **781**, 64-75.
15. Muralidhar, G., Utz, E. D., Elliott, M. S., Katze, J. R., and Trewyn, R. W. (1988) Identifying inhibitors of queuine modification of tRNA in cultured cells, *Anal. Biochem.*, **171**, 346-351.
16. Hoops, G. C., Townsend, L. B., and Garcia, G. A. (1995) tRNA-guanine transglycosylase from *Escherichia coli*: structure-activity studies investigating the role of the aminomethyl substituent of the heterocyclic substrate PreQ1, *Biochemistry*, **34**, 15381-15387.
17. Goodenough-Lashua, D. M., and Garcia, G. A. (2003) tRNA-guanine transglycosylase from *E. coli*: A ping-pong kinetic mechanism is consistent with nucleophilic catalysis, *Bioorg. Chem.*, **31**, 331-344.
18. Нилов Д. К., Тараров В. И., Куликов А. В., Захаренко А. Л., Гущина И. В., и др. (2016) Ингибирование поли(ADP-рибозо)полимеразы метаболитом нуклеиновых кислот 7-метилгуанином, *Acta Naturae*, **8**, 120-128.
19. Nilov, D., Maluchenko, N., Kurgina, T., Pushkarev, S., Lys, A., et al. (2020) Molecular mechanisms of PARP-1 inhibitor 7-methylguanine, *Int. J. Mol. Sci.*, **21**, 2159.
20. Нилов Д. К., Пушкарев С. В., Гущина И. В., Манасарян Г. А., Кирсанов К. И., и др. (2020) Моделирование фермент-субстратных комплексов поли(ADP-рибозо)полимеразы 1 человека, *Биохимия*, **85**, 116-125.
21. Manasaryan, G., Suplatov, D., Pushkarev, S., Drobot, V., Kuimov, A., et al. (2021) Bioinformatic analysis of the nicotinamide binding site in poly(ADP-ribose) polymerase family proteins, *Cancers (Basel)*, **13**, 1201.
22. Alemasova, E. E., and Lavrik, O. I. (2019) Poly(ADP-ribosylation) by PARP1: reaction mechanism and regulatory proteins, *Nucleic Acids Res.*, **47**, 3811-3827.
23. Lord, C. J., Tutt, A. N., and Ashworth, A. (2015) Synthetic lethality and cancer therapy: lessons learned from the development of PARP inhibitors, *Annu. Rev. Med.*, **66**, 455-470.
24. Henning, R. J., Bourgeois, M., and Harbison, R. D. (2018) Poly(ADP-ribose) polymerase (PARP) and PARP inhibitors: Mechanisms of action and role in cardiovascular disorders, *Cardiovasc. Toxicol.*, **18**, 493-506.
25. Berger, N. A., Besson, V. C., Boulares, A. H., Bürkle, A., Chiarugi, A., et al. (2018) Opportunities for the repurposing of PARP inhibitors for the therapy of non-oncological diseases, *Br. J. Pharmacol.*, **175**, 192-222.
26. Wang, J., Cieplak, P., and Kollman, P. A. (2000) How well does a restrained electrostatic potential (RESP) model perform in calculating conformational energies of organic and biological molecules? *J. Comput. Chem.*, **21**, 1049-1074.
27. Bayly, C. I., Cieplak, P., Cornell, W. D., and Kollman, P. A. (1993) A well-behaved electrostatic potential based method using charge restraints for deriving atomic charges: The RESP model, *J. Phys. Chem.*, **97**, 10269-10280.
28. Dupradeau, F. Y., Pigache, A., Zaffran, T., Savineau, C., Lelong, R., et al. (2010) The R.E.D. tools: Advances in RESP and ESP charge derivation and force field library building, *Phys. Chem. Chem. Phys.*, **12**, 7821-7839.
29. Barca, G. M. J., Bertoni, C., Carrington, L., Datta, D., De Silva, N., et al. (2020) Recent developments in the general atomic and molecular electronic structure system, *J. Chem. Phys.*, **152**, 154102.
30. Maier, J. A., Martinez, C., Kasavajhala, K., Wickstrom, L., Hauser, K. E., et al. (2015) ff14SB: improving the accuracy of protein side chain and backbone parameters from ff99SB, *J. Chem. Theory Comput.*, **11**, 3696-3713.
31. Sievers, K., Welp, L., Urlaub, H., and Ficner, R. (2021) Structural and functional insights into human tRNA guanine transglycosylase, *RNA Biol.*, **18**, 382-396.
32. Case, D. A., Belfon, K., Ben-Shalom, I. Y., Brozell, S. R., Cerutti, D. S., et al. (2020) AMBER 2020. University of California, San Francisco.
33. Salomon-Ferrer, R., Götz, A. W., Poole, D., Le Grand, S., and Walker, R. C. (2013) Routine microsecond molecular dynamics simulations with AMBER on GPUs. 2. Explicit solvent Particle Mesh Ewald, *J. Chem. Theory Comput.*, **9**, 3878-3888.
34. Roe, D. R., and Cheatham, T. E. 3rd. (2013) PTRAJ and CPPTRAJ: Software for processing and analysis of molecular dynamics trajectory data, *J. Chem. Theory Comput.*, **9**, 3084-3095.
35. Stroganov, O. V., Novikov, F. N., Stroylov, V. S., Kulkov, V., and Chilov, G. G. (2008) Lead finder: an approach to improve accuracy of protein-ligand docking, binding energy estimation, and virtual screening, *J. Chem. Inf. Model.*, **48**, 2371-2385.
36. Novikov, F. N., Stroylov, V. S., Zeifman, A. A., Stroganov, O. V., Kulkov, V., et al. (2012) Lead Finder docking and virtual screening evaluation with Astex and DUD test sets, *J. Comput. Aided Mol. Des.*, **26**, 725-735.
37. Humphrey, W., Dalke, A., and Schulten, K. (1996) VMD: visual molecular dynamics, *J. Mol. Graph.*, **14**, 33-38.
38. Neeb, M., Czodrowski, P., Heine, A., Barandun, L. J., Hohn, C., et al. (2014) Chasing protons: how isothermal titration calorimetry, mutagenesis, and pKa calculations trace the locus of charge in ligand binding to a tRNA-binding enzyme, *J. Med. Chem.*, **57**, 5554-5565.
39. Hohn, C., Härtsch, A., Ehrmann, F. R., Pfaffeneder, T., Trapp, N., et al. (2016) An immucillin-based transition-state-analogous inhibitor of tRNA-guanine transglycosylase (TGT), *Chemistry*, **22**, 6750-6754.
40. Barandun, L. J., Immekus, F., Kohler, P. C., Tonazzi, S., Wagner, B., et al. (2012) From *lin*-benzoguanines to *lin*-benzohypoxanthines as ligands for *Zymomonas mobilis* tRNA-guanine transglycosylase: Replacement of protein-ligand hydrogen bonding by importing water clusters, *Chemistry*, **18**, 9246-9257.
41. Fergus, C., Al-Qasem, M., Cotter, M., McDonnell, C. M., Sorrentino, E., et al. (2021) The human tRNA-guanine transglycosylase displays promiscuous nucleobase preference but strict tRNA specificity, *Nucleic Acids Res.*, **49**, 4877-4890.

42. Li, Q., and Shah, S. (2017) Structure-based virtual screening, *Methods Mol. Biol.*, **1558**, 111-124.
43. Batool, M., Ahmad, B., and Choi, S. (2019) A structure-based drug discovery paradigm, *Int. J. Mol. Sci.*, **20**, 2783.
44. Gushchina, I. V., Polenova, A. M., Suplatov, D. A., Švedas, V. K., and Nilov, D. K. (2020) vsFilt: a tool to improve virtual screening by structural filtration of docking poses, *J. Chem. Inf. Model.*, **60**, 3692-3696.

**MODELING THE STRUCTURE OF HUMAN tRNA-GUANINE
TRANSGLYCOSYLASE IN COMPLEX WITH 7-METHYLGUANINE
AND REVEALING THE FACTORS THAT DETERMINE
THE ENZYME INTERACTION WITH INHIBITORS***

S. V. Pushkarev¹, V. A. Vinnik², I. V. Shapovalova¹, V. K. Švedas^{1,3}, and D. K. Nilov^{3}**

¹ *Lomonosov Moscow State University, Faculty of Bioengineering and Bioinformatics, 119991 Moscow, Russia*

² *Lomonosov Moscow State University, Faculty of Medicine, 119991 Moscow, Russia*

³ *Lomonosov Moscow State University, Belozersky Institute of Physico-Chemical Biology, 119991 Moscow, Russia; e-mail: nilovdm@gmail.com*

tRNA-guanine transglycosylase, which catalyzes the replacement of guanine with quinine in human tRNA and participates in the translation mechanism, is involved in the development of cancer. However, information on small-molecule inhibitors that can suppress the activity of this enzyme is very limited. Molecular dynamics simulations were used to determine the amino acid residues that provide efficient binding of inhibitors in the active site of tRNA-guanine transglycosylase. Using a probe 7-methylguanine molecule, it was demonstrated that the ability of the inhibitor to transit into a charged form in the environment of hydrogen bond acceptors Asp105 and Asp159 plays a key role in complex formation. The formation of hydrogen bonds and hydrophobic contacts with Gln202, Gly229, Phe109, and Met259 residues is also important. It has been predicted that the introduction of substituents will have a different effect on the ability to inhibit tRNA-guanine transglycosylase, as well as the DNA repair protein poly(ADP-ribose)polymerase I, which can contribute to the development of more efficient and selective compounds.

Keywords: tRNA-guanine transglycosylase, queuine, inhibitor, 7-methylguanine, molecular dynamics, docking

УДК 616-091.8;576.385.5

ГИБРИДНЫЕ/АТИПИЧНЫЕ ФОРМЫ ЦИРКУЛИРУЮЩИХ ОПУХОЛЕВЫХ КЛЕТОК: СОВРЕМЕННОЕ СОСТОЯНИЕ ПРОБЛЕМЫ

Обзор

© 2022 Е.В. Кайгородова^{1,2*}, А.В. Козик², И.С. Заваруев², М.Ю. Грищенко³

¹ Научно-исследовательский институт онкологии, Томский национальный исследовательский медицинский центр Российской академии наук, 634050 Томск, Россия; электронная почта: zlobinae@mail.ru

² Федеральное государственное бюджетное учреждение высшего образования «Сибирский государственный медицинский университет»
Министерства здравоохранения Российской Федерации, 634050 Томск, Россия

³ Областное государственное автономное учреждение здравоохранения «Томский областной онкологический диспансер», 634050 Томск, Россия

Поступила в редакцию 24.02.2022

После доработки 27.03.2022

Принята к публикации 28.03.2022

Одним из наиболее распространённых заболеваний во всём мире является рак, лечение которого сопряжено со многими проблемами, такими как лекарственная и радиорезистентность, а также образование метастазов. Эти трудности связаны с гетерогенностью опухоли, которая имеет много причин. Одной из них может быть слияние клеток – механизм, который имеет отношение как к физиологическим (например, заживление ран), так и к патофизиологическим (рак и вирусная инфекция) процессам. Настоящий обзор литературы направлен на обобщение имеющихся данных о гибридных/атипичных формах циркулирующих опухолевых клеток (СНС) и их роли в опухолевой прогрессии. Для этого был проведён биоинформационный поиск в универсальных базах данных PubMed, NCBI и Google Scholar с применением ключевых слов для поиска «hybrid cancer cells», «cancer cell fusion» и др. В данном обзоре представлена последняя информация о гибридных/атипичных опухолевых клетках (СAML), теории образования гибридных опухолевых клеток, их разновидности и характеристики с приведением данных собственных исследований. Многие аспекты изучения гибридных клеток сейчас всё ещё находятся на зачаточной стадии. Однако при уже накопленном уровне знаний такие циркулирующие гибриды как СAML и СНС показывают себя как многообещающий биомаркёр опухолевых заболеваний и даже больше – как новый подход к лечению рака.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: гибридные/атипичные клетки, клеточное слияние, рак, опухолевая прогрессия, циркулирующие опухолевые клетки.

DOI: 10.31857/S032097252204008X, **EDN:** ARFNQU

ВВЕДЕНИЕ

Раковые заболевания являются лидирующей причиной смерти в большинстве стран. За 2020 г. было зарегистрировано 19,3 млн случаев рака, из которых около 10 млн окончились смертельным исходом [1]. В России выявлен 591 371 случай злокачественных новообразований с 312 122 смертельными случаями [2], что

ставит это заболевание на второе место по частоте возникновения и смертности в стране среди всего населения [1]. Высокая смертность от данной патологии обусловлена множеством особенностей течения рака, включая метастатический процесс [3] и химиорезистентность [4], и является крайне актуальной проблемой мировой онкологии. Уже известно, что в данных процессах может участвовать принципиально иная группа клеток – гибриды между раковыми и нормальными клетками пациента. В настоящем обзоре представлена последняя информация по данной форме злокачественных клеток, вызвавших пристальное внимание среди учёных в последнее время. Показаны теории образования гибридных опухолевых клеток, их разновидности и характеристики с приведением данных собственных исследований.

Принятые сокращения: MSC – мезенхимальные стволовые клетки; РМЖ – рак молочной железы; ЕМТ – эпителиально-мезенхимальный переход; CSC – раковые стволовые клетки; СAML – атипичные гибридные опухолевые клетки, похожие на макрофаги; СНС – циркулирующие гибридные клетки; СТС – циркулирующие опухолевые клетки.

* Адресат для корреспонденции.

ИСТОРИЯ ОТКРЫТИЯ ГИБРИДНЫХ ФОРМ КЛЕТОК

Слияние клеток является процессом, обратным клеточному делению – объединение мембран и внутриклеточного содержимого двух клеток. В норме с помощью данного механизма в организме человека образуются остеокласты, миоциты скелетной мускулатуры и синцитиотрофобласт. Слияние играет роль в регенерации внутренних органов. Таким образом, образование гибридов участвует в ряде важных процессов в организме человека [5].

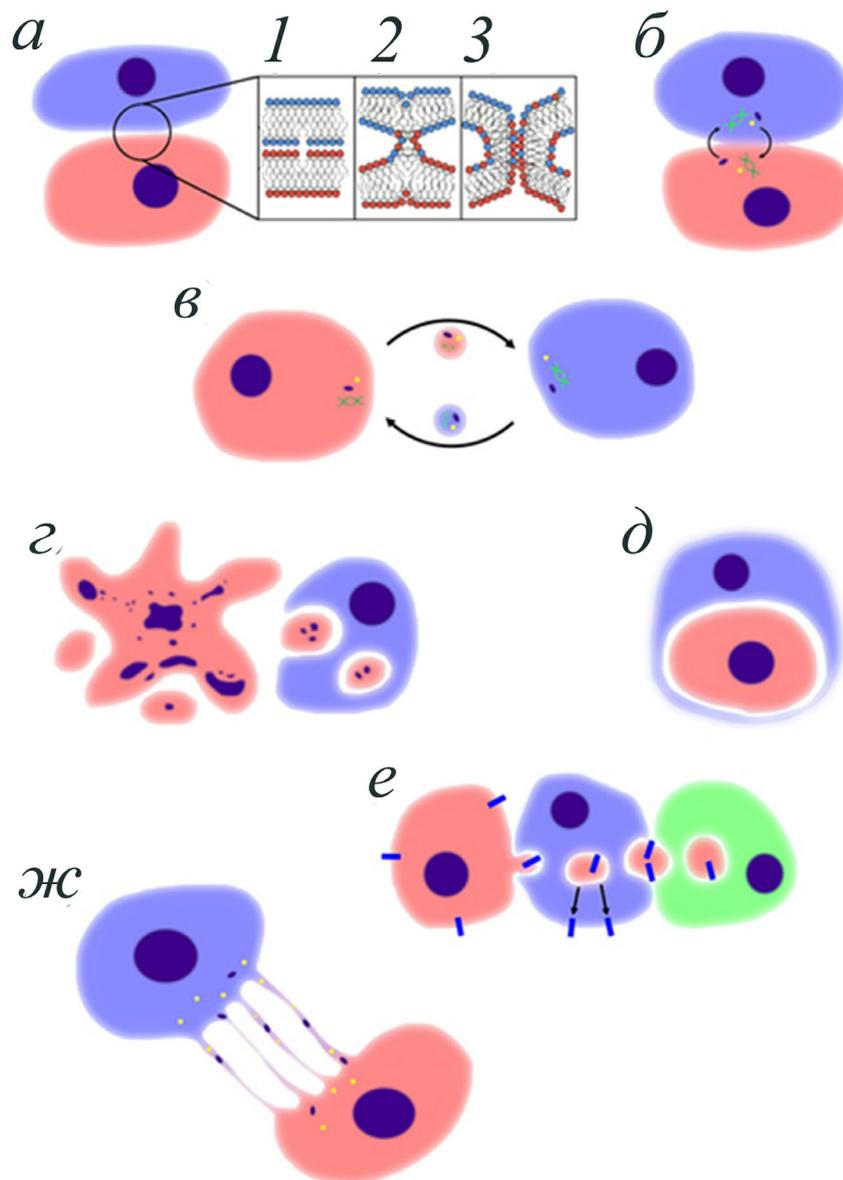
В 1911 г. Otto Aichel предположил, что раковые клетки способны к слиянию с лейкоцитами, образуя злокачественные гибридные клетки [5]. Его гипотеза была подтверждена в 1974 г. Goldenberg et al. [6], обнаруживших в клетках астроцитарной глиомы человека, выращенной в золотистом хомяке, хромосомы как донора, так и реципиента. Гибридные клетки обладают как свойствами раковых клеток (способность к неконтрольному росту и размножению), так и лейкоцитов (хемотаксис) [5]. Совокупность этих характеристик делает гибриды крайне склонными к образованию метастазов, что было подтверждено рядом исследователей [7]. Стоит отметить противоположные результаты, полученные в 1969 и 1989 гг. Harris et al. [8, 9]. Исследования показали, что слияние нормальных фибробластов мыши с различными линиями злокачественных клеток мыши привело к образованию стабильных гибридов, которые имели хромосомные маркеры обоих родительских клеточных линий и не образовывали опухоли у гистосовместимых животных. И хотя современные данные говорят скорее об озлокачествлении опухолевых клеток после слияния [10–12], исследование Harris позволило предположить наличие ген-супрессоров опухолевого роста.

