

# СОДЕРЖАНИЕ

Том 507, 2022

- Chasmaporthetes lunensis* (Nyctenidae, Carnivora) из раннего плейстоцена Крыма  
*А. В. Лавров, Д. Р. Хантемиров, Д. О. Гимранов, А. В. Лопатин* 441
- Изменение уровня сывороточного амилоида а у домашних кошек в период беременности  
*С. В. Найдено, Г. С. Алексеева, П. С. Ключникова, М. Н. Ерофеева* 445
- Аллелотоксичность и водоустойчивость дерново-подзолистой почвы после выращивания на ней пшеницы  
*Б. И. Сандухадзе, Г. Н. Федотов, Н. В. Давыдова, Р. З. Мамедов, Д. А. Ушкова, В. А. Нардид, И. В. Горелекин, М. С. Крахмалева, Д. И. Потапов, А. О. Казаченко, В. В. Бугрова, Т. А. Грачева* 449
- Свойства и активность пептидов на основе клеточного рецептора ACE2 и их взаимодействие с рецептор-связывающим доменом белка S вируса SARS-COV-2  
*М. В. Сидорова, Р. Ш. Бибилашвили, Д. В. Авдеев, У. С. Кожокар, М. Е. Палькеева, М. В. Овчинников, А. С. Молокоедов, Д. А. Широков, А. В. Семенова, В. И. Уварова, П. О. Куляев, Е. В. Хватов, А. А. Игнатова, А. В. Феофанов, Д. И. Осолодкин, Ю. Б. Порозов, Л. И. Козловская, А. А. Ишмухаметов, Е. В. Парфёнова, А. М. Егоров* 455
- Взаимосвязь прогноза течения COVID-19 с мутациями белка NS8 SARS-COV-2 в зависимости от штаммовой принадлежности вируса  
*М. Ю. Шкурников, Д. А. Аверинская, А. Г. Комаров, И. А. Карбышев, Г. И. Спешилов, И. А. Штинова, Д. А. Дорошенко, В. И. Вечорко* 460
- Оценка принадлежности малонового диальдегида к модуляторам и субстратам белка-транспортера Р-гликопротеина  
*А. В. Шулькин, Ю. В. Абаленихина, П. Ю. Мыльников, И. В. Черных, Е. Н. Якушева* 465
- Регуляция ренин-ангиотензин-альдостероновой системы плаценты при ранней и поздней преэклампсии  
*К. А. Артемьева, Н. В. Низяева, О. Р. Баев, А. Ю. Романов, Г. В. Хлестова, М. Н. Болтовская, А. И. Щеголев, Л. В. Кактурский* 475
- Нейропротекторный эффект нейропептида циклопролилглицина зависит от активации AMPA- и Trk-рецепторов  
*Т. А. Гудашева, К. Н. Колясникова, А. Г. Аляева, С. В. Николаев, Т. А. Антипова, С. Б. Серединин* 483
- Оценка сезонной изменчивости спектра свободных аминокислот плазмы крови boreального вида фауны рукокрылых урала – прудовой ночницы *Myotis dasycneme* (Voie, 1825)  
*Л. А. Ковальчук, В. А. Мищенко, Л. В. Черная, В. П. Снитько, В. Н. Большаков* 488
- Зависимость обучения управлению мозг-компьютерным интерфейсом от личностных характеристик  
*Е. В. Боброва, В. В. Решетникова, Е. А. Вершинина, А. А. Гришин, М. Р. Исаев, П. Д. Бобров, Ю. П. Герасименко* 493

Исследования противоопухолевой активности йодацетата в липосомальной форме <i>Д. А. Коршунов, М. А. Булдаков, Е. Е. Серeda, М. В. Буктеров, И. В. Мильто, И. В. Кондакова</i>	499
Радиозащитное действие наноцерея при облучении мышей средними и летальными дозами ионов углерода <i>В. Е. Балакин, О. М. Розанова, Е. Н. Смирнова, Т. А. Белякова, Н. С. Стрельникова, А. В. Смирнов, А. Г. Васильева</i>	504
Энтропия и эффективность роста у морских видов рыб Арктики <i>Л. И. Карамушко</i>	510
Взаимосвязь генотипа главного комплекса гистосовместимости класса I с летальностью COVID-19 у пациентов с сахарным диабетом <i>М. Ю. Шкурников, Д. А. Аверинская, А. Г. Комаров, И. А. Карбышев, Г. И. Спешилев, И. А. Штинова, Д. А. Дорошенко, В. И. Вечорко, О. М. Дряпкина</i>	515
Липопротеиды плазмы крови: окисляемость и участие в транспорте ацилгидроперокси-производных фосфолипидов <i>В. З. Ланкин, А. К. Тихазе, В. Я. Косач, А. Д. Дорошук</i>	520
Различия в презентации пептидов вариантов Омикрон-штамма BA.1–BA.5 вируса SARS-CoV-2 молекулами ГКГС <i>С. А. Нерсисян, М. Ю. Шкурников, А. П. Жиянов, В. О. Новосад, А. Г. Тоневицкий</i>	525
Парафилия нетопырей ( <i>Pipistrellus</i> ; Vespertilionidae) подтверждается анализом ядерных генных маркеров <i>С. С. Жукова, Е. Н. Соловьева, И. В. Артюшин, С. В. Крускоп</i>	530
Нортриптилин модулирует миграцию лимфоцитов и моноцитов периферической крови пациентов с хронической обструктивной болезнью легких <i>А. Г. Кадушкин, А. Д. Таганович, Л. В. Мовчан, Т. С. Колесникова, Е. В. Ходосовская, Т. В. Шман</i>	536
Транскриптом клеток рака легкого, устойчивых к цитотоксической активности макрофагов <i>О. В. Ковалева, П. А. Подлесная, М. В. Васильева, П. Б. Копнин, А. С. Балкин, А. О. Плотников, Н. Е. Кушлинский, А. Н. Грачев</i>	542

---

---

# CONTENTS

Vol. 507, 2022

- Chasmaporthetes lunensis* (Hyaenidae, Carnivora) from the Early Pleistocene of Crimea  
*A. V. Lavrov, D. R. Hantemirov, D. O. Gimramov, and A. V. Lopatin* 441
- Changes in Serum Amyloid a Level in Domestic Cats during Pregnancy  
*S. V. Naidenko, G. S. Alekseeva, P. S. Klyuchnikova, and M. N. Erofeeva* 445
- Allelotoxicity and Water Stability of Sod-podzolic Soil after Wheat Growing  
*B. I. Sandukhadze, G. N. Fedotov, N. V. Davydova, R. Z. Mamedov, D. A. Ushkova, V. A. Nardid, I. V. Gorepekin, M. S. Krakhmaleva, D. I. Potapov, A. O. Kazachenko, V. V. Bugrova, and T. A. Gracheva* 449
- Properties and Activity of Peptide derivatives of ACE2 Cellular Receptor and their Interaction with SARS-COV-2 S-protein Receptor-binding Domain  
*M. V. Sidorova, R. S. Bibilashvili, D. V. Avdeev, U. S. Kozhokar, M. E. Palkeeva, M. V. Ovchinnikov, A. S. Molokoedov, D. A. Shirokov, A. V. Semyonova, V. I. Uvarova, P. O. Kulyaev, E. V. Khvatov, A. A. Ignatova, A. V. Feofanov, D. I. Osolodkin, Yu. B. Porozov, L. I. Kozlovskaya, A. A. Ishmukhametov, Ye. V. Parfyenova, and A. M. Egorov* 455
- Relationship of COVID-19 Severity with SARS-COV-2 NS8 Protein Mutations Depended on Virus Strain  
*M. Yu. Shkurnikov, D. A. Averinskaya, A. G. Komarov, I. A. Karbyshev, G. I. Speshilov, I. A. Shiinova, D. A. Doroshenko, and V. I. Vechorko* 460
- Assessment of Malondialdehyde Belonging to Modulators and Substrates of the P-glycoprotein Transporter Protein  
*A. V. Shchulkin, Yu. V. Abalenikhina, P. Y. Mylnikov, I. V. Chernykh, and E. N. Yakusheva* 465
- Regulation of the Placental Renin-angiotensin-aldosterone System in Early and Late Onset Preeclampsia  
*K. A. Artemieva, N. V. Nizyaeva, O. R. Baev, A. Yu. Romanov, G. V. Khlestova, M. N. Boltovskaya, A. I. Shchegolev, and L. V. Kakturskiy* 475
- Neuroprotective Effect of cycloprolylglycine Neuropeptide Depends on AMPA- and TRKB-receptor Activation  
*T. A. Gudasheva, K. N. Koliashnikova, A. G. Alyaeva, S. V. Nikolaev, T. A. Antipova, and S. B. Seredenin* 483
- Assessment of Seasonal Variability of the Spectrum of Free Amino Acids in the Blood Plasma of the Boreal Bat Species (*Myotis dasycneme boie*, 1825) of the Ural Fauna  
*L. A. Kovalchuk, V. A. Mishchenko, L. V. Chernaya, V. P. Snit'ko, and V. N. Bolshakov* 488
- Dependence of Brain-computer Interface Control Training on Personality Traits  
*E. V. Bobrova, V. V. Reshetnikova, E. A. Vershinina, A. A. Grishin, M. R. Isaev, P. D. Bobrov, and Yu. P. Gerasimenko* 493
- Studies of the Antitumor Activity of Iodoacetate in Liposomal Form  
*D. A. Korshunov, M. A. Buldakov, E. E. Sereda, I. V. Kondakova, M. V. Bukterov, and I. V. Milto* 499

Radioprotective Effect of Nanocerium by Irradiation of Mice with Carbon Ions in Medium and Lethal Doses	
<i>V. E. Balakin, O. M. Rozanova, E. N. Smirnova, T. A. Belyakova, N. I. Strelnikova, A. V. Smirnov, and A. G. Vasilyeva</i>	504
Entropy and Efficiency of Growth in Marine Fish Species of the Arctic	
<i>L. I. Karamushko</i>	510
Association of HLA CLASS I Genotype with Mortality in Patients with Diabetes Mellitus and COVID-19	
<i>M. Yu. Shkurnikov, D. A. Averinskaya, A. G. Komarov, I. A. Karbyshev, G. I. Speshilov, I. A. Shtinova, D. A. Doroshenko, V. I. Vechorko, and O. M. Drapkina</i>	515
Blood Plasma Lipoproteids: Oxidizability and Participation in the Transport of Acylhydroperoxy-derivatives of Phospholipids	
<i>V. Z. Lankin, A. K. Tikhaze, V. Ya. Kosach, and A. D. Doroshchuk</i>	520
Differences in SARS-CoV-2 Omicron Strain Variants BA.1–BA.5 Peptides Presentation by HLA Molecules	
<i>S. A. Nersisyan, M. Yu. Shkurnikov, A. P. Zhiyanov, V. O. Novosad, and A. G. Tonevitsky</i>	525
Paraphyly of the Pipistrelles (Pipistrellus; Vespertilionidae) is Confirmed by the Analysis of the Nuclear Gene Markers	
<i>S. S. Zhukova, E. N. Solovyeva, I. V. Artyushin, and S. V. Kruskop</i>	530
Nortriptyline Modulates the Migration of Peripheral Blood Lymphocytes and Monocytes in Patients with Chronic Obstructive Pulmonary Disease	
<i>A. G. Kadushkin, A. D. Tahanovich, L. V. Movchan, T. S. Kolesnikova, A. V. Khadasouskaya, and T. V. Shman</i>	536
Transcriptome of Lung Cancer Cells Resistant to the Cytotoxic Activity of Macrophages	
<i>O. V. Kovaleva, P. A. Podlesnaya, M. V. Vasileva, P. B. Kopnin, A. S. Balkin, A. O. Plotnikov, N. E. Kushlinskii, and A. N. Gratchev</i>	542

---

---

УДК 569.742.6:551.793(477.75)

## *CHASMAPORTHETES LUNENSIS* (HYAENIDAE, CARNIVORA) ИЗ РАННЕГО ПЛЕЙСТОЦЕНА КРЫМА

© 2022 г. А. В. Лавров<sup>1</sup>, Д. Р. Хантемиров<sup>2,\*</sup>, Д. О. Гимранов<sup>3</sup>, академик РАН А. В. Лопатин<sup>1</sup>

Поступило 28.06.2022 г.

После доработки 25.08.2022 г.

Принято к публикации 25.08.2022 г.

Из раннеплейстоценового местонахождения в пещере Таврида (Крым, поздний виллафранк, возраст 1.8–1.5 млн. лет) описан фрагмент верхнечелюстной кости вымершей гиены *Chasmaporthetes lunensis* (Del Campa, 1914), типичного представителя виллафранкских фаун Евразии. Это первая находка рода *Chasmaporthetes* в плейстоцене Крыма.

**Ключевые слова:** *Chasmaporthetes lunensis*, поздний виллафранк, пещера Таврида, Крым, премоляры

**DOI:** 10.31857/S2686738922060178

Род *Chasmaporthetes* Hay, 1921, объединяет неогеновые и плейстоценовые виды сравнительно крупных, но легко сложенных гиен, из-за длинных тонких конечностей получивших название “охотящихся гиен” (hunting hyenas). Предполагается, что в отличие от многих других гиен хасмапортетесы были активными охотниками, хорошо адаптированными к бегу.

Специализация к активному хищничеству также отражена в строении зубной системы этих гиен. Все щечные зубы представителей рода *Chasmaporthetes* режущего (гиперкарниворного) типа. Предкоренные зубы более тонкие, чем у других плио-плейстоценовых гиен, с режущими лезвиями главных бугорков и сильно развитыми задними добавочными базальными бугорками. Для *Chasmaporthetes* характерен узкий хищнический зуб m1 без метаконида; его короткий талонид не имеет бассейна (в отличие от других гиен) и состоит из одного режущего лезвия, которое сформировано гипоконидом [1–3].

Род *Chasmaporthetes* существовал с позднего миоцена (туролия) до раннего плейстоцена (1.4–0.8 млн. л.н.). Его ареал включал значительную часть Евразии (*C. lunensis* (Del Campa, 1914); *C. borissiakii* (Khomenko, 1932); *C. bonisi* Koufos,

1987; *C. exitelus* Kurtén et Werdelin, 1988; *C. gangsriensis* Tseng, Li et Wang, 2013), Африки (*C. nitidula* Ewer, 1955; *C. australis* Hendey, 1974) и Северной Америки (*C. ossifragus* Hay, 1921) [1, 4]. Это единственный род Hyaenidae, проникший в Северную Америку [4, 5].

Наибольшее распространение представители рода *Chasmaporthetes* получили в виллафранке. На территории Евразии с позднего плиоцена по ранний плейстоцен был широко распространен *C. lunensis*. В Испании этот вид был найден в плиоценовых местонахождениях Лайна и Вильяройя [6–8] и раннеплейстоценовом местонахождении Пуэбла-де-Вальверде [9]. На территории Франции *C. lunensis* известен из плиоценового местонахождения Этуэр и из нижнего плейстоцена местонахождений Сенез, Рокканейра, Сен-Валье и Пардин [10, 11]. В Италии раннеплейстоценовые остатки *C. lunensis* найдены в местонахождениях Оливола, Валь-ди-Магра и Инферно [10, 12], в Германии – в местонахождении Эрпфинген [13].

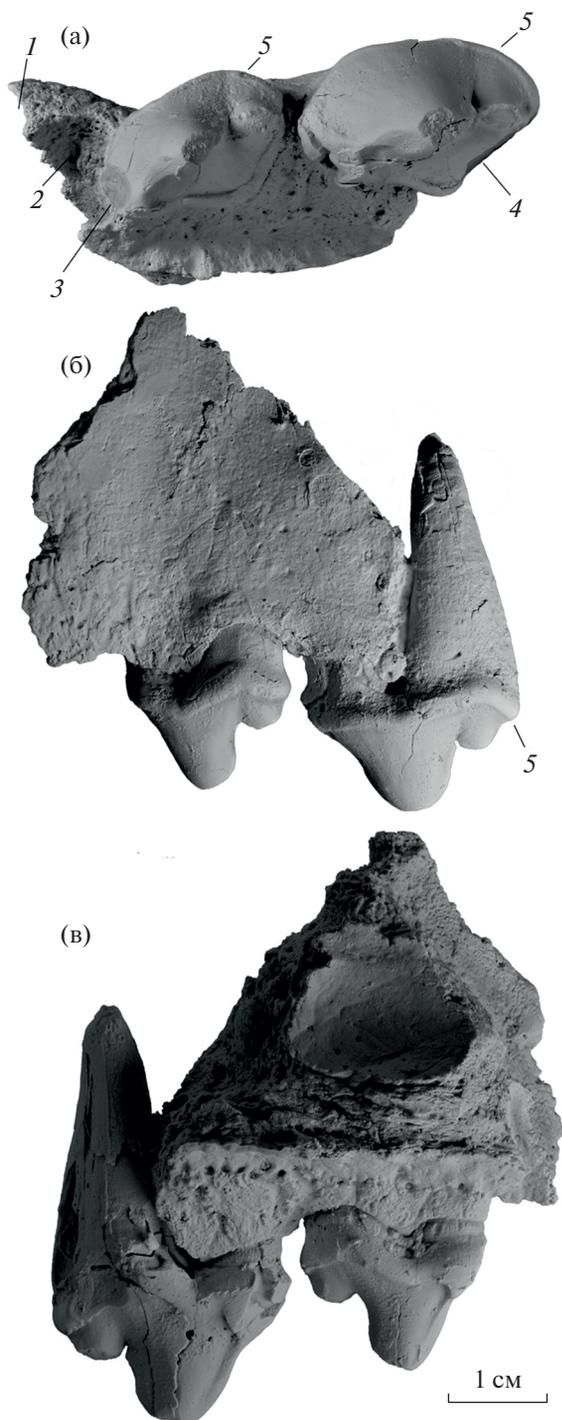
За пределами Европы *C. lunensis* был найден в Турции в плиоценовых местонахождениях Гулязи [14] и Чалта [15]. Материалы по *C. lunensis* из плиоцена и плейстоцена Евразии были детально описаны М.В. Сотниковой [2, 16] из местонахождений Береговая (Россия, Забайкалье), Одесские катакомбы (Украина, MN15; подвид *C. l. odessanus* Sotnikova, 1994), Шамар (Монголия, MN16), Курруксай (Таджикистан, MNQ17). *C. lunensis* также присутствует в нескольких китайских плиоценовых местонахождениях [1, 17]. Помимо *C. lunensis* в Азии выделялись также *C. kani* Galiano et Frailey, 1977, *C. progressus* Qiu, 1987 и *C. bielawskiyi* (Schaub,

<sup>1</sup> Палеонтологический институт им. А.А. Борисяка Российской академии наук, Москва, Россия

<sup>2</sup> Уральский федеральный университет имени первого президента России Б.Н. Ельцина, Екатеринбург, Россия

<sup>3</sup> Институт экологии растений и животных Уральского отделения Российской академии наук, Екатеринбург, Россия

\*e-mail: hantemirov.d@mail.ru



**Рис. 1.** *Chasmaporthetes lunensis* (Del Campana, 1914), экз. ПИН, № 5644/110, фрагмент левой верхнечелюстной кости с P2–P3: а – с окклюзиальной стороны, б – с лабиальной стороны, в – с лингвальной стороны; Крым, пещера Таврида; нижний плейстоцен. Обозначения: 1 – дистальный край альвеолы С1; 2 – дистальная часть альвеолы P1; 3 – фасетка стирания от окклюзии с р2; 4 – фасетка стирания от окклюзии с р3; 5 – цингулюм.

1941) [см. 17], но в настоящее время они обоснованно считаются синонимами *C. lunensis* [18].

Находки *Chasmaporthetes* в Восточной Европе редки. В связи с этим значительный интерес представляют новые материалы из пещеры Таврида в Крыму. Эта пещера расположена в 15 км восточнее Симферополя около п. Зуя Белогорского района. По составу фауны позвоночных костеносный слой датируется ранним плейстоценом (поздний виллафранк, псекупский комплекс, 1.8–1.5 млн. л.н.) [19]. Во время раскопок в пещере было найдено множество костей хищных млекопитающих, в том числе Нyaenidae. Подавляющее большинство остатков гиен (к настоящему времени их найдено более 100) принадлежит гигантской гиене *Pachycrocuta brevirostris* (Gervais, 1850), и лишь одна находка из сборов 2021 г. – описанный ниже верхнечелюстной фрагмент – относится к *C. lunensis* (рис. 1). Это первая находка *Chasmaporthetes* в плейстоцене Крыма см. [20].

Изученный образец хранится в Палеонтологическом институте им. А.А. Борисяка РАН (ПИН), Москва. Измерения проводились штангенциркулем с точностью до 0.1 мм. На зубах измерялись наибольшая переднезадняя длина (L) и наибольшая лабиолингвальная ширина (W).

На фрагменте левой верхнечелюстной кости (экз. ПИН, № 5644/110) сохранились целые двухкорневые премоляры P2–P3 и части альвеол однокорневых зубов – клыка С1 и переднего премоляра P1 (рис. 1). Дистальный край альвеолы С1 вплотную примыкает к альвеоле P1. Ширина уцелевшей части альвеолы P1 – 11.9 мм, реконструируемая ширина P1 – 12.2–12.4 мм. Дистальный край альвеолы P1 без диастемы примыкает к альвеоле P2.

Премоляры P2–P3 имеют высокий конусовидный главный бугорок, редуцированный передний добавочный бугорок, смещенный лингвально, сильно развитый задний добавочный базальный бугорок, а также характерные для *Chasmaporthetes* мощный непрерывный цингулюм и базальный лингвальный выступ (выступ протокона), смещенный дистально.

Главные бугорки P2–P3 лабиолингвально сжатые, выпуклые с лабиальной стороны и почти плоские с лингвальной стороны, слегка наклонены назад. Главный бугорок на P2 существенно короче и ниже, чем на P3. Передний и задний режущие гребни хорошо выражены. Основание переднего режущего гребня смещено лингвально от оси зуба. Передние добавочные бугорки сильно редуцированы и уплощены, смещены лингвально (различию соответствующих складок в основании главных бугорков). Задние добавочные базальные бугорки высокие, сильно сжатые лабиолингвально, отделены от главных бугорков глубокими вы-



4. *Berta A.* The Plio-Pleistocene hyaena *Chasmaporthetes ossifragus* from Florida // *Journal of Vertebrate Paleontology*. 1981. V. 1. № 3–4. P. 341–356.
5. *Tseng Z.J., Li Q., Wang X.* A new cursorial hyena from Tibet, and analysis of biostratigraphy, paleozoogeography, and dental morphology of *Chasmaporthetes* (Mammalia, Carnivora) // *Journal of Vertebrate Paleontology*. 2013. V. 33. № 6. P. 1457–1471.
6. *Villalta Comella J.F. de.* Contribución al conocimiento de la fauna de mamíferos fósiles del Plioceno de Villarroya (Logroño) // *Boletín del Instituto Geológico y Minero de España*. 1952. № 64. P. 1–203.
7. *Crusafont M., Aguirre E.* *Euryboas lunensis* et *Hyaena donnezani* associées, en Espagne dans le gisement d'âge Pliocène terminal de Layna (Soria) // *Comptes Rendus de l'Académie des sciences, Paris. Sér. D.* 1971. V. 273. P. 2476–2478.
8. *Kurtén B., Crusafont Pairó M.* Villafranchian carnivores (Mammalia) from La Puebla de Valverde (Teruel, Spain). Helsinki: Societas Scientiarum Fennica, 1977. 39 p.
9. *Antón M., Turner A., Salesa M.J., Morales J.* A complete skull of *Chasmaporthetes lunensis* (Carnivora, Hyaenidae) from the Spanish Pliocene site of La Puebla de Valverde (Teruel) // *Estudios Geológicos*. 2006. V. 62. № 1. P. 375–388.
10. *Schaub S.* Ein neues Hyaenidengenuss von der Montagne de Perrier // *Eclogae Geologicae Helveticae*. 1941. V. 34. № 2. P. 279–286.
11. *Viret J.* Le loess à bancs durcis de Saint-Vallier (Drôme), et sa faune de mammifères villafranchiens // *Nouvelles Archives de Museum d'Histoire Naturelle de Lyon*. 1954. Fasc. 4. P. 1–200.
12. *Ficcarelli G., Torre D.* Una mandibola di *Euryboas lunensis* (Del Campana) nel giacimento Villafranchiano di Olivola (Val di Magra) // *Memorie della Società Toscana di Scienze Naturali. Ser. A.* 1967. V. 74. P. 193–198.
13. *Lehmann U.* Weitere Fossilfunde aus dem ältesten Pleistozän der Erpfinger Höhle (Schwäbische Alb) // *Mitteilungen aus dem Geologischen Staatsinstitut in Hamburg*. 1957. V. 26. P. 60–99.
14. *Schütt G.* Hyaenidenfunde aus dem Villafranchium der Türkei // *Mitteilungen aus dem Geologischen Institut der Universität Hannover*. 1971. V. 10. P. 119–140.
15. *Sen S., Saraç G.* Hyaenidae (Carnivora, Mammalia) from late Miocene and Pliocene of Çalta (Ankara, Turkey) // *Revue de Paléobiologie*. 2018. V. 37. № 2. C. 561–575.
16. *Сотникова М.В.* Род *Chasmaporthetes* Нав, 1921 из плиоцена России, Украины, Монголии и Таджикистана // *Палеотериология* / Ред. Л.П. Татариннов. Москва: Наука, 1994. С. 113–139.
17. *Qiu Z., Deng T., Wang B.* Early Pleistocene mammalian fauna from Longdan, Dongxiang, Gansu, China // *Palaentologia Sinica. New ser. C.* 2004. № 191. P. 1–198.
18. *Werdelin L., Solounias N.* The Hyaenidae: taxonomy, systematics and evolution // *Fossils and Strata*. 1991. № 30. P. 1–104.
19. *Лопатин А.В., Вислобокова И.А., Лавров А.В., и др.* Пещера Таврида – новое местонахождение раннеплейстоценовых позвоночных в Крыму // *Доклады Академии наук*. 2019. Т. 485. № 3. С. 381–385.
20. *Родионов В.В., Туттов В.В.* Раннеплиоценовая фауна млекопитающих с юго-западного побережья Крыма // 100-летие Палеонтологического общества России. Проблемы и перспективы палеонтологических исследований. Материалы LXII сессии Палеонтологического общества при РАН (4–8 апреля 2016 г., Санкт-Петербург). Санкт-Петербург: ВСЕГЕИ, 2016. С. 269.