ТЕОРИИ ОБРАЗОВАНИЯ ГИБРИДНЫХ КЛЕТОК

Существует множество теорий образования гибридных клеток. Наиболее хорошо изучен синцитин-зависимый механизм слияния (рисунок, а). Вкратце, данный процесс можно разделить на 3 стадии. Первая подразумевает сближение клеток до состояния, при котором между цитоплазматическими мембранами не остаётся молекул воды. Кроме того, наблюдается перераспределение отрицательно заряженных фосфолипидов, включая фосфатидилсерин, с внутренней на внешнюю мембрану в месте контакта. В таких условиях наружные липидные слои обе-

их клеток начинают смешиваться между собой, сигнализируя о втором этапе процесса – полуслиянии (hemifusion). Наконец, формируется стебель слияния (fusion stalk), стенки которого образованы объединённым билипидным слоем обеих клеток. Внутри же он наполнен цитоплазмой двух клеток. Стебель расширяется, завершая процесс слияния. Задачу сближения и инициации слияния выполняют белки фузогены (fusogenes), такие как синцитин-1 и -2 [13]. Их роль в гибридизации клеток была уже неоднократно подтверждена, например, в 2018 г. в эксперименте Mezler et al. [14] проводилось слияние мезенхимальных стволовых клеток (Mesenchymal Stem Cells, MSC) и клеток рака яичников SK-OV-3. Данные гибриды экспрессировали синцитин-2 и MFSD-2A, в норме характерные для клеток синцитиотрофобласта плаценты. Гены, отвечающие за синтез синцитинов в клетках, были внесены в геном эукариот ретровирусами миллионы лет назад. Поэтому инфекции, вызываемые разнообразными вирусами, включая SARS-CoV-2 [15], также приводят к гибридизации [16]. Кроме того, клеточное слияние вызывают и некоторые виды бактерий [17].

Другие теории образования гибридных клеток включают в себя теорию прямого взаимодействия (direct interaction) (рисунок, б), подразумевающую обмен РНК, факторами роста и цитокинами между раковыми клетками и MSC. Непрямое взаимодействие (indirect interaction) (рисунок, в) объясняет генез гибридов тем же механизмом, но передача молекул осуществляется на расстоянии при помощи везикул, выпускаемых клетками во внеклеточную среду. Теория же фагоцитоза (рисунок, г) описывает приобретение лейкоцитами элементов раковых клеток через их фагоцитоз [18]. Разновидностью этой теории можно назвать энтоз – полное поглощение одной клетки другой (рисунок, д). В эксперименте *in vitro* на MSC и эмбриональных стволовых клетках последние способны поглотить мезенхимальные стволовые клетки с сохранением их жизнеспособности [19]. Другой разновидностью фагоцитоза является трофоцитоз – «надкусывание» живой раковой клетки с дальнейшей презентацией антигенов клетки-донора на поверхности клетки-реципиента (рисунок, е). Клетка-донор при этом зачастую теряет свои функции, передавая их реципиенту, или погибает. Клеточная гибель в ходе трофоцитоза несёт название трофоцитоза [20]. Трофоцитоз был описан между MSC и клетками рака яичников, приводя к хеморезистентности клеток [21]. Вполне возможно, что материал раковых клеток передаётся MSC не через их прямое взаимодействие, а



Теории клеточного слияния. *а* – Синцитин-зависимый механизм: максимальное сближение мембран клеток (1); полуслияние, при котором происходит смешение липидов внешнего слоя билипидов плазматической мембраны (2); образование стебля слияния (3). *б* – Прямое взаимодействие клеток с непосредственным обменом молекул. *в* – Непрямое взаимодействие с обменом веществами на расстоянии. *г* – Приобретение материала раковых клеток посредством фагоцитоза. *д* – Энтоз (поглощение живой клетки с сохранением её жизнеспособности). *е* – Трогоцитоз (слева) – «надкусывание» живой клетки с приобретением антигенов клетки-донора. Передача полученных таким образом элементов цитоплазмы третьим клеткам носит название драгоцитоз (справа). *ж* – Обмен материалом с помощью «туннельных нанотрубочек»

доставкой с макрофагами, предварительно захватившими компоненты злокачественных клеток посредством трогоцитоза. Такой способ межклеточного взаимодействия имеет название драгоцитоз (рисунок, *е*), и на данный момент доказано выживание некоторых бактерий через данный механизм [22]. В обзоре Manjunath et al. [10] авторы предполагают, что процесс передачи ионов, молекул, везикул и органелл между клет-

ками может происходить через формирование так называемых «туннельных нанотрубочек» (рисунок, *ж*). Это тонкие образования 20–500 нм в диаметре, содержащие F-актин и микротрубочки, и формируемые клетками в стрессовых условиях – нехватка питательных веществ, вирусная инвазия, окислительный стресс и др. Формирование данных структур и подключение к окружающим клеткам способ-

ствует их выживанию в неблагоприятных условиях. Возможно, таким образом, раковые клетки подключаются к оказавшимся рядом макрофагам, что может окончиться необратимым слиянием двух клеток. Наконец, Notch-сигналинг и щелевые соединения также могут быть вовлечены в процесс клеточного слияния [21].

После слияния клетки претерпевают процесс пост-гибридизационной селекции (Post-Hybrid Selection Process, PHSP), включающий в себя спонтанные переходы из гетеро- в синкарион (Hetero- to Synkarion Transition, HST) – переход от многоядерности к клетке с единым ядром; хромосомные перестройки и нарушения митоза. PHSP – весьма неустойчивый процесс и чувствителен к сигналам извне. Неудавшееся слияние ядра или геномная перестройка приводит к прекращению процесса и терминации клетки путём апоптоза или некроза. По этой причине жизнеспособные гибриды образуются редко, но в случае успешного завершения селекции они получают способность к неконтролируемому росту, вкупе с механизмами ускользания от клеточного иммунитета и повышенной устойчивости к противоопухолевым препаратам. Такие клетки способны стремительно размножаться и быстро образовывать метастазы [23].

ХАРАКТЕРИСТИКА ГИБРИДНЫХ ОПУХОЛЕВЫХ КЛЕТОК

За всё время исследования гибридных клеток был выделен ряд гибридов, отличающихся друг от друга клетками, с которыми они вступили в слияние. В таблице систематизированы данные о различных популяциях гибридных клеток.

Гибриды «Опухолевая клетка + здоровая клетка». Данная группа отличается наибольшим разнообразием среди всех гибридных клеток [30–34, 43–45]. Описана возможность слияния опухолевой клетки с эпителиальной клеткой [30–33, 45], фибробластами [34, 43] и остеокластами [44]. Объединяют их лишь повышенная резистентность к противоопухолевым препаратам и темпы деления по сравнению со своими раковыми клетками-предшественниками. Все остальные свойства, такие как поверхностные маркёры и характерные генетические мутации каждого гибрида, зависят от родительских клеток. Часто описывается наследование от родительских опухолевых клеток свойств стволовых клеток, таких как появление транскрипционных факторов, характерных для стволовых клеток – Oct4, Sox2, Nanog, Klf4, Bmi1 и CD133, и повышение метастатического потенциала с

образованием маммосфер при раке молочной железы (PMЖ). В большинстве случаев клетки сохраняют морфологию родительской раковой клетки. В нескольких работах по скрещиванию клеток эпителия молочной железы с разными клеточными линиями PMЖ [31, 32] каждый гибрид показывал отличные друг от друга способности к росту и размножению. Следовательно, вполне возможно, что гибридные клетки вносят значительный вклад в опухолевую гетерогенность.

Клиническая важность выявления гибридных клеток обусловлена отличиями в биохимических процессах и действии сигнальных путей от обычных раковых клеток. Например, клетки, полученные в результате слияния клеток, принадлежащих к двум разным линиям PMЖ, обладали изменённой активностью пути RAF-АКТ. Это привело к парадоксальной реакции гибридов на ингибитор PI3K – добавление препарата вело к значительному повышению подвижности злокачественных клеток, когда простые клеточные линии опухолевых клеток PMЖ реагировали блокировкой миграции. По этой причине имеет смысл проводить поиск таких гибридов у пациентов для проведения эффективной терапии [45].

Гибриды «Опухолевая клетка + стволовая клетка». Группа гибридов стволовых клеток с раковыми клетками также весьма разнообразна [11, 41, 42, 46–49], аналогично предыдущей группе. Существует мнение, что именно процесс слияния опухолевых клеток с MSC и макрофагами лежит в основе метастазирования клеток, поскольку опухолевые клетки приобретают их свойства, способны отрываться и циркулировать в крови. Так, в исследованиях Li et al. [46] было показано, что при слиянии опухолевых клеток со стромальными клетками сальника, по своим характеристикам схожими с MSC, гибридные формы увеличивали свою подвижность по сравнению с родительскими клетками. Авторы предполагают, что это связано с подавлением экспрессии E-кадгерина и стимуляцией – виментина. Это также подтверждается в ряде исследований [41, 42], где после слияния раковой клетки и MSC гибриды претерпевают эпителиально-мезенхимальный переход (Epithelial-Mesenchymal Transition, EMT) с повышением их миграционных и пролиферативных способностей. При этом новообразованный гибрид способен как сохранить морфологию раковой эпителиальной клетки [42, 50], так и перейти к более мезенхимальному виду, близкому к фибробластному [51], однако во всех случаях гибриды имеют мезенхимальный генный и молекулярный профили. Учитывая стремление гибридов к

Характеристика типов гибридных клеток

Тип гибридной клетки	Основные характеристики	Роль в опухолевой прогрессии («+» – усиливают; «-» – ингибируют; «?» – неизвестно)	Источник
Остеокласты	крупные многоядерные клетки неправильной формы, обеспечивающие ремоделинг кости; располагаются преимущественно в зонах лизиса/синтеза костей; остеокласты становятся таковыми путём слияния с малыми одноядерными пре-остеокластами – последовательно по одной клетке за раз, тем самым клетки увеличивают остеолитическую активность; (аналогичный эффект возможен при слиянии с клетками миеломы)	«+»	[24–26]
Синцитиотрофобласт	клетки цитотрофобласта сливаются в структуры с множеством удлинённых ядер, хорошо развитым эндоцитозным аппаратом и множеством микроворсин на свободной поверхности; многоядерные синцитиальные структуры обеспечивают обменную функцию плаценты и продукцию плацентарных гормонов; поддержание многоядерного синцитиотрофобласта происходит за счёт постоянного поступления одноядерных цитотрофобластов	«?»	[27, 28]
Мышечные волокна скелетной мускулатуры	многоядерная структура цилиндрической формы, в среднем достигающая в длину 10 см, образуется в результате слияния множества миобластов; основная действующая единица скелетной мышцы	«?»	[29]
Гибрид «Опухолевая клетка + эпителиоцит»	морфология в большинстве случаев заимствуется у раковой клетки-предшественницы; поверхностные маркёры зависят от родительских клеток; гибриды демонстрируют повышенную колониеобразующую способность и устойчивость к терапии (по сравнению с родительскими клетками); зачастую приобретает свойства стволовых клеток	«+»	[30–33]
Гибрид «Опухолевая клетка + фибробласт»	клетки имеют различную морфологию, многоядерны, но имеют сниженную выживаемость и пролиферативную активность: в 97% случаев клетки останавливают деление и погибают из-за "митотической катастрофы"; однако единичные выжившие клетки приобретают одинаковое строение, похожее на родительские раковые клетки, начинают быстрее расти, не поддаются классическому лечению	«+»/«-»	[8, 34]
Гибрид «Опухолевая клетка + макрофаг»	к данной группе принадлежат атипичные гибридные опухолевые клетки, похожие на макрофаги (Cancer-Associated Macrophage-Like Cells, CAML) и циркулирующие гибридные клетки (Circulating Hybrid Cells, CHC); средние размеры 43,5 мкм, имеют овальную, аморфную или головастикоподобную форму; обнаруживаются в большинстве биологических жидкостей пациентов по маркёрам CD45 и ЕrСAM; большая часть гибридов приобретает повышенный метастатический потенциал и куда более подвижны под действием хемоаттрактантов, чем родительские клетки	«+»	[35–37]
Гибрид «Опухолевая клетка + лимфоцит»	представлены гибридами - искусственно получаемыми гибридами между раковой и плазматической клеткой, способной быстро синтезировать моноклональные антитела; присутствие подобных гибридов у онкологических больных не было подтверждено	«?»	[38]

Окончание таблицы

Тип гибридной клетки	Основные характеристики	Роль в опухолевой прогрессии («+» – усиливают; «-» – ингибируют; «?» – неизвестно)	Источник
Гибрид «Опухолевая клетка + дендритная клетка»	искусственно выведенные многоядерные клетки неправильной формы с короткими отростками; гибриды способны представлять опухолевые антигены Т-клеткам; гибриды лучше стимулируют активность цитотоксических лимфоцитов в сравнении с опухолевыми или дендритными клетками; рассматриваются в качестве «вакцин от рака»	«-»	[39, 40]
Гибрид «Опухолевая клетка + стволовая клетка»	могут как сохранить морфологию раковой клетки, так и принять фибробластоподобный вид; сохраняют мезенхимальный генный и молекулярный профили; поверхностные маркеры различны и зависят от клеток-предшественниц; гибридные формы увеличивают свою подвижность, пролиферативную активность и резистентность к терапии; предполагается генез CSC в ходе данного слияния	«+»	[5, 41, 42]

анеу- и полиплоидии, а также обнаружение этого феномена в метастатических клетках, при том что появление тетраплоидов не характерно в ходе прогрессии негибридных раковых клеток, далее поддерживает вышеописанную теорию [42].

Не исключена возможность генеза раковых стволовых клеток (Cancer Stem Cells, CSC) в результате слияния раковой и нормальной стволовой клетки. CSC – субпопуляция опухолевых клеток, обладающих низким пролиферативным потенциалом, но исключительно высокой жизнеспособностью. Этому содействуют нечувствительность к апоптотическим сигналам и устойчивость к противоопухолевым препаратам. Им отводится роль «спящих клеток», способных приступить к делению даже после полного уничтожения первичной опухоли, приводящих к рецидивам рака. В многочисленных опытах по скрещиванию MSC и раковых клеток были получены гибриды, обладающие свойствами CSC. Гибридная теория вполне может решить проблему образования данной малоизвестной субпопуляции, но она требует дальнейших исследований и подтверждений [5].

Гибриды «Опухолевая клетка + макрофаг». Несмотря на повышенный метастатический потенциал вышеперечисленных гибридов, не существует данных, подтверждающих их циркуляцию в крови и других биологических жидкостях. Это делает их труднодоступными для получения, тем самым серьезно снижая их диагностическую ценность. Вместо них обнаруживается другой, более однородный тип гибридных клеток – гибриды опухолевых клеток с макрофага-

ми. На данный момент можно сказать, что это наиболее активно исследуемый тип гибридных клеток. Уже описано несколько подтипов таких гибридов, однако стоит отметить их сходство между собой. Не исключено, что исследователи дали несколько названий одному и тому же типу клеток. Так, Adams et al. [52] в 2014 г. описали CAML в крови пациентов с раком молочной и поджелудочной железы. Ряд других исследователей [10] дали подобным клеткам название «Macrophage-Tumor cell Fusion cells» (MTF). Морфологически это высокодифференцированные клетки миелоидного ряда, способные к фагоцитозу, с большим атипичным ядром или множеством более мелких ядер [52]. Размеры CAML варьируют от 21 до 300 мкм (со средним значением 43,5 мкм), в то время как циркулирующие раковые клетки и лейкоциты имеют размер 18,8 и 12,4 мкм соответственно [35]. CAML способны принимать овальную, аморфную или головастикоподобную форму [36]. Данные клетки присутствуют у широкого спектра онкобольных в крови (8,2 клеток/7,5 мл) и в разы больше – в асцитической жидкости (~600 000 клеток/мл – при раке яичников), но не обнаруживаются у здоровых людей [53]. CAML исходят из ткани первичной опухоли (до 13% от всех клеток) [54]. Такие клетки экспрессируют CD45, характерный для всех видов лейкоцитов человека [55]; EPCAM – молекулы клеточной адгезии эпителия, обнаруживающиеся у большинства раковых эпителиальных клеток [56], и цитокератины (СК) [57]. Кайгородова с соавт. [58] в исследовании асцитической

жидкости больных раком яичников выделили 12 популяций EpCAM-положительных клеток. Было установлено, что самой многочисленной группой являлись атипичные клетки гибридного фенотипа с признаками стволовости и EMT (EpCAM⁺, CD45⁺, CD44⁺, CD24^{+/-}, CD133^{+/-}, N-кадгерин^{+/-}), причём эти данные неоднократно подтверждались. Кроме этого, в наших исследованиях было показано, что количество атипичных/гибридных форм опухолевых клеток EpCAM⁺CD45⁺ в асцитической жидкости больных раком яичников имеет прямую корреляционную связь со степенью канцероматоза [59]. Sukhbaatar et al. [60] в ходе поиска мутаций TP53 в клетках рака яичников также обнаружили клетки EpCAM⁺CD45⁺, но не обнаружил в них каких-либо мутаций этого гена. Авторами показано, что в SAML по сравнению с нормальными макрофагами в 10–170 раз повышена экспрессия таких генов, как ZEB1, SNAIL, TWIST, INMB1, THNSB и COL11, что приводит к увеличению количества N-кадгерина и виментина.

Помимо SAML, выделяют также небольшие (5–20 мкм) клетки округлой формы с 1–2 круглыми ядрами, имеющие маркёры, аналогичные SAML. Этим клеткам было дано название «циркулирующие гибридные клетки» (СНС). Они также наблюдаются в крови большинства онкологических больных в количествах куда больших, чем имеющие только маркёры раковых клеток циркулирующие опухолевые клетки (Circulating Tumor Cells, CTC) – в среднем примерно 5–70 клеток на 500 000 живых клеток в зависимости от онкологического заболевания, вплоть до тысяч – при увеальной меланоме [61]. Предполагается, что именно СНС являются продуктом клеточного слияния, когда SAML образуются в результате поглощения содержимого раковых клеток [57]. Ряд работ подтверждает метастатический потенциал СНС – в исследованиях Gast et al. [12] скрещивание макрофагов с клетками аденокарциномы и меланомы привело к образованию гибридных форм с увеличенным пролиферативным потенциалом и усиленной способностью давать метастазы. Интересно, что в условиях *in vitro* клетки со временем прекращают деление. *In vivo* же наблюдается повышенный пролиферативный потенциал гибридов, что говорит о том, что на гибриды «опухолевая клетка + макрофаг» положительно влияют сигналы от микроокружения. Ещё более интересным является тот факт, что СНС встречаются даже в образцах крови здоровых пациентов, что принципиально отличает данные клетки от SAML [7]. Неоднократно подчеркивалась гетерогенность СНС в экспрессии генов белков, отвечающих за мезенхимальные

(виментин, N-кадгерин), стволовые (CD44, CD133, ALDH1) свойства, а также некоторых рецепторов (рецепторы андрогенов). При этом только СНС с выраженными свойствами стволовых и мезенхимальных клеток участвуют в метастатическом процессе, а повышенное количество андрогеновых рецепторов при РМЖ говорит о повышенной резистентности к терапии [62–64].

Неоднократно среди гибридов «опухолевая клетка + макрофаг» обнаруживались клетки с такими маркёрами, как CD163 [65–67], CD204 и CD206 [68]. Они характерны для M2-макрофагов. В отличие от провоспалительных M1, M2 угнетают воспаление и стимулируют процессы опухолевого роста и прогрессии. Установлено, что именно при слиянии раковой клетки с M2-макрофагом получаемый гибрид приобретает черты макрофага и стволовой клетки, получая повышенную способность к метастазированию [69]. Более того, наблюдается избирательное слияние M2-макрофагов с раковыми клетками [70]. Скорее всего, все гибриды «опухолевая клетка + макрофаг» образованы при участии опухоль-ассоциированных макрофагов (tumor-associated macrophages, TAM) – клеток, находящихся в составе солидной опухоли и поддерживающих её жизнеспособность. Они имеют M2-характерный фенотип, и считается, что TAM и M2-макрофаги являются одними и теми же клетками, хотя последние исследования говорят о некорректности данной теории [71].

Именно гибриды «опухолевая клетка + макрофаг» вызывают крайне высокий интерес среди научного сообщества вследствие своего значительного присутствия в крови даже на самых ранних этапах прогрессирования заболевания [10] и лёгкости получения, что потенциально делает их эффективным и надёжным биомаркёром солидных опухолей. Огромный размер SAML серьёзно упрощает задачу выделения клеток из крови, позволяя применять такие технически простые методы, как микрофилтрация [35].

В исследованиях последних лет предполагается, что клетки CD45⁺EpCAM⁺ обладают устойчивостью к химиотерапии повышенной злокачественностью. В частности, считается, что клетки CD45⁺EpCAM⁺ чрезмерно экспрессируют на своей поверхности HLA I и HLA II, что также позволяет им уходить от цитотоксического воздействия NK-клеток. Касательно химиорезистентности, SAML демонстрируют увеличенную устойчивость, например, к цисплатину и паклитакселу (более 27 мкг/мл, по сравнению с 8–12 и 7–10 мкг/мл соответственно для клеток CD45⁺EpCAM⁺) [52, 72, 73], и к радиотера-

пии, показывая возросшую способность к репарации ДНК [66, 74].

Сам факт злокачественности опухоли также может быть подтверждён с помощью обнаружения САМЛ. В исследовании Adams et al. [75] гибриды обнаруживались у 88% пациентов с инвазивной карциномой молочной железы и только у 26% — с доброкачественными новообразованиями. Многими авторами ставится прямая зависимость между концентрацией гибридных клеток и неблагоприятностью прогноза для пациента. Однако, несмотря на значительное повышение количества клеток CD45⁺ErCAM⁺ на поздних стадиях заболевания, их присутствие отмечается и на более ранних этапах прогрессирования рака [57]. Описано обнаружение данных клеток задолго до появления метастазов, что потенциально делает их предвестником скорого распространения опухоли [10]. Так, в проведённом нами исследовании было показано, что в крови больных раком эндометрия T1-стадии наблюдаются атипичные/гибридные формы клеток CD45⁺ErCAM⁺, концентрация которых коррелировала с риском возникновения рецидивов после лечения [76]. На основе исследований пациентов с раком пищевода [35], лёгких [77], поджелудочной железы [78] и рядом других онкологий [53] показано, что размер САМЛ ≥ 50 мкм и их количество в крови $\geq 5-6$ клеток/7,5 мл говорит о низкой выживаемости и о высоком риске рецидива после проведённой терапии. При проведении совместного исследования количества САМЛ с СТС пациенты с повышенными концентрациями циркулирующих опухолевых клеток (≥ 5 клеток/7,5 мл) и гибридов в крови имели сниженные показатели выживаемости по сравнению с больными с высокими значениями СТС, но без САМЛ [79].

СНС также показывают себя как хороший биомаркёр для диагностики и мониторинга раковых заболеваний, не в последнюю очередь вследствие большой концентрации в крови онкобольных [80–82]. В ряде работ [80, 82] наблюдали снижение концентрации гибридов в крови больных различными онкологическими заболеваниями органов желудочно-кишечного тракта (ЖКТ) после проведённой терапии. А повышение количества СНС в крови больных карциномами полости рта позволило Henn et al. [81] предсказывать появление скрытых метастазов в лимфатических узлах, что даёт возможность избежать высокоинвазивной операции лимфодиссекции шеи, приводящей к осложнениям в 25% случаев.

Важной проблемой, мешающей становлению СНС в качестве клинических биомаркёров,

является их сходство с нормальными лейкоцитами пациента. По этой причине быстрое, простое и эффективное выделение и их последующий анализ затруднителен. Одним из разрабатываемых методов для решения данной проблемы является использование диэлектрофоретического метода в специально разработанном микрофлюидном чипе. Разделение клеток происходит за счёт различий в поляризации каждой клетки и тока жидкости. В эксперименте на образцах крови пациента с аденокарциномой поджелудочной железы удалось добиться исключения 96,5% лейкоцитов, увеличив концентрацию СНС в образце в 18,6 раз [83].

ГИБРИДНЫЕ КЛЕТКИ И ТЕРАПИЯ РАКА

Доказательство роли гибридов в процессах метастазирования и резистентности рака показывает возможность разработки эффективных методов терапии раковых заболеваний посредством воздействия на гибридные клетки. Самым очевидным подходом здесь выглядит препятствование процессу клеточного слияния. Известно, что гипоксия и TNF α стимулируют процессы объединения клеток [84]. Они также вовлечены в старт процесса апоптоза. Исследователи подтвердили и роль данного процесса программируемой клеточной гибели в формировании гибридов. Поэтому угнетать гибридацию клеток можно и через ингибирование тех или иных элементов сигнальных путей, запускающих апоптоз. Разработок в этой сфере достаточно много. Например, возможно нарушить работу рецептора TNF α с помощью малых интерферирующих РНК [85] или антибиотика миноциклина [86]. Достаточно известным и активно разрабатываемым подходом прекращения созревания TNF α из про-TNF α является подавление фермента ADAM17 [87]. Весьма популярна разработка моноклональных антител как к самому TNF α , так и к элементам сигнальных путей, активируемым этим фактором [88]. Другими целями для подавления апоптоза выступают фосфатидилсерин [89], матриксная металлопротеиназа 9 [90], каспазы [91], и др. Некоторые из представленных методик противотNF α -терапии уже давно известны мировой медицине, но исследование роли этого фактора в клеточном слиянии может увеличить их популярность среди онкологов.

Роль стимулирующих факторов также подтверждается тем, что они характерны для воспалительной реакции, всегда возникающей как при процессе регенерации ткани, так и при опухолевом росте. В обоих случаях наблюдается

клеточное слияние [92]. Поэтому, противовоспалительная терапия также может быть использована для предотвращения слияния раковых клеток как это сделали, например, Li et al. [93], успешно заблокировав рецепторы интерлейкина-4 клеток рабдомиосаркомы, тем самым предотвратив опухолевый рост и прогрессию *in vivo*.

Ещё одним подходом к предотвращению клеточного слияния является нарушение работы синцитинов. Существуют работы по применению антисенс-олигонуклеотидов и коротких последовательностей РНК, образующих шпильки (shRNA), снижающих экспрессию генов, отвечающих за синтез синцитинов-1 и -2 соответственно. В то же время экспрессия синцитинов связана с положительным прогнозом у пациентов с РМЖ, поэтому целесообразность данной терапии требует подробных исследований [94].

Разумеется, если существуют вещества, способствующие слиянию клеток, то должны быть и физиологические ингибиторы клеточной гибридизации. Установлено, что TGF β в больших концентрациях ингибирует процессы клеточного слияния, хотя рассматривать его в качестве противоопухолевого препарата не стоит из-за стимуляции пролиферации клеток, включая злокачественные [95].

Отдельно стоит выделить гибриды между дендритными и раковыми клетками [40, 96, 97]. Это искусственно выведенные клетки, имеющие антигены как раковой, так и антигенпредставляющей клетки, что позволяет им эффективно стимулировать собственный противоопухолевый иммунитет пациента. Уже достаточно давно было выдвинуто предположение о возможности применения гибридов раковой клетки с дендритной в качестве противоопухолевых вакцин [40]. Множество методик применения таких гибридов сейчас находятся в разработке. Например, плазматические мембраны гибридных клеток были использованы для покрытия наночастиц, образованных циркониевыми металл-органическими каркасными структурами, обычно применяемыми для фотодинамической терапии. При введении в организм онкобольного такие наночастицы накапливаются в опухо-

ли, согласно эффекту повышенной проницаемости и удерживания (EPR), а также за счёт наличия у частиц поверхностных белков, характерных для опухолевых клеток. При облучении наночастиц лазером происходит быстрое образование активных форм кислорода, а антигены раковых и дендритных клеток в оболочке частиц стимулируют мощный иммунный ответ со стороны Т-киллеров. Эксперименты *in vivo* на мышах с привитыми опухолями показали значительное замедление роста опухолевой массы на 28-й день после начала терапии по сравнению с другими наночастицами для фотодинамической терапии, а на 62-й день – 40%-ную выживаемость среди животных, когда во всех остальных группах все мыши погибли [97].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Несмотря на то что явление клеточного слияния было открыто уже более 100 лет назад, всё это время оно оставалось вне поля зрения учёных – все внимание мировой науки уделялось теории раковых стволовых клеток. Именно по этой причине многие аспекты исследования гибридных клеток сейчас всё ещё находятся на зачаточной стадии. Однако при уже накопленном уровне знаний такие циркулирующие гибриды, как САМЛ и СНС, показывают себя как многообещающий биомаркер опухолевых заболеваний, и даже больше – как новый подход к лечению рака. Развитие таких методик применения гибридных раковых клеток говорит об огромном, ещё нераскрытом потенциале гибридов, требующем подробных исследований.

Финансирование. Поисково-аналитическая работа проведена при поддержке Российского научного фонда (грант № 19-75-30016).

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Соблюдение этических норм. Настоящая статья не содержит описания выполненных авторами исследований с участием людей или использованием животных в качестве объектов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Sung, H. (2021) Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries, *CA Cancer J. Clinic.*, **71**, 209-249, doi: 10.3322/caac.21660.
2. Russian Federation. Cancer Country Profile 2020, URL: https://www.who.int/cancer/country-profiles/RUS_2020.pdf.
3. Chaffer, C. L., and Weinberg, R. A. (2011) A perspective on cancer cell metastasis, *Science*, **331**, 1559-1564, doi: 10.1126/science.1203543.
4. Kachalaki, S., Ebrahimi, M., Mohamed Khosroshahi, L., Mohammadinejad, S., and Baradaran, B. (2016) Cancer chemoresistance; biochemical and molecular aspects: a brief overview, *Eur. J. Pharm. Sci.*, **89**, 20-30, doi: 10.1016/j.ejps.2016.03.025.
5. Shabo, I., Svanvik, J., Lindström, A., Lechertier, T., Trabulo, S., et al. (2020) Roles of cell fusion, hybridization and polyploid cell formation in cancer metastasis, *J. Clin. Oncol.*, **11**, 121-135, doi: 10.5306/wjco.v11.i3.121.