## **CHASMAPORTHETES LUNENSIS (HYAENIDAE, CARNIVORA) FROM THE EARLY PLEISTOCENE OF CRIMEA**

**A. V. Lavrov<sup>a</sup>, D. R. Hantemirov<sup>b,#</sup>, D. O. Gimramov<sup>c</sup>, and Academician of the RAS A. V. Lopatin<sup>a</sup>**

<sup>a</sup> *Borissiak Paleontological Institute, Russian Academy of Sciences, Moscow, Russian Federation*

<sup>b</sup> *Ural Federal University named after the First President of Russia B.N. Yeltsin, Yekaterinburg, Russian Federation*

<sup>c</sup> *Institute of Plant and Animal Ecology, Ural Branch, Russian Academy of Sciences, Yekaterinburg, Russian Federation*

<sup>#</sup>*e-mail: hantemirov.d@mail.ru*

A maxillary fragment of the extinct hyena *Chasmaporthetes lunensis* (Del Campana, 1914) is described from the Early Pleistocene locality of Taurida cave (Crimea, Late Villafranchian, 1.8–1.5 Ma). The species was a typical representative of the Villafranchian faunas of Eurasia. This is the first record of the genus *Chasmaporthetes* in the Pleistocene of Crimea.

*Keywords:* *Chasmaporthetes lunensis*, Late Villafranchian, Taurida cave, Crimea, premolars

УДК 599.742.7; 57.02

## ИЗМЕНЕНИЕ УРОВНЯ СЫВОРОТОЧНОГО АМИЛОИДА А У ДОМАШНИХ КОШЕК В ПЕРИОД БЕРЕМЕННОСТИ

© 2022 г. Член-корреспондент РАН С. В. Найденко<sup>1,\*</sup>, Г. С. Алексеева<sup>1</sup>,  
П. С. Ключникова<sup>1</sup>, М. Н. Ерофеева<sup>1</sup>

Поступило 13.07.2022 г.

После доработки 18.07.2022 г.

Принято к публикации 20.07.2022 г.

Воспроизводство редких видов в неволе — актуальная проблема для сохранения и восстановления биоразнообразия. Для млекопитающих, в том числе кошачьих, оценка и контроль протекания беременности являются основополагающим моментом для успешного разведения. Впервые проведена оценка изменений концентраций сывoroточного амилоида А (SAA), основного белка острой фазы воспаления у кошачьих, в период беременности у домашней кошки. Выявлено, что изменения концентраций SAA у беременных самок носят закономерный характер: увеличение к середине беременности (30-й день) и снижение к 60-му дню. После родов наблюдается значительное увеличение концентраций SAA в крови кошек. Существенное влияние на динамику концентраций SAA в ходе исследования оказывал размер выводка, в частности после родов увеличение его уровня было существенно выше у самок, родивших большие выводки (от 4 до 7 котят).

*Ключевые слова:* кошачьи, разведение, белок острой фазы воспаления, размер выводка

DOI: 10.31857/S268673892206021X

Кошачьи — семейство хищных млекопитающих, включающее 39 видов [1]. Численность большинства из них снижается. Особенно катастрофична ситуация с некоторыми крупными представителями семейства (тигр (*Panthera tigris*), лев (*P. leo*), ягуар (*P. onca*)). В частности, численность тигра в XX в. сократилась более чем в 30 раз [2]. Даже при успешном восстановлении вида во всех доступных местообитаниях численность его никогда не сможет достигнуть описанной к началу XX в., восстановление ареала в исторических границах также невозможно.

При нарушении и фрагментации ареала все более важным становится сохранение генофонда диких кошачьих. Основными подходами являются создание криобанков и воспроизводство животных ex-situ. При сохранении генетического материала кошачьих путем криоконсервации в первую очередь сохраняют сперматозоиды и ооциты, реже эмбрионы и соматические клетки [3]. Очевидный плюс этого подхода — длительность хранения проб и низкая стоимость поддержания коллекции. Воспроизводство животных в

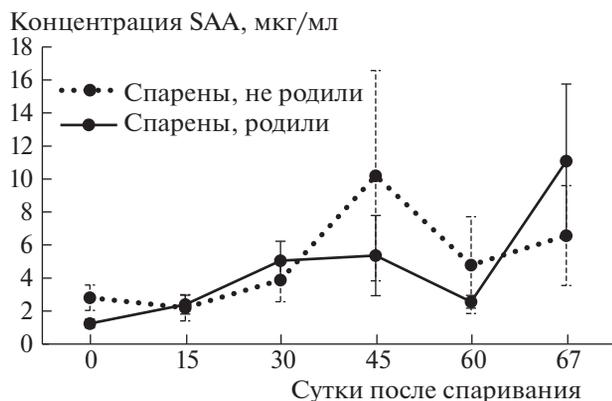
зоопарках и питомниках, несмотря на относительно высокую стоимость процесса, имеет свои преимущества. Одно из них — сохранение видоспецифичных паттернов поведения, формирующихся в процессе онтогенеза при взаимодействии с матерью и однопометниками [4].

Таким образом, воспроизводство редких видов кошачьих ex-situ остается актуальным и необходимым. Однако их размножение в неволе — сложный процесс, требующий учета особенностей поведения [5], предпочтения брачных партнеров [6], физиологии размножения [7], факторов, влияющих на качество спермы и репродуктивный успех самцов [8], характера протекания беременности, в том числе и при различных репродуктивных стратегиях. Последнее — одна из важнейших составляющих успеха размножения диких кошачьих в неволе. Повышенный уровень глюкокортикоидов (стресса животных) может вести к прохолостованию животных, снижению размера выводка [9], а свободный выбор брачного партнера — к снижению эмбриональных потерь [8].

Существует ряд подходов к оценке физиологического состояния животных, одним из которых является определение концентраций белков острой фазы воспаления [10], что может выявлять отклонения в протекании беременности [11] и позволяет принять своевременные меры для сохранения потомства. У кошек основным таким

<sup>1</sup> Институт проблем экологии и эволюции им. А.Н. Северцова Российской академии наук, Москва, Россия

\*e-mail: snaidenko@mail.ru



**Рис. 1.** Средний уровень SAA у родивших и неродивших самок на разных сроках после спаривания (точка 67 соответствует забору крови после родов).

белком является сывороточный амилоид А (serum amyloid A, SAA) [12]. Для отдельных видов кошачьих, в том числе гепарда и леопарда, его концентрацию оценивали [12], однако никогда не прослеживали динамику на протяжении беременности. Целью настоящего исследования было оценить закономерности изменения уровня SAA у модельного вида кошачьих (домашней кошки) в период беременности.

Работу проводили на научно-экспериментальной базе «Черноголовка» ИПЭЭ РАН в 2018–2021 гг. Кошек в течение года содержали в вольерах при естественном световом и температурном режиме. Условия содержания животных детально описаны ранее [6, 9]. В работе использовали 35 кошек, которые в марте-апреле спаривались с самцами. Выводки (от 1 до 7 котят, средний размер выводка  $3.9 \pm 0.4$ ) принесли 23 кошки, остальные 12 — не родили. За 1–15 сут до спариваний (точка 0), на 15-е, 30-е, 45-е и 60-е сутки после спариваний и через сутки после родов у кошек собирали кровь (до 3 мл) из паховой вены. Кровь центрифугировали 15 мин при 3000 об/мин, сыворотку отделяли и замораживали при  $-18^{\circ}\text{C}$  до проведения анализа. Концентрацию SAA определяли с использованием ИФА-наборов (Tridelta Development Ltd, Ирландия, Cat. № TP802). Различия концентраций SAA в группах родившие/неродившие оценивали с помощью метода ANOVA для повторных измерений (A), в течение беременности в каждой группе — методом Фридман-ANOVA (F-A). Пост-хок анализ проводили с помощью критериев Манна–Уитни (M-W) (между группами) и Вилкоксона (W) для сопряженных пар (разный срок беременности для одних и тех же животных). Результаты представлены на графиках в виде среднего  $\pm$ SE.

Концентрации SAA варьировали от 0.2 до 100.1 мкг/мл. Средний уровень составил от 2.2 до

10.2 мкг/мл у родивших самок и от 1.2 до 11.1 мкг/мл — у неродивших. Достоверных различий в уровне SAA между родившими и неродившими кошками не выявлено (A:F = 1.43;  $df = 6$ ;  $p = 0.24$ ) (рис. 1). Ни в одной из контрольных точек также не выявлено достоверных различий в уровне SAA между родившими и впоследствии неродившими самками (M-W:Z = 0.30–1.86;  $n_1 = 12$ ;  $n_2 = 22$ –23;  $p = 0.062$ –0.770).

У самок, спаривавшихся с самцом, но впоследствии неродивших, не выявлено достоверных изменений в уровне SAA во время всего периода исследований (F-A:N = 12;  $df = 5$ ;  $\chi^2 = 2.13$ ;  $p = 0.83$ ). Максимальные значения в такой группе были отмечены на 45-е сутки после спаривания животных. Две особи из 12 в этот период показывали очень высокие концентрации SAA — 36.4 и 72.4 мкг/мл. В отличие от неродивших самок, родившие показывали в ходе беременности закономерные изменения уровня SAA (F-A:N = 22;  $df = 5$ ;  $\chi^2 = 28.35$ ,  $p = 0.00003$ ). Минимальной концентрация SAA была в точке 0 (до спаривания), уже к 15-м суткам после спаривания она несколько возрастала (в среднем в 1.9 раза), а впоследствии в течение всей беременности (и после родов) оставалась достоверно более высокой, чем до спаривания (W:Z = 2.55–3.78;  $n = 21$ –23;  $p = 0.0002$ –0.0108). Через 15 сут после спаривания уровень SAA был достоверно ниже, чем на 30-е сутки после спаривания и после родов (W:Z = 2.73 и 2.29;  $n = 23$  и 22;  $p = 0.006$  и 0.022). На 30-й день беременности уровень SAA был достоверно выше, чем на 60-й (W:Z = 2.06;  $n = 22$ ;  $p = 0.039$ ). Наиболее высокими концентрации были через сутки после родов, хотя именно в этот период разброс значений был максимален. Таким образом, повышение уровня SAA у беременных самок отмечалось к 15–30-м суткам беременности, затем он снижался к 60-м суткам и резко возрастал после родов.

Размер выводка оказывал достоверное влияние на уровень SAA у домашних кошек в период беременности (A:F = 3.63;  $df = 6$ ;  $p = 0.020$ ) (рис. 2).

Сравнение проводили для выводков маленького (от 1 до 3 котят) и большого (от 4 до 7 котят) размера (детали см. [9]). В целом в первые 30 сут беременности уровень SAA возрастал значительно у самок, вынашивающих маленькие выводки, но уже к 45-м сут он существенно снижался. У самок, вынашивающих крупные выводки, это снижение отмечали позже, хотя на сроке 45 сут у них обнаружена значительная индивидуальная изменчивость этого показателя. После родов уровень SAA существенно возрастал только у самок с большими выводками. Вместе с тем достоверных различий в концентрации SAA у самок, вынашивающих большие и маленькие выводки, выявлено не было ни в одной из контрольных точек.

У беременных самок домашней кошки выявлены достоверные закономерности в изменении уровня SAA: увеличение его концентраций в течение первого месяца беременности, падение к 60-м суткам и увеличение после родов. Последнее, по-видимому, объясняется тем, что роды сопровождаются разрывом кровеносных сосудов при отделении плаценты, и, соответственно, развитием в той или иной степени воспалительного процесса как ответной реакции на “повреждение” организма. Это объяснение хорошо соотносится с тем, что самки, родившие большие выводки, демонстрируют более высокие уровни SAA.

У кошачьих уровень SAA является одним из основных маркеров протекания воспалительных реакций, это основной белок острой фазы воспаления [12, 13]. В определенной степени этим можно объяснить его практически двукратное увеличение в организме кошек к 15 сут беременности, которые соответствуют имплантации эмбрионов (12–14 сут) и, соответственно, “проникновению” в организм самки чужеродных антигенов. Сходство процесса имплантации и воспаления неоднократно отмечалось [14]. Учитывая, что основной функцией SAA в организме является защита тканей от интенсивного повреждения, вызванного медиаторами воспаления, объяснимо увеличение его уровня в период формирования плаценты.

Увеличение уровня SAA к середине беременности (точнее к 30-м суткам) может быть связано с дальнейшим развитием плаценты. В литературе нам не удалось найти описания сроков окончания формирования плаценты у домашних кошек; общеизвестно, что у человека этот процесс заканчивается почти в середине беременности (на 16-й неделе или 40). У кошки общая продолжительность беременности – 64–66 сут [15]. Снижение уровня SAA к 60-м суткам беременности (а у самок, вынашивающих небольшие выводки, уже к 45-м суткам) может быть связано с произошедшим окончанием формирования плаценты.

Несмотря на закономерные изменения уровня SAA в ходе беременности, этот показатель не позволяет дифференцировать беременных кошек и кошек, впоследствии неродивших. Вместе с тем отсутствие детенышей у неродивших кошек не исключало возможности, что у этих кошек (или отдельных животных) не произошла имплантация, а эмбрионы впоследствии были резорбированы или произошел выкидыш. Для четкого понимания закономерностей изменений концентраций SAA требуется его анализ у контрольных самок, которые не спаривались с самцами, что позволило бы получить более полное представление об изменении уровня белков острой фазы воспаления у кошачьих в период беременности.

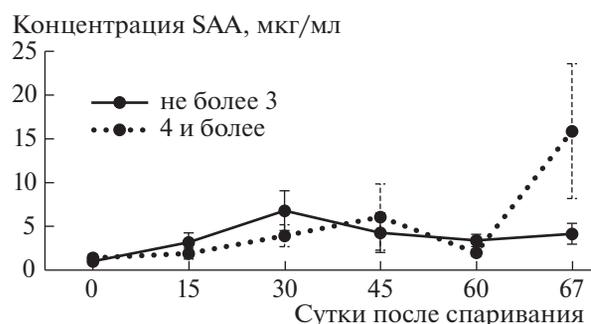


Рис. 2. Средний уровень SAA у самок с маленькими (1–3) и большими (4–7) выводками на разных сроках после спаривания (точка 67 соответствует забору крови после родов).

#### ИСТОЧНИК ФИНАНСИРОВАНИЯ

Работа выполнена при поддержке РФФ 18-14-00200.

#### КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы уведомляют редакцию, что не имеют конфликта интересов, связанных с публикацией данной статьи. Проведение исследований было одобрено Комиссией по биоэтике ИПЭЭ РАН (№ 21 от 21.04.2018).

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Kitchener A.C., Breitenmoser-Würsten C., Eizirik E., et al. *Cat News*. 2017. № 11. P. 1–80.
2. Dinerstein E., Loucks C., Wikramanayake E., et al. *BioScience*. 2007. V. 57. № 6. P. 508–514.
3. Amstislavsky S., Brusentsev E., Kizilova E., et al. *Reprod. Dom. Anim.* 2018. V. 53. № 5. P. 1219–1226.
4. Guardini G., Bowen J., Mariti C., et al. *Animals*. 2017. V. 7. № 93.
5. Wielebnowski N.C., Fletchall N., Carlstead K., et al. *Zoo Biol.* 2002. V. 21. P. 77–98.
6. Erofeeva M.N., Alekseeva G.S., Kim M.D., et al. *Animals*. 2022. V. 12. № 2: 165.
7. Jewgenow K., Goritz F., Neubauer K., et al. *J. Europ. Wildl. Res.* 2006. V. 52. P. 34–38.
8. Naidenko S., Erofeeva M., Goeritz F., et al. *Acta zool. Sin.* 2007. V. 53. P. 408–416.
9. Alekseeva G.S., Loshchagina J.A., Erofeeva M.N., et al. *Animals*. 2020. V. 10. 903.
10. Jain S., Gautam V., Naseem S. *J. Pharm. Bioallied Sc.* 2011. V. 3. № (1). P. 118–127.
11. Ulutas P.A., Musal B., Kiral F., et al. *Res. Vet. Sc.* 2008. V. 86. № 3. P. 373–376.
12. Heinrich S.K., Hofer H., Courtiol A., et al. *Sc. reports*. 2017. V. 7. № 1. P. 1–11.
13. He R., Shepard L.W., Chen J., et al. *J. Immunol.* 2006. V. 177. № 6. P. 4072–4079.
14. Chavan A.R., Griffith O.W., Stadtmayer D.J., et al. *Mol. Biol. Evol.* 2020. V. 38. № 3. P. 1060–1074.
15. Prescott C.W. *Austral. Vet. J.* 1973. V. 49. P. 126–129.

## CHANGES IN SERUM AMYLOID A LEVEL IN DOMESTIC CATS DURING PREGNANCY

Corresponding Member of the RAS **S. V. Naidenko<sup>a,#</sup>, G. S. Alekseeva<sup>a</sup>,  
P. S. Klyuchnikova<sup>a</sup>, and M. N. Erofeeva<sup>a</sup>**

<sup>a</sup> *Severtsov Institute of Ecology and Evolution of Russian Academy of Sciences, Moscow, Russian Federation*

<sup>#</sup>*e-mail: snaidenko@mail.ru*

Reproduction of endangered species in captivity is an urgent problem for the conservation and restoration of biodiversity. For mammals, including felids, assessing and monitoring of pregnancy progression is fundamental to successful breeding. For the first time, changes in serum amyloid A (SAA) concentrations, the main protein of the acute phase of inflammation in felines, were assessed during pregnancy in a domestic cat. It was found that changes in SAA concentrations in pregnant females are regular: an increase to the middle of pregnancy and a decrease to the 60<sup>th</sup> day. After parturition, there is an increase in SAA concentrations in the blood of domestic cats. The litter size had a significant effect on the dynamic of SAA concentrations during the experiment, in particular, after birth, the increase in its level was significantly higher in females that gave birth to larger litters (from 4 to 7 kittens).

*Keywords:* felids, breeding, acute phase protein, litter size

УДК 631.4; 633.1

## АЛЛЕЛОТОКСИЧНОСТЬ И ВОДОУСТОЙЧИВОСТЬ ДЕРНОВО-ПОДЗОЛИСТОЙ ПОЧВЫ ПОСЛЕ ВЫРАЩИВАНИЯ НА НЕЙ ПШЕНИЦЫ

© 2022 г. Академик РАН Б. И. Сандухадзе<sup>2</sup>, Г. Н. Федотов<sup>1</sup>, Н. В. Давыдова<sup>2</sup>, Р. З. Мамедов<sup>2</sup>, Д. А. Ушкова<sup>1</sup>, В. А. Нардид<sup>2</sup>, И. В. Горепекин<sup>1</sup>, М. С. Крахмалева<sup>2</sup>, Д. И. Потапов<sup>1</sup>, А. О. Казаченко<sup>2</sup>, В. В. Бугрова<sup>2</sup>, Т. А. Грачева<sup>1,\*</sup>

Поступило 12.05.2022 г.

После доработки 13.07.2022 г.

Принято к публикации 15.07.2022 г.

Известно, что аллелотоксичность почв и водоустойчивость почвенной структуры определяются поступлением в почву растительных остатков, но взаимосвязь этих почвенных свойств не была исследована. В работе проведен отбор почвенных образцов после выращивания на делянках на дерново-подзолистой почве в полях ФИЦ “Немчиновка” 25 сортов яровых и озимых пшениц. Методом биотестирования было изучено аллеловоздействие почвенных образцов, отобранных с делянок, на развитие семян яровой пшеницы сорта Лиза. Для этих же почвенных образцов была определена водоустойчивость почвенной структуры. Установлено существование сигмоидной зависимости между аллеловоздействием образцов и их водоустойчивостью с корреляцией больше 95%. Наличие такой зависимости, по-видимому, обусловлено известным из литературы повышением водоустойчивости почв при увеличении количества попадающих в них свежих растительных остатков и переходом воздействия аллелотоксинов от стимуляции к угнетению с ростом их концентрации в почвах.

*Ключевые слова:* яровая и озимая пшеницы, водоустойчивость почв, растительные остатки, аллеловоздействие почв, развитие семян в почвах, влияние аллелотоксинов на растения

DOI: 10.31857/S2686738922060270

Существование аллелопатического почвоутомления (аллелотоксичности почв) и его негативное влияние на развитие растений известно давно [1]. Оно обусловлено высокой сорбционной способностью почв и закреплением в них аллелотоксинов [1–3].

Известны различные механизмы поступления этих веществ в почву. Они выделяются растениями для борьбы с конкурентами (1), а также в качестве сигнальных веществ для предупреждения других растений об экологической опасности или для торможения своих биохимических процессов (2), чтобы возникшие негативные экологические факторы нанесли сообществу растений минимальный урон [1–3].

Установлено, что действие любых абиотических стресс-факторов (3) в процессе вегетации приводит к усилению выработки растениями аллелотоксинов, выделению их и повышению аллелотоксичности почв [4]. Эти вещества вырабаты-

ваются микроорганизмами при борьбе с конкурентами за ресурсы и в качестве побочных продуктов метаболизма (4). Кроме того, в литературе описано выделение аллелотоксинов из растительных остатков (5) при их разложении в почвах [1].

Также известно, что водоустойчивость почвенной структуры зависит от количества поступающих в нее свежих растительных остатков [5–7]. Однако взаимосвязь между водоустойчивостью почвенной структуры и аллелотоксичностью устанавливать до настоящего времени не пытались, хотя они могут определяться одним фактором – поступлением в почвы свежих растительных остатков.

Целью работы была проверка существования взаимосвязи между аллелотоксичностью почв и водоустойчивостью почвенной структуры.

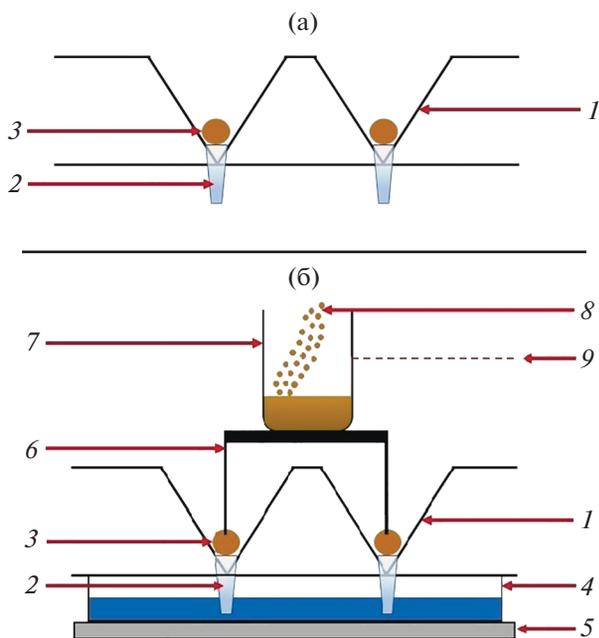
В работе исследовали образцы почв, отобранные после уборки сортов яровой пшеницы, участвующих в полевых сортоиспытаниях на базе ФИЦ “Немчиновка” в 2021 г.

В работе использовали яровые пшеницы сортов РИМА, Эстер, Лиза, Московская-35, Лада, Приокская, Агрос, Л459/3-15, Л460/2-15 и сорта и линии озимой пшеницы Московская 39, Московская 56, Мироновская 808, Эритроспермум 128/13,

<sup>1</sup> Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, Москва, Россия

<sup>2</sup> Федеральный исследовательский центр “Немчиновка”, Немчиновка, Московская область, Россия

\*e-mail: tanyadunaeva12@mail.ru



**Рис. 1.** (а) Схема кассеты для определения водоустойчивости почвенных агрегатов. Цифрами обозначены: 1 – алюминиевые уголки, соединенные между собой; 2 – хлопчатобумажные фитили; 3 – почвенные агрегаты. (б) Общая схема установки для определения водоустойчивости почвенных агрегатов: цифрами обозначены: 1 – алюминиевые уголки, соединенные между собой; 2 – хлопчатобумажные фитили; 3 – почвенные агрегаты; 4 – емкость с водой; 5 – весы; 6 – площадка с закрепленными на ней лезвиями; 7 – мерный стаканчик с песком; 8 – добавляемый в мерный стаканчик песок; 9 – луч лазера, направленный на мерную шкалу стаканчика.

Эритроспермум 416/20, Московская 40, Немчиновская 85, Эритроспермум 185/16, Лютесценс 214/17, Немчиновская 24, Немчиновская 17, Эритроспермум 130/19, Эритроспермум 118/20, Эритроспермум 361/20, Лютесценс 362/20, Лютесценс 982/08, которые выращивали на дерново-подзолистой почве в полях ФИЦ “Немчиновка” на делянках, на которые вносили разные дозы азотных удобрений. После уборки урожая с делянок, на которых выращивали пшеницу, были отобраны образцы почвы для определения их водоустойчивости и аллелотоксичности.

Процесс определения водоустойчивости состоял из двух этапов: подготовки образцов и проведения измерения.

При подготовке образцов почвы высушивали до воздушно-сухого состояния и просеивали через сита, отбирая агрегаты диаметром 4.5–5 мм.

В ходе измерения воздушно-сухие агрегаты помещали в кассету, представляющую собой 2 алюминиевых уголка, закрепленных таким образом, чтобы угол был ориентирован по направлению действия силы тяжести (рис. 1 а, 1). В ниж-

ней части уголка были размещены фитили из хлопчатобумажной ткани (рис 1 а, 2). В алюминиевые уголки на фитили укладывали по 14 почвенных агрегатов<sup>1</sup> так, чтобы они касались друг друга. Посредством вакуумирования удаляли из агрегатов воздух в течение 15 мин при разрежении 15 кПа. Условия были подобраны в ходе изучения водоустойчивости воздушно-сухих агрегатов в предварительных экспериментах. После этого агрегаты в вакууме через фитили капиллярно увлажняли до значений, близких к насыщению.