6. Goldenberg, D. M., Pavia, R. A., and Tsao, M. C. (1974) *In vivo* hybridisation of human tumour and normal hamster cells, *Nature*, **250**, 649-651, doi: 10.1038/250649a0.
7. Reduzzi, C., Vismara, M., Gerratana, L., Silvestri, M., De Braud, F., et al. (2020) The curious phenomenon of dual-positive circulating cells: Longtime overlooked tumor cells, *Semin. Cancer Biol.*, **60**, 344-350, doi: 10.1016/j.semcancer.2019.10.008.
8. Harris, H. (1989) The biology of tumour suppression, *CIBA Found. Symp.*, **142**, 199-208.
9. Harris, H., Miller, O. J., Klein, G., Worst, P., and Tachibana, T. (1969) Suppression of malignancy by cell fusion, *Nature*, **223**, 363-368.
10. Manjunath, Y., Porciani, D., Mitchem, J. B., Suvilesh, K. N., Avella, D. M., et al. (2020) Tumor-cell-macrophage fusion cells as liquid biomarkers and tumor enhancers in cancer, *Int. J. Mol. Sci.*, **21**, 1872, doi: 10.3390/ijms21051872.
11. Pawelek, J. M., and Chakraborty, A. K. (2008) Fusion of tumour cells with bone marrow-derived cells: a unifying explanation for metastasis, *Nat. Rev. Cancer*, **8**, 377-386, doi: 10.1038/nrc2371.
12. Gast, C. E., Silk, A. D., Zarour, L., Riegler, L., Burkhardt, J. G., et al. (2018) Cell fusion potentiates tumor heterogeneity and reveals circulating hybrid cells that correlate with stage and survival, *Sci. Adv.*, **4**, eaat7828, doi: 10.1126/sciadv.aat7828.
13. Bastida-Ruiz, D., Van Hoesen, K., and Cohen, M. (2016) The dark side of cell fusion, *Int. J. Mol. Sci.*, **17**, 638, doi: 10.3390/ijms17050638.
14. Melzer, C., von der Ohe, J., and Hass, R. (2018) MSC stimulate ovarian tumor growth during intercellular communication but reduce tumorigenicity after fusion with ovarian cancer cells, *Cell Commun. Signal.*, **16**, 67, doi: 10.1186/s12964-018-0279-1.
15. Podbilewicz, B. (2014) Virus and cell fusion mechanisms, *Ann. Rev. Cell Dev. Biol.*, **30**, 111-139, doi: 10.1146/annurev-cellbio-101512-122422.
16. Wang, X., Chen, C. H., Badeti, S., Cho, J. H., Naghizadeh, A., et al. (2021) Deletion of ER-retention motif on SARS-CoV-2 spike protein reduces cell hybrid during cell-cell fusion, *Cell Biosci.*, **11**, 114, doi: 10.1186/s13578-021-00626-0.
17. Ku, J. W. K., Chen, Y., Lim, B. J. W., Gasser, S., Crasta, K. C., and Gan, Y.-H. (2020) Bacterial-induced cell fusion is a danger signal triggering cGAS-STING pathway via micronuclei formation, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **117**, 15923-15934, doi: 10.1073/pnas.2006908117.
18. Broncy, L., and Paterlini-Bréchet, P. (2018) Cancer-associated circulating atypical cells with both epithelial and macrophage-specific markers, *J. Lab. Prec. Med.*, **3**, 91, doi: 10.21037/jlpm.2018.10.05.
19. Sottile, F., Aulicino, F., Theka, I., and Cosma, M. P. (2016) Mesenchymal stem cells generate distinct functional hybrids *in vitro* via cell fusion or entosis, *Sci. Rep.*, **6**, 36863, doi: 10.1038/srep36863.
20. Miyake, K., and Karasuyama, H. (2021) The role of trogocytosis in the modulation of immune cell functions, *Cells*, **10**, 1255, doi: 10.3390/cells10051255.
21. Melzer, C., Yang, Y., and Hass, R. (2016) Interaction of MSC with tumor cells, *Cell Commun. Signal.*, **14**, 20, doi: 10.1186/s12964-016-0143-0.
22. Dragotakes, Q., Fu, M. S., and Casadevall, A. (2019) Dragocytosis: elucidation of the mechanism for cryptococcus neoformans macrophage-to-macrophage transfer, *J. Immunol.*, **202**, 2661-2670, doi: 10.4049/jimmunol.1801118.
23. Melzer, C., Ohe, J. V., and Hass, R. (2020) Altered tumor plasticity after different cancer cell fusions with MSC, *Int. J. Mol. Sci.*, **21**, 8347, doi: 10.3390/ijms21218347.
24. Soe, K. (2020) Osteoclast fusion: physiological regulation of multinucleation through heterogeneity-potential implications for drug sensitivity, *Int. J. Mol. Sci.*, **21**, 7717, doi: 10.3390/ijms21207717.
25. Jacome-Galarza, C. E., Percin, G. I., Muller, J. T., Mass, E., Lazarov, T., et al. (2019) Developmental origin, functional maintenance and genetic rescue of osteoclasts, *Nature*, **568**, 541-545, doi: 10.1038/s41586-019-1105-7.
26. Andersen, T. L., Boissy, P., Sondergaard, T. E., Kupisiewicz, K., Plesner, T., et al. (2007) Osteoclast nuclei of myeloma patients show chromosome translocations specific for the myeloma cell clone: a new type of cancer-host partnership? *J. Pathol.*, **211**, 10-17, doi: 10.1002/path.2078.
27. Смирнова Т. Л. (2009) Плацента. Этапы развития, *Вестник Чувашского университета*, **2**, 73-79.
28. Huppertz, B., and Gauster, M. (2011) Trophoblast fusion, *Adv. Exp. Med. Biol.*, **713**, 81-95, doi: 10.1007/978-94-007-0763-4_6.
29. Cretoiu, D., Pavelescu, L., Duica, F., Radu, M., Suciuc, N., et al. (2018) Myofibers, *Muscle Atrophy*, **1088**, 23-46, doi: 10.1007/978-981-13-1435-3_2.
30. Dittmar, T., Schwitalla, S., Seidel, J., Haverkamp, S., Reith, G., et al. (2010) Characterization of hybrid cells derived from spontaneous fusion events between breast epithelial cells exhibiting stem-like characteristics and breast cancer cells, *Clin. Exp. Metastasis*, **28**, 75-90, doi: 10.1007/s10585-010-9359-3.
31. Fahlbusch, S. S., Keil, S., Epplen, J. T., Zänker, K. S., and Dittmar, T. (2020) Comparison of hybrid clones derived from human breast epithelial cells and three different cancer cell lines regarding *in vitro* cancer stem/initiating cell properties, *BMC Cancer*, **20**, 446, doi: 10.1186/s12885-020-06952-9.
32. Gauck, D., Keil, S., Niggemann, B., Zänker, K. S., and Dittmar, T. (2017) Hybrid clone cells derived from human breast epithelial cells and human breast cancer cells exhibit properties of cancer stem/initiating cells, *BMC Cancer*, **17**, 515, doi: 10.1186/s12885-017-3509-9.
33. Berndt, B., Haverkamp, S., Reith, G., Keil, S., Niggemann, B., et al. (2013) Fusion of CCL21 non-migratory active breast epithelial and breast cancer cells give rise to CCL21 migratory active tumor hybrid cell lines, *PLoS One*, **8**, e63711, doi: 10.1371/journal.pone.0063711.
34. Wang, R., Sun, X., Wang, C. Y., Hu, P., Chu, C.-Y., Liu, S., et al. (2012) Spontaneous cancer-stromal cell fusion as a mechanism of prostate cancer androgen-independent progression, *PLoS One*, **7**, e42653, doi: 10.1371/journal.pone.0042653.
35. Gironde, D. J., Adams, D. L., He, J., Xu, T., Gao, H., et al. (2020) Cancer associated macrophage-like cells and prognosis of esophageal cancer after chemoradiation therapy, *J. Transl. Med.*, **18**, 413, doi: 10.1186/s12967-020-02563-x.
36. Mu, Z., Wang, C., Ye, Z., Rossi, G., Sun, C., et al. (2017) Prognostic values of cancer associated macrophage-like cells (CAML) enumeration in metastatic breast cancer, *Breast Cancer Res. Treat.*, **165**, 733-741, doi: 10.1007/s10549-017-4372-8.
37. Rachkovsky, M., Sodi, S., Chakraborty, A., Avissar, Y., Bolognia, J., et al. (1998) Melanoma x macrophage hybrids with enhanced metastatic potential, *Clin. Exp. Metastasis*, **16**, 299-312, doi: 10.1023/a:1006557228604.
38. Kohler, G., and Milstein, C. (1975) Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity, *Nature*, **256**, 495-497.
39. Koido, S., Ohana, M., Liu, C., Nikrui, N., Durfee, J., et al. (2004) Dendritic cells fused with human cancer cells:

- Morphology, antigen expression, and T cell stimulation, *Clin. Immunol.*, **113**, 261-269, doi: 10.1016/j.clim.2004.08.004.
40. Serhal, K., Baillou, C., Ghinea, N., Fontanges, P., Dupuy, F. P., et al. (2007) Characteristics of hybrid cells obtained by dendritic cell/tumour cell fusion in a T-47D breast cancer cell line model indicate their potential as anti-tumour vaccines, *Int. J. Oncol.*, **31**, 1357-1365, doi: 10.3892/ijo.31.6.1357.
 41. Xue, J., Zhu, Y., Sun, Z., Ji, R., Zhang, X., et al. (2015) Tumorigenic hybrids between mesenchymal stem cells and gastric cancer cells enhanced cancer proliferation, migration and stemness, *BMC Cancer*, **15**, 793, doi: 10.1186/s12885-015-1780-1.
 42. Rappa, G., Mercaide, J., and Lorico, A. (2012) Spontaneous formation of tumorigenic hybrids between breast cancer and multipotent stromal cells is a source of tumor heterogeneity, *Am. J. Pathol.*, **180**, 2504-2515, doi: 10.1016/j.ajpath.2012.02.020.
 43. Kemény, L., Kurgyis, Z., Buknicz, T., Groma, G., Jakab, A., et al. (2016) Melanoma cells can adopt the phenotype of stromal fibroblasts and macrophages by spontaneous cell fusion *in vitro*, *Int. J. Mol. Sci.*, **17**, 826, doi: 10.3390/ijms17060826.
 44. Hass, R., von der Ohe, J., and Dittmar, T. (2021) Hybrid formation and fusion of cancer cells *in vitro* and *in vivo*, *Cancers*, **13**, 4496, doi: 10.3390/cancers13174496.
 45. Özel, C., Seidel, J., Meyer-Staeckling, S., Brandt, B. H., Niggemann, B., et al. (2012) Hybrid cells derived from breast epithelial cell/breast cancer cell fusion events show a differential RAF-AKT crosstalk, *Cell Commun. Signal.*, **10**, 10, doi: 10.1186/1478-811X-10-10.
 46. Li, M., Li, X., Zhao, L., Zhou, J., Cheng, Y., et al. (2019) Spontaneous formation of tumorigenic hybrids between human omental adipose-derived stromal cells and endometrial cancer cells increased motility and heterogeneity of cancer cells, *Cell Cycle*, **18**, 320-332, doi: 10.1080/15384101.2019.1568743.
 47. Xu, M. H., Gao, X., Luo, D., Zhou, X. D., Xiong, W., et al. (2014) EMT and acquisition of stem cell-like properties are involved in spontaneous formation of tumorigenic hybrids between lung cancer and bone marrow-derived mesenchymal stem cells, *PLoS One*, **9**, e87893, doi: 10.1371/journal.pone.0087893.
 48. Dörnen, J., Myklebost, O., and Dittmar, T. (2020) Cell fusion of mesenchymal stem/stromal cells and breast cancer cells leads to the formation of hybrid cells exhibiting diverse and individual (stem cell) characteristics, *Int. J. Mol. Sci.*, **21**, 9636, doi: 10.3390/ijms21249636.
 49. Li, H., Feng, Z., Tsang, T. C., Tang, T., Jia, X., et al. (2014) Fusion of HepG2 cells with mesenchymal stem cells increases cancer-associated and malignant properties: an *in vivo* metastasis model, *Oncol. Rep.*, **32**, 539-547, doi: 10.3892/or.2014.3264.
 50. He, X., Li, B., Shao, Y., Zhao, Na, Hsu, Y., et al. (2015) Cell fusion between gastric epithelial cells and mesenchymal stem cells results in epithelial-to-mesenchymal transition and malignant transformation, *BMC Cancer*, **15**, 24, doi: 10.1186/s12885-015-1027-1.
 51. Zhang, L. N., Kong, C. F., Zhao, D., Cong, X. L., Wang, S. S., et al. (2019) Fusion with mesenchymal stem cells differentially affects tumorigenic and metastatic abilities of lung cancer cells, *J. Cell Physiol.*, **234**, 3570-3582, doi: 10.1002/jcp.27011.
 52. Adams, D. L., Martin, S. S., Alpaugh, R. K., Charpentier, M., Tsai, S., et al. (2014) Circulating giant macrophages as a potential biomarker of solid tumors, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **111**, 3514-3519, doi: 10.1073/pnas.1320198111.
 53. Adams, D., Adams, D. K., Lin, S. H., Cristofanilli, M., Bergan, R. C., et al. (2017) Cancer-associated macrophage-like cells as prognostic indicators of overall survival in a variety of solid malignancies, *J. Clin. Oncol.*, **35**, 11503-11503.
 54. Akhter, M. Z., Sharawat, S. K., Kumar, V., Kochat, V., Equbal, V., et al. (2018) Aggressive serous epithelial ovarian cancer is potentially propagated by EpCAM⁺CD45⁺ phenotype, *Oncogene*, **37**, 2089-2103, doi: 10.1038/s41388-017-0106-y.
 55. Rheinländer, A., Schraven, B., and Bommhardt, U. (2018) CD45 in human physiology and clinical medicine, *Immunol. Lett.*, **196**, 22-32, doi: 10.1016/j.imlet.2018.01.009.
 56. Huang, L., Yang, Y., Yang, F., Liu, S., Zhu, Z., et al. (2018) Functions of EpCAM in physiological processes and diseases (review), *Int. J. Mol. Med.*, **42**, 1771-1785, doi: 10.3892/ijmm.2018.3764.
 57. Sutton, T. L., Walker, B. S., and Wong, M. H. (2019) Circulating hybrid cells join the fray of circulating cellular biomarkers, *Cell. Mol. Gastroenterol. Hepatol.*, **8**, 595-607, doi: 10.1016/j.jcmgh.2019.07.002.
 58. Кайгородова Е. В., Федулова Н. В., Очиров М. О., Дьяков Д. А., Молчанов С. В., Часовских Н. Ю. (2020) Различные популяции опухолевых клеток в асцитической жидкости больных раком яичников, *Бюлл. Сиб. Мед.*, **19**, 50-58, doi: 10.20538/1682-0363-2020-1-50-58.
 59. Кайгородова Е. В., Очиров М. О., Молчанов С. В., Рогачев Р. Р., Дьяков Д. Д., и др. (2021) Различные популяции EpCam-положительных клеток в асцитической жидкости у больных раком яичников: связь со степенью канцероматоза, *Бюлл. Сиб. Мед.*, **20**, 44-53, doi: 10.20538/1682-0363-2021-2-44-53.
 60. Sukhbaatar, N., Bachmayr-Heyda, A., Auer, K., Aust, S., Heyumar, S., et al. (2017) Two different, mutually exclusively distributed, TP53 mutations in ovarian and peritoneal tumor tissues of a serous ovarian cancer patient: Indicative for tumor origin? *Cold Spring Harb. Mol. Case Studies*, **3**, a001461, doi: 10.1101/mcs.a001461.
 61. Dietz, M. S., Sutton, T. L., Walker, B. S., Gast, C. E., Zarour, L., et al. (2021) Relevance of circulating hybrid cells as a non-invasive biomarker for myriad solid tumors, *Sci. Rep.*, **11**, 13630, doi: 10.1038/s41598-021-93053-7.
 62. Walker, B. S., Sengupta, S., Parappilly, M., Ors, A., Fischer, J., et al. (2020) Harnessing the heterogeneity of circulating hybrid cells in pancreatic adenocarcinoma, *Cancer Res.*, **80** (Suppl 21), PO-014, doi: 10.1158/1538-7445.TUMHET2020-PO-014.
 63. Dietz, M. S., Sutton, T., Walker, B., Chang, Y. H., Chin, K., et al. (2020) A novel disseminated tumor cell identified in myriad cancer harbors tumor initiating properties, *Cancer Res.*, **80** (Suppl. 21), PO-102, doi: 10.1158/1538-7445.TUMHET2020-PO-102.
 64. Denisov, E. V., Menyailo, M. E., Zolotareva, S. Y., Gerashchenko, T. S., Alifanov, V. V., et al. (2021) 23P Transcriptional profiling of circulating tumor and hybrid cells in breast cancer patients, *Ann. Oncol.*, **32** (Suppl. 5), S367-S368, doi: 10.1016/j.annonc.2021.08.301.
 65. Aljabery, F., Olsson, H., Gimm, O., Jahnson, S., and Shabo, I. (2018) M2-macrophage infiltration and macrophage traits of tumor cells in urinary bladder cancer, *Urol. Oncol. Semin. Origin. Invest.*, **36**, 159.e19-159.e26, doi: 10.1016/j.urolonc.2017.11.020.
 66. Garvin, S., Oda, H., Arnesson, L. G., Lindström, A., and Shabo, I. (2018) Tumor cell expression of CD163 is associated to postoperative radiotherapy and poor prognosis in patients with breast cancer treated with breast-conserving surgery, *J. Cancer Res. Clin. Oncol.*, **144**, 1253-1263, doi: 10.1007/s00432-018-2646-0.