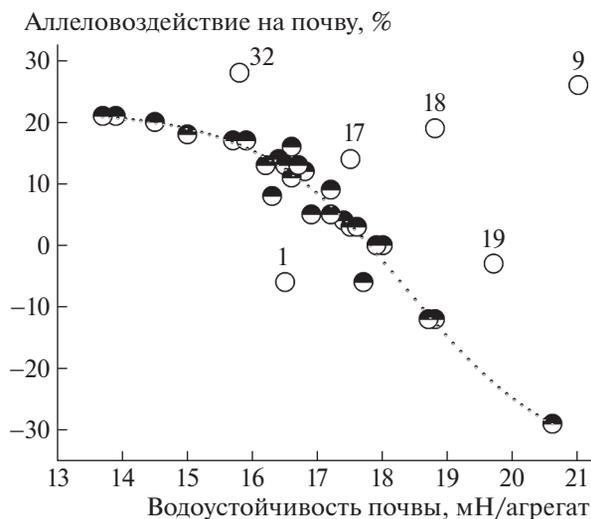
После увлажнения агрегатов в вакууме кассету извлекали из эксикатора и помещали в расположенную на весах емкость с водой таким образом (рис. 1 б, 4, 5), чтобы фитили агрегатов обеспечивали сохранение насыщения агрегатов водой, достигнутое на этапе вакуумирования. Затем на линейно расположенные агрегаты помещали устройство, представляющее собой два параллельно расположенных лезвия, закрепленные на площадке (рис. 1 б, 6), на которую устанавливали стаканчик с мерной шкалой (рис. 1 б, 7). Использование двух лезвий обеспечивало устойчивость устройства при воздействии на агрегаты, а также увеличивало количество агрегатов, которые одновременно рассекали лезвия. Добавляя песок в стаканчик (рис. 1 б, 8), повышали нагрузку на агрегаты, которую фиксировали при помощи весов. Луч лазера (рис. 1 б, 9), закрепленный на другом штативе, направленный на мерную шкалу стаканчика, позволял хорошо контролировать процесс разрушения агрегатов.

С целью стандартизации получаемых данных рассчитывали предельное сопротивление разрушения агрегатов. Экспериментально определяемую нагрузку в граммах выражали в миллиньютонах (мН). Для получения удельной характеристики нагрузку делили на общее количество агрегатов в повторности – 28 штук.

Эксперименты проводили в шестикратной повторности с последующей статистической обработкой результатов с использованием программного обеспечения OriginPro, в котором рассчитывали доверительный интервал, который не превышал 10% при 95% уровне значимости.

Для определения аллеловоздействия почв на развитие семян проводили сравнительные испытания по развитию проростков семян яровой пшеницы сорт Лиза в песке и почвах. При проведении этих экспериментов принимали за 100% развитие семян в песке и рассчитывали относительно полученного значения замедление или ускорение развития проростков семян почвой [1].

<sup>1</sup> Количество агрегатов, укладываемых в уголки, лимитировалось размерами емкости, в которой проводили их вакуумирование.



**Рис. 2.** Взаимосвязь между аллеловоздействием и водоустойчивостью почвенных образцов после выращивания на почве озимой и яровой пшеницы разных сортов. Номера образцов почв на графике соответствуют данным, представленным в таблицах.

Изучали изменение интегральной длины проростков 7.5 г семян (~200 шт.), которую определяли, используя экспресс-метод биотестирования, основанный на существовании линейной зависимости между насыпным объемом семян с проростками в воде и длиной их проростков [8].

При проведении экспериментов на дно чашки диаметром 95 мм помещали 30 г почвы или песка, затем ровным слоем размещали 7.5 г семян, а сверху – 30 г почвы или песка соответственно. После этого в чашку равномерно добавляли воду из мерной пипетки.

Семена, проросшие в песке/почве, отмывали от субстрата и помещали порциями в мерный цилиндр на 100 мл с водой, размещенный на вибростол, колеблющемся с частотой 50 Гц. После помещения каждой порции проросших семян в цилиндре на них помещали (сроком на 15–20 с) небольшой резиновый грузик массой 8 г, что приводило к уплотнению структуры. После проводили дополнительное уплотнение структуры легкими постукиваниями (30–40 раз) цилиндра о стол. Эти операции позволяли создать однородную структуру, а нижняя граница груза позволяла определять насыпной объем с точностью до 0.5 мл.

Эксперименты проводили в шестикратной повторности с последующей статистической обработкой результатов с использованием программного обеспечения OriginPro, в котором рассчитывали доверительный интервал, который не превышал 15% при 95% уровне значимости.

Полученные данные по водоустойчивости и аллеловоздействию образцов почв после выращивания озимой и яровой пшеницы разных сортов приведены в табл. 1 и 2.

Из построенного в координатах “аллеловоздействие – водоустойчивость почв” графика (рис. 2) хорошо видно, что образцы почвы после выращивания трех сортов пшеницы (Московская 39, Лютеценс 214/17 и Агрос) выпадают из общей картины. На графике 6 точек выпадают из общей картины (один из сортов выращивали при 4 дозах внесения азота).

Свойства образцов почв после выращивания 22 сортов пшеницы располагаются на графике так, что аппроксимируются с очень высокой корреляцией (более 95%) сигмоидной зависимостью.

Из полученных данных хорошо видно, что длина стебля пшеницы, доза вносимых в почву азотных удобрений и урожайность не оказывают значимого влияния на изучаемые свойства, так как обнаруженная закономерность не нарушается при изменении этих параметров.

Можно предположить, что увеличение количества растительных остатков, которые попадают в почву [5–7] преимущественно в виде корневого опада, сопровождается ростом водоустойчивости.

На основе полученной зависимости можно сделать вывод, что увеличение количества попадающих в почву растительных остатков приводит сначала к снижению стимулирующего воздействия, а затем – к проявлению и росту аллелотоксичности почв. Это хорошо объясняется с позиций известных из литературы данных по изучению аллелотоксичности.

В них показано, что при малых концентрациях аллелотоксины оказывают на растения стимулирующее, а не угнетающее влияние, а их негативный эффект начинает проявляться при более высокой концентрации [9, 10].

**Таблица 1.** Водоустойчивость и аллеловоздействие образцов дерново-подзолистых почв на прорастание семян яровой пшеницы сорт “Лиза” и начальную стадию развития из них растений после выращивания различных сортов озимой пшеницы, удобряемых различными дозами азота

№	Сорт	Длина стебля	Доза азота, кг/га	Аллеловоздействие, %	Водоустойчивость, мН/агрегат
1	Московская 39	длинный	120	-6 ± 2	16.5 ± 0.52
2	Московская 56	длинный	120	+4 ± 2	17.4 ± 0.60
3	Мироновская 808	длинный	120	0 ± 2	18.0 ± 0.56
4	Эритроспермум 128/13	длинный	120	+18 ± 3	15.0 ± 0.76
5	Эритроспермум 416/20	длинный	120	+20 ± 3	14.5 ± 0.92
6	Московская 40	средний	120	+17 ± 3	15.7 ± 0.65
7	Немчиновская 85	средний	120	+12 ± 2	16.8 ± 0.84
8	Эритроспермум 185/16	средний	120	+4 ± 2	17.4 ± 0.54
9	Лютесценс 214/17	средний	120	+26 ± 3	21.0 ± 1.06
10	Немчиновская 24	средний	120	+3 ± 2	17.5 ± 0.74
11	Немчиновская 17	средний	120	+3 ± 2	17.6 ± 0.54
12	Эритроспермум 130/19	короткий	120	+16 ± 3	16.6 ± 0.95
13	Эритроспермум 118/20	короткий	120	+21 ± 3	13.9 ± 0.50
14	Эритроспермум 361/20	короткий	120	+21 ± 3	13.7 ± 0.36
15	Лютесценс 362/20	короткий	120	+14 ± 3	16.4 ± 0.30
16	Лютесценс 982/08	короткий	120	0 ± 2	17.9 ± 1.02
17	Московская 39	длинный	0	+14 ± 3	17.5 ± 0.52
18	Московская 39	длинный	60	+19 ± 3	18.8 ± 1.30
19	Московская 39	длинный	180	-3 ± 2	19.7 ± 0.38
20	Немчиновская 85	средний	0	-6 ± 3	17.7 ± 0.56
21	Немчиновская 85	средний	60	-12 ± 3	18.8 ± 0.38
22	Немчиновская 85	средний	180	5 ± 2	17.2 ± 0.43
23	Лютесценс 982/08	короткий	0	-29 ± 4	20.6 ± 0.59
24	Лютесценс 982/08	короткий	60	-12 ± 3	18.7 ± 0.95
25	Лютесценс 982/08	короткий	180	+9 ± 3	17.2 ± 0.81

**Таблица 2.** Водоустойчивость и аллеловоздействие образцов дерново-подзолистых почв на прорастание семян яровой пшеницы сорт “Лиза” и начальную стадию развития из них растений после выращивания различных сортов яровой пшеницы, удобренных дозой азота 120 кг/га

№	Сорт	Урожайность, т/га	Аллеловоздействие, %	Водоустойчивость, мН/агрегат
26	РИМА	3.36 ± 0.62	5 ± 2	16.9 ± 0.43
27	Эстер	3.27 ± 0.33	13 ± 2	16.5 ± 0.46
28	Лиза	2.80 ± 0.28	11 ± 2	16.6 ± 0.28
29	Московская-35	3.62 ± 0.25	17 ± 3	15.9 ± 0.38
30	Лада	3.68 ± 0.29	13 ± 2	16.2 ± 0.44
31	Приокская	3.69 ± 0.22	9 ± 2	17.2 ± 0.52
32	Агрос	4.35 ± 0.34	28 ± 3	15.8 ± 1.28
33	Л459/3-15	4.58 ± 0.37	8 ± 2	16.3 ± 0.89
34	Л460/2-15	4.47 ± 0.24	13 ± 2	16.7 ± 0.85

На основе всей представленной выше информации дается достаточно простое объяснение полученной сигмоидной зависимости — увеличение количества растительных остатков, попадающих в почву, приводит к увеличению поступления в почву аллелотоксинов, которые при росте их содержания в почве изменяют эффект воздействия от стимуляции к угнетению. При этом из данного объяснения вытекает ряд следствий, без которых трудно представить возникновение наблюдающейся зависимости:

1. Аллелотоксины в условиях выращивания пшениц в 2021 г. попадали в почву преимущественно при перегнивании корневых растительных остатков. Все остальные описанные выше механизмы (1–4) не могут оказывать на поступление аллелотоксинов в почву при проведении данных экспериментов значимого влияния, так как в противном случае не удалось бы получить обнаруженной зависимости.

2. Растительные остатки озимой пшеницы, попавшие в почву перед зимой, к лету уже перегнивают и не оказывают значимого влияния на водостойчивость и на аллеловоздействие почв. Иначе данные по свойствам почв после озимых пшениц не легли на одну кривую с данными после яровых пшениц.

3. Количество отмирающих корней не зависит от наземной массы растений. Об этом свидетельствует отсутствие влияния на аллелотоксичность и водостойчивость почвенных образцов урожайности и длины стебля растений.

4. Количество аллелотоксинов в растительных остатках разных сортов пшеницы и их состав значимо не меняются от сорта к сорту, а также под влиянием внесения азотных удобрений. В противном случае следовало бы ожидать большего разброса точек.

Причина того, что сорта Московская 39, Лютеценс 214/17 и Агрос при выращивании влияют на почву иначе, по-видимому, связана с тем, что либо доминирует другой механизм поступления в почву аллелотоксинов, либо для этих сортов характерны другие составы аллелотоксинов, образующихся в почве при перегнивании корневого опада.

## ВЫВОДЫ

1. При изучении аллеловоздействия на почву и ее водостойчивость при выращивании на почве яровой и озимой пшениц разных сортов обнаружено существование сигмоидной зависимости этих свойств друг от друга для 22 из 25 исследованных сортов.

2. На основании литературных данных выдвинуто предположение, что существование этой зависимости определяется повышением водо-

устойчивости почв при увеличении количества попадающих в них свежих растительных остатков и переходом аллеловоздействия аллелотоксинов от стимуляции к угнетению с ростом их концентрации в почве.

3. Причина отличающегося поведения трех сортов пшеницы Московская 39, Лютеценс 214/17 и “Агрос” от других сортов пшеницы в настоящий момент не вполне понятна.

## ИСТОЧНИК ФИНАНСИРОВАНИЯ

Работа выполнена при финансовой поддержке РНФ в рамках научного проекта № 22-14-00107 Методологические основы оценки продукционного потенциала почв на федеральном, региональном и локальном уровнях.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Гродзинский А.М., Богдан Г.П., Головки Э.А., Дзюбенко Н.Н., Мороз П.А., Прутенская Н.И. Аллелопатическое почвоутомление. Киев: Наук. думка, 1979. 248 с.
2. Allelopathy. A Physiological Process with Ecological Implications / Eds. Reigosa M.J., Pedrol N., Gonzalez L. Springer, 2006. 637 p.
3. Rice E.L. Allelopathy. New York: Academic Press, 1984. 422 p.
4. Cheng F., Cheng Z. Research Progress on the use of Plant Allelopathy in Agriculture and the Physiological and Ecological Mechanisms of Allelopathy // *Frontiers in Plant Science*. 2015. V. 6. Article 1020.
5. Шинкарев А.А., Перепелкина Е.Б. Содержание и состав гумусовых веществ в водопроходных агрегатах темно-серой лесной почвы // *Почвоведение*, 1997. № 2. С. 165–172.
6. Козут Б.М. Принципы и методы оценки содержания трансформируемого органического вещества в пахотных почвах // *Почвоведение*, 2003. № 3. С. 308–316.
7. Овчинникова М.Ф. Деградация гумуса (особенности проявления в разных экоусловиях). М. 2012. 236 с.
8. Федотов Г.Н., Шоба С.А., Федотова М.Ф., Горепенин И.В. Влияние аллелотоксичности почв на прорастание семян зерновых культур // *Почвоведение*. 2019. № 4. С. 489–496.
9. Ghulam J., Shaukat M., Arshad N.C., Imran H., Muhammad A. Allelochemicals: sources, toxicity and microbial transformation in soil — a review // *Annals of Microbiology*, 58 (3), 351–357 (2008).
10. Гродзинский А.М. Аллелопатия растений и почвоутомление. Избранные труды. Киев, Наукова думка. 1991. 432 с.

## ALLELOTOXICITY AND WATER STABILITY OF SOD-PODZOLIC SOIL AFTER WHEAT GROWING

Academician of the RAS **B. I. Sandukhadze<sup>b</sup>, G. N. Fedotov<sup>a</sup>, N. V. Davydova<sup>b</sup>, R. Z. Mamedov<sup>b</sup>, D. A. Ushkova<sup>a</sup>, V. A. Nardid<sup>b</sup>, I. V. Gorepekin<sup>a</sup>, M. S. Krakhmaleva<sup>b</sup>, D. I. Potapov<sup>a</sup>, A. O. Kazachenko<sup>b</sup>, V. V. Bugrova<sup>b</sup>, and T. A. Gracheva<sup>a,#</sup>**

<sup>a</sup> *Lomonosov Moscow State University, Moscow, Russian Federation*

<sup>b</sup> *Federal Research Center "Nemchinovka", Nemchinovka, Moscow region, Russian Federation*

<sup>#</sup> *e-mail: tanyadunaeva12@mail.ru*

It is known that soil allelotoxicity and the water stability of soil structure are determined by the entry of plant residues into the soil, but the relationship of these soil properties has not been investigated. The selection of soil samples from the fields of the Federal Research Center "Nemchinovka" after growing on plots with sod-podzolic soil 25 cultivars of spring and winter wheat was carried out in the work. Effect of soil allelotoxicity of plot samples on germination of spring wheat seed of Liza cultivar was studied by biotesting method. The water stability of soil structure was determined for the same samples. The existence of a sigmoid dependence between the allelotoxicity of soil samples and their water stability with a correlation greater than 95% has been established. The presence of such dependence is apparently related to the increase in soil water stability known from the literature with an increase in the amount of fresh plant residues entering them and the transition of the allelotoxins effects from stimulation to suppression with an increase in their concentration in soils.

**Keywords:** spring and winter wheat, water stability of soil, plant residues, alleloeffect of soils, seed development in soils, the effect of allelotoxins on plants

УДК 577.11

## СВОЙСТВА И АКТИВНОСТЬ ПЕПТИДОВ НА ОСНОВЕ КЛЕТОЧНОГО РЕЦЕПТОРА ACE2 И ИХ ВЗАИМОДЕЙСТВИЕ С РЕЦЕПТОР-СВЯЗЫВАЮЩИМ ДОМЕНОМ БЕЛКА S ВИРУСА SARS-COV-2

© 2022 г. М. В. Сидорова<sup>1</sup>, Р. Ш. Бибилашвили<sup>1</sup>, Д. В. Авдеев<sup>1</sup>, У. С. Кожокар<sup>1</sup>, М. Е. Палькеева<sup>1</sup>, М. В. Овчинников<sup>1</sup>, А. С. Молокоедов<sup>1</sup>, Д. А. Широков<sup>2,3</sup>, А. В. Семенова<sup>2</sup>, В. И. Уварова<sup>4</sup>, П. О. Куляев<sup>5</sup>, Е. В. Хватов<sup>4</sup>, А. А. Игнатова<sup>6</sup>, А. В. Феофанов<sup>7</sup>, Д. И. Осолодкин<sup>4,8</sup>, Ю. Б. Порозов<sup>5,8</sup>, Л. И. Козловская<sup>4,8,\*</sup>, академик РАН А. А. Ишмухаметов<sup>4,8</sup>, член-корреспондент РАН Е. В. Парфёнова<sup>1</sup>, академик РАН А. М. Егоров<sup>4,7</sup>

Поступило 11.07.2022 г.

После доработки 15.07.2022 г.

Принято к публикации 18.07.2022 г.

Целью работы были дизайн и характеристика пептидов на основе  $\alpha$ -спиралей h1 и h2 клеточного рецептора ACE2, формирующих интерфейс взаимодействия с рецептор-связывающим доменом (RBD) S-белка SARS-CoV-2. Синтезированы мономерные пептиды и гетеродимерные пептиды на их основе, соединенные дисульфидными связями по различным положениям. Исследованы растворимость, аффинность к RBD и степень спирализации пептидов, а также проведено моделирование молекулярной динамики в различных растворителях. Установлено, что сохранение спиральной конформации является необходимым условием связывания пептидов с RBD. Растворенные в воде пептиды имеют низкую степень спиральности и низкую аффинность к RBD. Димерные пептиды обладают более высокой степенью спиральности, чем мономерные, что может быть следствием взаимного влияния спиралей. Степень спиральности пептидов в трифторэтаноле была наиболее высокой, однако для проведения исследований *in vitro* наиболее подходящим растворителем является водно-спиртовая смесь.

**Ключевые слова:** SARS-CoV-2, пептидные ингибиторы, RBD, ACE2, спиральность, константа диссоциации

**DOI:** 10.31857/S2686738922060336

<sup>1</sup> Национальный медицинский исследовательский центр кардиологии им. академика Е.И. Чазова, Москва, Россия

<sup>2</sup> Федеральный научно-клинический центр физико-химической медицины Федерального медико-биологического агентства, Москва, Россия

<sup>3</sup> Московская государственная академия ветеринарной медицины и биотехнологии им. К.И. Скрябина, Москва, Россия

<sup>4</sup> Федеральный научный центр исследований и разработки иммунобиологических препаратов им. М.П. Чумакова Российской академии наук (Институт полиомиелита), Москва, Россия

<sup>5</sup> Научно-технологический университет "Сириус", Сочи, Россия

<sup>6</sup> Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова Российской академии наук, Москва, Россия

<sup>7</sup> Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, Москва, Россия

<sup>8</sup> Первый Московский государственный медицинский университет им. И.М. Сеченова (Сеченовский университет), Москва, Россия

\*e-mail: kozlovskaya\_li@chumakovs.ru

Пандемия COVID-19 и появление новых вариантов ее этиологического агента – вируса SARS-CoV-2 – делает актуальными исследования по поиску эффективных средств профилактики и лечения этой инфекции. На начальных стадиях взаимодействия вируса с клеткой ключевую роль играет белок S, который формирует шипы на поверхности вирусной частицы. Рецептор-связывающий домен (RBD) белка S взаимодействует с интерфейсом клеточного рецептора ACE2, состоящим из  $\alpha$ -спиралей h1 и h2, и запускает слияние клеточной и вирусной мембран для проникновения вирусного генома в цитоплазму клетки [1]. На настоящий момент для ингибирования этого взаимодействия разработаны и применяются в клинической практике моноклональные антитела с нейтрализующей активностью [2–4], которые в дальнейшем станут препаратом сравнения для новых соединений. Одним из подходов к дизайну молекул, способных по конкурентному механизму предотвращать связывание RBD SARS-CoV-2 и родственных ему вирусов с ACE2, являет-

ся конструирование пептидов, имитирующих структуру и свойства клеточного рецептора ACE2. В 2020–2022 гг. изучено значительное количество пептидных молекул на основе последовательности ACE2 и нацеленных на взаимодействие с белком S [5] методами *in silico*, и только для некоторых из них эффективность ингибирования образования комплекса RBD-ACE2 и (или) противовирусная активность были исследованы *in vitro*. Более того, всего несколько синтезированных структур, проявивших высокую (наномольную) аффинность связывания *in silico* [6] и *in vitro* [7, 8], проявили противовирусную активность на клеточных моделях или животных [9–12].

Для повышения эффективности связывания необходимо оптимизировать структуру пептида с целью создания молекулы, наиболее близко воссоздающей структуру ACE2, обеспечивающую высокоаффинное взаимодействие с RBD [13–15]. Нами были разработаны и синтезированы мономерные пептиды на основе аминокислотной последовательности антипараллельных  $\alpha$ -спиралей h1 и h2 ACE2 с модифицированными остатками. Мономерные пептиды были соединены дисульфидными мостиками по различным положениям для получения гетеродимерных “химерных” пептидов X1-4 (табл. 1; синтез пептидов X1, X2 и их мономеров описан ранее [16]). Для этих пептидов проведены экспериментальные исследования растворимости, аффинности связывания с RBD и степени спирализации, а также моделирование молекулярной динамики в различных растворителях.

Исследование аффинности проводили методом микротермофореза [17], а исследование степени  $\alpha$ -спиральности – с помощью спектроскопии кругового дихроизма (КД) [18] (табл. 1). Синтезированные пептиды обладают низкой растворимостью в воде. В водном растворе аффинность к RBD проявляли только два химерных пептида (Kd X1: 4 мкМ, X2: 12 мкМ) и два мономерных пептида на основе спирали h2 (константы диссоциации Kd составили h2: 40 мкМ, 900h2: 2 мкМ). Методом КД было установлено, что пептиды в водном растворе имеют низкую степень спиральности, что может являться причиной их низкой аффинности к RBD.

Стабилизация элементов вторичной структуры в пептидах и белках, в частности,  $\alpha$ -спиралей, – это комплексный многофакторный процесс, в котором участвуют несколько различных механизмов. К индуцирующим спирализацию эффектам относят уменьшение энтропийного вклада молекул растворителя в сворачивание спиралей за счет разрушения сети водородных связей между ними и боковыми цепями аминокислотных остатков пептида.

Для повышения степени спирализации синтезированных пептидов были подобраны растворители, стабилизирующие их  $\alpha$ -спиральную конформацию, а также пригодные для биологических экспериментов.

Наиболее подходящим для поддержания устойчивой спиральной конформации пептидов является трифторэтанол (ТФЭ) [19]. Степень спиральности пептидов в ТФЭ была наиболее высокой: от 50 до 100%. При этом димерные пептиды X3 и X4 в ТФЭ сохраняют полностью спиральную конформацию. Этот растворитель может быть использован для характеристики общей способности пептида к спирализации. Однако ТФЭ токсичен для культур клеток и в высокой концентрации непригоден для проведения исследований *in vitro*.

Методом КД была подтверждена более высокая степень спиральности пептидов в водно-спиртовой смеси (37–63%) по сравнению с водой. В водно-спиртовой смеси мономерные пептиды проявляют аффинность к RBD с константами диссоциации в диапазоне 1–4 и 2–8 мкМ для пептидов на основе последовательности  $\alpha$ -спирали h1 и h2 соответственно. Объединение мономерных пептидов в гетеродимеры приводит к повышению аффинности при соединении “середины к середине” или “хвост к голове” (константы диссоциации дипептидов X2 и X4 < 1 мкМ), однако не влияет на аффинность при соединении “голова к хвосту” (константа диссоциации дипептида X1 ~7 мкМ) (табл. 1). Кроме того, димерные пептиды обладают более высокой степенью спиральности, чем мономерные, что может быть следствием взаимного стабилизирующего влияния спиралей h1 и h2 друг на друга.

При моделировании молекулярной динамики (100–300 нс) в воде пептиды, особенно мономерные, проявляют склонность к дестабилизации структуры и потере спиральной конформации (рис. 1).

Степень спиральности и стабильности химерных пептидов в воде оказывается значительно выше, чем у мономерных, что поддерживает гипотезу о взаимной стабилизации спиралей в гетеродимерах. В водно-спиртовой смеси и в ТФЭ спиральная конформация остается достаточно стабильной в течение всего времени моделирования как для мономерных, так и химерных пептидов. Это указывает на возможность дополнительной стабилизации спиральной структуры за счет свойств этих растворителей, частично имитирующих особенности белкового окружения спиралей в структуре рецептора.

Предложенные димерные пептиды на основе спиралей h1 и h2 рецептора ACE2, соединенных дисульфидными мостиками, способны к связыванию с RBD S-белка SARS-CoV-2 с аффинно-

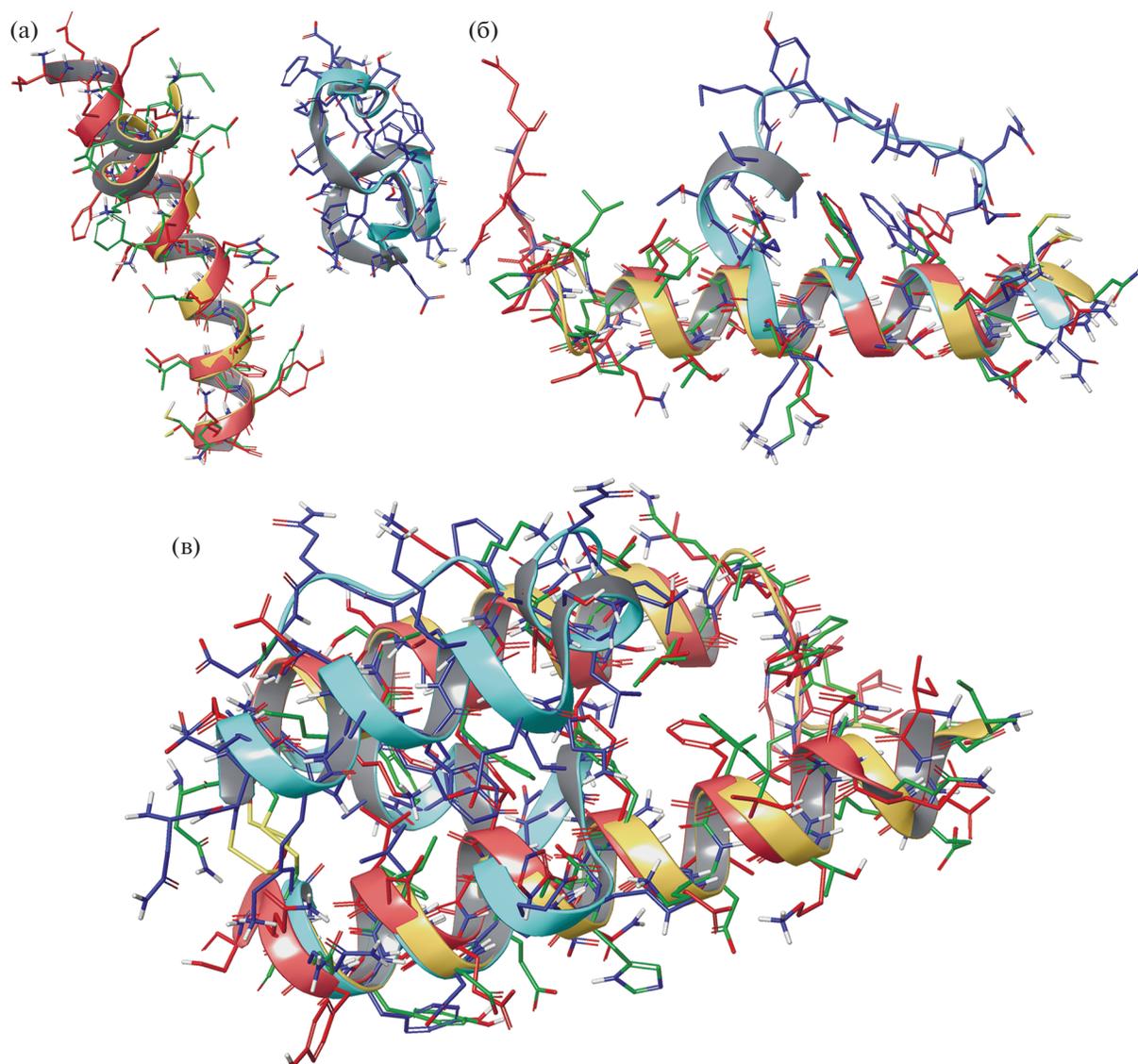
Таблица 1. Структура и свойства изучаемых пептидов

Код, комментарий	Последовательность	α-спиральность, % <sup>a</sup>			Kd связывания с RBD, μM <sup>b</sup>	
		H <sub>2</sub> O	ВСС	ТФЭ	H <sub>2</sub> O	ВСС
Спираль h1						
МТИ–23 (SPB1, контроль)	IEEQAKTFLDKFNHEAEDLFYQS-NH <sub>2</sub>	6.0	44.4	79.8	NB	3.57 ± 1.78
h1–D–Cys (21–42) h1	cEEQAKTFLDKFNHEAEDLFYk	6.2	39.2	72.5	–	–
h1–Mpa (21–42) h1	IEEQAKTFLDK[Mpa]FNHQAEDLFYk	6.0	37.8	85.3	NB	1.07 ± 0.36
200h1 (21–44) h1	IEEQAKTFLDKFNHEAEDLFYQCS	3.9	40.3	52.4	NB	3.10 ± 1.03
900h1 (21–44) h1	IEEQAKTFLDEFNEEAEDLFYQCS	NS*	37.2	73.7	NB	3.45 ± 2.42
Спираль h2						
h2 (67–89) h2	DKWSAFLKEQSTIAQ-Nle-YPLQECI	8.0	45.5	62.0	40 ± 8	2.58 ± 1.11
h2–Cys (67–89) h2	DKWSAFLKECSTIAQIYPLQEI	6.9	38.2	70.2	NB	3.87 ± 1.94
900h2 (64–87) h2	NCGDKWSAFLKEQSTLAQ-Nle-YPLQE	7.2	51.6	65.2	1.7 ± 0.4	7.22 ± 3.61
Димерные пептиды						
X1 (h1–D–Cys – h2)	cEEQAKTFLDKFNHEAEDLFYk   S ————— S DKWSAFLKEQSTLAQ-Nle-YPLQECI	8.0	41.1	95.2	4.2 ± 0.5	7.39 ± 5.54
X2 (h1–Mpa – h2–Cys)	IEEQAKTFLDKFNHQAEDLFYk   Mpa   S   S   DKWSAFLKECSTIAQIYPLQEI	NS	51.7	82.5	12 ± 5	0.929 ± 0.371
X3 (200h1 – 900h2) Cys <sup>43</sup> (h1)–Cys <sup>65</sup> (h2)	IEEQAKTFLDKFNHEAEDLFYQCS   S ————— S   NCGDKWSAFLKEQSTLAQ-Nle-YPLQE	NS	55.0	98.0	NB	–
X4 (900h1 – 900h2)	IEEQAKTFLDEFNEEAEDLFYQCS   S ————— S   NCGDKWSAFLKEQSTLAQ-Nle-YPLQE	8.8	62.8	100.0	NB	0.882 ± 0.353

NB – нет связывания в исследованном диапазоне концентраций; NS – исследование не проведено из-за нерастворимости пептида; – исследование не проводилось; а – по данным спектроскопии КД; б – по данным термофореза.

стью в субмикромольном диапазоне, превышающей аффинность индивидуальных мономеров. Образование спиральной структуры пептидов приводит к повышению эффективности связывания с RBD SARS-CoV-2: аффинность пептидов к RBD зависит от степени α-спиральности их вторичной структуры, и сохранность исходной спиральной структуры, присущей рецептору ACE2, необходима для успешного связывания с RBD S-

белка SARS-CoV-2. Водно-спиртовая смесь (ВСС) поддерживает спиральность пептидов и может быть использована для проведения исследований *in vitro*. Дальнейшая стабилизация структуры пептидов и подбор оптимальной аминокислотной последовательности и растворителя позволят создать кандидатные молекулы для исследования взаимодействия SARS-CoV-2 и рецептора *in vivo*.



**Рис. 1.** Репрезентативные структуры мономерных пептидов 200h1 (а) и 900h2 (б) и полученного из них химерного пептида X3 (в) по результатам моделирования молекулярной динамики. Структуры в воде, ВСС и ТФЭ окрашены голубым, красным и желтым цветом, соответственно, и совмещены по наибольшему структурному подобию. Наложение структур 200h1 оказывается невозможным в силу принципиального отличия конформаций.

#### БЛАГОДАРНОСТИ

Авторы благодарят В. Мануверу и А. Варижук за проведение оценки аффинности связывания методом термофореза.

#### ИСТОЧНИК ФИНАНСИРОВАНИЯ

Работа поддержана грантом Российского фонда фундаментальных исследований № 20-04-60110.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Yang J., Petitjean S.J.L., Koehler M., et al. Molecular interaction and inhibition of SARS-CoV-2 binding to the ACE2 receptor. // *Nat. Commun.* 2020. V. 11. P. 4541.
2. Guo Y., Huang L., Zhang G., et al. SARS-CoV-2 neutralizing antibody with extensive Spike binding coverage and modified for optimal therapeutic outcomes // *Nat. Commun.* 2021. V. 12. № 1. P. 2623.
3. Zhou X., Wang H., Ji Q., et al. Molecular deconvolution of the neutralizing antibodies induced by an inactivated SARS-CoV-2 virus vaccine // *Protein Cell.* 2021. V. 12. № 10. P. 818–823.
4. Chen D., Zhao Y., Li M., et al. A general Fc engineering platform for the next generation of antibody therapeutics // *Theranostics.* 2021. V. 11. № 4. P. 1901–1917.
5. Pomplun S. Targeting the SARS-CoV-2-spike protein: from antibodies to miniproteins and peptides // *RSC Med. Chem.* 2020 V. 12. № 2. P. 197–202.
6. Han Y., Král P. Computational Design of ACE2-Based Peptide Inhibitors of SARS-CoV-2 // *ACS Nano.* 2020. V. 14. № 4. P. 5143–5147.

7. Huang X., Pearce R., Zhang Y. De novo design of protein peptides to block association of the SARS-CoV-2 spike protein with human ACE2 // *Aging* (Albany NY). 2020. V. 12. № 12. P. 11263–11276.
8. Sadremomtaz A., Al-Dahmani Z.M., Ruiz-Moreno A.J., et al. Synthetic Peptides That Antagonize the Angiotensin-Converting Enzyme-2 (ACE-2) Interaction with SARS-CoV-2 Receptor Binding Spike Protein // *J. Med. Chem.* 2022. V. 65. № 4. P. 2836–2847.
9. Cao L., Goresnik I., Coventry B., et al. De novo design of picomolar SARS-CoV-2 miniprotein inhibitors // *Science*. 2020. V. 370. № 6515. P. 426–431.
10. Curreli F., Victor S.M.B., Ahmed S., et al. Stapled Peptides Based on Human Angiotensin-Converting Enzyme 2 (ACE2) Potently Inhibit SARS-CoV-2 Infection In Vitro // *mBio*. 2020. V. 11. № 6. P. e02451–20.
11. Khatri B., Pramanick I., Malladi S.K., et al. A dimeric proteomimetic prevents SARS-CoV-2 infection by dimerizing the spike protein // *Nat. Chem. Biol.* 2022.
12. Linsky T.W., Vergara R., Codina N., et al. De novo design of potent and resilient hACE2 decoys to neutralize SARS-CoV-2 // *Science*. 2020. V. 370. № 6521. P. 1208–1214.
13. Muttenthaler M., King G.F., Adams D.J., Alewood P.F. Trends in peptide drug discovery. *Nat Rev Drug Discov.* 2021. V. 20. № 4. P. 309–325.
14. Maas M.N., Hintzen J.C.J., Löffler P.M.G., et al. Targeting SARS-CoV-2 spike protein by stapled hACE2 peptides // *Chem. Commun. (Camb)*. 2021. V. 7. № 26. P. 3283–3286.
15. Morgan D.C., Morris C., Mahindra A., et al. Stapled ACE2 peptidomimetics designed to target the SARS-CoV-2 spike protein do not prevent virus internalization // *Pept. Sci. (Hoboken)*. 2021. V. 8. P. e24217.
16. Библиашвили П.Ш., Сидорова М.В., Дудкина У.С. и др. Пептидные ингибиторы взаимодействия рецептор-связывающего домена вируса SARS-CoV-2 с клеточным рецептором ACE2 // *Биомед. хим.* 2021. Т. 67. № 3. С. 244–250.
17. Tsvetkov V., Varizhuk A., Kozlovskaya L., et al. EGCG as an anti-SARS-CoV-2 agent: Preventive versus therapeutic potential against original and mutant virus // *Biochimie*. 2021. № 191. P. 27–32.
18. Sreerama N.W. Estimation of Protein Secondary Structure from Circular Dichroism Spectra: Comparison of CONTIN, SELCON, and CDSSTR Methods with an Expanded Reference Set // *Anal. Biochem.* 2020. V. 287. № 2. P. 252–260.
19. Buck M. Trifluoroethanol and colleagues: cosolvents come of age. Recent studies with peptides and proteins // *Q. Rev. Biophys.* 1998. V. 31. № 3. P. 297–355.

## PROPERTIES AND ACTIVITY OF PEPTIDE DERIVATIVES OF ACE2 CELLULAR RECEPTOR AND THEIR INTERACTION WITH SARS-COV-2 S-PROTEIN RECEPTOR-BINDING DOMAIN

M. V. Sidorova<sup>a</sup>, R. S. Bibilashvili<sup>a</sup>, D. V. Avdeev<sup>a</sup>, U. S. Kozhokar<sup>a</sup>, M. E. Palkeeva<sup>a</sup>,  
M. V. Ovchinnikov<sup>a</sup>, A. S. Molokoedov<sup>a</sup>, D. A. Shirokov<sup>b,c</sup>, A. V. Semyonova<sup>b</sup>, V. I. Uvarova<sup>d</sup>,  
P. O. Kulyaev<sup>e</sup>, E. V. Khvatov<sup>d</sup>, A. A. Ignatova<sup>f</sup>, A. V. Feofanov<sup>g</sup>, D. I. Osolodkin<sup>d,h</sup>, Yu. B. Porozov<sup>e,h</sup>,  
L. I. Kozlovskaya<sup>d,h,#</sup>, Academician of the RAS A. A. Ishmukhametov<sup>d,h</sup>,

Corresponding Member of the RAS Ye. V. Parfyenova<sup>a</sup>, and Academician of the RAS A. M. Egorov<sup>d,g</sup>

<sup>a</sup> National Medical Research Center for Cardiology named after academician E.I. Chazov of the Ministry of Health of the Russian Federation, Moscow, Russian Federation

<sup>b</sup> Federal Research and Clinical Center of Physical Chemical Medicine of Federal Medical Biological Agency, Moscow, Russian Federation

<sup>c</sup> K.I. Skryabin Moscow State Academy of Veterinary Medicine and Biotechnology, Moscow, Russian Federation

<sup>d</sup> Chumakov Federal Scientific Center for Research and Development of Immune-and-Biological Products of Russian Academy of Sciences (Institute of Poliomyelitis), Moscow, Russian Federation

<sup>e</sup> Sirius University of Science and Technology, Sochi, Russian Federation

<sup>f</sup> Institute of Bioorganic Chemistry, Russian Academy of Sciences (RAS), Moscow, Russian Federation

<sup>g</sup> Lomonosov Moscow State University, Moscow, Russian Federation

<sup>h</sup> Sechenov First Moscow State Medical University (Sechenov University), Moscow, Russian Federation

<sup>#</sup>e-mail: kozlovskaya\_li@chumakovs.su

The aim of this work was to design and characterize peptides based on the  $\alpha$ -helices h1 and h2 of the ACE2 receptor, forming the interaction interface between the receptor-binding domain (RBD) of the SARS-CoV-2 S-protein and the cellular ACE2 receptor. Monomeric and heterodimeric peptides were synthesized, connected by disulfide bonds at different positions. Solubility, RBD binding affinity, and peptide helicity were studied, and molecular dynamics simulation was carried out in various solvents. It has been established that the preservation of the helical conformation is a necessary condition for the binding of peptides to RBD. Peptides have a low degree of helicity in water and low affinity for RBD. Dimeric peptides have a higher degree of helicity than monomeric ones, probably due to the mutual influence of helices. The degree of helicity of the peptides in trifluoroethanol is the highest; however, for *in vitro* studies, the most suitable solvent is a water-ethanol mixture.

**Keywords:** SARS-CoV-2, peptide inhibitors, RBD, ACE2, helicity, dissociation constant

УДК 616.92

## ВЗАИМОСВЯЗЬ ПРОГНОЗА ТЕЧЕНИЯ COVID-19 С МУТАЦИЯМИ БЕЛКА NS8 SARS-COV-2 В ЗАВИСИМОСТИ ОТ ШТАММОВОЙ ПРИНАДЛЕЖНОСТИ ВИРУСА

© 2022 г. М. Ю. Шкурников<sup>1,2,\*</sup>, Д. А. Аверинская<sup>1</sup>, А. Г. Комаров<sup>3</sup>, И. А. Карбышев<sup>3</sup>, Г. И. Спешиллов<sup>3</sup>, И. А. Штинова<sup>3</sup>, Д. А. Дорошенко<sup>4</sup>, В. И. Вечорко<sup>4</sup>

Представлено академиком РАН С.И. Колесниковым

Поступило 08.08.2022 г.

После доработки 14.08.2022 г.

Принято к публикации 16.08.2022 г.

В середине 2021 г. штамм Дельта SARS-CoV-2 вызвал третью волну пандемии COVID-19. Огромные усилия были направлены на изучение влияния его мутаций на эффективность нейтрализующих антител. Значительно меньшее внимание было обращено на индивидуальные особенности презентации его пептидов молекулами главного комплекса гистосовместимости класса I (ГКГС-I). В данном исследовании была изучена взаимосвязь HLA-I генотипа пациентов в возрасте не старше 60 лет с тяжестью течения COVID-19, вызванной двумя наиболее распространенными летом 2021 г. вариантами штамма Дельта SARS-CoV-2: AY.122 и B.1.617.2. Анализ тяжести течения COVID-19 выявил более тяжелое течение заболевания, вызванного вариантом AY.122. Сравнение профиля мутаций двух наиболее распространенных вариантов штамма Дельта показал, что наибольший вклад в способность ГКГС-I презентировать пептиды вируса вносит мутация G8R в белке NS8. Учитывая, что белок NS8 способен подавлять созревание молекул ГКГС-I, появление мутации в одном из его иммуногенных эпитопов, могло внести весомый вклад в превалирование варианта AY.122 в российской популяции.

**Ключевые слова:** COVID-19, NS8, ORF8, HLA, ГКГС-I, AY.122, B.1.617.2

**DOI:** 10.31857/S2686738922060312

### ВВЕДЕНИЕ

В середине 2021 г. штамм Дельта коронавируса SARS-CoV-2 вызвал третью волну пандемии COVID-19 в ряде стран мира, в том числе и в России [1]. Резкий рост заболеваемости был связан с высокой трансмиссивностью нового штамма по сравнению с альфа-вариантом [2]. Возрастание трансмиссивности во многом было обусловлено увеличением до 6 раз по сравнению со штаммом Альфа количества выдыхаемых на пике инфекции зараженным человеком вирусных частиц [3].

Дельта-вариант увеличил не только риск госпитализации по поводу COVID-19, но и риск смерти у непривитых пациентов [4]. Штамм Дельта активно мутировал, что привело к формированию подштаммов, значительно отличающихся по профилю мутаций [1]. Данное обстоятельство крайне важно, так как изменения аминокислотной последовательности белков SARS-CoV-2 значимо влияют на способность молекул главного комплекса гистосовместимости класса I (ГКГС-I) презентировать их на поверхности зараженной клетки [5].

Молекулы ГКГС-I являются одними из ключевых медиаторов первых звеньев развития специфического иммунного ответа на вирус SARS-CoV-2. Активная репликация и высвобождение вируса приводят к гибели зараженной клетки и поглощению ее остатков дендритными клетками и макрофагами. После фагоцитоза остатков погибших клеток и вирусных белков, содержащихся в них, дендритные клетки и макрофаги мигрируют в региональные лимфатические узлы и с помощью молекул ГКГС-I презентуют наивным цитотоксическим Т-лимфоцитам пептиды вируса

<sup>1</sup> НИУ Высшая школа экономики, Факультет биологии и биотехнологии, Москва, Россия

<sup>2</sup> Институт биоорганической химии им. академиком М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова Российской академии наук, Москва, Россия

<sup>3</sup> ГБУЗ «Диагностический центр (Центр лабораторных исследований) Департамента здравоохранения города Москвы», Москва, Россия

<sup>4</sup> ГБУЗ «Городская клиническая больница № 15 им. О.М. Филатова» Департамента здравоохранения, г. Москвы, Россия

\*e-mail: mshkurnikov@hse.ru

SARS-CoV-2. В процессе презентации цитотоксические Т-лимфоциты получают сигнал активации и активно пролиферируют, образуя популяцию вирусоспецифических цитотоксических CD8<sup>+</sup> Т-лимфоцитов (цТ-лимфоцитов) [6]. Активированные цТ-лимфоциты способны распознать зараженные вирусом SARS-CoV-2 клетки. Обнаружив на поверхности инфицированной клетки комплекс молекулы ГКГС-I и вирусного пептида, цТ-лимфоциты разрушают ее с помощью перфоринов и сериновых протеаз [7], тем самым прерывая размножение вируса.

Существует три основных типа молекул ГКГС-I, кодируемых генами HLA-A, HLA-B и HLA-C (от англ. Human Leukocyte Antigen). В геноме человека каждый ген может быть представлен в двух вариантах (аллелях), унаследованных от родителей. В популяции существуют десятки вариантов каждого аллеля, кодирующих молекулы ГКГС-I с индивидуальной способностью взаимодействовать с чужеродными пептидами. Индивидуальные комбинации молекул ГКГС-I существенно влияют на тяжесть многих инфекционных заболеваний [6].

За более чем два года пандемии COVID-19 накоплена значительная информация об особенностях формирования Т-клеточного иммунитета к COVID-19 [8]. Однако ассоциации HLA-генотипа и течения COVID-19 преимущественно анализировали по данным, относящимся к первой волне пандемии и исходному штамму вируса. Более того, при исследованиях ассоциаций и тяжести течения COVID-19 практически не учитывался возраст переболевших. Необходимо отметить, что возраст является значимым фактором в формировании иммунного ответа к COVID-19 [9]. В частности показано, что у людей старше 60 лет в значительной степени снижается длина теломер наивных Т-лимфоцитов, что приводит практически к десятикратному падению их способности к делению при активации [10], сокращается репертуар Т-клеточного рецептора [11].

Ранее на выборке пациентов первой волны нами было показано, что генотип HLA-I является значимым фактором риска тяжелого течения COVID-19 только у пациентов в возрасте не старше 60 лет [6]. В данном исследовании мы изучили взаимосвязь HLA-I генотипа пациентов в возрасте не старше 60 лет с тяжестью течения COVID-19, вызванной двумя наиболее распространенными летом 2021 г. вариантами штамма Дельта SARS-CoV-2: AY.122 и B.1.617.2.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В исследование были включены 45 пациентов, госпитализированных по поводу COVID-19 в августе 2021 г. Протокол исследования был одобрен

этическим комитетом ГБУЗ ГКБ № 15 им. О.М. Филатова ДЗМ. Все пациенты подписали информированное согласие.

Мазки из носо- и ротоглотки собирали в пробирки с транспортной средой. Для исследования образцов на наличие РНК SARS-CoV-2 применяли различные наборы реагентов для ОТ-ПЦР и комплектные к ним наборы для выделения РНК: ПОЛИВИР SARS-CoV-2 Express (ЛИТЕХ, Россия), АмплиПрайм SARS-CoV-2 DUO / МагноПрайм ФАКТ-Р (НекстБио, Россия) и SARS-CoV-2 “CoV-2-Тест” (ТестГен, Россия). Пригодными к секвенированию считали образцы с Ct менее 30.

Приготовление библиотек для секвенирования осуществляли с помощью панели праймеров и баркодов (“ДиаСистемс”, Россия). Панель праймеров содержала ген-специфические части из базы данных международного консорциума исследователей ARTIC network. Секвенирование осуществлялось на платформе Illumina MiSeq (Illumina) с использованием набора реагентов MiSeq 600 cycles v3, запускаемого в режиме чтения 2 × 250 п.о. Аннотирование последовательностей осуществлялось с применением баз данных Pango-lineage (версия 4.1.2) [12] и NextStain [13].

Определение HLA-генотипа осуществляли с помощью набора реагентов HLA-эксперт (ДНК-Технология, Россия), как описано ранее [6]. Анализ влияния мутаций на аффинность взаимодействия пептидов SARS-CoV-2 и молекул ГКГС-I осуществляли по протоколу T-CoV [14]. Последовательности белков подштаммов SARS-CoV-2 были получены из базы данных GISAID [15]: AY.122 (EPI\_ISL\_895058), B.1.617.2 (EPI\_ISL\_1315070).

Статистический анализ результатов осуществлялся в среде R с использованием критериев Вилкоксона и Хи-квадрат, а также точного теста Фишера.

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

В августе 2021 г. была сформирована выборка из 45 пациентов, госпитализированных со среднетяжелым и тяжелым течением COVID-19, проведено HLA-генотипирование и определена штаммовая принадлежность вируса SARS-CoV-2. Характеристика пациентов представлена в табл. 1. Секвенирование РНК, выделенной из мазков из носоглотки, позволило установить, что пациенты были инфицированы вариантами AY.122 и B.1.617.2 штамма Дельта SARS-CoV-2. По данным портала GISAID [15] выявленное нами соотношение вариантов SARS-CoV-2 характерно для московского региона в августе 2021 г. (отношение шансов 2.2,  $p = 0.1$ , 95% доверительный интервал 0.8–5.4).

Нам удалось установить, что тяжесть течения COVID-19 значительно различалась для больных вариантами AY.122 и B.1.617.2 (отношение шансов неопр.,  $p = 0.4$ , 95% доверительный интервал 0.9 – неопр.). Мы проанализировали различия в профиле мутаций этих вариантов SARS-CoV-2 (рис. 1). В варианте AY.122 выявлено 12 мутаций: 6 мутаций в ORF1ab, две мутации во вспомогательных белках и четыре мутации в структурных белках. В свою очередь вариант B.1.617.2 несет 24 мутации: пять мутаций в ORF1ab, пять мутаций во вспомогательных белках и 14 мутаций в структурных белках. Необходимо отметить, что два варианта SARS-CoV-2 объединяют только две мутации: D614G в спайк-белке и P323L в РНК-зависимой РНК полимеразе из ORF1ab. Обе эти мутации закрепились в геноме SARS-CoV-2 еще в начале 2020 г. и ассоциированы с тяжестью течения COVID-19 [16]. Учитывая, что подавляющее большинство мутаций в вариантах вируса различаются, мы проанализировали их влияние на способность молекул ГКГС-I взаимодействовать с мутантными пептидами каждого варианта.

HLA-генотипирование пациентов показало, что наиболее частыми аллелями в выборке были HLA-A\*02:01 (частота 0.26) и HLA-A\*01:01 (частота 0.25), что характерно для популяции московского региона [6]. Малый объем выборки не позволил выявить взаимосвязи гаплотипов и отдельных аллелей с тяжестью течения COVID-19 для анализируемых вариантов SARS-CoV-2. Тем не менее был оценен индекс риска тяжелого течения COVID-19 [6], отражающий интегральную способность индивидуального набора молекул ГКГС-I презентировать пептиды SARS-CoV-2 (рис. 2, панель А). Различия в индексе риска между пациентами, переболевшими вариантом AY.122 в среднетяжелой и тяжелой форме, оказались недостоверными ( $p = 0.47$ ). Однако можно отметить тенденцию к более высокому индексу риска у пациентов с тяжелым течением.