67. Garvin, S., Vikhe Patil, E., Arnesson, L. G., Oda, H., Hedayati, E., et al. (2019) Differences in intra-tumoral macrophage infiltration and radiotherapy response among intrinsic subtypes in pT1-T2 breast cancers treated with breast-conserving surgery, *Virch. Arch. Int. J. Pathol.*, **475**, 151-162, doi: 10.1007/s00428-019-02563-3.
68. Clawson, G. A., Matters, G. L., Xin, P., McGovern, C., Wafula, E., et al. (2017) "Stealth dissemination" of macrophage-tumor cell fusions cultured from blood of patients with pancreatic ductal adenocarcinoma, *PLoS One*, **12**, e0184451, doi: 10.1371/journal.pone.0184451.
69. Tretyakova, M. S., Subbalakshmi, A. R., Menyailo, M. E., Jolly, M. K., and Denisov, E. (2021) Tumor hybrid cells: Nature and biological significance, *Preprints*, **2021**, 2021110250, doi: 10.20944/preprints202111.0250.v1.
70. Aguirre, L. A., Montalbán-Hernández, K., Avendaño-Ortiz, J., Marín, E., Lozano, R., Toledano, V., et al. (2020) Tumor stem cells fuse with monocytes to form highly invasive tumor-hybrid cells, *Oncimmunology*, **9**, 1773204, doi: 10.1080/2162402X.2020.1773204.
71. Zhou, J., Tang, Z., Gao, S., Li, C., Feng, Y., and Zhou, X. (2020) Tumor-associated macrophages: Recent insights and therapies, *Front. Oncol.*, **10**, 188, doi: 10.3389/fonc.2020.00188.
72. Gubbels, J. A., Felder, M., Horibata, S., Belisle, J. A., Kapur, A., et al. (2010) MUC16 provides immune protection by inhibiting synapse formation between NK and ovarian tumor cells, *Mol. Cancer*, **9**, 11, doi: 10.1186/1476-4598-9-11.
73. Baligar, P., Mukherjee, S., Kochat, V., Rastogi, A., and Mukhopadhyay, A. (2016) Molecular and cellular functions distinguish superior therapeutic efficiency of bone marrow CD45 cells over mesenchymal stem cells in liver cirrhosis, *Stem Cells*, **34**, 135-147, doi: 10.1002/stem.2210.
74. Lindström, A., Midtbö, K., Arnesson, L. G., Garvin, S., and Shabo, I. (2017) Fusion between M2-macrophages and cancer cells results in a subpopulation of radioresistant cells with enhanced DNA-repair capacity, *Radiotarget*, **8**, 51370-51386, doi: 10.18632/oncotarget.17986.
75. Adams, D. L., Adams, D. K., Alpaugh, R. K., Cristofanilli, M., Martin, S. S., et al. (2016) Circulating cancer-associated macrophage-like cells differentiate malignant breast cancer and benign breast conditions, *Cancer Epidemiol. Biomark. Prevent.*, **25**, 1037-1042, doi: 10.1158/1055-9965.epi-15-1221.
76. Кайгородова Е. В., Заваруев И. С., Грищенко М. Ю., Чернышова А. Л. (2021) Особенности встречаемости атипичных/гибридных форм EpCam⁺CD45⁺ клеток у больных раком эндометрия, *Усп. Мол. Онкол.*, **8**, 50, doi: 10.17650/2313-805X-2021-8-4-5-163.
77. Augustyn, A., Adams, D. L., He, J., Qiao, Y., Verma, V., et al. (2020) Giant circulating cancer-associated macrophage-like cells are associated with disease recurrence and survival in non-small cell lung cancer treated with chemoradiation and atezolizumab, *Clin. Lung Cancer*, **22**, e451-e465, doi: 10.1016/j.clc.2020.06.016.
78. Gardner, K. P., Aldakkak, M., Tang, C. M., Tsai, S., and Adams, D. L. (2021) Circulating stromal cells in resectable pancreatic cancer correlates to pathological stage and predicts for poor clinical outcomes, *NPJ Precis. Oncol.*, **5**, 25, doi: 10.1038/s41698-021-00161-8.
79. Ding, J., Jin, W., Chen, C., Shao, Z., and Wu, J. (2012) Tumor associated macrophage × cancer cell hybrids may acquire cancer stem cell properties in breast cancer, *PLoS One*, **7**, e41942, doi: 10.1371/journal.pone.0041942.
80. Walker, B. S., Sutton, T. L., Zarour, L., Hunter, J. G., Wood, S. G., et al. (2021) Circulating hybrid cells: A novel liquid biomarker of treatment response in gastrointestinal cancers, *Ann. Surg. Oncol.*, **28**, 8567-8578, doi: 10.1245/s10434-021-10379-2.
81. Henn, T. E., Anderson, A. N., Hollett, Y. R., Sutton, T. L., Walker, B. S., et al. (2021) Circulating hybrid cells predict presence of occult nodal metastases in oral cavity carcinoma, *Head Neck*, **43**, 2193-2201, doi: 10.1002/hed.26692.
82. Zarour, L., Swain, J., Billingsley, K., Lopez, C., Vaccaro, G., et al. (2018) Use of circulating cancer cell hybrids to monitor treatment response to hepatic arterial infusion in patients with colorectal cancer metastatic to the liver, *HPB*, **20**, S352, doi: 10.1016/j.hpb.2018.06.2584.
83. Montoya Mira, J., Sapre, A. A., Walker, B. S., Alvarez, J. B., Gustafson, K. T., et al. (2021) Label-free enrichment of rare unconventional circulating neoplastic cells using a microfluidic dielectrophoretic sorting device, *Commun. Biol.*, **4**, 1130, doi: 10.1038/s42003-021-02651-8.
84. Cavazzoni, E., Bugiantella, W., Graziosi, L., Franceschini, M. S., and Donini, A. (2013) Malignant ascites: pathophysiology and treatment, *Int. J. Clin. Oncol.*, **18**, 1-9, doi: 10.1007/s10147-012-0396-6.
85. Melzer, C., von der Ohe, J., and Hass, R. (2018) *In vitro* fusion of normal and neoplastic breast epithelial cells with human mesenchymal stroma/stem cells partially involves tumor necrosis factor receptor signaling, *Stem Cells*, **36**, 977-989, doi: 10.1002/stem.2819.
86. Weiler, J., and Dittmar, T. (2019) Minocycline impairs TNF- α -induced cell fusion of M13SV1-Cre cells with MDA-MB-435-pFDR1 cells by suppressing NF- κ B transcriptional activity and its induction of target-gene expression of fusion-relevant factors, *Cell Commun. Signal.*, **17**, 71, doi: 10.1186/s12964-019-0384-9.
87. Mulooley, M., McGowan, P. M., Crown, J., and Duffy, M. J. (2016) The ADAMs family of proteases as targets for the treatment of cancer, *Cancer Biol. Ther.*, **17**, 870-880, doi: 10.1080/15384047.2016.1177684.
88. Sedger, L. M., and McDermott, M. F. (2014) TNF and TNF-receptors: From mediators of cell death and inflammation to therapeutic giants – past, present and future, *Cytokine Growth Factor Rev.*, **25**, 453-472, doi: 10.1016/j.cytogfr.2014.07.016.
89. Chang, W., Fa, H., Xiao, D., and Wang, J. (2020) Targeting phosphatidylserine for cancer therapy: Prospects and challenges, *Theranostics*, **10**, 9214-9229, doi: 10.7150/thno.45125.
90. Weiler, J., Mohr, M., Zänker, K. S., and Dittmar, T. (2018) Matrix metalloproteinase-9 (MMP9) is involved in the TNF- α -induced fusion of human M13SV1-Cre breast epithelial cells and human MDA-MB-435-pFDR1 cancer cells, *Cell Commun. Signal.*, **16**, 14, doi: 10.1186/s12964-018-0226-1.
91. Noubissi, F. K., Harkness, T., Alexander, C. M., and Ogle, B. M. (2015) Apoptosis-induced cancer cell fusion: a mechanism of breast cancer metastasis, *FASEB J.*, **29**, 4036-4045, doi: 10.1096/fj.15-271098.
92. Dittmar, T., and Zänker, K. S. (2015) Tissue regeneration in the chronically inflamed tumor environment: Implications for cell fusion driven tumor progression and therapy resistant tumor hybrid cells, *Int. J. Mol. Sci.*, **16**, 30362-30381, doi: 10.3390/ijms161226240.
93. Li, G., Kikuchi, K., Radka, M., Abraham, J., Rubin, B. P., and Keller, C. (2013) IL-4 receptor blockade abrogates satellite cell: Rhabdomyosarcoma fusion and prevents tumor establishment, *Stem Cells*, **31**, 2304-2312, doi: 10.1002/stem.1491.
94. Fernandes, C., Prabhu, P., Juvale, K., Soares, D., and Yc, M. (2019) Cancer cell fusion: a potential target to tackle drug-resistant and metastatic cancer cells, *Drug Discov. Today*, **24**, 1836-1844, doi: 10.1016/j.drudis.2019.05.024.

95. Sieler, M., Weiler, J., and Dittmar, T. (2021) Cell–cell fusion and the roads to novel properties of tumor hybrid cells, *Cells*, **10**, 1465, doi: 10.3390/cells10061465.
96. Greene, J. M., Schneble, E. J., Jackson, D. O., Hale, D. F., Vreeland, T. J., et al. (2016) A phase I/IIa clinical trial in stage IV melanoma of an autologous tumor–dendritic cell fusion (dendritoma) vaccine with low dose interleukin-2, *Cancer Immunol. Immunother.*, **65**, 383–392, doi: 10.1007/s00262-016-1809-6.
97. Liu, W., Zou, M., Liu, T., Zeng, J., Li, X., et al. (2019) Expandable immunotherapeutic nanoplatfoms engineered from cytomembranes of hybrid cells derived from cancer and dendritic cells, *Adv. Mater.*, **31**, 1900499, doi: 10.1002/adma.201900499.

HYBRID/ATYPICAL FORMS OF CIRCULATING TUMOR CELLS: CURRENT STATE OF THE PROBLEM

Review

E. V. Kaigorodova^{1,2*}, A. V. Kozik², I. S. Zavaruev², and M. Yu. Grishchenko³

¹ *Cancer Research Institute, Tomsk National Research Medical Center, Russian Academy of Sciences, 634050 Tomsk, Russia; E-mail: zlobinae@mail.ru*

² *Siberian State Medical University, 634050 Tomsk, Russia*

³ *Tomsk Regional Oncological Dispensary, 634050 Tomsk, Russia*

Cancer is one of the most common diseases worldwide, and treatment bears many challenges such as drug and radioresistance and formation of metastases. These difficulties are due to tumor heterogeneity, which has many origins. One may be cell fusion, a process that is relevant in both physiological (e.g., wound healing) and pathophysiological (cancer and viral infection) processes. This literature review aimed to generalize the existing data about hybrid/atypical forms of circulating cancer cells and their role in tumor progression. For that, the bioinformatical search in universal databases, such as PubMed, NCBI and Google Scholar was conducted by using the keywords “hybrid cancer cells”, “cancer cell fusion”, etc. In this review the latest information related to hybrid tumor cells, their genesis theories, characteristics of different variants with data from our own researches were presented. Many aspects of hybrid cell research are still in their infancy. However, with the level of knowledge already accumulated, circulating hybrids such as CAML and CHC show themselves as a promising biomarker for tumor diseases, and even more as a new approach to cancer treatment.

Keywords: hybrid cells, cell fusion, cancer, circulating tumor cells

ПРАВИЛА ДЛЯ АВТОРОВ

EDN: ARQSOF

1. Общие положения

1.1. Ежемесячный международный журнал «Биохимия»/Biochemistry (Moscow), учредителем которого является Российская академия наук, издается и распространяется одновременно на русском и английском языках.

1.2. Журнал «Биохимия» публикует работы по всем разделам биохимии, а также концептуально важные работы по биохимическим аспектам смежных областей (молекулярной биологии, биофизики, биоорганической химии, микробиологии, иммунологии, физиологии, нейробиологии, геронтологии, биомедицинских наук и др.), направленные на понимание молекулярных и клеточных основ биологических процессов. Тематика журнала также охватывает новые экспериментальные методики в области биохимии, теоретические достижения, имеющие значение для биохимии, обзоры современных биохимических тем исследования и мини-обзоры. **Журнал не рассматривает** чисто феноменологические работы, которые описывают изменения биохимических параметров или маркеров биологических процессов **без связи с механизмами**, вызвавшими эти изменения или являющимися следствием таких изменений, а также работы по клонированию и экспрессии (в том числе в трансгенных животных и растениях) индивидуальных генов и материалы по анализу геномных полиморфизмов.

1.3. К публикации принимаются законченные оригинальные работы, содержащие новые экспериментальные результаты; методические работы, включающие описание новых методов биохимических исследований; материалы теоретического характера с изложением новых принципов, подходов для решения тех или иных биохимических задач. Не принимаются статьи с результатами, новизна которых заключается только в том, что изучаемый хорошо известный объект получен из другого источника.

Раздел «**Краткие сообщения**» публикует короткие экспериментальные статьи заявочного, приоритетного характера, требующие скорейшей публикации. В сопроводительном письме в редакцию авторам следует мотивировать необходимость ускоренного прохождения материала. Срок публикации таких сообщений 1–2 месяца.

Журнал печатает заказанные редколлегией (или предлагаемые авторами и одобренные ред-

коллегией) **обзоры** по наиболее актуальным проблемам биохимии и смежных наук. К обзорным статьям предъявляются следующие требования: 1) у авторов должны быть **свои работы** по теме обзора; 2) список цитированной литературы должен включать **работы**, опубликованные по данной теме в течение последних 5 лет; 3) обзор не должен быть пересказом и, подчас, дословным цитированием кусков ранее опубликованных работ, в нем должен быть критический разбор цитируемых материалов и своя концепция, свое видение проблемы, побудившее авторов написать данный обзор. Редакция и рецензенты строго следят за плагиатом.

Раздел «**Дискуссии**» предоставляет авторам возможность опубликовать комментарии, критические замечания и иные соображения по поводу напечатанных ранее на страницах журнала работ, выступить с новой гипотезой. Раздел носит полемический характер и печатает ответные реплики затронутых в публикациях сторон.

1.4. Журнал индексируется и включен в библиографические базы данных Web of Sciences, Biochemistry and Biophysics Citation Index, Biological Abstracts, BIOSIS Database, Chemical Abstracts, Chemical Titles, Current Contents/Life Science, Excerpta Medica, Index Internationale de Cardiologia, Index Medicus (MEDLINE/Pubmed), International Abstracts of Biological Sciences, The ISI Alerting Service, Science Citation Index, Science Citation Index Expanded, SCOPUS, Compendx; РИНЦ. Журнал включен в Перечень рецензируемых научных изданий ВАК.

1.5. Правила для авторов и информацию о журнале можно найти на сайтах журнала <http://protein.bio.msu.ru/biokhimiya> и <https://biochemistrymoscow.com>, а также на порталах издательств Pleiades <https://pleiades.online/ru/journal/biochmsc/> и Springer <https://www.springer.com/journal/10541>. На сайте журнала на английском языке представлены содержания всех выпусков, начиная с 1996 г., с резюме статей, ключевыми словами и адресами авторов, а также в полном объеме – тематические выпуски журнала, посвященные наиболее актуальным проблемам биохимии.

1.6. Импакт-фактор Biochemistry (Moscow) в 2020 г. составил 2.487, импакт-фактор РИНЦ для «Биохимии» – 3.038. По данным Scopus журнал

находится во 2-й квартили (Q2) среди журналов биохимического и медико-биологического профилей.

1.7. Для увеличения охвата читательской аудитории и повышения цитируемости своей работы вы можете опубликовать статью в Biochemistry (Moscow) в режиме открытого доступа (Open Access). Вся информация о публикации статьи в свободном доступе можно найти на сайте издательства: <https://pleiades.online/ru/authors/openaccess/> или обратившись в редакцию.

2. Порядок подачи рукописей

2.1. Редакция принимает на рассмотрение рукописи, присланные по электронной почте в форме присоединенных файлов (attachment) на адреса редакции: editorial@biochemistrymoscow.com или ozrina@bio.chem.msu.ru, а также поданные через Авторский портал издательства: <https://publish.sciencejournals.ru>.

2.2. Материал статьи – текст, включая резюме на русском и английском языках, список литературы, рисунки с подписями и таблицы – оформляется одним файлом; каждый рисунок дополнительно оформляется отдельным файлом. Если пересылаемый материал велик по объему, следует использовать программы для архивирования.

Все страницы рукописи, в том числе содержащие список литературы, таблицы и подписи к ним, следует пронумеровать; строки также следует последовательно пронумеровать.

На отдельной странице прилагаются сведения об авторах с указанием адресов, контактных телефонов, факса и электронной почты, а также указывается автор, ответственный за переписку с редакцией и работу с корректурой.

2.3. Одновременно с русским желательно представить аутентичный английский вариант рукописи.

2.4. При подаче рукописи авторам следует прислать в редакцию **сопроводительное письмо**, в котором надо указать, что: 1) представленный материал (или его части) не был ранее нигде опубликован и не находится на рассмотрении на предмет публикации в других изданиях; 2) авторы ознакомились с этическими нормами, предписанными международными соглашениями о публикациях научных статей, и соблюдают их; 3) авторами представлена информация о потенциальных конфликтах интересов; 4) авторы оз-

накопились с правилами проведения исследований с участием человека и/или животных и соблюдают их; 5) каждый соавтор сообщает о своем согласии на авторство в статье (см. соответствующие Положения на сайтах журнала и на порталах Springer и Pleiades).

3. Требования к оформлению рукописей

3.1. Текст статьи должен быть изложен по возможности сжато и тщательно отредактирован, но без ущерба для ее понимания и воспроизведения результатов.

3.2. Рукопись должна быть построена следующим образом: 1) индекс УДК; 2) заглавие; 3) инициалы и фамилии авторов; 4) полные названия учреждений, индекс, город и электронная почта (аффилиация); 5) резюме на русском языке; 6) ключевые слова; 7) краткое заглавие статьи (колонтитул); 8) текст статьи, включающий список цитированной литературы, таблицы, подписи к рисункам; 9) резюме на английском языке (с переводом названия статьи, фамилий авторов, аффилиации и ключевых слов).

Индекс УДК (уникальной десятичной классификации) выделяется *курсивом* и ставится в верхнем левом углу первой страницы.

Заглавие должно быть максимально кратким, информативным и без сокращений.

Если авторы статьи являются сотрудниками разных учреждений, то учреждения следует пронумеровать и после каждой *фамилии* надстрочным знаком указать соответствующий номер; звездочкой справа от цифры необходимо отметить автора, ответственного за переписку с редакцией. Для каждого из авторов приводится полное название учреждения с индексом, городом и страной; для автора, ответственного за переписку, указывается также адрес электронной почты. Авторы, внесшие равный вклад в работу, обозначаются знаком решетки (#).

Резюме должно быть кратким (не более 250 слов), сжато и ясно описывающим основные конкретные результаты работы и вытекающие из них выводы.

Ключевых слов – не более 15.

При использовании нестандартных сокращений должен быть добавлен раздел *Принятые сокращения*.

Текст экспериментальной статьи следует разбить на разделы: 1) Введение, 2) Материалы и методы, 3) Результаты исследования, 4) Обсуждение результатов (объединенный раздел «Результаты и их обсуждение» допускается в тех случаях, когда обсуждение невелико по объему),

5) Заключение, 6) Список литературы, 7) Резюме на английском языке.

Во *введении* кратко излагается история вопроса с обязательным рассмотрением работ, в которых аналогичные или близкие исследования уже проводились, и формулируется цель исследования.

Основное требование к изложению *методов исследования* состоит в том, чтобы процедуры были описаны максимально кратко, но по описанию можно было воспроизвести эксперименты; сюда же должны быть включены использованные в работе материалы, реактивы и приборы с указанием фирмы и страны-производителя, например: глицерин («Sigma-Aldrich», США), электронный микроскоп JEM 100C («JEOL», Япония). Только новые методы следует детально описывать; на ранее опубликованные и общеизвестные достаточно сослаться в списке литературы, указав автора и/или название метода (например, концентрацию белка определяли по методу Бредфорда [7]). Если метод известен не слишком широко, желательно изложить его принцип и указать автора. **Не допускаются** ссылки на методы по типу «нуклеазу измеряли методом [7]» или «по [7]» (ссылка не может быть самостоятельным членом предложения).

Результаты исследования обычно представлены рисунками и таблицами; те эксперименты, которые не нуждаются в документации, описываются в тексте. В этом разделе не следует приводить обсуждение результатов, можно ограничиться объяснением причинно-следственных связей между описываемыми экспериментами.

Раздел «*Обсуждение результатов*» должен содержать интерпретацию результатов (но не их повторение) и сравнение с ранее опубликованными результатами. Желательно основные результаты иллюстрировать простой и наглядной схемой.

В случае необходимости рукопись завершается *заключением*, которое отделяется от раздела «Обсуждение результатов» отбивкой.

В связи с участием журнала в международном Комитете по этике публикаций (Committee on Publication Ethics – COPE) авторам следует внести в конце статьи несколько фраз, демонстрирующих приверженность международным этическим стандартам. Ниже приведены образцы представления соответствующих разделов в заключительной части статьи.

1) Следует описать вклад каждого из авторов в работу и подготовку рукописи (раздел «Вклад авторов»). Например: А.Б. Иванов и В.Г. Петров – концепция и руководство работой; Д.Е. Сидоров и З.И. Дроздов – проведение экспериментов; А.Б. Семенов и В.Г. Петров – об-

суждение результатов исследования; С.И. Холодов и В.Г. Антонов – написание текста; А.Б. Иванов, В.Г. Петров, А.Б. Семенов – редактирование текста статьи.