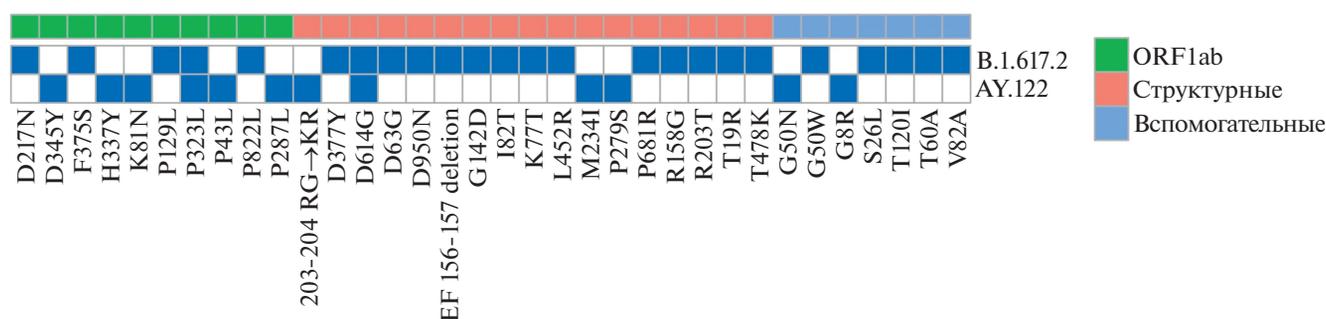
Анализ влияния мутаций на число вирусных пептидов, взаимодействующих с индивидуальным набором молекул ГКГС-I с аффинностью

**Таблица 1.** Характеристика выборки пациентов с COVID-19

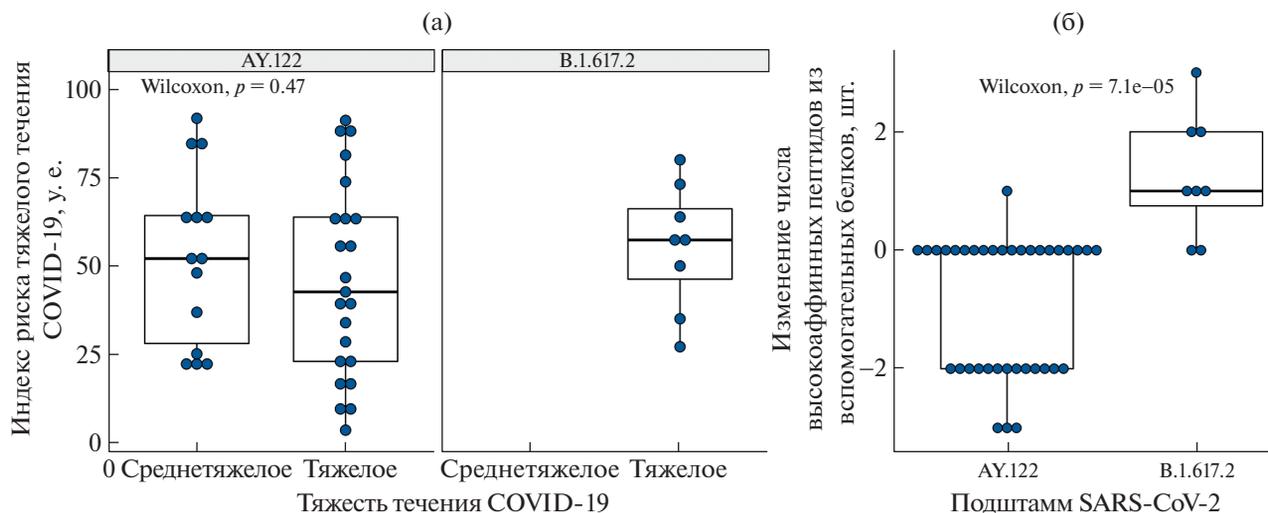
Показатель	Вариант AY.122	Вариант B.1.617.2	<i>p</i>
<i>n</i>	37	8	
Возраст, медиана [25–75%]	35 [32–46]	45 [35–51.8]	0.26
Пол (муж./жен.)	10/27	1/7	0.65
Тяжесть			<b>0.04</b>
Средняя	14	8	
Тяжелая	23	0	
Максимальная степень поражения легких по КТ			0.37
КТ-0	3	0	
КТ-1	10	4	
КТ-2	5	1	
КТ-3	9	0	
КТ-4	3	0	
н.д.	7	3	
Исход			1
Летальный	1	0	
Выписан	36	8	
Диабет	8	2	1
Ожирение	7	1	1
Гипертония	8	2	1

менее 50 нМоль, показал что, различия достоверны для вспомогательных белков вируса (рис. 2, панель Б). Так, у инфицированным вариантом AY.122 число высокоаффинных пептидов значительно сократилось по сравнению с инфицированными вариантом B.1.617.2 ( $p < 0.01$ ).

Значимое снижение числа высокоаффинных пептидов в варианте AY.122 прежде всего связано с мутацией G8R в белке NS8. Данная мутация вызывает падение аффинности взаимодействия пептидов FLGIITTV и FLVFLGIITTV с молекулой ГКГС-I, кодируемой наиболее частой для на-



**Рис. 1.** Профиль мутаций в вариантах AY.122 и B.1.617.2 SARS-CoV-2.



**Рис. 2.** Панель а — взаимосвязь индекса риска тяжелого течения COVID-19 с фактическим течением заболевания. Панель б — влияние мутаций во вспомогательных белках вариантов AY.122 и B.1.617.2 на аффинность их взаимодействия с индивидуальным набором молекул ГКГС-I.

шей популяции аллелью HLA-A\*02:01. Ранее была показана иммуногенность пептида FLGIITTV у пациентов, переболевших COVID-19 [17]. Особого внимания заслуживает тот факт, что белок NS8 (ORF8) способен подавлять созревание молекул ГКГС-I и их транслокацию на поверхность зараженной клетки [18, 19]. Данные обстоятельства могли внести весомый вклад в превалирование варианта AY.122 в российской популяции и более тяжелое, по сравнению с другими вариантами штамма Дельта, течение COVID-19, вызванной им. Предлагаемый подход к анализу мутаций на уровне вариантов SARS-CoV-2 представляется очень важным, так как SARS-CoV-2 продолжает активно мутировать.

### ЗАКЛЮЧЕНИЕ

1. Анализ взаимосвязи индекса риска тяжелого течения COVID-19, основанного на аффинности взаимодействия молекул ГКГС-I с пептидами вируса, с фактическим течением заболевания позволяет отметить тенденцию к более высокому индексу риска у пациентов с тяжелым течением.

2. Анализ влияния мутаций во вспомогательных белках штаммов AY.122 и B.1.617.2 на аффинность их взаимодействия с индивидуальным набором молекул ГКГС-I объясняет превалирование AY.122 в российской популяции и более тяжелое, по сравнению с другими штаммами Дельта, течение COVID-19, вызванной им.

3. Настоящее исследование демонстрирует дополнительные возможности эпидемиологического мониторинга имеющей очевидную тенденцию к активному распространению и выраженной изменчивости коронавирусной инфекции SARS-CoV-2.

### КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Все авторы сообщают об отсутствии конфликта интересов.

### ИСТОЧНИКИ ФИНАНСИРОВАНИЯ

Работа выполнена в рамках реализации программы ДЗМ “Научное обеспечение столичного здравоохранения на 2020–2022 гг.”.

### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Klink G., Safina K.R., Nabieva E., et al. The rise and spread of the SARS-CoV-2 AY.122 lineage in Russia // *Virus Evolution*. 2022. V. 8. № 1.
2. Callaway E. Delta coronavirus variant: scientists brace for impact // *Nature*. 2021. V. 595. № 7865. P. 17–18.
3. Earnest R., Uddin R., Matluk N., et al. Comparative transmissibility of SARS-CoV-2 variants Delta and Alpha in New England, USA // *Cell Reports Medicine*. 2022. V. 3. № 4. P. 100583.
4. Bast E., Tang F., Dahn J., et al. Increased risk of hospitalisation and death with the delta variant in the USA // *The Lancet Infectious Diseases*. 2021. V. 21. № 12. P. 1629–1630.
5. Nersisyan S., Zhiyanov A., Zakharova M., et al. Alterations in SARS-CoV-2 Omicron and Delta peptides presentation by HLA molecules // *PeerJ*. 2022. V. 10. P. e13354.
6. Shkurnikov M., Nersisyan S., Jankevic T., et al. Association of HLA Class I Genotypes With Severity of Coronavirus Disease-19 // *Frontiers in Immunology*. Frontiers, 2021. V. 12. P. 641900.
7. Wherry E.J., Ahmed R. Memory CD8 T-Cell Differentiation during Viral Infection // *Journal of Virology*. 2004. V. 78. № 11. P. 5535–5545.
8. Titov A., Shaykhutdinova R., Shcherbakova O.V., et al. Immunogenic epitope panel for accurate detection of

- non-cross-reactive T cell response to SARS-CoV-2 // JCI Insight. 2022. V. 7. № 9.
9. Sanchez-Vazquez R., Guío-Carrión A., Zapatero-Gaviria A., et al. Shorter telomere lengths in patients with severe COVID-19 disease // Aging. 2021. V. 13. № 1. P. 1–15.
  10. Anderson J.J., Susser E., Arbeev K.G., et al. Telomere-length dependent T-cell clonal expansion: A model linking ageing to COVID-19 T-cell lymphopenia and mortality // eBioMedicine. 2022. V. 78. P. 103978.
  11. Britanova O., Putintseva E., Shugay M., et al. Age-Related Decrease in TCR Repertoire Diversity Measured with Deep and Normalized Sequence Profiling // The Journal of Immunology. 2014. V. 192. № 6. P. 2689–2698.
  12. O’Toole Á., Scher E., Underwood A., et al. Assignment of Epidemiological Lineages in an Emerging Pandemic Using the Pangolin Tool // Virus Evolution. 2021.
  13. Hadfield J., Megill C., Bell S.M., et al. Nextstrain: real-time tracking of pathogen evolution // Bioinformatics. 2018. V. 34. № 23. P. 4121–4123.
  14. Nersisyan S., Zhiyanov A., Shkurnikov M., et al. T-CoV: a comprehensive portal of HLA-peptide interactions affected by SARS-CoV-2 mutations // Nucleic Acids Research. 2022. V. 50. № D1. P. D883–D887.
  15. Elbe S., Buckland-Merrett G. Data, disease and diplomacy: GISAID’s innovative contribution to global health // Global Challenges. 2017. V. 1. № 1. P. 33–46.
  16. Biswas S.K., Mudi S.R. Spike protein D614G and RdRp P323L: the SARS-CoV-2 mutations associated with severity of COVID-19 // Genomics & Informatics. 2020. V. 18. № 4. P. e44.
  17. Saini S.K., Hersby D.S., Tamhane T., et al. SARS-CoV-2 genome-wide T cell epitope mapping reveals immunodominance and substantial CD8+ T cell activation in COVID-19 patients. // Sci Immunol. 2021. V. 6. № 58.
  18. Zhang Y., Chen Y., Li Y., et al. The ORF8 protein of SARS-CoV-2 mediates immune evasion through down-regulating MHC-I // Proceedings of the National Academy of Sciences. 2021. V. 118. № 23.
  19. Matsuoka K., Imahashi N., Ohno M., et al. SARS-CoV-2 accessory protein ORF8 is secreted extracellularly as a glycoprotein homodimer // Journal of Biological Chemistry. 2022. V. 298. № 3. P. 101724.

## RELATIONSHIP OF COVID-19 SEVERITY WITH SARS-COV-2 NS8 PROTEIN MUTATIONS DEPENDED ON VIRUS STRAIN

M. Yu. Shkurnikov<sup>a,b,#</sup>, D. A. Averinskaya<sup>a</sup>, A. G. Komarov<sup>c</sup>, I. A. Karbyshev<sup>c</sup>, G. I. Speshilov<sup>c</sup>, I. A. Shtinova<sup>c</sup>, D. A. Doroshenko<sup>d</sup>, and V. I. Vechorko<sup>d</sup>

<sup>a</sup> Faculty of Biology and Biotechnology, HSE University, Moscow, Russian Federation

<sup>b</sup> Shemyakin-Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry, Russian Academy of Sciences, Moscow, Russian Federation

<sup>c</sup> Moscow City Public Institution of Health Care Diagnostic Center (Laboratory Testing Center) of Moscow Health Department, Moscow, Russian Federation

<sup>d</sup> Moscow City Public Institution of Health Care O.M. Filatov City Clinical Hospital of Moscow Health Department, Moscow, Russian Federation

<sup>#</sup>e-mail: mshkurnikov@hse.ru

Presented by Academician of the RAS S.I. Kolesnikov

In mid-2021, the Delta strain of SARS-CoV-2 caused the third wave of the COVID-19 pandemic. The pivotal studies were aimed at studying changes in the efficiency of neutralizing antibodies to the spike protein. However, much less attention was paid to the T-cell response and the presentation of virus peptides by MHC-I molecules. In this study, we compared the features of the HLA-I genotype in symptomatic patients below the age of 60 years, and the severity of COVID-19 caused by the two most common lineages of the SARS-CoV-2 Delta strain in the summer of 2021: AY.122 and B.1.617.2. Analysis of the COVID-19 severity revealed a more severe course of the disease caused by the AY.122 lineage. Furthermore, a comparison of the mutation profile of the two most common lineages of the Delta strain showed that the G8R mutation in the NS8 protein makes the most significant contribution to the ability of MHC-I to present viral peptides. Given that the NS8 protein can suppress the maturation of MHC-I molecules, the appearance of a mutation in one of its immunogenic epitopes could significantly contribute to the prevalence of the AY.122 variant in the Russian population.

**Keywords:** COVID-19, NS8, ORF8, HLA, ГКГС-I, AY.122, B.1.617.2

УДК 577.122:615.355

## ОЦЕНКА ПРИНАДЛЕЖНОСТИ МАЛОНОВОГО ДИАЛЬДЕГИДА К МОДУЛЯТОРАМ И СУБСТРАТАМ БЕЛКА-ТРАНСПОРТЕРА Р-ГЛИКОПРОТЕИНА

© 2022 г. А. В. Щулькин<sup>1</sup>, Ю. В. Абаленихина<sup>1,\*</sup>, П. Ю. Мыльников<sup>1</sup>,  
И. В. Черных<sup>1</sup>, Е. Н. Якушева<sup>1</sup>

Представлено академиком РАН С.Б. Серединым

Поступило 01.07.2022 г.

После доработки 15.07.2022 г.

Принято к публикации 18.07.2022 г.

В исследовании на клетках линии Caco-2 проведена оценка принадлежности малонового диальдегида (МДА) к модуляторам и субстратам Р-гликопротеина (Рgp), а также изучена биологическая роль Рgp в условиях окислительного стресса (ОС). МДА использовали в концентрациях 10, 50, 100 и 150 мкМ, ОС моделировали добавлением пероксида водорода (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) в концентрациях 0.1–100 мкМ в течение 24 ч. Относительное количество Рgp оценивали методом вестерн-блот, активность – по транспорту его субстрата фексофенадина (метод ВЭЖХ с УФ-детектированием), количество МДА (ВЭЖХ МС/МС). В ходе исследования было показано, что МДА в концентрациях 10 и 50 мкМ и длительности экспозиции 24 ч повышает относительное количество и активность Рgp, действуя через CAR и PXR, при этом МДА может транспортироваться Рgp. Индукция Рgp под действием МДА при развитии ОС возможно, имеет иметь защитное значение, обеспечивая выведение продукта пероксидации из клеток во внеклеточное пространство, тем самым увеличивая жизнеспособность клеток.

**Ключевые слова:** Р-гликопротеин, малоновый диальдегид, окислительный стресс, конститутивный андростановый рецептор, прегнан Х рецептор, клеточная линия Caco-2

Принятые сокращения: Р-gp – Р-гликопротеин, клетки линии Caco-2 – клетки аденокарциномы ободочной кишки человека, АФК – активные формы кислорода, ОС – окислительный стресс, МТТ – 3-(4,5-диметилтиазол-2-ил)-2,5-дифенил-2Н тетразолия, DTNB – 5,5'-дитиобис(2-нитро)бензоатом, ОП – оптическая плотность, ВЭЖХ – высокоэффективная жидкостная хроматография

DOI: 10.31857/S2686738922060300

### ВВЕДЕНИЕ

Р-гликопротеин (Рgp, ABCB1, MDR1-белок) – эффлюксный белок-транспортер суперсемейства ABC-транспортеров, обеспечивающий выведение субстратов из клеток во внеклеточное пространство и биологические жидкости [1].

Впервые Рgp был выделен R.L. Juliano и V. Ling в 1976 г. из цитоплазматической мембраны клеток яичника китайского хомячка, отобранных по устойчивости к колхицину и демонстрирующих перекрестную резистентность к широкому спектру амфифильных веществ [2].

Белок был назван Р-гликопротеином от слова permeability (от англ. проницаемость), потому что считалось, что он участвует в развитии лекар-

ственной устойчивости, снижая проницаемость клеточной мембраны для химиопрепаратов [3].

В дальнейшем А.Т. Fojo et al. (1987) показали, что ген, кодирующий Рgp – *MDR1*, у людей в больших количествах экспрессируется в надпочечниках и почках, на среднем уровне – в легких, печени, тощей кишке, ободочной и прямой кишке (образцы получены парацентезом) [4].

F. Thiebaut et al. (1987) на тканях человека, полученных при аутопсии или хирургических операциях, иммуногистохимически изучили локализацию Рgp. Ими было показано, что в печени Рgp локализуется преимущественно на билиарной поверхности гепатоцитов и на апикальной поверхности эпителиальных клеток в маленьких билиарных протоках. В поджелудочной железе Рgp был обнаружен на апикальной поверхности эпителиальных клеток маленьких, но не больших протоков. В почках – на апикальной поверхности эпителиальных клеток проксимальных почечных канальцев. Ободочная и тощая кишки показали

<sup>1</sup> Рязанский государственный медицинский университет им. академика И.П. Павлова, Рязань, Россия

\*e-mail: abalenihtina88@mail.ru

высокий уровень Pgr на апикальной поверхности эпителиальных клеток. Надпочечники характеризовались высоким уровнем Pgr на поверхности клеток в мозговом и корковом веществе [5]. В 1994 г. А.Н. Schinkel et al. выявили экспрессию *mdr1a* в капиллярах эндотелиальных клеток в гематоэнцефалическом барьере [6].

Учитывая указанную локализацию, в настоящее время считается, что Pgr выполняет следующие функции: на апикальной поверхности энтероцитов тонкого и толстого кишечника — препятствует всасыванию субстратов из просвета кишечника; на билиарной поверхности гепатоцитов — выводит эндо- и ксенобиотики в желчь; на апикальной поверхности эпителия почечных канальцев — выводит эндо- и ксенобиотики в просвет почечных канальцев; в эндотелиальных клетках гистогематических барьеров (гематоэнцефалического, гематоплацентарного, гематотестикулярного) — препятствует проникновению эндо- и ксенобиотиков в забарьерные органы; в опухолевых клетках — защищает их от воздействия цитостатиков за счет выведения из клеток [7].

В ряде исследований было показано, что развитие окислительного стресса (ОС) приводит к повышению количества и активности Pgr, а также экспрессии его гена [8].

Однако механизм индукции и ее значение на данный момент не известны. Можно предположить, что накапливающиеся при ОС продукты пероксидации стимулируют экспрессию гена *MRD1*, кодирующего Pgr, через рецепторы ксенобиотиков (CAR и PXR), а сам Pgr выполняет защитную роль, выводя их из клеток во внеклеточное пространство и, таким образом, снижая их токсическое действие. На проверку данной гипотезы и направлено настоящее исследование.

## 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°C и 5% содержании CO<sub>2</sub> 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 Pgr [9].

**Оценка цитотоксического действия МДА выполнялась в ходе МТТ-теста.** Для этого клетки культивировали в 96-луночном планшете. МДА (“Sigma-Aldrich”, Германия) добавляли в питательную среду до получения конечных концентраций 10, 50, 100 и 150 мкМ и инкубировали в течение 24 ч. На каждый эксперимент было выполнено по 3 повторения. После завершения инкубации в каждую лунку луночного планшета добавляли по 20 мкл 0.5% раствора бромида 3-(4,5-диметилтиазол-2-ил)-2,5-дифенил тетразолия (МТТ) и инкубировали в течение 2 ч, затем раствор МТТ удаляли и добавляли 200 мкл 1% раствора диметилсульфоксида (“ПанЭко”, Россия). Поглощение измеряли через 10 мин при 530 нм на спектрофотометре для планшетов Stat Fax 2100 (“Awareness Technology”, США).

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

$$\text{Жизнеспособность} = \frac{\text{ОП опытных лунок} - \text{ОП среды}}{\text{ОП контрольных лунок} - \text{ОП среды}} \times 100\%$$

где ОП — оптическая плотность.

**Оценка влияния МДА на уровень Pgr в клетках линии Caco-2** осуществлялась при их культивировании в 6-луночных планшетах в течение 21 сут. Затем к клеткам добавляли МДА до получения конечной концентрации 10, 50, 100 и 150 мкМ и инкубировали в течение 24 ч ( $n = 3$  для каждой концентрации). К контрольным клеткам в эквивалентном объеме прибавляли воду для инъекций (растворитель МДА).

При оценке механизма индукции Pgr под действием МДА в питательную среду за 30 мин до добавления МДА вносили: ингибитор прегнан X рецептора (PXR) — кетоконазол, 10 мкМ (“Sigma Aldrich”, Германия) [10], ингибитор кон-

ститутивного 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 [11].

После окончания экспозиции с МДА клетки снимали с лунок 6-луночных планшетов раствором трипсин-ЭДТА (0.25% трипсина и 0.2% ЭДТА, “Sigma-Aldrich”, Германия), трижды промывали раствором фосфатного буфера (“BioRad”, США) и лизировали в NP40 Cell Lysis Buffer Thermo (“Thermo Fisher Scientific”, США) с добавлением смеси ингибиторов протеиназ (4-(2-аминоэтилбензенсульфонил) флуорида гидрохлорид (AEBSF) 2 мМ, апротинин 0.3 мкМ, бестатин

130 мкМ, ЭДТА 1мМ, *транс*-эпоксисукцинил-L-лейциламино(4-гуанидино)бутан (E-64) 14 мкМ, лейпептин 1 мкМ, “Sigma-Aldrich”, Германия) в течение 30 мин при +4°C и постоянном перемешивании из расчета  $10^7$  клеток на 100 мкл буфера. Полученный 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, “ThermoFisher”, США).

Определение относительного количества Pgp в клетках линии Сасо-2 проводили методом вестерн-блот. 20 мкг белков супернатанта подвергли электрофорезу с использованием 7.5% TGX Stain-Free FastCast Acrylamide Kit (“Bio-Rad”, США) в буферной системе Laemmli (“BioRad”, США). Образцы смешивали с буфером Laemmli (“Bio-Rad”, США), содержащим 50 мМ β-меркаптоэтанол (“Helicon”, США) в соотношении 1 : 3, инкубировали 10 мин при температуре 70°C. Гели прогоняли при 100 В в течение 90 мин.

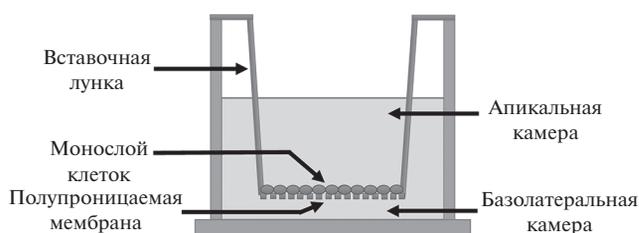
Белки переносили на нитроцеллюлозную мембрану (Trans-Blot Turbo Mini-Size nitrocellulose, “Bio-Rad”, США) с использованием Mini Trans-Blot (“Bio-Rad”, США) в течение 10 мин при 25 В и 1.3 А.

Белки на мембране блокировали 1% раствором Casein Blocker (“Bio-Rad”, США), содержащим 0.1% Tween-20 (“Sigma”, Германия), при инкубации в течение 1 ч и комнатной температуре.

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

Молекулярная масса Pgp была подтверждена путем сравнения с маркерами молекулярной массы (Precision plus protein standards Dual Color, “Bio-Rad”, США).

Содержание Pgp оценивали относительно содержания белка домашнего хозяйства GAPDH (первичные антитела GAPDH Loading Control Monoclonal Antibody (GA1R), DyLight 68 (“Invitrogen”, США), разведение 1:1000, вторичные антитела – вторичные кроличьи антитела к первич-



**Рис. 1.** Структура трансвелл-системы. Трансвелл-система представлена двумя камерами: апикальной и базолатеральной. Дно апикальной камеры является полупроницаемой мембраной, на которую высевали клетки линии Сасо-2 с плотностью  $10^5/\text{см}^2$ .

ным антителам GAPDH – Rabbit-anti-Mouse IgG (H+L) Secondary Antibody, HRP (“Invitrogen”, США), разведение 1:4000).

**Исследование влияния МДА на активности Pgp в клетках линии Сасо-2.** Клетки высевали в специальные трансвеллы, состоящие из двух камер апикальной и базолатеральной (рис. 1). Дно апикальной камеры представлено полупроницаемой мембраной, на которую высевали клетки линии Сасо-2 с плотностью  $10^5/\text{см}^2$  и культивировали в течение 21 сут.

Целостность клеточного монослоя оценивали по величине трансэпителиального сопротивления. При его значении выше 500 мОм см<sup>2</sup> выполняли транспортные эксперименты. Для этого в лунки трансвеллов добавляли питательную среду с МДА в концентрациях 10, 50 и 100 мкМ. В контрольные лунки добавляли дистиллированную воду – растворитель МДА. Длительность инкубации составила 30 мин (оценка прямого влияния МДА на молекулу Pgp) или 24 ч (оценка влияния МДА на количество Pgp).

После окончания инкубации питательную среду заменяли на транспортную среду, представляющую собой раствор Хэнкса (“Sigma-Aldrich”, Германия) с 25 мМ Хепес (“Sigma-Aldrich”, Германия) и 1% диметилсульфоксида (“ПанЭко”, Россия), а также содержащую соответствующую концентрацию МДА.

Затем добавляли субстрат Pgp – фексофенадин (“Sigma-Aldrich”, Германия) в апикальную камеру в конечной концентрации 150 мкМ. Через 1, 2 и 3 ч забирали образцы из базолатеральной камеры-реципиента для определения концентрации субстрата (*a*–*b* транспорт, обусловленный пассивной диффузией против функционирования Pgp).

В аналогичных трансвеллах оценивали транспорт фексофенадина из базолатеральной камеры в апикальную (*b*–*a* транспорт, обусловленный пассивной диффузией и функционированием Pgp). Для этого субстрат в той же концентрации добавляли в базолатеральную камеру, а затем че-

рез 1, 2 и 3 ч забирали образцы из апикальной камеры для определения концентрации фексофенадина.

Транспорт субстрата (фексофенадина) рассчитывали по формуле:

$$P_{app} = \frac{dQ}{dt} \frac{1}{AC_0},$$

где  $P_{app}$  – коэффициент кажущейся проницаемости (apparent permeability coefficient, см/сек),  $dQ/dt$  – изменение концентрации субстрата в камере реципиента за время инкубации (мкМ/сек),  $A$  – площадь полупроницаемой мембраны лунки в трансвелл-системе (см<sup>2</sup>),  $C_0$  – начальная концентрация субстрата в камере-доноре (мкМ).

Затем рассчитывали отношение коэффициентов кажущейся проницаемости:  $b-a$  к  $a-b$ , характеризующее общий вклад  $P_{gr}$  в транспорт фексофенадина через билипидную мембрану.

#### Определение концентрации фексофенадина.

Концентрации фексофенадина в транспортной среде определяли методом высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ) с УФ-детектированием при длине волны 220 нм. Исследование выполнялось на ВЭЖХ хроматографе “Стайер” (Россия) по оригинальной методике. Полученная проба транспортной среды (50 мкл), содержащая фексофенадин, разводилась в 150 мкл подвижной фазы, и 100 мкл полученного раствора вводились в хроматограф.

При анализе использовалась хроматографическая колонка Phenomenex Synergi 4u Polar-RP 80A (250 × 4.6) (США) с зернением 4 мкм. Температура разделения – 45°C. Скорость потока – 1 мл/мин. Состав подвижной фазы: 128 мл ацетонитрила (“PanReas AppliChem”, Испания), 267.4 мл воды деионизированной, 6.33 мл кислоты уксусной ледяной (“PanReas AppliChem”, Испания), с добавлением триэтиламина (“PanReas AppliChem”, Испания) до pH = 6.7. Время удерживания фексофенадина в данных условиях составляло 12.8 мин. Количественное определение проводилось методом абсолютной калибровки по площади пиков. Аналитический диапазон методики составлял 1.2–57.4 мкМ.

**Тестирование принадлежности малонового диальдегида (МДА) к субстратам  $P_{gr}$**  также выполнялось в трансвеллах.

Через 21 сут культивирования клеток линии Сасо-2 питательную среду заменяли на транспортную среду с добавлением МДА (“Sigma-Aldrich”, Германия) в апикальную камеру в конечной концентрации 1, 50, 100 мкМ. Через 1, 2 и 3 ч забирали образцы из базолатеральной камеры реципиента для определения концентрации тестируемого вещества ( $a-b$  транспорт, обусловленный пассивной диффузией против функционирования  $P_{gr}$ ).

Затем аналогичным образом оценивали транспорт МДА из базолатеральной камеры в апикальную ( $b-a$  транспорт, обусловленный пассивной диффузией и функционированием  $P_{gr}$ ).

Рассчитывали коэффициент кажущейся проницаемости МДА  $P_{app} a-b$ ,  $P_{app} b-a$  и их отношение. Значение данного отношения более “2” свидетельствует об асимметрии транспорта МДА через монослой клеток Сасо-2. Для подтверждения участия  $P_{gr}$  в формировании асимметрии транспорта выполнялись транспортные эксперименты с ингибитором белка-транспортера – верапамилем. Для этого его добавляли в обе камеры трансвеллов за 30 мин до внесения МДА в концентрации 200 мкМ. Выравнивание транспорта МДА по обе стороны от монослоя клеток Сасо-2 на фоне верапамила свидетельствует об участии  $P_{gr}$  в транспорте продукта перекисаации.

**Оценка концентрации МДА в транспортной среде** выполнялась методом ВЭЖХ-МС/МС с использованием хроматографической системы “Dionex Ultimate 3000” и tandemного масс-селективного детектора TSQ Fortis (“ThermoFisher”, США).

Хроматографию проводили на колонке UCT Selectra C18 4.6 mm × 100 mm, 3 μm, 100 Å в комплексе с предколонкой Selectra C18 Guard Cartridges SLC-18GDC46-3UM; температура колонки 35°C. Был использован изократический режим элюирования со скоростью потока 300 мкл/мин подвижной фазой, состоящей из 20% ацетонитрила и 80% водного раствора формиата аммония с концентрацией 10 мМоль/л.

Детектирование МДА проводили при следующих условиях. Осуществлялась ионизация путем формирования электроспрея в негативном режиме при атмосферном давлении. В ходе работы использовались условия источника ионов: напряжение электроспрея 2700 В, оболочечный газ (sheath gas) 50 л/мин, вспомогательный газ (aux gas) 10 л/мин, продувочный газ (sweep gas) 1 л/мин, температура испарителя 350°C, ион-транспортующей трубки 300°C. Для детектирования был использован режим MRM со следующими параметрами: разрешение Q1 и Q3 установлено на 0.7, скорость подачи аргона (CID gas) 1 мТорр. Для количественного определения использовался переход  $m/z$  71.1 Да → 41 Да. Для качественного анализа использовали переходы  $m/z$  71.1 Да → 43 Да,  $m/z$  71.1 Да → 53 Да.

С целью подготовки проб к хроматографированию проводилось осаждение белков путем смешивания 10 мкл пробы с 90 мкл ацетонитрила, последующим встряхиванием и дальнейшим центрифугированием при 10000 g в течение 10 мин при температуре +4°C. Полученный супернатант переносили в вials (“ThermoFisher”, США) со специальными вставками объемом 300 мкл, после

чего пробы помещали в автосемплер с поддерживаемой температурой +6°C.

Объем вводимой пробы 5 мкл, время удерживания МДА при указанных условиях составило 3.05 мин. Общее время анализа – 7 мин.

Количественное определение проводили методом абсолютной калибровки по площади пиков. Аналитический диапазон методики составлял 600 – 20000 нмоль/л.

На заключительном этапе исследования оценивали выживаемость клеток линии Сасо-2 при индукции/ингибировании активности Pgp в условиях развития окислительного стресса (ОС).

Клетки культивировали в 96-луночном планшете. ОС моделировали добавлением в культуральную среду пероксида водорода H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (“Sigma-Aldrich”, Германия) в конечных концентрациях 0.1, 0.5, 1, 5, 10 и 50 мкМ и инкубацией в течение 24 ч. На каждый эксперимент было выполнено по 3 повторения.

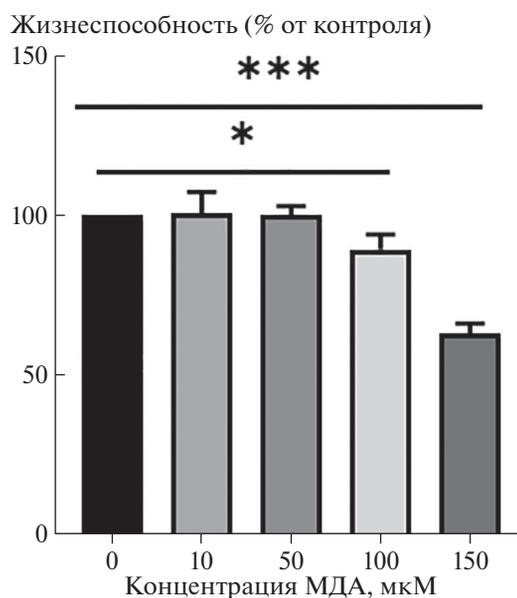
Ингибирование Pgp вызывали внесением в культуральную среду за 30 мин до добавления H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> верапамила в концентрации 200 мкМ, а индукцию – добавлением 10 мкМ рифампицина за 24 ч до моделирования ОС. В дальнейшем ингибитор и индуктор добавляли к клеткам совместно с H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> на протяжении всего исследования. После завершения эксперимента оценивали жизнеспособность клеток в ходе цитотоксического МТТ-теста.

**Статистический анализ.** Полученные результаты анализировали с помощью программного обеспечения GraphPad Prism 8. Результаты представлены в виде M ± SD. Для оценки статистической значимости различий использовали дисперсионный анализ (ANOVA), попарные сравнения выполняли с помощью теста Даннетта. Статистически значимыми считали различия при  $p < 0.05$ .

## ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

### *Влияние МДА на жизнеспособность клеток линии Сасо-2*

На первом этапе исследования с помощью МТТ-теста был установлен безопасный для клеток линии Сасо-2 диапазон концентраций МДА при воздействии в течение 24 ч. Жизнеспособность контрольных клеток принималась за 100%. МДА в концентрациях 10, 50 мкМ достоверно не влиял на жизнеспособность клеток, а в концентрациях 100 и 150 мкМ вызывал снижение изучаемого показателя при концентрации субстанции 100 и 150 мкМ до  $88.5 \pm 4.6\%$  ( $p = 0.028$ ) и  $63.9 \pm 3.1\%$  ( $p = 0.0003$ ) (рис. 2).



**Рис. 2.** Изменение жизнеспособности клеток линии Сасо-2 в зависимости от концентрации МДА при инкубации 24 ч ( $M \pm SD$ ,  $n = 3$ ). Жизнеспособность клеток оценивали с помощью МТТ-теста. \* – достоверное отличие от контроля (\*  $p < 0.05$ ; \*\*\*  $p < 0.001$ , тест Даннетта).

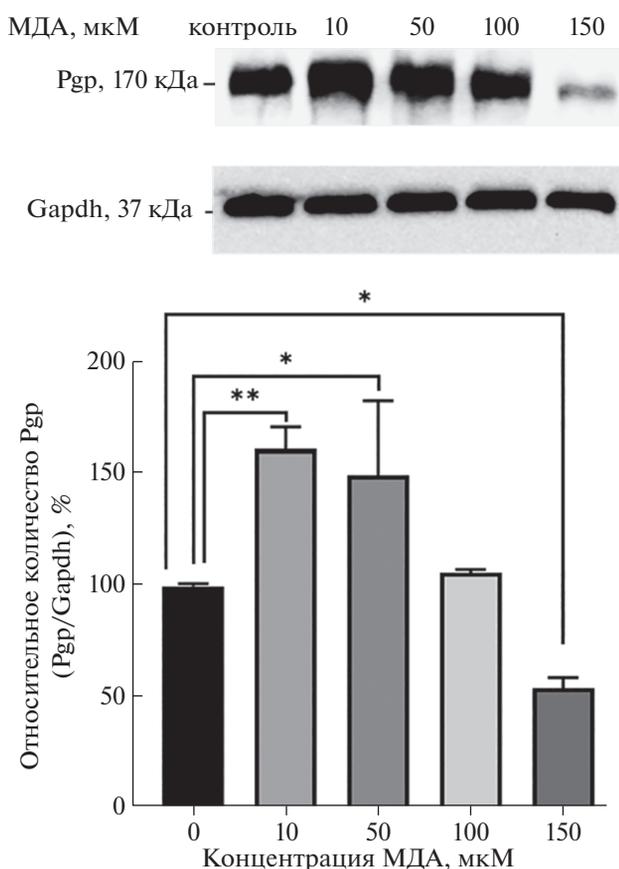
### *Влияние малонового диальдегида на количество и активность Pgp в клетках линии Сасо-2*

Воздействие МДА в концентрациях 10 и 50 мкМ в течение 24 ч приводило к повышению уровня Pgp на 61.6% ( $p = 0.006$ ) и 49.5% ( $p = 0.016$ ) соответственно по сравнению с контролем, в концентрации 100 мкМ статистически значимо не влияло на данный показатель ( $p > 0.05$ ), а в концентрации 150 мкМ вызывало его снижение на 46.5% ( $p = 0.018$ ) по сравнению с контролем (рис. 3).

Изменение количества Pgp под действием МДА во всех концентрациях сопровождалось следующей динамикой его активности.

Кратковременное воздействие МДА в течение 30 мин не влияло на коэффициенты кажущейся проницаемости Papp  $a-b$  и Papp  $b-a$  субстрата Pgp фексофенадина – данные показатели достоверно от контроля не отличались. Полученные результаты свидетельствуют о том, что МДА напрямую не влияет на активность Pgp, т.е. не является его прямым ингибитором или активатором.

В то же время увеличение длительности воздействия МДА до 24 ч в концентрации 10 мкМ приводило к увеличению коэффициента кажущейся проницаемости Papp  $b-a$  на 35.7% ( $p < 0.0001$ ), отношения Papp  $b-a$ /Papp  $a-b$  на 85.4% ( $p = 0.003$ ) и снижению коэффициента кажущейся проницаемости Papp  $a-b$  на 31.1% ( $p = 0.04$ ) по сравнению с контролем, а в концентрации



**Рис. 3.** Относительное количество Р-гликопротеина в клетках линии Сасо-2 при воздействии малонового диальдегида в концентрациях 10–150 мкМ в течение 24 ч. Относительное количество Р-гликопротеина определяли методом вестерн-блот с последующим денситометрическим анализом с использованием программного обеспечения ImageLab. Gapdh использовали в качестве цитоплазматического маркера. Эксперименты были повторены три раза с аналогичными результатами. \* $p < 0.05$ ; \*\* $p < 0.01$  – статистически значимые отличия от контроля (тест Даннетта).

50 мкМ – к увеличению коэффициента кажущейся проницаемости  $R_{app} b-a$  на 14.7% ( $p = 0.007$ ) и отношения  $R_{app} b-a/R_{app} a-b$  на 67.0% ( $p = 0.003$ ), коэффициент кажущейся проницаемости  $R_{app} a-b$  снижался на 31.6% ( $p = 0.04$ ) относительно контроля (табл. 1).

В концентрации 100 мкМ и длительности экспозиции 24 ч МДА достоверного влияния на изучаемые показатели транспорта фексофенадина не оказал.

Полученные данные свидетельствуют о повышении количества и активности Pgp под действием МДА в концентрациях 10 и 50 мкМ при длительности воздействия 24 ч.

#### *Механизм влияния малонового диальдегида на количество Pgp в клетках линии Сасо-2*

Для изучения механизмов повышения количества Pgp под действием МДА были выполнены

эксперименты с ингибиторами CAR – CINPA1 и PXR – кетоконазолом.

В ходе исследования было установлено, что CINPA1 в концентрации 10 мкМ предотвращал повышение количества Pgp при воздействии МДА в концентрации 10 и 50 мкМ в течение 24 ч, данный показатель достоверно от контроля не отличался. Инкубация клеток линии Сасо-2 с МДА в концентрации 100 мкМ совместно с CINPA1 сопровождалось снижением относительного количества Pgp на 25.5% ( $p = 0.0002$ ) по сравнению с контролем (рис. 4а).

Кетоконазол не влиял на индуцирующее действие МДА на количество Pgp в концентрации 10 мкМ, уровень белка-транспортера превышал показатели контроля на 26.1% ( $p = 0.015$ ), но при этом препятствовал индукции в концентрациях МДА 50 и 100 мкМ (количество Pgp достоверно не отличалось от значений контроля) (рис. 4б).

**Оценка принадлежности малонового диальдегида к субстратам Pgp** выполнялась по транспорту МДА через монослой клеток линии Сасо-2.

При концентрации МДА 10 мкМ коэффициент кажущейся проницаемости  $R_{app} b-a$  МДА (характеризующий транспорт МДА за счет работы Pgp + пассивной диффузии) достоверно превышал коэффициент кажущейся проницаемости  $R_{app} a-b$  (характеризующий транспорт МДА за счет пассивной диффузии против работы Pgp) на 94.8% ( $p = 0.00001$ ).

Ингибитор Pgp – верапамил вызывал снижение коэффициента кажущейся проницаемости  $R_{app} b-a$  на 28.8% ( $p = 0.038$ ), что сопровождалось выравниванием транспорта МДА по обе стороны мембраны ( $p = 0.018$ ).

Повышение концентрации МДА до 50 и 100 мкМ сопровождалось нивелированием асимметрии транспорта, коэффициенты кажущейся проницаемости  $R_{app} b-a$  МДА достоверно не отличались от  $R_{app} a-b$ .

Добавление в транспортную среду верапамила также существенно не влияло на изучаемые показатели, отмечалось только снижение коэффициента кажущейся проницаемости  $R_{app} b-a$  при концентрации МДА 100 мкМ на 31.7% ( $p = 0.0091$ ) (табл. 2).

Полученные результаты свидетельствуют о том, что МДА может транспортироваться Pgp.

#### *Оценка роли Р-гликопротеина при развитии окислительного стресса*

На заключительном этапе исследования оценивалась роль Pgp в защите клеток при ОС. Для этого вызывали индукцию (преинкубация с рифампицином) или ингибирование Pgp (преинкубация с верапамиллом) и оценивали жизнеспособность клеток в ходе МТТ теста после инкубации с

**Таблица 1.** Влияние МДА на транспорт субстрата Pgp – фексофенадина через билипидную мембрану клеток линии Сасо-2 ( $M \pm SD$ , см/с)

Время инкубации	Экспериментальная группа	Рapp $b-a$ , см/с, $\times 10^{-6}$	Рapp $a-b$ , см/с, $\times 10^{-6}$	Рapp $b-a$ /Рapp $a-b$
30 мин	Контроль	$5.43 \pm 0.13$	$1.93 \pm 0.19$	$2.82 \pm 0.15$
	МДА 10 мкМ	$5.45 \pm 0.20$	$1.96 \pm 0.16$	$2.78 \pm 0.24$
	МДА 50 мкМ	$5.51 \pm 0.26$	$2.04 \pm 0.11$	$2.71 \pm 0.25$
	МДА 100 мкМ	$5.98 \pm 1.18$	$1.76 \pm 0.13$	$3.41 \pm 0.19$
24 ч	МДА 10 мкМ	$7.37 \pm 0.26^{****}$	$1.33 \pm 0.18^*$	$5.23 \pm 0.50^{**}$
	МДА 50 мкМ	$6.23 \pm 0.23^{**}$	$1.32 \pm 0.05^*$	$4.71 \pm 0.21^{**}$
	МДА 100 мкМ	$5.64 \pm 0.92$	$1.89 \pm 0.57$	$3.20 \pm 1.19$

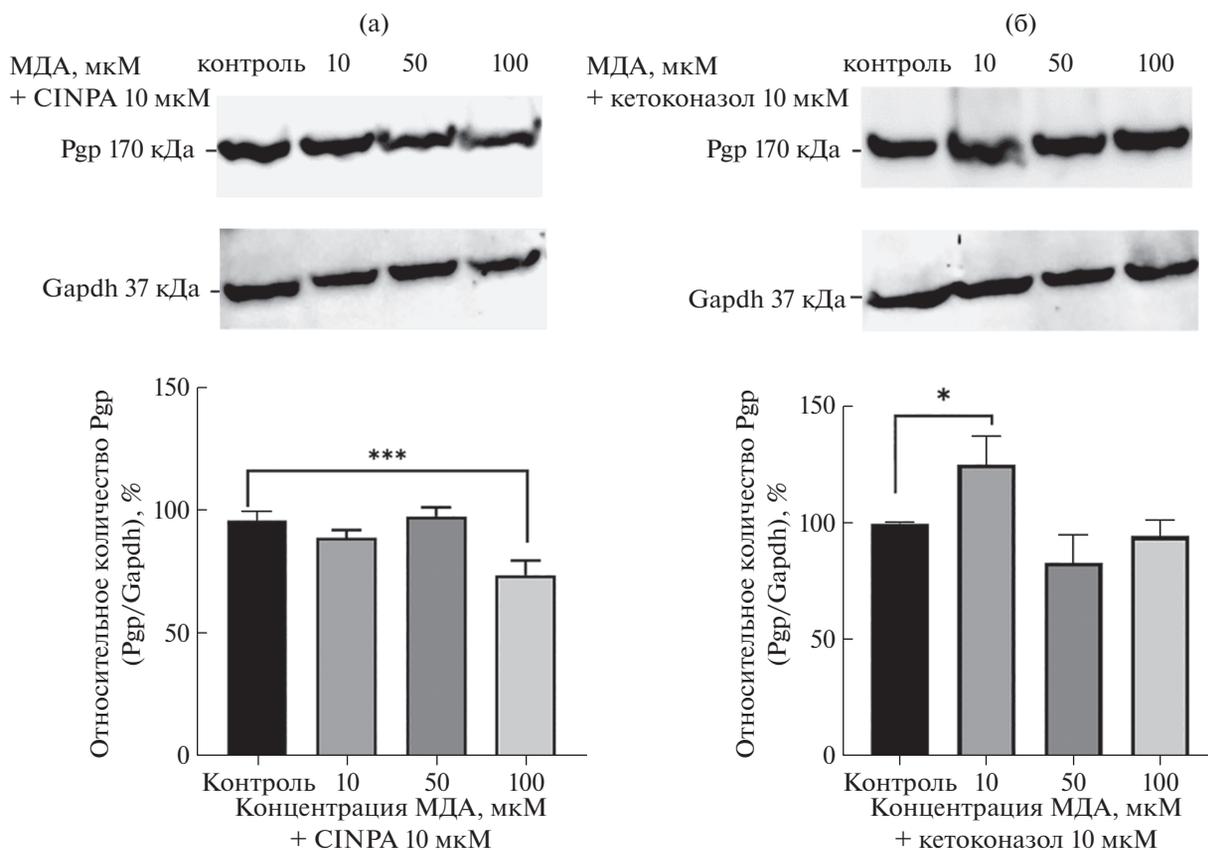
\*\*\*\* –  $p < 0.0001$ ; \*\* –  $p < 0.01$ ; \* –  $p < 0.05$  достоверное отличие от контроля (тест Даннетта).

$H_2O_2$  в концентрациях 0.1–100 мкМ в течение 24 ч.

Жизнеспособность контрольных клеток принималась за 100%. Воздействие  $H_2O_2$  приводило к снижению жизнеспособности клеток до 45.9%

( $p = 0.001$ ) и 65.7% ( $p = 0.002$ ) при концентрациях 50 и 100 мкМ соответственно.

Предварительная индукция Pgp повышала резистентность клеток к ОС, о чем свидетельствовало снижение их жизнеспособности при воздей-



**Рис. 4.** Относительное количество Р-гликопротеина в клетках линии Сасо-2 при воздействии малонового диальдегида в концентрациях 10, 50 и 100 мкМ в течение 24 ч в присутствии ингибиторов CAR (CINPA, а) и PXR (кетоконазол, б). Относительное количество Р-гликопротеина определяли методом вестерн-блот с последующим денситометрическим анализом с использованием программного обеспечения ImageLab. Gapdh использовали в качестве цитоплазматического маркера. Эксперименты были повторены три раза с аналогичными результатами. \* $p < 0.05$ ; \*\*\* $p < 0.001$  – статистически значимые отличия от контроля (тест Даннетта).

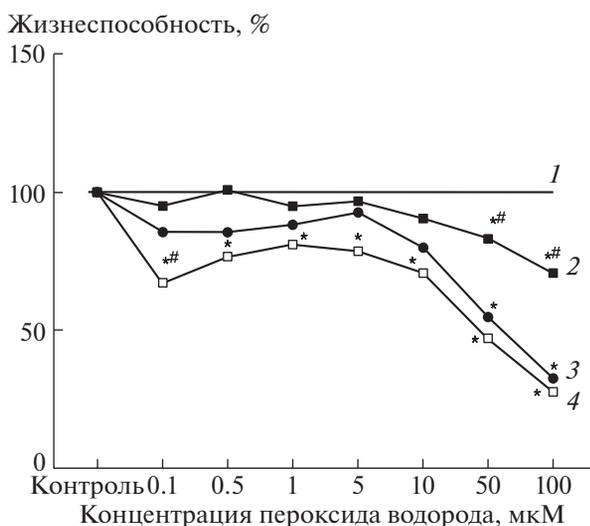
**Таблица 2.** Транспорт малонового диальдегида (МДА) через билипидную мембрану клеток линии Caco-2 ( $M \pm SD$ , см/сек)

Серии экспериментов	$P_{app} b-a, \times 10^{-6}$ см/сек	$P_{app} a-b, \times 10^{-6}$ см/сек	$P_{app} b-a/P_{app} a-b$
МДА 10 мкМ	$19.42 \pm 2.37$	$9.97 \pm 0.88$	$1.96 \pm 0.37$
МДА 10 мкМ + верапамил	$13.82 \pm 2.15^*$	$17.01 \pm 4.92$	$0.86 \pm 0.32^*$
МДА 50 мкМ	$14.38 \pm 0.84$	$10.14 \pm 3.1$	$1.54 \pm 0.64$
МДА 50 мкМ + верапамил	$12.88 \pm 1.81$	$13.88 \pm 1.66$	$0.93 \pm 0.02$
МДА 100 мкМ	$8.54 \pm 0.75$	$6.17 \pm 1.67$	$1.44 \pm 0.31$
МДА 100 мкМ + верапамил	$5.83 \pm 0.63^{**}$	$4.02 \pm 0.64$	$1.46 \pm 0.29$

\* $p < 0.05$ ; \*\* $p < 0.01$  – статистически значимые отличия группы МДА (тест Даннетта).

ствии  $H_2O_2$  только в концентрации 100 мкМ на 26.7% ( $p = 0.0012$ ) относительно контроля и повышение на 28.5% ( $p = 0.005$ ) и 40.7% ( $p = 0.001$ ) относительно самостоятельного применения  $H_2O_2$  в концентрациях 50 и 100 мкМ (рис. 5). Ингибирование белка-транспортера, наоборот, снижало устойчивость клеток, их жизнеспособность снижалась при использовании всего диапазона концентраций 0.1–100 мкМ, максимально при 50 и 100 мкМ на 52.9 и 77.6% ( $p < 0.0001$ ) относительно контроля. Стоит отметить, что при предварительном ингибировании Pgp и использовании  $H_2O_2$  в концентрации 0.1 мкМ жизнеспособность клеток статистически значимо снижалась на 18.7% ( $p = 0.01$ ) относительно самостоятельного воздействия прооксиданта (рис. 5).

Полученные результаты свидетельствуют о том, что Pgp играет защитную роль в клетках при развитии окислительного стресса.



**Рис. 5.** Изменение жизнеспособности клеток в условиях моделирования окислительного стресса (3,  $H_2O_2$ ), предварительной индукции (2, рифампицин) и ингибирования (4, верапамил) активности Р-гликопротеина при моделировании ОС, контроль принимали за 100% (1). \* – статистически значимые отличия относительно контроля, # – статистически значимые отличия относительно группы  $H_2O_2$ .

МДА является основным и наиболее изученным продуктом перекисного окисления полиненасыщенных жирных кислот. При этом МДА способен нарушать функционирование клеток благодаря своей способности вступать в реакцию с такими молекулами, как ДНК и белки [12].

Pgp – АТФ-зависимый белок-транспортер, обеспечивающий выведение своих субстратов из клеток во внеклеточное пространство и биологические жидкости, защищая их от воздействия токсических веществ [1].

В ряде исследований было показано, что развитие ОС может приводить к повышению количества и активности Pgp [8, 13]. Однако механизмы индукции и ее биологическое значение на данный момент не установлены, так же как и неясен ее биологический смысл.

В рамках настоящего исследования проверялась гипотеза о том, что МДА является субстратом Pgp (т.е. Pgp может выводить МДА из клеток, защищая их от его токсического воздействия), а также способен повышать активность данного белка-транспортера. Было показано, что МДА при длительности воздействия 24 ч в концентрации 10 и 50 мкМ вызывает повышение количества Pgp, что сопровождается также и увеличением активности белка-транспортера в изученных концентрациях.