2) Если работа выполнена при поддержке какой-либо организации, в разделе «Финансирование» следует указать, каким фондом и грантом поддержано данное исследование и каждая часть работы в отдельности, если источники финансирования разные. Следует приводить полные названия институтов и организаций-спонсоров.

3) В разделе «Благодарности» по желанию авторов сообщается информация о любой помощи в проведении работы и подготовке статьи: о полезных обсуждениях и дискуссиях, благодарности коллегам; о предоставлении материалов, научных данных, компьютерного оборудования, приборов; о проведении исследований в центрах коллективного пользования; о помощи в технической подготовке текста.

4) В разделе «Конфликт интересов» авторы заявляют о наличии или отсутствии конфликта интересов в финансовой или какой-либо иной сфере. Данный раздел является обязательным.

5) Обязательным является также раздел «Соблюдение этических норм». Если исследования проводились на животных, то в данном разделе указывается: «Все процедуры, выполненные в исследованиях с участием животных, соответствовали этическим стандартам учреждения, в котором проводились исследования, и утвержденным правовым актам РФ и международных организаций».

Если исследования проводились с участием людей, то в разделе «Соблюдение этических норм» указывается: «Все процедуры, выполненные в исследованиях с участием людей, соответствуют этическим стандартам национального комитета по исследовательской этике и Хельсинкской декларации 1964 года и ее последующим изменениям или сопоставимым нормам этики. От каждого из включенных в исследование участников было получено информированное добровольное согласие».

Если в статьях не содержится описания исследований с участием людей или использованием животных и выполненных кем-либо из авторов, в разделе «Соблюдение этических норм» указывается: «Настоящая статья не содержит описания выполненных авторами исследований с участием людей или использованием животных в качестве объектов».

6) Если статья содержит персональную информацию об участниках исследования, то необходимо включить следующее положение в раздел «Информированное согласие»: «От всех участников, чья персональная информация со-

держится в этой статье, получено дополнительное письменное добровольное согласие».

Список цитируемой литературы должен быть максимально кратким (не более 150 ссылок), но содержащим ссылки на все принципиально важные последние публикации по данному вопросу. В журнале принята последовательная нумерационная система цитирования, т.е. по ходу изложения указывается порядковый номер процитированного источника (в квадратных скобках), соответствующий номеру в Списке литературы. Авторам следует очень внимательно проверить последовательность нумерации ссылок в тексте и соответствие номера каждой ссылки в тексте и списке литературы. **Не допускается** включение в список литературы ссылок на веб-сайты, необходимо ссылаться на публикации авторов, предлагающих эти электронные ресурсы (программы/базы данных). Если такие публикации отсутствуют, ссылается в тексте так же, как на другие неопубликованные материалы (например, База данных структур бактериальных углеводов, <http://csdb.glycoscience.ru/bacterial>).

Ссылки на **неопубликованные** данные не допускаются. Можно сослаться на личное сообщение кого-либо, в таком случае необходимо указать инициалы и фамилию источника, а также место работы.

Следует избегать появления **дублированных** ссылок в списке литературы, а также ссылок на **отозванные** статьи.

Список литературы печатается как отдельный раздел рукописи с указанием фамилий и инициалов всех авторов, названия цитируемой статьи и выходных данных. Кроме этого, желательно дать DOI статьи. Ниже приводятся примеры ссылок на журналы, книги, сборники, диссертации.

1. Beltrami, C., Besnier, M., Shantikumar, S., Shearn, A. I. U., Rajakaruna, C., et al. (2017) Human pericardial fluid contains exosomes enriched with cardiovascular-expressed microRNAs and promotes therapeutic angiogenesis, *Mol. Ther.*, **25**, 679-693, doi: 10.1016/j.ymthe.2016.12.022.

2. Sloan-Dennison, S., and Schultz, Z. D. (2018) Label-free plasmonic nanostar probes to illuminate *in vitro* membrane receptor recognition, *Chem. Sci.*, **10**, 1807-1815, doi: 10.1039/c8sc05035j.

3. Анисимов В. Н. (2008) *Молекулярные и физиологические механизмы старения*, Наука, СПб.

4. Sambrook, J., and Russell, D. W. (2001) *Molecular cloning: a laboratory manual*, Cold Spring Harbor, Cold Spring Harbor Laboratory Press, N.Y.

5. Tanphaichitr, V. (2001) in *Handbook of vitamins* (Rucker, R., and Suttie, J., eds), Marcell Dekker, N.Y., pp. 275-316.

6. Гендролис А. А., Серебрянников Н. В., Гандель В. Г. (1978) В кн. *Простагландины* (под ред. Ажгихина И.С.), Медицина, Москва, с. 332-347.

7. Гандельман О. А. (1992) *Кинетика и механизм биолюминесцентного окисления люциферина светляков*. Дис. канд. хим. наук, МГУ, Москва.

8. Rosenkranz, A. A., Slastnikova, T. A., Durymanov, M. O., and Sobolev, A. S. (2013) Malignant melanoma and melanocortin 1 receptor, *Biochemistry (Moscow)*, **11**, 1228-1237, doi: 10.1134/S00062979-13110035.

Для авторов, использующих систему EndNote, редакция предоставляет стиль, который поддерживает форматирование цитат в тексте и список литературы. Стилиевой файл можно найти на сайтах журнала <http://protein.bio.msu.ru/biokhimiya> и <https://biochemistrymoscow.com> в разделах для авторов.

В конце статьи дается *резюме на английском языке*, являющееся аутентичным переводом заглавия статьи, инициалов и фамилий авторов в английской транскрипции, названий учреждений с индексами, названиями городов и адресами электронной почты, текста аннотации и ключевых слов.

3.3.1. Объем экспериментальной статьи, включая список литературы, таблицы, рисунки (3 рисунка считаются за 1 страницу) и подписи к ним, резюме на английском языке, не должен превышать 20 машинописных страниц, количество рисунков — не более 8; **краткое сообщение** — не более 12 страниц (включая не более 4 рисунков и/или таблиц); **мини-обзор** — не более 16 страниц (включая не более 5 рисунков); **обзор** — не более 35 страниц (включая не более 8 рисунков); сообщения в разделе «**Дискуссии**» — до 4 страниц.

3.3.2. Текстовые файлы следует представлять в формате Microsoft Word (версия 6.0 и более поздние), шрифты для основного текста — Times New Roman и Symbol, размер букв 12, полтора интервала, в одну колонку без выравнивания по правому краю, без переноса слов, с полями 3 см с левой стороны, на странице — не более 30 строк.

Для оформления текста можно использовать курсив, полужирные начертания, подстрочные и надстрочные индексы, греческие и математические символы (шрифт Symbol) в соответствии со стилевым оформлением журнала.

Стиль оформления текстового материала должен быть простым: **без запрограммированных заголовков, вставок, шаблонов, ссылок на литературные источники (гиперссылок)**; без увеличения межстрочных и межбуквенных интервалов; без

использования шаблонов — в окне «стиль» должно быть «обычный»). Особенно это относится к «Списку литературы», т.к. запрограммированные порядковые номера при переносе в издательскую программу исчезают.

Авторы не должны использовать такие функции программы Word, как «Закладка», «Примечание», «Сноска», «Концевая сноска», потому что они неправильно интерпретируются издательской программой. Если в тексте встречается сноска (или концевая сноска), то сразу после предложения или абзаца с ее номером, следует набрать «{Footnote}», т.е. «{Сноска}», и далее непосредственно текст сноски.

Если при подготовке статьи была использована функция «Рецензирование», то перед сохранением файла нужно отменить функцию «Рецензирование» и затем использовать функцию «Принять все изменения в документе».

3.3.3. Таблицы следует приводить в тех случаях, когда данные не могут быть приведены в тексте.

Каждая таблица оформляется на отдельной странице и имеет свой заголовок. Колонки в таблице должны быть озаглавлены, с указанием через запятую размерности приводимых величин. Необходимо стремиться к максимальной краткости заголовков колонок, не давать величин, легко выводимых из имеющихся (например, разность или проценты). Повторение одних и тех же данных в тексте, в таблицах или на рисунках не допускается.

Таблицы принимаются только в формате Word (doc, docx). Если таблицы содержат графические вставки, эти вставки следует прислать в виде отдельных графических файлов высокого качества.

3.3.4. Рисунки с подрисуночными подписями следует располагать в тексте по месту ссылки на каждый рисунок. Кроме того, рисунки должны быть представлены в виде отдельных файлов, удовлетворяющих следующим требованиям:

— для схем и графиков **без полутоновых вставок**: файлы в формате tiff, jpg или pdf, в черно-белом режиме (Line-art, Black-and-White, Bitmap). Пикселизированные (растровые) рисунки принимаются только в форматах tiff или jpg;

— для **полутоновых рисунков** или графиков **с полутоновыми вставками**: файлы в формате tiff, jpg или pdf, в полутоновом черно-белом режиме (градации серого — Grayscale). Пикселизированные (растровые) рисунки принимаются только в форматах tiff или jpg;

— для **цветных рисунков**: файлы в формате tiff, jpg или pdf, в цветном режиме CMYK (для цветной печати), RGB (для цветных рисунков в электронной версии). Пикселизированные (растровые) рисунки принимаются только в форматах tiff или jpg.

— независимо от типа графики, рисунок должен обладать **высоким реальным разрешением**: не ниже 300 dpi для полутоновых иллюстраций; не ниже 600 dpi для штриховых и смешанных (полутоновых/штриховых) иллюстраций. Пикселизация изображений в форматах растровой графики не должна быть грубой. Линии рисунков должны быть толщиной не менее 3 пунктов (point). Следует избегать чрезмерно мелких обозначений (букв, цифр, значков и т.д.). Пикселизированные (растровые) рисунки не следует вставлять в документ Word или переводить в формат pdf, так как это ухудшает их качество;

— рисунки должны иметь размеры, соответствующие их информативности. Размер рисунка на одну колонку не должен быть менее 8 см; на две колонки — менее 17 см. Рисунки не должны быть чрезмерно крупными;

— векторные иллюстрации не должны содержать точечных закрасок, таких как «Noise», «Black&white noise», «Top noise». Для векторной графики все использованные шрифты должны быть включены в файл;

— шрифты внутри рисунков выбираются из гарнитуры Arial размером 9 пунктов;

— следует избегать сканирования рисунков из книг и других печатных изданий, так как такие файлы дают низкое качество при печати и имеют неоправданно большой размер.

Общие требования к подготовке графиков, диаграмм и формул:

— **график** должен содержать обозначения координатных осей (измеряемый параметр и единица измерения), а также кривых и других деталей. Надписи по осям выполняются вдоль осей шрифтом Arial с заглавной буквы, единица измерения отделяется запятой, а не скобками (например, Объем элюента, мл). Линии внутри рисунка следует пронумеровать (цифры выполняются *курсивом* — 1, 2 и т.д.), и в подрисуночной подписи (не на рисунке) дать пояснения к каждой линии. Экспериментальные точки предпочтительно представлять заштрихованными и незаштрихованными кружками, квадратами, треугольниками, ромбами. Отдельные кривые могут различаться также сплошным или штриховым изображением. Все линии должны быть изображены четко с толщиной линий (обычно 3 пункта), позволяющей уменьшить рисунок до конечного размера в журнале. Координатные оси в большинстве случаев необходимо отображать черными (не серыми) линиями. Фон графика или диаграммы должен быть белым, без линий координатной сетки (за исключением случаев, когда иной цвет фона или наличие сетки необходимы для правильного восприятия);

– на **диаграммах** и **фотографиях** отдельные элементы (столбцы, дорожки геля и пр.) следует пронумеровать *курсивными* арабскими цифрами (1, 2 и т.д.) и в подрисуночной подписи (не на рисунке) дать пояснения к каждой цифре. Если помимо арабских требуется введение римских цифр (I, II, III и т.д.), эти цифры должны быть прямого начертания.

– если рисунок состоит из нескольких частей (диаграмм, графиков, схем, структур белков, фотографий, в т.ч. электрофореграмм), их нужно обозначить строчными *курсивными* буквами (a, б, в и т.д.) гарнитурой Times, размером большим, чем основной текст, и поместить эти буквы в верхних левых углах соответствующих частей. В подрисуночной подписи следует дать пояснение к каждой части рисунка;

– для написания **химических формул** в тексте используется программа ChemWindows;

– длинные и сложные **математические формулы** следует представлять в виде рисунков без подписей в одном из допустимых форматов (pdf, tiff или jpg). Каждую формулу нужно дать отдельным файлом, название которого соответствует номеру формулы; при подготовке данных файлов следует руководствоваться правилами подготовки графических материалов. Функцией «Редактор уравнений» надо пользоваться **только для развернутых уравнений** (как нумерованных, так и встречающихся в тексте), но не для небольших выражений (обозначений), вкрапленных в текст, например, ΔG , $T\Delta S$, K_m . (Для таких небольших выражений должны использоваться основные функции программы Word, как и для всего остального текста статьи.) Для выражений, в которых требуется «кернинг» (нижний и верхний индексы, расположенные один под другим), надо использовать только надстрочные и подстрочные знаки (например, NH_3^+), а «кернинг» будет выполнен макетчиком. Эти требования обусловлены тем, что издательская программа неправильно воспринимает данные, полученные с помощью функции «Редактор уравнений»;

– в ширину формула не должна превышать 8,5 см (ширина колонки журнала). Более длинные формулы должны быть разбиты автором на несколько строк. Формулы должны быть набраны шрифтами Times New Roman и Symbol. В случае если формулы предоставляются в виде пикселизированных (растровых) изображений, они должны быть представлены в черно-белом режиме (Line-art, Black-and-White, Bitmap) в формате tiff или jpg. Такие изображения должны обладать **высоким реальным разрешением** (пикселизация не должна быть грубой). Особое внимание следует уделять качеству графической передачи надписей, цифр и мелких элементов пиксе-

лизированного изображения. Пикселизированные (растровые) изображения не стоит вставлять в документ Word или переводить в формат pdf, так как это зачастую ухудшает их качество;

– **аминокислотные, нуклеотидные и пр. последовательности** часто изображаются в форме, требующей строго вертикального расположения компонентов. Поэтому во избежание ошибок и необходимости проверять большие количества сложной информации авторы должны представлять в редакцию материалы такого рода в виде, пригодном для репродукции.

Обращаем внимание на общие условия публикации иллюстраций:

– надписи и обозначения на рисунках могут меняться в русской и английской версиях при переводе, поэтому для фотографий и рисунков, где надписи наложены на сложный, неоднотонный фон, желательно предоставить второй вариант без текста и всех обозначений, для остальных иллюстраций – располагать надписи на иллюстрации так, чтобы они не соприкасались с другими ее частями. Авторы также могут сами подготовить версии рисунков с английскими надписями;

– рисунок должен иметь заголовок и информативную подрисуночную подпись, делающую его смысл понятным без обращения к тексту – указываются условия, специфические для данного эксперимента; ссылки на основной текст допускаются только чтобы избежать повторов и неясностей;

– цветные иллюстрации публикуются **бесплатно для авторов** в том случае, если они будут размещены **только в электронной версии статьи**, а в печатной версии журнала они будут в черно-белом исполнении. При этом авторы должны иметь в виду, что в печатной версии с черно-белыми рисунками сохранятся подрисуночные подписи из цветной электронной версии, поэтому следует избегать указаний на цвет в подрисуночных подписях. Авторам необходимо подбирать цвета таким образом, чтобы при черно-белой печати не утратилась информативность. Цветные линии графиков желательно размечать обозначениями, цифрами или спецсимволами, или делать различающиеся типы линий для каждого цвета. Цветные области на иллюстрациях желательно размечать различающимися обозначениями или спецсимволами, а не одинаковыми символами разных цветов. Если цветовое разделение областей находится примерно в одном цветовом тоне, то желательно провести тонкую линию границы между ними. При большом количестве цветных областей в схожих цветовых тонах желательно дополнительно обозначить области символами или штриховкой. Все

надписи и обозначения желательно делать не цветными, а черными или белыми, в зависимости от подложки;

– если электронная версия статьи содержит несколько цветных рисунков, в печатной версии возможна платная публикация всех этих рисунков в цвете, либо бесплатная публикация всех этих рисунков в черно-белом исполнении. Публикация в печатной версии только части цветных рисунков в цветном исполнении невозможна;

– подготовленные рисунки желательно распечатать, чтобы убедиться, что они хорошо выглядят в напечатанном виде: все элементы рисунка должны быть хорошо видны на распечатке, фон должен быть чистым, надписи и цифры должны легко читаться. Зачастую бывает достаточно сложно оценить качество рисунка только по тому, как он выглядит на экране компьютера.

– если авторы используют в своей рукописи иллюстрации или таблицы из других публикаций (в том числе своих собственных), то им необходимо запросить у правообладателей этих публикаций разрешение на перепечатку или использование материалов.

Несоблюдение правил подготовки графического материала приводит к необходимости переработки рисунков авторами и задержке публикации рукописи.

3.3.5. Дополнительные материалы к статьям.

Для более полного описания исследования к статье могут прилагаться дополнительные материалы (аудио- и видеофайлы, презентации, дополнительные таблицы, рисунки и пр.) при условии, что автор является правообладателем данных материалов, и автором ранее не были переданы авторские права на их использование иным (кроме издателя) лицам, либо автор имеет письменное разрешение правообладателя на их использование в целях опубликования и распространения в журнале. Дополнительные материалы должны быть законченным произведением. Не допускается выносить в дополнительные файлы материалы, критически важные для понимания статьи. Дополнительные материалы не правятся и не обрабатываются, публикуются в исходном авторском исполнении. Файлы дополнительных материалов должны именоваться по порядку, например, «ESM_1.jpg», «ESM_2.pdf», «ESM_3.xls». В тексте статьи должна быть указана ссылка на наличие дополнительных материалов («...дополнительные данные приведены в Online Resource 1», «...как показано в таблице Online Resource 2»). Дополнительные материалы являются частью статьи,

на которую распространяются все правила и требования, предъявляемые к основному тексту. Дополнительные материалы публикуются только в электронной версии журнала на сайтах <https://www.springer.com>, <http://protein.bio.msu.ru/biohimiya/> и <https://biochemistrymoscow.com>.