Однако при длительности преинкубации 30 мин МДА не влиял на активность белка-транспортера, что свидетельствует о том, что молекула МДА непосредственно на Pgp не воздействует, т.е. не является его прямым индуктором/ингибитором.

Для изучения механизмов повышения относительного количества Pgp под действием МДА была изучена роль прегнан X рецептора (PXR, steroid and xenobiotic receptor – SXR, NR1I2 – Nuclear Receptor Subfamily 1, Group I, Member 2) и конститутивного андростанового рецептора (CAR, NR1I3, подсемейство 1, группа 1, член 3) в данном процессе. PXR и CAR являются членами суперсемейства ядерных рецепторов, экспрессируются 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 [14].

Установлено, что данные рецепторы играют важную роль в индукции ферментов биотрансформации и белков-транспортёров под действием ксенобиотиков. Также показано, что развитие окислительного и нитрозативного стресса может приводить к повышению количества PXR [15, 16] и CAR [17].

Ингибирование CAR предотвращало индукцию Pgp при использовании всех изученных концентраций МДА, а блокирование PXR нивелировало индуцирующий эффект МДА только в концентрации 50 мкМ. Полученные результаты свидетельствуют о том, что МДА может индуцировать Pgp через активацию CAR и PXR, при этом вклад CAR, видимо, более существенный.

При тестировании МДА на принадлежность к субстратам Pgp было показано, что в концентрации 10 мкМ белок-транспортёр принимает участие в транспорте продукта перекисидации. При увеличении концентрации МДА до 50 и 100 мкМ вклад Pgp в транспорт МДА уменьшается, так как, видимо, увеличивается его транспорт путем пассивной диффузии. Молекула МДА имеет небольшую молекулярную массу и легко может проходить через монослой клеток [18, 19].

Согласно данным литературы, субстратами Pgp, в основном, являются вещества с молекулярной массой выше 300 Да [20]. Молекулярная масса МДА 72 Да. Можно было бы предположить, что транспортируется не сама молекула, а продукт взаимодействия МДА с каким-либо эндогенным компонентом. Но детектирование МДА методом ВЭЖХ-МС/МС исключает это предположение.

На заключительном этапе исследования была оценена роль Pgp в защите клеток при ОС. Для этого в ходе МТТ теста оценивалась выживаемость клеток Сасо-2 при индукции и ингибировании Pgp на фоне ОС. Было показано, что индукция Pgp повышает выживаемость клеток, а ингибирование — ее снижает.

## ВЫВОДЫ

Таким образом, на клетках линии Сасо-2 было доказано:

1) МДА — конечный продукт перекисного окисления полиненасыщенных жирных кислот, в концентрациях 10 и 50 мкМ и длительности экспозиции 24 ч повышает относительное количество и активность Pgp, действуя через ядерные рецепторы CAR и PXR.

2) МДА при определенных концентрациях может транспортироваться Pgp.

3) Биологическое значение индукции Pgp под действием МДА определяется его защитным и цитопротекторным действием, которое обеспечивает выведение данного продукта перекисидации из клеток во внеклеточное пространство и таким образом увеличивает жизнеспособность клеток.

## ИСТОЧНИК ФИНАНСИРОВАНИЯ

Работа выполнена при финансовой поддержке гранта Президента Российской Федерации для государственной поддержки молодых российских ученых — кандидатов наук МК-1856.2020.7.

## КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

## СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

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

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Якушева Е.Н., Тумов Д.С., Правкин С.К. Локализация, модели функционирования и физиологические функции гликопротеина-P // Успехи физиологических наук. 2017. Т. 48. № 4. С. 70–87.
2. Juliano R.L., Ling V. A surface glycoprotein modulating drug permeability in Chinese hamster ovary cell mutans // Biochem. Biophys. Acta. 1976. V. 455. № 1. P. 155–162.
3. Gottesman M.M., Ling V. The molecular basis of multidrug resistance in cancer: The early years of P-glycoprotein research // FEBS Lett. 2006. V. 580. P. 998–1009.
4. Fojo A.T., Ueda K., Slamon D.J., Poplack D.G., Gottesman M.M., Pastan I. Expression of a multidrug-resistance gene in human tumors and tissues // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1987. V. 84. № 1. P. 265–269.
5. Thiebaut F., Tsuruo T., Hamada H., Gottesman M.M., Pastan I., Willingham M.C. Cellular localization of the multidrug-resistance gene product P-glycoprotein in normal human tissues // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1987. V. 84. № 21. P. 7735–7738.
6. Schinkel A.H., Smit J.J.M., van Tellingen O., Beijnen J.H., Wagenaar E., Vandeemter L., Mol C., Vandervalk M.A., Robanusmaandag E.C., Teiele H.P.J. Disruption of the mouse mdr1a P-glycoprotein gene leads to a deficiency in the blood-brain barrier and to increased sensitivity to drugs // Cell. 1994. V. 77. P. 491–502.
7. Borst P., Schinkel A.H. P-glycoprotein ABCB1: a major player in drug handling by mammals // J. Clin. Invest. 2013. V. 123. № 10. P. 4131–4133.
8. Shchulkin A.V., Abalenikhina Yu.V., Erokhina P.D., Chernykh I.V., Yakusheva E.N. The Role of PGlycoprotein in Decreasing Cell Membranes Permeability

- during Oxidative Stress // *Biochemistry (Moscow)*. 2021. V. 86. № 2. P. 197–206.
9. *Hilgers A.R., Conradi R.A., Burton P.S.* Caco-2 cell monolayers as a model for drug transport across the intestinal mucosa // *Pharmac. res.* 1990. V. 7. № 9. P. 902–910.
  10. *Kota B.P., Tran V.H., Allen J., Bebawy M., Roufogalis B.D.* Characterization of PXR mediated P-glycoprotein regulation in intestinal LS174T cells // *Pharmacol Res.* 2010. V. 62. № 5. P. 426–431.
  11. *Cherian M.T., Lin W., Wu J., Chen T.* CINPA1 is an inhibitor of constitutive androstane receptor that does not activate pregnane X receptor. *Mol Pharmacol.* 2015. V. 87. № 5. P. 878–889.
  12. *Rio D. Del, Stewart A. J., Pellegrini N.* A review of recent studies on malondialdehyde as toxic molecule and biological marker of oxidative stress // *Nutrition, Metabolism and Cardiovascular Diseases.* 2005. V. 15. № 4. P. 316–328.
  13. *Ziemann C., Bürkle A., Kahl G.F., Hirsch-Ernst K.I.* Reactive oxygen species participate in *mdr1b* mRNA and P-glycoprotein overexpression in primary rat hepatocyte cultures // *Carcinogenesis.* 1999. V. 20. № 3. P. 407–14.
  14. *Lemmen J., Tozakidis I.E., Bele P., Galla H.J.* Constitutive androstane receptor upregulates *Abcb1* and *Abcg2* at the blood-brain barrier after CITCO activation // *Brain Res.* 2013. V. 21. P. 1501: 68–80.
  15. *Abalenikhina Y.V., Sudakova E.A., Slepnev A.A., Seidkulieva A.A., Erokhina P.D., Shchulkin A.V., Yakusheva E.N.* Functioning of the pregnan X receptor under oxidative stress // *Biochemistry (Moscow), Supplement Series A: Membrane and Cell Biology.* 2022. V. 16. № 1. P. 21–28.
  16. *Abalenikhina Y.V., Sudakova E.A., Seidkulieva A.A., Shchul'kin A.V., and Yakusheva E.N.* Funktsionirovanie pregnan X retseptora v usloviakh nitrozativnogo stressa // *Biomed Khim.* 2021. V. 67. № 5. P. 394–401.
  17. *Shchul'kin A.V., Abalenikhina Y.V., Seidkulieva A.A., Ryabkov A.N., and Yakusheva E.N.* Induction of Constitutive Androstane Receptor during the Development of Oxidative Stress // *Bull Exp Biol Med.* 2021. V. 171. № 5. P. 615–618.
  18. *Tesoriere L., D'Arpa D., Butera D., Pintaudi A.M., Allegra M., Livrea M.A.* Exposure to malondialdehyde induces an early redox unbalance preceding membrane toxicity in human erythrocytes // *Free Radic Res.* 2002. V. 36. № 1. P. 89–97.
  19. *Draper H.H., Hadley M.* A review of recent studies on the metabolism of exogenous and endogenous malondialdehyde // *Xenobiotica.* 1990. V. 20. № 9. P. 901–907.
  20. *Mora Lagares L., Minovski N., Novič M.* Multiclass Classifier for P-Glycoprotein Substrates, Inhibitors, and Non-Active Compounds // *Molecules.* 2019. V. 24. № 10.

## ASSESSMENT OF MALONDIALDEHYDE BELONGING TO MODULATORS AND SUBSTRATES OF THE P-GLYCOPROTEIN TRANSPORTER PROTEIN

A. V. Shchulkin<sup>a</sup>, Yu. V. Abalenikhina<sup>a, #</sup>, P. Y. Mylnikov<sup>a</sup>, I. V. Chernykh<sup>a</sup>, and E. N. Yakusheva<sup>a</sup>

<sup>a</sup> Ryazan State Medical University, Ryazan, Russian Federation

<sup>#</sup>e-mail: [abalenikhina88@mail.ru](mailto:abalenikhina88@mail.ru)

Presented by Academician of the RAS S.B. Seredinin

In a study on cells of the Caco2 line, an assessment of the affiliation of malondialdehyde (MDA) to modulators and substrates of P-glycoprotein (Pgp) was carried out, and the biological role of Pgp in conditions of oxidative stress (OS) was studied. MDA was used at concentrations of 10, 50, 100 and 150 μM, OS was modeled by adding hydrogen peroxide (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) at concentrations of 0.1–100 μM for 24 hours. The relative amount of Pgp was evaluated by the westernblot method, the activity was estimated by the transport of its substrate fexofenadine (HPLC method with UV detection, HPLC MS/MS). During the study, it was shown that MDA at concentrations of 10 and 50 μM and exposure duration of 24 hours increases the relative amount and activity of Pgp, acting through CAR and PXR, while MDA can be transported by Pgp. The induction of Pgp under the action of MDA during the development of OS can have a protective value, ensuring the removal of the peroxidation product from cells into the extracellular space, thereby increasing the viability of cells.

**Keywords:** P-glycoprotein, malondialdehyde, oxidative stress, constitutive androstane receptor, pregnan X receptor, Caco-2 cell line

УДК 618.3-008.6

## РЕГУЛЯЦИЯ РЕНИН-АНГИОТЕНЗИН-АЛЬДОСТЕРОНОВОЙ СИСТЕМЫ ПЛАЦЕНТЫ ПРИ РАННЕЙ И ПОЗДНЕЙ ПРЕЭКЛАМПСИИ

© 2022 г. К. А. Артемьева<sup>1,\*</sup>, Н. В. Низяева<sup>1</sup>, О. Р. Баев<sup>2</sup>, А. Ю. Романов<sup>2</sup>, Г. В. Хлестова<sup>2</sup>, М. Н. Болтовская<sup>1</sup>, А. И. Щеголев<sup>2</sup>, член-корреспондент РАН Л. В. Кактурский<sup>1</sup>

Поступило 25.04.2022 г.

После доработки 14.07.2022 г.

Принято к публикации 18.07.2022 г.

Преэклампсия (ПЭ) является одним из наиболее опасных осложнений беременности, характеризующимся гипертонией, протеинурией и симптомами полиорганной недостаточности, выявленными *de novo* после 20 нед беременности. Ренин-ангиотензин-альдостероновая система (РААС) одной из первых распознает беременность и является важным регулятором артериального давления. Плацента имеет собственную РААС, роль которой в развитии ПЭ не до конца изучена. В данной работе мы впервые характеризуем экспрессию компонентов РААС и контролирующих ее микроРНК в плаценте в зависимости от срока манифестации ПЭ. Полученные данные позволят разработать в будущем новую стратегию поиска терапевтических средств для пациентов, страдающих ПЭ и сердечно-сосудистыми заболеваниями.

**Ключевые слова:** плацента, преэклампсия, ренин-ангиотензин-альдостероновая система, микроРНК

**DOI:** 10.31857/S2686738922060026

### ВВЕДЕНИЕ

Преэклампсия (ПЭ) является специфическим для беременности синдромом, характеризующимся выявленными *de novo* гипертонией и протеинурией, а также симптомами полиорганной недостаточности, развивающимися после 20 нед беременности. Распространенность ПЭ составляет от 2 до 8% беременностей. На долю преэклампсии ежегодно приходится более 70000 случаев материнской и 500000 случаев смерти плода/новорожденных [1]. В долгосрочной перспективе перенесенная ПЭ способствует развитию хронической сердечно-сосудистой и почечной патологии примерно у 20% женщин [2]. Важным регулятором артериального давления и одной из систем, первыми распознающих беременность, является ренин-ангиотензин-альдо-

стероновая система (РААС) [3]. При физиологическом течении беременности организм матери приспособляется и компенсирует изменяющиеся гемодинамические условия [4]. Патологические изменения в РААС служат основной причиной поверхностной цитотрофобластической инвазии и нарушения ремоделирования спиральных артерий, что представляет собой фундаментальный патофизиологический процесс, сопровождаемый серией осложнений. Плацента имеет собственную РААС, определяемую с 6 нед и наиболее активную на ранних сроках беременности [5]. Следует отметить, что биологические свойства ангиотензина (Ат) II, основного биологически активного конечного продукта каскада РААС разнообразны и не ограничиваются только регуляцией тонуса сосудов, что чрезвычайно важно при беременности. Ат II связывается с плацентарными рецепторами и стимулирует пролиферацию и миграцию клеток, ангиогенез и инвазию клеток трофобласта [6]. Изменения РААС не компенсируются у женщин с ПЭ, что приводит к сужению капилляров, повреждениям почек, нарушениям водно-солевого обмена и т.д. [7]. Поддержание циркулирующей РААС, отвечающей за поддержание материнского гомеостаза, и активация почечной РААС в совокупности с измененной сосудистой реактивностью к Ат способствуют развитию гипертонии, повреждению почек и нарушению нейрогуморального контроля мате-

<sup>1</sup> Научно-исследовательский институт морфологии человека имени академика А.П. Авцына Федерального государственного бюджетного научного учреждения “Российский научный центр хирургии имени академика Б.В. Петровского”, Москва, Россия

<sup>2</sup> Федеральное государственное бюджетное учреждение “Национальный медицинский исследовательский центр акушерства, гинекологии и перинатологии имени академика В.И. Кулакова” Министерства здравоохранения Российской Федерации, Москва, Россия  
\*e-mail: artemjeva\_ksenia@mail.ru

**Таблица 1.** Количество пациенток в группах исследования

Группы	Неосложненная беременность	Преэклампсия
Всего	44	40
До 34 нед гестации	15	18
После 34 нед гестации	29	22

ринского кровообращения и водно-солевого баланса, что приводит в конечном итоге к ПЭ [8]. Было показано, что в передаче сигналов РААС важную роль играют микроРНК микроРНК (miRNA, miR) [9], в частности, miR-146a и -155, вовлеченные в ключевые патогенетические механизмы развития преэклампсии – гипертензию, окислительный стресс, воспаление, дисрегуляцию иммунного ответа.

Роль маточно-плацентарной РААС в развитии и функции плаценты при ПЭ не до конца раскрыта. В данной работе мы впервые характеризуем экспрессию компонентов РААС и контролирующих ее miR в различных структурах плаценты в зависимости от срока манифестации ПЭ.

Цель работы: оценить экспрессию компонентов РААС и контролирующих ее микроРНК в плаценте в зависимости от срока манифестации ПЭ.

## ОБЪЕКТ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

В исследовании приняли участие беременные женщины, страдающие ПЭ, и женщины с физиологической беременностью соответствующих сроков гестации (табл. 1).

Работа одобрена Этическим Комитетом ФГБУ “НМИЦ акушерства, гинекологии и перинатологии им. В.И. Кулакова” Минздрава России, протокол № 6 от 09 июня 2016 г. Все пациентки дали добровольное информированное согласие на участие в исследовании.

Критерии включения в группу ПЭ:

1. Одноплодная беременность;
2. Возраст беременной от 18 до 43 лет;
3. Наличие критериев ПЭ (артериальная гипертензия (артериальное давление  $\geq 140/90$  мм рт. ст.), протеинурия ( $\geq 0.3$  г/л в суточной моче), отеки, проявления полиорганной недостаточности);
4. Родоразрешение путем операции кесарева сечения.

Пациентки с проявлением патологии до 34 нед включительно были отнесены к ранней ПЭ. Группы с ранней и поздней ПЭ соответствовали группам сравнения по гестационному возрасту.

Критерии включения для обеих групп сравнения:

1. Беременность, наступившая в естественном цикле;
2. Родоразрешение путем кесарева сечения;
3. Общее содержание белка в моче ниже 100 мкг/мл;
4. Без признаков гипертензивных расстройств (артериальное давление ниже 140/90 мм рт. ст.).

Для ранней группы сравнения критерием стали преждевременные оперативные роды на сроке до 34 нед гестации включительно; у каждой из пациенток под контролем гистологического исследования были отобраны образцы плацент без признаков воспалительной инфильтрации (хориоамнионитов, виллитов и интервиллитов).

Для поздней группы сравнения критерием явилось оперативное родоразрешение по следующим показаниям:

- Наличие рубца на матке после ранее выполненной операции кесарева сечения;
- Заболевания глаз, сетчатки, миопия тяжелой степени (что не влияло на течение беременности и на плаценту);
- Неправильное положение плода;
- Анатомически узкий таз.

## Гистологическое исследование

Фрагменты ткани плаценты (размерами  $1.5 \times 1 \times 0.5$  см) от пациенток, страдающих ПЭ, и пациенток групп сравнения были взяты через всю толщу плацентарного диска из краевой, парацентральной и центральной (включающей ворсинчатый хорион, базальную и хориальную пластинки) зон. Полученные кусочки фиксировали в 10%-ном растворе забуференного нейтрального формалина, pH = 7.4 (Biovitrum, Россия) в течение 24 ч, затем заключали в парафин. Далее из них изготавливали срезы толщиной 4 мкм. Исследовали не менее 10 фрагментов плаценты (4 – из центральной зоны, по 2 – из парацентральной и периферической).

## Иммуногистохимическое исследование

Иммуногистохимическое (ИГХ) исследование выполняли с использованием автоматического иммуностейнера Ventana (Roche, Великобритания) с закрытым протоколом для детекции на парафиновых срезах плаценты. Протокол включал все этапы стандартной процедуры ИГХ исследования: депарафинирование срезов, демаскировку антигенов, блокирование эндогенной пероксидазы, инкубацию с первичными и вторичными антителами. Система визуализации – Ultra View Universal DAB Detection Kit Ventana (Roche, Великобритания). В качестве первичных антител были использованы кроличьи моноклональные анти-

тела к ангиотензиногену (1:300, Anti-Angiotensinogen antibody (ab276132); Abcam, США), вторичных антител – козы антикроличьи IgG (Goat anti-rabbit IgG, Ventana, Roche, Великобритания). Производитель указал перекрестное реагирование антитела ab276132 с Ат I, II и ангиотензиногеном ввиду общего строения концевых фрагментов для всех ангиотензинов, поэтому продукт ИГХ реакции оценивали в целом как ангиотензины (АТ).

*Выявление miR в структурных элементах плаценты методом хромогенной гибридизации in situ (CISH)*

Для выявления miR-146a и -155 использовали набор “MiRCURY LNA™ microRNA ISH Optimization Kit (FFPE)"/MiRCURY LNA™ для оптимизации гибридизации *in situ* микроРНК (на зафиксированных 10% формалином и залитых в парафин препаратах), включающий DIG-меченные LNA™ ДНК-зонды для детекции miR-146a и miR-155 и контроли: положительный – 5'-DIG меченная U6 snRNA (малая ядерная РНК), отрицательный – 5'- и 3'-DIG меченный скремблированный зонд. Протокол колориметрического метода выявления miR был выполнен согласно инструкции производителя Exicon, США ([www.exicon.info](http://www.exicon.info)).

*Оценка ИГХ и CISH окрашивания*

Интенсивность продуктов ИГХ реакции и CISH оценивали в единицах оптической плотности (ЕОП) при помощи микроскопа Nikon Eclipse с программным обеспечением NIS-Elements AR3 (Чехия) при увеличении  $\times 400$  с анализом не менее 20 полей зрения. В полях зрения отсутствовали инфаркты, кальцинаты и участки тромбоза. В плацентах группы сравнения отсутствовали признаки воспалительных изменений. Показатели экспрессии ИГХ маркеров умножали на 100.

*Статистический метод*

Статистическую обработку полученных результатов проводили с использованием статистических функций “Microsoft Excel” и программных пакетов “MedCalc Statistical”, “BM SPSS Statistics 8”. Проверку нормальности распределения исходных данных осуществляли с помощью теста Колмогорова–Смирнова. Данные представляли в виде медианы (Me) и квартилей Q1 и Q3 в формате Me (Q1; Q3). Для оценки различий в группах применяли метод парных сравнений Манна–Уитни. Достоверность принималась при значениях  $p < 0.05$ .

**РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ**

*Иммуногистохимическое исследование плаценты*

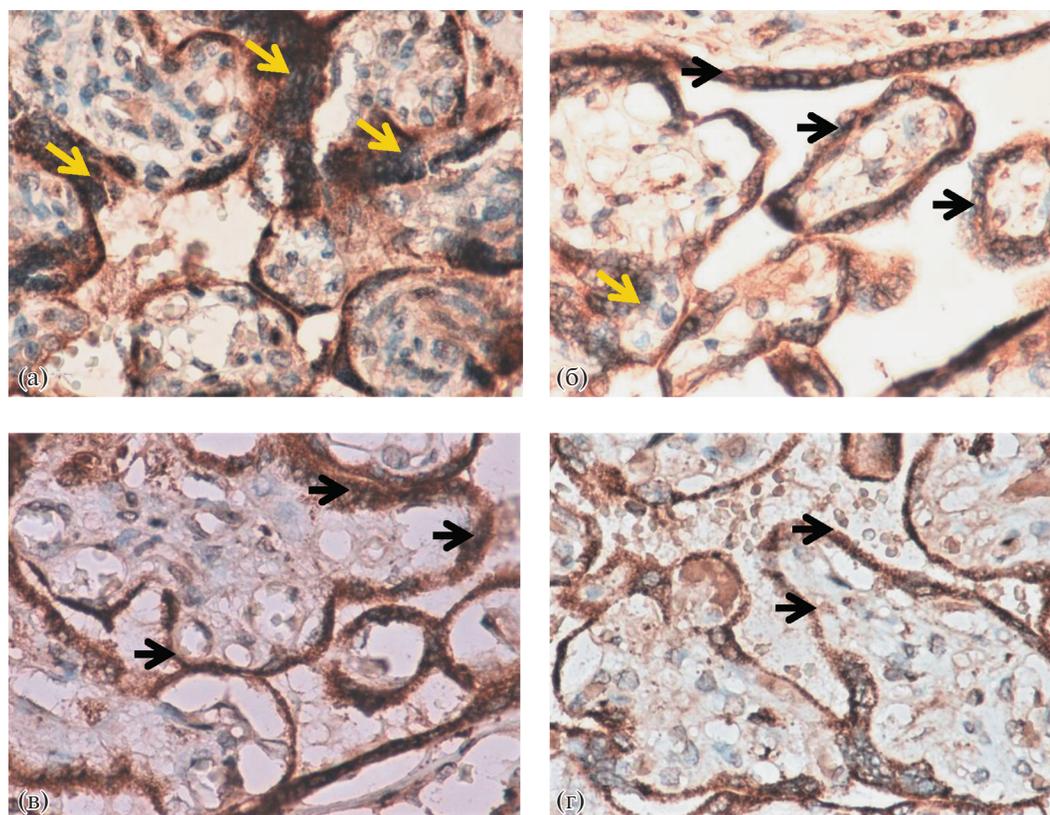
При анализе препаратов выявлена интенсивная, преимущественно цитоплазматическая экспрессия АТ в цитотрофобласте (ЦТ) и синцитиотрофобласте (СЦТ) створчатых, промежуточных и терминальных ворсин, синцитиальных узелках (СУ), децидуальных клетках, в эндотелии сосудов и мезенхимальных клетках стромы ворсин (рис. 1, 2). Интересно отметить, что слабая экспрессия АТ отмечена и в макрофагах (МФ). Как при ранней, так и при поздней ПЭ экспрессия маркера выше, чем в группах сравнения (рис. 3).

*Экспрессия miR -146a и 155 в структурах плаценты*

При физиологической беременности мембранное и цитоплазматическое окрашивание miR-146a и -155 обнаружено в ворсинчатом и вневорсинчатом трофобласте, СУ и децидуальных клетках. Окрашивание miR-155 отмечали также в цитоплазме МФ. Морфометрически экспрессию оценивали в СЦТ и СУ, где она была более выражена. В конце неосложненной беременности отмечается самый высокий уровень miR-146a и -155. Ранняя ПЭ характеризовалась более высоким уровнем экспрессии miR-155 в сравнении с группой неосложненной беременности. Экспрессия miR-146a в синцитиотрофобласте при ранней ПЭ была ниже, чем при поздней ( $p = 0.022$ ). При поздней ПЭ показатели экспрессии как miR-146a, так и -155, были значимо ниже, чем в группе сравнения (табл. 2).

Ранее считалось, что РААС связана в первую очередь с нейроэндокринной функцией почек и надпочечников. Последствия нерегулируемого высвобождения компонентов и регуляторов РААС при разрушении трофобласта включают подавление материнской циркулирующей и активацию внутрипочечной РААС, снижение маточно-плацентарного кровотока, что ведет к дальнейшему повреждению плаценты и изменению нейрогуморального контроля сердечно-сосудистой и мочевыделительной систем [10, 11], усугубляющими гипертензивные эффекты почечной РААС. Результаты нашего исследования показывают, что плацента представляет собой альтернативную ренин-ангиотензиновую систему, структуры которой (прежде всего ворсинчатый и вневорсинчатый трофобласт, синцитиальные узелки), обладают способностью к продукции метаболитов РААС. Как было установлено, при ПЭ экспрессия Ат повышена как при ранней, так и поздней манифестации заболевания.