3.3.6. Все физические величины рекомендуются приводить в международной системе СИ.

3.3.7. Физико-химические символы в тексте, структурные формулы органических соединений и математические формулы должны быть набраны на компьютере. В буквенных обозначениях отношений единиц в качестве знака деления следует применять косую черту, например, моль/с (моль в секунду). В более сложных выражениях одновременно с косой чертой применяют скобки, чтобы избежать двусмысленности: $a/(bc)$, но не $a/b/c$ или a/bc ; $(a/b)c$, но не $a/b \cdot c$. Отношения можно также представить в виде произведения символов единиц, возведенных в степень (положительную и отрицательную), например, моль \cdot с⁻¹. Не допускаются выражения типа мА/гель, мкмоль/мин \cdot мг белка и т.п. В таких случаях следует писать: мА на 1 столбик геля, мкмоль/мин на 1 мг белка и т.п.

3.3.8. При подготовке статьи необходимо учесть правила использования символов, сокращений, условных обозначений и пр., рекомендованные Комиссией по биохимической номенклатуре Международного союза биохимии и молекулярной биологии (<https://iubmb.org>). Сокращенные обозначения, приведенные в настоящих правилах, можно применять без специальной расшифровки (определения). Символы и сокращения, не указанные в приведенном списке, подлежат определению на первой странице, подстрочно, под заголовком «Принятые сокращения».

Следует помнить, что сокращения создают помехи для читателя, поэтому их применение должно быть сведено к минимуму. Ясность и недвусмысленность важнее краткости. С другой стороны, применение сокращений названий веществ и других терминов в ряде случаев представляется оправданным, в особенности в уравнениях, таблицах, на рисунках.

Названия простых веществ можно заменить их формулами, например, NaCl вместо «хлорид натрия», CH₃COOH или AcOH вместо «уксусная кислота». При составлении сокращенных обозначений веществ следует широко пользоваться стандартными химическими символами (C, H, O, P, S, Na, Cl и т.д.), тривиальными названиями (фолат и т.п.) и их символами (Me – метил, Pr – пропил, Ac – ацетил и т.д.).

Для обозначения аминокислотных остатков в полипептидах и белках рекомендуется использовать одно- или трехбуквенные символы:

Аланин	Ala	A
Аргинин	Arg	R
Аспарагин	Asn	N
Аспарагиновая кислота	Asp	D
Аспарагиновая кислота или аспарагин	Asx	B
Валин	Val	V
Гистидин	His	H
Глицин	Gly	G
Глутамин	Gln	Q
Глутаминовая кислота	Glu	E
Глутаминовая кислота или глутамин	Glx	Z
Изолейцин	Ile	I
Лейцин	Leu	L
Лизин	Lys	K
Метионин	Met	M
Пролин	Pro	P
Серин	Ser	S
Тирозин	Tyr	Y
Треонин	Thr	T
Триптофан	Trp	W
Фенилаланин	Phe	F
Цистеин	Cys	C

Макромолекулы, построенные из повторяющихся единиц, могут быть обозначены с помощью приставки «поли» или подстрочного индекса *n*. Например, полилизин можно обозначить как поли(Lys) или (Lys)_{*n*}; полимер, построенный из чередующихся остатков аланина и лизина, — поли(Ala–Lys) или (Ala–Lys)_{*n*}; аналогичный полимер со случайным распределением остатков аланина и лизина — поли(Ala, Lys) или (Ala, Lys)_{*n*}. Индекс *n* можно заменить числом — средним, например, (Lys)₁₀, или с указанием пределов, например, (Lys)_{8–12}.

При трехбуквенном обозначении аминокислотных остатков белков следует использовать прямые буквы, из которых первая — заглавная, а остальные — строчные. Аминокислотные остатки с номером в последовательности следует приводить в виде Asn223.

Согласно правилам генетической номенклатуры для написания **генов** используют в основном трехбуквенное обозначение латинскими буквами, написанными **курсивом** (*Italic*) (кроме дрозофилы и некоторых других организмов). Соответствующие продукты (белки) обозначают заглавными буквами прямого начертания. У **прокариот** нормальные гены обозначают строчными буквами со знаком «плюс» в верхнем индексе (например, *proA*⁺); мутантные гены — также строчными буквами с номером мутации (например, *proA22*). У **эукариот** нормаль-

ные гены обозначают заглавными буквами (например, *LEU2*), мутантные — строчными буквами с номером мутации, если необходимо (например, *leu2–3*).

При описании в статье новой последовательности гена **необходимо предварительное депонирование ее** в базе данных **GenBank** или другой публично доступной базе данных.

Символы, используемые для моносахаридов:

Арабиноза	Ara
2-Дезоксирибоза	dRib
Галактоза	Gal
Глюкоза	Glc
Ксилоза	Xyl
Манноза	Man
Рибоза	Rib
Фруктоза	Fru
Фукоза	Fuc
Глюкозамин, N-ацетилглюкозамин	GlcN, GalNAc
Галактозамин, N-ацетилгалактозамин	GalN, GlcNAc
Нейраминавая, N-ацетилнейраминавая кислота	Neu, NeuAc

Если необходимо указать — фураноза или пираноза, — следует написать курсивом буквы *f* или *p* после символа моносахарида, например, Rib*f* — рибофураноза.

Для нуклеозидов, нуклеотидов и полинуклеотидов используются следующие символы:

Аденозин	A
Гуанозин	G
Инозин	I
Ксантозин	X
Рибозилтимин	T
Уридин	U
Аденозин-5'-моно-, ди- и трифосфаты	AMP, ADP, ATP
Гуанозин-5'-моно-, ди- и трифосфаты	GMP, GDP, GTP
Оротидин-5'-моно-, ди- и трифосфаты	OMP, ODP, OTP
Риботимидин-5'-моно-, ди- и трифосфаты	гTMP, гTDP, гTTP
Уридин-5'-моно-, ди- и трифосфаты	UMP, UDP, UTP
Цитидин-5'-моно-, ди- и трифосфаты	CMP, CDP, CTP

Соответствующие дезоксирибонуклеотиды обозначаются добавлением латинской строчной буквы d перед трехбуквенным символом, например, dATP, dGTP и т.д.

Обозначение изомеров AMP: 2'-AMP, 3'-AMP, 5'-AMP, 3' : 5'-AMP (аденозин-3' : 5'-монофосфат, сAMP).

Ниже приведены символы, используемые для нуклеиновых кислот:

Дезоксирибонуклеиновая кислота	ДНК
Комплементарная ДНК	кДНК
Митохондриальная ДНК	мтДНК
Рибонуклеиновая кислота	РНК
Митохондриальная РНК	мтРНК
Матричная (информационная) РНК	мРНК
Рибосомная РНК	рРНК
Транспортная РНК	тРНК
тРНК с указанием акцепторной специфичности	тРНК ^{Ala} , тРНК ^{Glu} и т.д.
Изоакцепторная РНК	тРНК ₁ , тРНК ₂ и т.д.
Аминоацилпроизводные тРНК	Ala ^t РНК, Glu ^t РНК и т.д.

Полифосфоинозитиды и продукты их гидролиза рекомендуется обозначать следующими символами:

Фосфатидил	Ptd
Инозитид	Ins
Фосфат	P

Для названия ферментов допускаются сокращения (с пояснением в сноске «Принятые сокращения») типа Г6ФДГ (глюкозо-6-фосфатдегидрогеназа); нет возражений против замены названия субстрата, входящего в тривиальное наименование фермента, стандартной аббревиатурой, например, АТРаза, Glu-декарбоксилаза и т.п. Прочие сокращения, не требующие специальной расшифровки:

БСА	бычий сывороточный альбумин
ДЭАЭ-целлюлоза	диэтиламиноэтилцеллюлоза
КМ-целлюлоза	О-карбоксиметилцеллюлоза
ПААГ	полиакриламидный гель
ТХУ	трихлоруксусная кислота
ЭГТА	этиленгликоль-бис-(аминоэтилэфир)тетраацетат
ЭДТА	этилендиаминтетраацетат
СоА, СоASH	коэнзим А
Ацил-СоА	ацилкоэнзим А
Ds-Na	додецилсульфат натрия
FAD, FADH ₂	флавинадениндинуклеотид и его восстановленная форма
FMN, FMNH ₂	рибофлавин-5'-фосфат и его восстановленная форма
GSH, GSSG	глутатион и его окисленная форма
G-белок	гуаниннуклеотидсвязывающий регуляторный белок

IgG	иммуноглобулин G
NAD, NAD ⁺ , NADH	никотинамидадениндинуклеотид, его окисленная и восстановленная формы
NADP, NADP ⁺ , NADPH	никотинамидадениндинуклеотидфосфат, его окисленная и восстановленная формы
P _i	неорганический фосфат
PP _i	неорганический пиррофосфат
POPOP	1,4-бис-(5-фенилоксазоллил-2)-бензол
PPO	2,5-дифенилоксазол
Q, QH ₂	убихинон, убихинол

Термины, обозначающие групповые понятия (жирные кислоты, белок, вирус и т.п.), а также краткие термины (фолат, фуран и т.п.) **не сокращаются. Не следует сокращать** понятия типа «красные кровяные клетки», «внеклеточная жидкость», а также названия тканевых препаратов, буферов, суспензионных сред.

Стандартные экспериментальные физико-химические методы и связанные с ними термины могут быть обозначены в тексте общепринятыми аббревиатурами из заглавных букв русского алфавита: ДОВ – дисперсия оптического вращения, КД – круговой дихроизм, ГЖХ – газожидкостная хроматография, ЖХВД – жидкостная хроматография высокого давления, ИК- и УФ-спектроскопия – инфракрасная и ультрафиолетовая спектроскопия, ТСХ – тонкослойная хроматография, ЭПР – электронный парамагнитный резонанс, ЭСР – электронный спиновый резонанс, ЯМР – ядерный магнитный резонанс, Ds-Na-ПААГ-электрофорез – электрофорез в полиакриламидном геле в присутствии додецилсульфата натрия.

Также не требуют специальной расшифровки общепринятые сокращения ПЦР (полимеразная цепная реакция) и ИФА (иммуноферментный анализ).

3.3.9. Номенклатура веществ, меченных изотопами. Символ изотопа помещается в квадратных скобках перед названием соединений (без пробела): [¹⁴C]мочевина, [α -¹⁴C]лейцин, L-[метил-¹⁴C]метионин. Если соединение содержит больше одного атома изотопа, и позиция этих атомов не указывается, то число атомов изотопа обозначается подстрочным индексом справа от символа: [¹⁴C₂]гликолевая кислота. Символом U обозначается равномерное распределение метки: запись [U-¹⁴C]глюкоза означает, что изотоп ¹⁴C распределен равномерно между всеми шестью положениями. Символ G указывает, что все позиции содержат изотоп, но его распределение между позициями необязательно равномерно:

[G-¹⁴C]глюкоза. В последнем случае достаточно писать: [¹⁴C]глюкоза.

Приставка, указывающая изотоп, ставится перед той частью названия вещества, к которой она относится: йод[¹⁴C]уксусная кислота, 1-амино-[¹⁴C]метилциклопентанол (H₂N¹⁴CH₂C₅H₈OH), фруктозо-1,5-[1-³²P]дифосфат. Термины типа [¹³¹I]-меченный альбумин не следует сокращать до [¹³¹I]альбумин, поскольку нативный альбумин не содержит йода; приемлемо обозначение [¹³¹I]йодальбумин.

Если вещество содержит изотопы нескольких элементов, их символы располагаются в алфавитном порядке: [3-¹⁴C, 2,3-D¹⁵N]серин. Дейтерий можно обозначать символами ²H или D, тритий — ³H или T.

Положение изотопа в соединении следует обозначать арабскими цифрами, греческими буквами или приставками, которые помещаются внутри квадратных скобок перед символом изотопа и отделяются от него дефисом: [1-³H]этанол, L-[α-¹⁴C]лейцин, [карбокси-¹⁴C]лейцин, [3,4-¹⁴C, ³⁵S]метионин, L-[метил-¹⁴C]метионин.

Те же правила применяются и в том случае, если соединения обозначены стандартными символами: [α-³²P]АТР, [³²P]СМР (не СМ³²Р!). Однако радиоактивные неорганические фосфат и пирофосфат можно обозначить ³²P_i и ³²P_{Pi} соответственно.

Изотопы в простых молекулах, написанных формулами, обозначаются без квадратных скобок: ¹⁴CO₂, H₂¹⁸O, D₂O, H₂³⁵SO₄, ³²PO₄³⁻ (но [³²P]фосфат). Квадратные скобки не ставятся, когда символ изотопа присоединяется к словам, не являющимся названием определенного соединения, а также к словам, обозначающим групповые названия соединений: ¹³¹I-меченный, ³H-лиганды, ¹⁴C-стероиды, ¹⁴C-аминокислоты.

При описании результатов экспериментов с использованием изотопов радиоактивность следует, если возможно, выражать в абсолютных величинах — кюри (Ки) или беккерелях (Бк), или распадах/мин (DPM), или имп/мин (CPM).

3.3.10. Ниже приведены рекомендации по оформлению конкретных разделов, принятые в международной биохимической литературе (см. *Biochem. J.*, **289**, 1–15 (1993)).

Животные, растения, микроорганизмы. Для всех экспериментальных животных, кроме обычных лабораторных, следует указывать полные родовое и видовое названия; то же относится и к растениям. Необходимо указать разновидности, штаммы и, если возможно, источник материала. В сообщениях о влиянии изменений в питании приводится состав питательных смесей.

Названия микроорганизмов в резюме и при первом упоминании в тексте должны быть приведены **полностью**, с указанием родового и видового названий и **напечатаны** курсивом (*Italic*); далее по тексту родовое название обозначается одной заглавной (первой) буквой, а видовое печатается полностью. Необходимо указать номер в коллекции, из которой получены микроорганизмы, или номер штамма (прямым начертанием). Если обсуждаются два рода с одинаковой первой буквой, можно использовать сокращения типа *Strep.* и *Staph.*; если в тексте речь идет о семействах (например, эубактерии, молочнокислые бактерии) или о роде в целом (например, стафилококковые), то соответствующие названия печатаются обычным шрифтом.

Центрифугирование. Если условия центрифугирования имеют решающее значение, то следует сообщить необходимые сведения, позволяющие воспроизвести эксперимент: описание центрифужного ротора, количественный состав сус-пензионной среды, температуру процесса, время работы ротора с постоянной скоростью (исключая время на разгон и торможение), скорость центрифугирования в единицах g, приведенную к усредненному радиусу вращения столбика жидкости. Например, «центрифугирование проводили в течение 15 мин при 2 °C и 10 000 g (*r*_{cp} 8 см)».

При центрифугировании в градиенте плотности нужно указать тип использованной центрифуги и ротора, температуру, состав градиента. Результаты лучше всего представлять в виде зависимости от расстояния до центра ротора, а не от номера фракции; в таком случае не обязательно указывать верхнюю и нижнюю части градиента. Если используются номера фракций, то верх и низ градиента должны быть отмечены.

Ультрацентрифугирование описывается следующими символами и единицами: коэффициент седиментации (не константа) — *s*; коэффициент седиментации при нулевых концентрациях в воде при 20 °C — *s*_{20,в}⁰; единицы Сведберга — (10⁻¹³ с) — *S*; удельный объем частицы — *v*; коэффициент диффузии — *D*, коэффициент диффузии в воде при 20 °C — *D*_{20,в}⁰. Нужно указывать температуру, при которой проводились седиментация и диффузия.

Хроматография. Фотографии и рисунки бумажных и тонкослойных хроматограмм публикуются только тогда, когда несут информацию, которую сложно описать в тексте. Скорость движения вещества относительно фронта растворителя в бумажной или тонкослойной хроматографии описывается величиной *R_f*. Соотношение смеси растворителей лучше всего описывать так: бутан-1-ол : CH₃COOH : H₂O (4 : 4 : 1, по объему).

Диаграммы элюирования для колоночной хроматографии должны быть представлены так, чтобы объем элюента возрастал слева направо. Единицы концентрации и объема должны быть указаны. Следует также приводить размеры колонок и, если возможно, ее свободный объем (V_0). Максимум пика элюции характеризуется величиной V_e (объем элюции) или, лучше, коэффициентом распределения (α или K_D). Калибровочные кривые для колонок (зависимость распределения молекулярных масс от V_e или K_D) не представляются.

Электрофорез. Фотографии электрофоретического разделения в гелях публикуются, если содержат важную информацию. В тексте должны быть оговорены состав среды, pH, температура, электрофоретические подвижности (m), рабочее напряжение. Для обозначения изоэлектрических точек используется символ pI.

Ферменты. В вопросах номенклатуры ферментов авторам следует придерживаться рекомендаций последнего издания «Enzyme Nomenclature» (Acad. Press, San Diego, New York, 1992) с учетом дополнений (<http://www.enzyme-database.org/news.php>). Упоминание фермента необходимо сопровождать его номенклатурным номером. В каждой статье следует оговаривать единицы количества ферментов, что может быть сделано в терминах скорости реакции, катализируемой в определенных условиях. Единица СИ для скорости составляет 1 моль превращенного субстрата (или 1 моль образующегося продукта) в 1 секунду. Это значение скорости соответствует единице количества фермента, называемой katal (символ — kat). За единицу активности фермента также можно принять его количество, обеспечивающее иную скорость реакции, например, 1 мкмоль субстрата в 1 мин.

При определении концентрации белков часто используют стандартные белковые растворы (например, БСА); в таких случаях следует указать тип белка, его источник и, если возможно, влажность.

Константы скорости прямых и обратных реакций в многостадийном ферментативном процессе следует обозначать k_{+n} и k_{-n} соответственно. Константа Михаэлиса (K_m) определяется как концентрация субстрата ($[S]$), при которой $v = V/2$, где $V(V_{max})$ — скорость реакции в условиях насыщения фермента субстратом, v — скорость образования продукта или расходования субстрата. Если в реакции участвуют два субстрата — А и В, то $K_m^A = [A]$ при $v = V/2$ и $[B]$, стремящейся к бесконечности; значение $[A]$ при $v = V/2$ и конечной концентрации В, которая должна быть указана, следует называть кажущейся константой Михаэлиса для А ($K_m^{A \text{ каж}}$). В

ферментативной кинетике используются также понятия: K_s — константа диссоциации фермент-субстратного комплекса, K_i — константа диссоциации фермент-ингибиторного комплекса, $[I]_{50}$ — концентрация ингибитора, вызывающая полумаксимальное торможение реакции, h — коэффициент Хилла — параметр уравнения Хилла, используемого для описания негерперболических зависимостей v от концентрации субстрата или модификатора (см. также рекомендации по символам и терминологии в ферментативной кинетике в «Arch. Biochem. Biophys.» за 1983 г. (224, 732–740)).

Количество вещества, молекулярная масса и дальтон, молярная концентрация. В Международной системе единиц СИ за единицу количества вещества (n) принят моль — количество вещества, содержащее столько же структурных единиц (молекул, атомов, ионов, электронов или др.), сколько атомов углерода содержит 0,012 кг углерода¹² (постоянная Авогадро $N_A = 6,02 \cdot 10^{23}$ 1/моль показывает число структурных единиц в 1 моле любого вещества). Молярная масса (M) — масса 1 моля вещества (m/n), имеет размерность г/моль или кг/моль. Ясно, что масса вещества (m , г), количество вещества (n , моль) и молярная масса (M , г/моль) — понятия разные и между ними существует простое соотношение: $m = nM$. Для обозначения массы биохимических объектов преимущественно используют величины относительной молекулярной массы (M_r , прежнее наименование — «молекулярный вес») — отношение массы молекулы вещества к 1/12 массы атома углерода¹², следовательно, величина безразмерная, и молекулярной массы — массы одной молекулы вещества, выраженной в дальтонах (Да — дальтон — 1/12 массы атома углерода¹² или M/N_A). Таким образом, про некий белок можно сказать, что он имеет относительную молекулярную массу 50 000 ($M_r = 50\,000$) или молекулярную массу 50 000 Да (лучше 50 кДа). Некорректно выражать M_r в дальтонах, по всей статье следует использовать либо M_r , либо молекулярную массу (кДа).

При описании растворов следует давать **молярную концентрацию** (M , mM, мкМ и т.д.), показывающую, сколько молей вещества содержится в 1 л раствора, но не **нормальную** концентрацию (н.). Концентрацию указывают в десятичной системе (0,25 М HCl). Использование процентных выражений концентрации следует уточнять дополнением: m/m или m/V или V/V , например, 5%-ный раствор (m/V) означает 5 г на 100 мл. Для растворов солей, выраженных в процентах, следует указывать, были ли использованы кристаллогидраты или безводные соли.

Нуклеотидная последовательность. Авторам следует помнить, что последовательность нуклеотидов должна быть определена в обеих цепях ДНК. Для публикации обычно достаточно четкого описания таких определений и наличия полной последовательности.

Степени в таблицах и на рисунках. Часто авторы, желая избежать чисел с большим количеством знаков, в заголовках таблиц или на рисунках используют степени; в таких случаях необходима большая аккуратность. Здесь лучше пояснить примерами: 1) концентрацию 0,00015 М можно записать $15 \cdot 10^{-5}$ М, лучше степень заменить соответствующей приставкой – 0,15 мМ или 150 мкМ; если же речь идет о выражении данной концентрации в таблице или на рисунке, то под заголовком «Концентрация, мМ» следует писать 0,15 или под заголовком «Концентрация, мкМ» – 150, или, если заголовок «Концентрация $\times 10^5$, М», то 15 (но не 15 под заголовком «Концентрация, М $\times 10^5$!»); 2) если значение некоего k равно 0,002, то следует писать 2 под заголовком « $10^3 k$ »; если указано 2 под заголовком « $10^{-3} k$ », то это означает, что k равно 2000; 3) сложные количественные выражения записываются аналогично: выражение $1/[S] = 200 \text{ М}^{-1}$ будет выглядеть как 2 под заголовком « $10^{-2}/[S]$, мМ $^{-1}$ » или как 0,2 под заголовком « $1/[S]$, мМ $^{-1}$ ». Удобно пользоваться квадратными скобками для обозначения концентрации.

Ниже приведены десятичные приставки к единицам измерения и соответствующие символы, которыми рекомендуется пользоваться.

Степень	Приставка	Символ
10^{12}	тера	Т
10^9	гига	Г
10^6	мега	М
10^3	кило	к
10^2	гекто	г*
10	дека	да*
10^{-1}	деци	д*
10^{-2}	санти	с*
10^{-3}	милли	м
10^{-6}	микро	мк
10^{-9}	нано	н
10^{-12}	пико	п
10^{-15}	фемто	ф
10^{-18}	атто	а

* По возможности избегать (за исключением см).

Комбинация приставки и символа единиц измерения считается одним символом и может возводиться в степень без скобок, например, мМ $^{-1}$ и см 2 .

Буферные растворы следует так описывать, чтобы читатель мог воспроизвести условия эксперимента. Полезно бывает дать в разделе «Материалы и методы» или при первом упоминании полный состав буферного раствора, например: 0,09 М CH_3COONa /0,01 М CH_3COOH , рН 5,6 (это означает, что буферная смесь приготовлена из данных компонентов в указанных концентрациях). Далее по тексту можно коротко указать: 0,1 М натрий-ацетатный буфер, рН 5,6 – суммарную концентрацию всех входящих в раствор ионизированных веществ. Если буфер содержит два и более видов ионизированных веществ, например, пиридин и CH_3COOH , то следует указать концентрацию каждого компонента.

Некоторые буферы широко известны по тривиальным названиям, образованным первыми буквами их химических названий, и не нуждаются в расшифровке:

Aces	2-[(2-Амино-2-оксоэтил)амино]этансульфоновая кислота
Ada	[(Карбоимилметил)амино]диуксусная кислота
Bes	2-[Бис-(2-гидроксиэтил)амино]этансульфоно-вая кислота
Bicine	N,N-Бис-(2-гидроксиэтилглицин)
Bistris	2-[Бис-(2-гидроксиэтил)амино]-2-(гидрокси-метил)пропан-1,3-диол
Hepes	4-(2-Гидроксиэтил)-1-пиперазин-этансуль-фоновая кислота
Heppps	4-(2-Гидроксиэтил)-1-пиперазин-пропан-сульфоновая кислота
Mes	4-Морфолин-этансульфоновая кислота
Mops	4-Морфолин-пропансульфоновая кислота
Pipes	1,4-Пиперазин-диэтансульфоновая кислота
Taps	3-[(2-Гидрокси-1,1-бис-(гидроксиметил)-этил)амино]-1-пропансульфоновая кислота
Tes	2-[(2-Гидрокси-1,1-бис-(гидроксиметил)-этил)амино]-1-этансульфоновая кислота
Tricine	N-[2-Гидрокси-1,1-бис-(гидроксиметил)-этил]глицин
Tris	2-Амино-2-гидроксиметилпропан-1,3-диол

Для инкубационных сред типа раствора Кребса–Рингера, среды Игла, среды Веймоуса следует дать ссылку на литературный источник либо указать их состав.

Спектры и данные спектроскопии. Полные спектры печатаются только в тех случаях, если они содержат новую или важную информацию. Спектры поглощения в УФ- и видимой областях, флуоресценции, кругового дихроизма и дисперсии оптического вращения должны иметь шкалу длин волн (в нм или мкм). По возможности при описании поглощения, оптического вращения или кругового дихроизма нужно пользоваться терминами молярности. Как указыва-

лось выше, аббревиатуры методов ДОВ, КД, ЭПР, ЭСР, ЯМР являются общепринятыми и не требуют расшифровки.

Видимая и УФ-абсорбционная спектроскопия. Величина $\lg(I_0/I)$ характеризует оптическую плотность раствора; если рассеянием и отражением можно пренебречь, то эта величина практически характеризует поглощение. Если рассеяние учитывается, например, при количественной оценке клеточной плотности в культуре, следует употреблять более общий термин – пропускание (T). В других случаях используется термин «поглощение» (абсорбция, A), но не «экстинкция» или «оптическая плотность». Принятые символы: A – поглощение ($\lg(I/I_0)$), a – удельный коэффициент поглощения (л/г на 1 см), иногда используют $A^{1\%_{\text{см}}}$; ε – молярный коэффициент поглощения (численно равен поглощению 1 М раствора в кювете с длиной оптического пути 1 см), можно использовать единицы л/моль на 1 см или $\text{M}^{-1} \cdot \text{см}^{-1}$, но не $\text{см}^2 \cdot \text{моль}^{-1}$. Длины волн (нм), при которых проводилось измерение, приводят без указания единиц: A_{280} . Знак равенства не пишется между ε или A и численной величиной.

ИК-Спектры приводятся в процентах трансмиссии (T) как функция длины волны (в мкм) или частоты (в см^{-1}).

Оптическое вращение описывается величиной удельного вращения $[\alpha]_{\lambda}^t$, численно равной вращению (в градусах) в растворе с концентрацией 1 г/мл при длине оптического пути 1 дм (10 см), длине волны λ и температуре t . Необходимо указывать концентрацию раствора (г/100 мл) и растворитель, например, $[\alpha]_{420}^{27,5^\circ}$ (2 г на 100 мл метанола). Можно представлять данные в молярном выражении (молярное вращение): $[M] = [\alpha] \cdot M_r$ и $[m] = [\alpha] \cdot M_r/100$.

В случае биополимеров приводят дисперсию оптического вращения за счет усредненного остатка ($[m]_{\text{м.г.в}}$); размерность $[m]$ – град $\cdot \text{см}^2/\text{дмоль}$.

Дисперсия оптического вращения характеризуется как изменение $[\alpha]$ или $[m]$ в зависимости от длины волны или частоты.

Круговой дихроизм описывается величиной молярного адсорбционного коэффициента ($\Delta\varepsilon = \varepsilon_L - \varepsilon_R$, где ε_L и ε_R – коэффициенты поглощения света, поляризованного по кругу влево и вправо) или молярной эллиптичностью $[\theta]_M$. Для биополимеров часто используют молярные концентрации в расчете на усредненный остаток (M_r). Единицы молярного адсорбционного коэффициента – л/моль на 1 см или $\text{M}^{-1} \cdot \text{см}^{-1}$, единицы молярной эллиптичности те же, что для оптического вращения $[m]$ в расчете на усредненный остаток; соотношение между $\Delta\varepsilon$ и $[\theta]_M$ выражается уравнением $[\theta]_M = 3300 \cdot \Delta\varepsilon$.

Флуоресцентная спектроскопия. При описании

спектров возбуждения и излучения флуоресценции (F) следует указывать, является ли спектр относительным, нормализованным или скорректированным (указать способ коррекции). Данные поляризации флуоресценции и спектры описываются величиной степени поляризации P или анизотропии A , обе величины безразмерные.

Статистическая обработка результатов. Данные значительного числа независимых экспериментов должны быть представлены так, чтобы можно было оценить их воспроизводимость и значимость. Если целью работы являлось определение количественных или статистических характеристик популяции, то существенная информация обычно выражается следующим образом: 1) число независимых экспериментов (повторные измерения на одном животном или результаты, полученные из целого ряда тканей, и т.д. дают только одну независимую оценку); 2) среднее значение; 3) стандартное отклонение; коэффициент вариации стандартной ошибки в оценке среднего значения. Следует ясно указать, использовались ли стандартное отклонение или стандартная ошибка. Удобной формой включения этих данных в таблицу является, например, такая: $263 \pm 2,5 (10)$, где цифра в скобках указывает число значений, использовавшихся для подсчета среднего.

Если утверждается значимость результатов, то следует провести тест на определение значимости и оценить вероятность. Если не указано другое, подразумевается, что используется статистика для нормального распределения.

Громоздкие данные, которые трудно или невозможно привести в печатном варианте журнала (такие как большие таблицы идентифицированных белков в протеомных исследованиях), рекомендуется давать в виде приложений, которые будут доступны читателю только на интернет-сайте журнала. Текст статьи должен содержать ссылки на такие приложения.

4. Порядок работы с рукописями (рецензирование, редакционная подготовка, корректура)

4.1. Поступившей в редакцию правильно оформленной рукописи присваивается регистрационный номер и фиксируется дата поступления, о чем редакция информирует авторов по электронной почте. **Рукописи, оформленные не по правилам, возвращаются авторам без рассмотрения.**

4.2. Рецензирование. При подаче рукописи авторы могут указать двух потенциальных рецензентов (ФИО, адрес электронной почты) из числа специалистов в данной области исследо-

ваний, а также тех, чье участие в рецензировании нежелательно.

Все рукописи рассматривает Ответственный ученый секретарь (Executive Editor-in-Chief) и направляет Ответственному Редактору по соответствующей конкретной области исследований; он, в свою очередь, указывает двух-трех специалистов для рецензирования рукописи. Список Ответственных Редакторов и членов редколлегии размещен на сайте журнала, а также на сайтах Biochemistry (Moscow) на порталах Pleiades и Springer.

На основании экспертных заключений редколлегии определяет дальнейшую судьбу рукописи и в спорных случаях привлекает дополнительных рецензентов. По решению редколлегии рукопись может быть принята к публикации в представленном виде, отправлена авторам на доработку или отклонена. Основанием для отклонения рукописи являются недостаточно высокие оценки при рецензировании вследствие несоответствия профилю или уровню публикаций журнала.

Рукопись, получившая высшую оценку двух независимых рецензентов, печатается со специальной пометкой «Ускоренная публикация» (срок публикации – 1–2 месяца).

В случае необходимости рукопись направляется авторам на доработку по замечаниям рецензентов и редакторов, после чего она повторно рецензируется, и редколлегии вновь решает вопрос о приемлемости рукописи для публикации. В начале публикуемой статьи приводятся даты первоначального поступления рукописи в редакцию, поступления после окончательной доработки и принятия к публикации.

Переработанная рукопись должна быть возвращена в редакцию в течение трех месяцев после получения авторами отзывов; в противном случае рукопись рассматривается как вновь поступившая – ей присваивается новый регистрационный номер и ставится новая дата поступления в редакцию.

В журнале принято «одностороннее слепое рецензирование» (single-blind review), т.е. авторам недоступны имена рецензентов, и редакция строго соблюдает конфиденциальность рецензентов. Все редакционные письма авторам идут за подписью Ответственного ученого секретаря журнала.

4.3. С 2003 г. редакция приступила к практике предварительной публикации рукописей (*Papers in Press*) на сайте *Biochemistry (Moscow)* (<http://protein.bio.msu.ru/biokhimiya>) до выхода в свет статьи. На сайте размещаются экспериментальные статьи на английском языке, получившие высшие оценки при рецензировании и принятые к публикации.

4.4. На всех стадиях работы с рукописями, а также для общения с авторами, редакторами и рецензентами редакция использует электронно-почтовую связь, поэтому авторы должны быть очень внимательны к указанному в рукописи адресу электронной почты и должны своевременно сообщать о произошедших изменениях.

4.5. Через месяц после сдачи очередного выпуска журнала в печать редакция рассылает авторам по электронной почте корректуру статьи в виде pdf-файла и инструкцию по работе с ней.

На стадии корректуры не допускаются замены текста, рисунков или таблиц. Если все же это необходимо, то вопрос решается редколлегией; в крайнем случае, статья переносится в другой номер.

4.6. Мы приветствуем размещение препринтов – неопубликованных и не прошедших рецензирование рукописей – на серверах препринтов, веб-сайтах авторов или исследовательских организаций. При подаче рукописи в журнал авторы должны проинформировать редакцию о размещении препринта, включая doi и условия лицензирования. После публикации рукописи автор несет ответственность за появление на странице препринта ссылки на публикацию, включая doi и URL-ссылку на опубликованную статью.

5. Англоязычный вариант журнала

5.1. Каждый выпуск журнала готовится одновременно на русском и английском языках.

Перевод статей осуществляет группа высококвалифицированных переводчиков-биохимиков. В ходе работы у переводчиков часто возникает необходимость связаться с авторами и устранить неточности в русском тексте статьи.

Авторы, достаточно хорошо владеющие профессиональным английским языком, представляют в редакцию свой **аутентичный** перевод статьи.

5.2. Переводы редактируются английской редакцией журнала, и подготовленный текст направляется авторам для корректировки. Согласованные с авторами исправления вносятся и в русский, и в английский тексты в формате Word. На стадии pdf-корректуры не допускается замена фрагментов текста, таблиц и иллюстраций.

5.3. Статьи, прошедшие ускоренную редакционную подготовку, могут быть опубликованы в режиме Online First на сайте Springer.

5.4. После выхода журнала в свет редакция рассылает авторам оттиски русского и английского вариантов статей в виде pdf-файлов.