Учитывая, что ПЭ, особенно тяжелого течения, ассоциирована с повреждением плаценты и трофобласта, то становится понятно, что слуши-



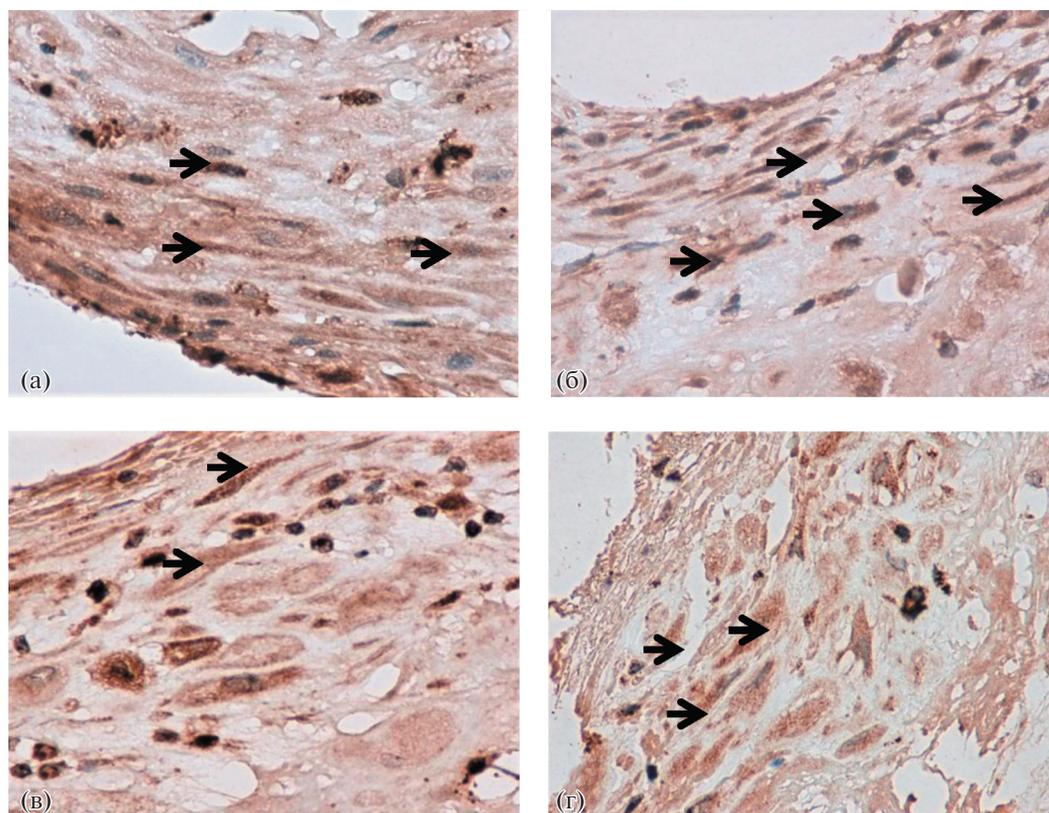
**Рис. 1.** Экспрессия ангиотензинов в ворсинчатом дереве плаценты при ранней и поздней преэклампсии (ПЭ),  $\times 400$ . а – ранняя ПЭ (31–32 нед). Экспрессия отмечается в синцитиотрофобласте (отмечено желтой стрелкой) и синцитиальных узелках (отмечено черной стрелкой); б – ранняя группа сравнения (31 нед); в – поздняя ПЭ (38 нед); г – поздняя группа сравнения (38 нед).

вание и массивное поступление клеток трофобласта в материнский кровоток будут приводить к изменениям соотношения метаболитов РААС в плазме крови, а это будет обуславливать склон-

ность к гипертензивным расстройствам [12]. Более того, аномальное развитие, гипоксия и повреждение плаценты связаны с избыточным выделением экзосом и других плацентарных частиц,

**Таблица 2.** Экспрессия miR-146a и miR-155 в ворсинах плаценты при ранней и поздней преэклампсии (ПЭ), ЕОП (Ме, Q1; Q3)

miR	miR-146a		miR-155	
	СУ	СЦТ	СУ	СЦТ
Ранняя группа сравнения (РН)	2.3 (1.63; 2.97)	1.9 (1.67; 2.13)	4.5 (3.97; 5.03)	2.5 (2.39; 2.61)
Ранняя ПЭ (РПЭ)	2.2 (1.83; 2.57)	2.0 (1.73; 2.27)	5.0 (4.59; 5.41)	4.5 (4.33; 4.68)
Поздняя группа сравнения (ПН)	5.5 (4.62; 6.39)	4.4 (3.66; 5.14)	8.2 (7.72; 8.69)	8.1 (7.63; 8.58)
Поздняя ПЭ (ППЭ)	2.3 (1.96; 2.64)	2.8 (2.56; 3.04)	4.9 (4.67; 5.13)	5.1 (5.09; 5.12)
РН–ПН	$p = 0.003$	$p = 0.001$	$p = 0.04$	$p < 0.001$
ПН–ППЭ	$p = 0.001$	$p = 0.014$	$p = 0.005$	$p = 0.003$
РН–РПЭ	$p = 0.62$	$p = 0.474$	$p = 0.737$	$p = 0.005$
РПЭ–ППЭ	$p = 0.81$	$p = 0.022$	$p = 0.944$	$p = 0.096$



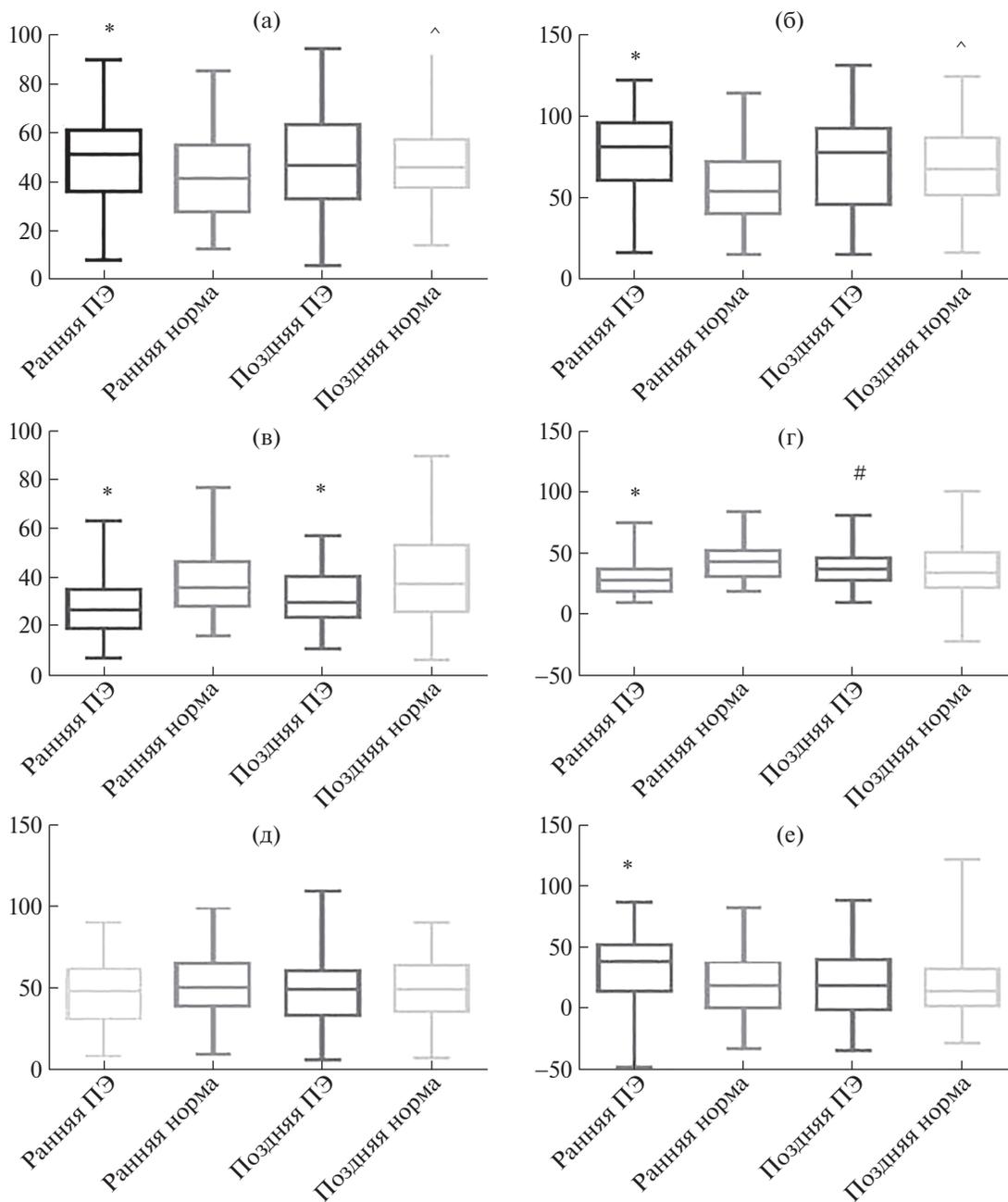
**Рис. 2.** Экспрессия ангиотензинов в децидуальной пластинке при ранней и поздней преэклампсии (ПЭ),  $\times 400$ . а – ранняя ПЭ (32 нед); б – ранняя группа сравнения (31 нед); в – поздняя ПЭ (38 нед); г – поздняя группа сравнения (38 нед) (децидуальные клетки отмечены стрелками).

содержащих ангиотензины, аутоантитела к рецептору Ат II 1-го типа, являющиеся агонистами и имеющие те же функции, что и Ат II, в материнский кровоток, а также нарушение продукции микроРНК [13]. Полученные данные показали, что ранняя ПЭ характеризовалась более высоким уровнем экспрессии miR-155, чем в группе сравнения. Наряду с этим miR-146a, наоборот, проявила снижение как при ранней, так и при поздней манифестации ПЭ. Несмотря на значительную экспрессию АТ в эндотелии сосудов плаценты, выраженного CISH-окрашивания miR-146a и -155 эндотелия не наблюдали. В то же время показано, что воздействие Ат на эндотелиальные клетки человека вызывает увеличение экспрессии miR-146a и снижение экспрессии IL-6, что защищает клетки от его провоспалительного действия [14]. Вероятно, такое распределение miR-146a и -155 в эндотелии сосудов плаценты может служить дополнительным фактором риска развития ПЭ. Это согласуется с данными о снижении регуляции циркулирующей miR-146a при гипертонии [15]. MiR-155 играет важную роль в регуляции Ат II, эндотелина I, экспрессии eNOS. Ингибирование miR-155 усиливает продукцию

NO в эндотелиоцитах и ацетилхолин-индуцированную эндотелий-зависимую вазорелаксацию [16]. Сверхэкспрессия miR-155 вызывает ингибирование ангиогенного индуктора Cyr61 – фактора, участвующего в регуляции ангиогенеза на ранних сроках беременности, что ведет к местной ишемии и окислительному стрессу, а также predisполагающим фактором развития ПЭ [17]. Обращает на себя экспрессия miR-155 в цитоплазме МФ, где также отмечалась экспрессия АТ. МФ экспрессируют рецептор I-го типа для Ат, индуцирующий сдвиг фенотипа МФ в сторону провоспалительного (M1), способствуя РААС-зависимой гипертензии [18].

В предыдущей работе нами было показано, что поврежденный трофобласт при ПЭ, очевидно, не способен поддерживать синтез miR на необходимом уровне, что ведет к формированию порочного круга при ПЭ и дальнейшему прогрессированию заболевания [19].

Таким образом, в настоящей работе показано, что плацента обладает способностью к синтезу метаболитов РААС, что демонстрирует важную роль плаценты в развитии гипертензивных расстройств. Кроме того, было выявлено нарушение



**Рис. 3.** Экспрессия ангиотензинов в структурах плаценты при ранней и поздней преэклампсии (ПЭ). а, б – в синцитиотрофобласте, а – мембранное окрашивание, б – цитоплазматическое окрашивание; в, г – во вневорсинчатом трофобласте, в – мембранное окрашивание, г – цитоплазматическое окрашивание; д, е – в синцитиальных узелках, д – мембранное окрашивание, е – цитоплазматическое окрашивание; ж, з – в децидуальных клетках, ж – мембранное окрашивание, з – цитоплазматическое окрашивание; и – в эндотелии цитоплазматическое окрашивание; к – в фибробластоподобных клетках цитоплазматическое окрашивание; л, м – в макрофагах, л – мембранное окрашивание, м – цитоплазматическое окрашивание. \* – различия значимы в сравнении с группой контроля; # – различия значимы между группами ранней и поздней преэклампсии; ^ – различия значимы между группами ранней и поздней нормы.

экспрессии в структурах плаценты miR-146a и -155, участвующих, с одной стороны, в регуляции провоспалительного ответа, а с другой – связанных с гипертензивными нарушениями при беременности. Полученные данные раскрывают но-

вые патогенетические механизмы при ранней и поздней ПЭ. Дальнейшее изучение роли miR может стать основой для разработки подходов к профилактике ПЭ и созданию miR-терапевтических средств.

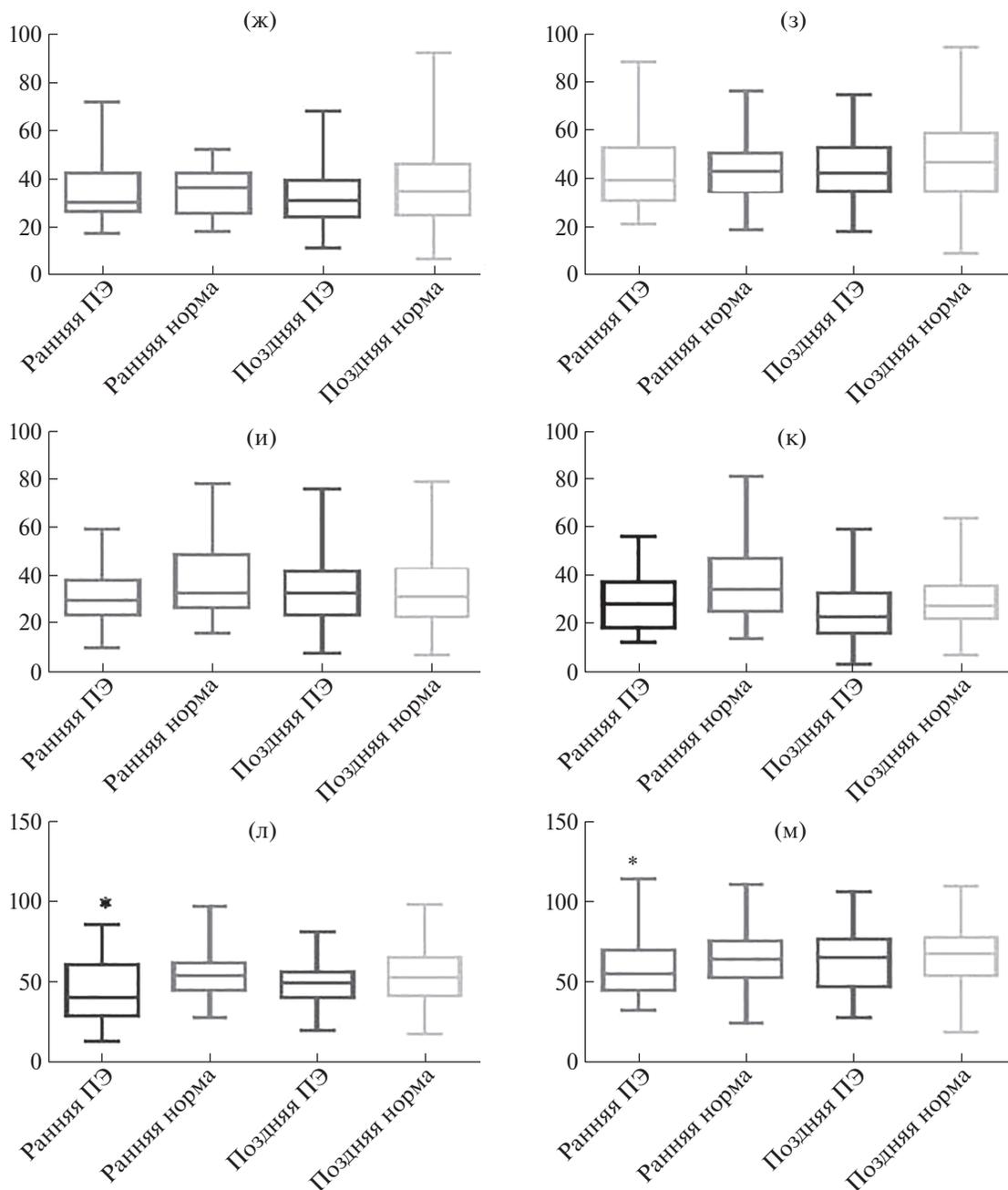


Рис. 3. Окончание.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, нами установлена возможность синтеза плацентой ключевых метаболитов ренин-ангиотензин-альдостероновой системы с повышением их уровня в структурах плаценты при преэклампсии. Представленная работа имеет фундаментальное значение, свидетельствуя о роли плаценты в развитии гипертензивных состояний, которые связаны, прежде всего, с повреждением структур плаценты и трофобласта как дополнительного источника вазоконстрикторов.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Aneman I., Pienaar D., Suvakov S., et al.* Mechanisms of key innate immune cells in early- and late-onset pre-eclampsia // *Front immunol.* 2020. V. 11. № 1864.
2. *Barbosa I.R.C., Silva W.B.M., Cerqueira G.S.G., et al.* Maternal and fetal outcome in women with hypertensive disorders of pregnancy: the impact of prenatal care // *Ther. Adv. Cardiovasc. Dis.* 2015. V. 9. P. 140–146.
3. *Lumbers E.R., Pringle K.G.* Roles of the circulating renin-angiotensin-aldosterone system in human preg-

- nancy // *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*. 2014. V. 306. № 2. P. 91–101.
4. Рудюк Л.А., Решетникова О.С. Макроскопические изменения плаценты при беременности, осложненной врожденными пороками сердца // *Клиническая и экспериментальная морфология*. 2019. Т. 8. № 1. С. 19–26.
  5. Pringle K.G., Tadros M., Callister R., et al. The expression and localization of the human placental prorenin/renin-angiotensin system throughout pregnancy: roles in trophoblast invasion and angiogenesis? // *Placenta*. 2011. V. 32. P. 956–962.
  6. Singh S., Moodley J., Khaliq O.P., et al. A narrative review of the renin-angiotensin-aldosterone system in the placenta and placental bed of HIV infected women of african ancestry with preeclampsia // *Curr Hypertens Rep*. 2021. V. 23. № 8. P. 39.
  7. Yang J., Shang J., Zhang S., et al. The role of the renin-angiotensin-aldosterone system in preeclampsia: genetic polymorphisms and microRNA // *J Mol Endocrinol*. 2013. V. 50. № 2. P. 53–66.
  8. Navar L.G. Intrarenal renin-angiotensin system in regulation of glomerular function // *Curr Opin Nephrol Hypertens*. 2014. V. 23. P. 38–45.
  9. Improtta-Caria A.C., Aras M.G., Nascimento L., et al. MicroRNAs regulating renin-angiotensin-aldosterone system, sympathetic nervous system and left ventricular hypertrophy in systemic arterial hypertension // *Biomolecules*. 2021. V. 11. № 12. P. 1771.
  10. Fushima T., Sekimoto A., Minato T., et al. Reduced uterine perfusion pressure (RUPP) model of preeclampsia in mice // *PLoS ONE*. 2016. V. 11. P. e0155426.
  11. Sandgren J.A., Scroggins S.M., Santillan D.A., et al. Vasopressin: the missing link for preeclampsia? // *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*. 2015. V. 309. P. 1062–1064.
  12. Arthurs A.L., Lumbers E.R., Pringle K.G. MicroRNA mimics that target the placental renin-angiotensin system inhibit trophoblast proliferation // *Mol Hum Reprod*. 2019. V. 25. P. 218–227.
  13. Khlestova G.V., Romanov A.Yu., Nizyaeva N.V., et al. Dynamics of renin, angiotensin II, and angiotensin (1–7) during pregnancy and predisposition to hypertension-associated complications // *Bull Exp Biol Med*. 2018. V. 165. № 4. P. 438–439.
  14. Гапеев И.Ф. Роль ми-РНК в регуляции патофизиологических механизмов при артериальной гипертензии // *Наука молодых (Eruditio Juvenium)*. 2018. Т. 6. № 4. С. 589–599.
  15. Roganović J. Downregulation of microRNA-146a in diabetes, obesity and hypertension may contribute to severe COVID-19 // *Med Hypotheses*. 2021. V. 146. P. 10448.
  16. Nemezc M., Alexandru N., Tanko G., et al. Role of microRNA in endothelial dysfunction and hypertension // *Curr Hypertens Rep*. 2016. V. 18. № 12. P. 87.
  17. Pankiewicz K., Fijałkowska A., Issat T., et al. Insight into the key points of preeclampsia pathophysiology: uterine artery remodeling and the role of microRNAs // *Int J Mol Sci*. 2021. V. 22. № 6. P. 3132.
  18. Justin Rucker A., Crowley S.D. The role of macrophages in hypertension and its complications // *Pflugers Arch*. 2017. V. 469. № 3–4. P. 419–430.
  19. Nizyaeva N.V., Kulikova G.V., Nagovitsyna M.N., et al. Expression of microRNA-146a and microRNA-155 in placental villi in early- and late-onset preeclampsia // *Bull Exp Biol Med*. 2017. V. 163. № 3. P. 394–399.

## REGULATION OF THE PLACENTAL RENIN-ANGIOTENSIN-ALDOSTERONE SYSTEM IN EARLY AND LATE ONSET PREECLAMPSIA

K. A. Artemieva<sup>a, #</sup>, N. V. Nizyaeva<sup>a</sup>, O. R. Baev<sup>b</sup>, A. Yu. Romanov<sup>b</sup>, G. V. Khlestova<sup>b</sup>, M. N. Boltovskaya<sup>a</sup>, A. I. Shchegolev<sup>b</sup>, and Corresponding Member of the RAS L. V. Kakturskiy<sup>a</sup>

<sup>a</sup>*Avtsyn Research Institute of Human Morphology Federal State Budgetary Scientific Institution “Petrovsky National Research Centre of Surgery”, Moscow, Russian Federation*

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

<sup>#</sup>*e-mail: artemjeva\_ksenia@mail.ru*

Preeclampsia (PE) is one of the most dangerous complications of pregnancy, characterized by hypertension, proteinuria, and symptoms of multiple organ failure detected de novo after 20 weeks of pregnancy. The renin-angiotensin-aldosterone system (RAAS) is one of the first to recognize pregnancy and is an important regulator of blood pressure. The placenta has its own RAAS, the role of which in the development of PE is not fully understood. In this work, for the first time, we characterize the expression of RAAS components and miRNAs controlling it in the placenta at various times of PE manifestation. The data obtained will allow the development of a new strategy in the future for the search for therapeutic agents for patients suffering from PE and cardiovascular diseases.

**Keywords:** placenta, preeclampsia, renin-angiotensin-aldosterone system, miRNA

УДК 577.112

## НЕЙРОПРОТЕКТОРНЫЙ ЭФФЕКТ НЕЙРОПЕПТИДА ЦИКЛОПРОЛИЛГЛИЦИНА ЗАВИСИТ ОТ АКТИВАЦИИ АМРА- И TRK-РЕЦЕПТОРОВ

© 2022 г. Член-корреспондент РАН Т. А. Гудашева<sup>1,\*</sup>, К. Н. Колясникова<sup>1</sup>, А. Г. Аляева<sup>1</sup>,  
С. В. Николаев<sup>1</sup>, Т. А. Антипова<sup>1</sup>, академик РАН С. Б. Середенин<sup>1</sup>

Поступило 20.06.2022 г.

После доработки 18.07.2022 г.

Принято к публикации 20.07.2022 г.

Ранее нами было показано, что эндогенный нейропептид циклопролилглицин (ЦПГ) является положительным модулятором АМРА-рецепторов, выявлена зависимость анксиолитического и антигипоксического действия циклодипептида от BDNF/Trk сигналинга. В настоящей работе в экспериментах *in vitro* с применением блокаторов АМРА-рецепторов DNQX и GYKI 52466 и блокатора Trk-рецепторов K252a впервые выявлено, что нейропротекторный эффект ЦПГ зависит от активации как АМРА, так и Trk рецепторов.

**Ключевые слова:** циклопролилглицин, нейропротекторная активность, мозговой нейротрофический фактор (BDNF), Trk, АМРА

**DOI:** 10.31857/S2686738922060099

Циклопролилглицин (ЦПГ), эндогенный циклодипептид, теоретически предполагался в качестве топологического пептидного аналога классического ноотропа пирацетама (N-карбамидометилпирролидона-2) [1], а в дальнейшем был идентифицирован в головном мозге грызунов [2], в плазме крови, цереброспинальной жидкости и головном мозге человека [3]. Установлено, что ЦПГ подобен по структуре пирацетаму, и обладает сходным спектром фармакологических эффектов, включая ноотропную, антигипоксическую, нейропротекторную и анксиолитическую активности [4, 5].

В электрофизиологических экспериментах на изолированных клетках Пуркинье мозжечка крыс выявлена способность ЦПГ положительно модулировать токи АМРА-рецепторов [6]. Подобно другим ампакинам [7, 8], ЦПГ повышает содержание мозгового нейротрофического фактора (brain derived neurotrophic factor, BDNF) в нейрональных культурах [9]. При этом важно, что спектр фармакологической активности ЦПГ, включая нейропротекторную, прокогнитивную, антидепрессивную, анальгетическую [10], близок к имеющемуся у BDNF [11, 12]. На основе этих

данных нами сформулирована гипотеза, что фармакологические эффекты ЦПГ обусловлены стимуляцией BDNF/TrkB сигналинга вследствие активации АМРА-рецепторов, что было подтверждено введением блокатора Trk-рецепторов K252A или конкурентного антагониста АМРА-рецепторов, соединения DNQX, которые препятствовали проявлению анксиолитического [13] и антигипоксического [5] эффектов ЦПГ.

Логично предположить, что и другие фармакологические эффекты ЦПГ также обусловлены стимуляцией АМРА/BDNF/TrkB каскада. Поэтому в настоящей работе мы изучили влияние конкурентного и неконкурентного антагонистов АМРА-рецепторов, DNQX [14] и GYKI 52466 [15] соответственно, и блокатора Trk-рецепторов K252a [16] на нейропротекторную активность ЦПГ на клеточной модели окислительного стресса.

Модель окислительного стресса на культуре гиппокампальных нейронов линии НТ-22 воспроизводили согласно [17]. Концентрация ЦПГ  $10^{-6}$  М была выбрана как наиболее активная в электрофизиологических экспериментах на клетках Пуркинье [6], она также соответствует содержанию эндогенного ЦПГ в мозге у грызунов [2]. Окислительный стресс моделировали путем внесения перекиси водорода в конечной концентрации 1.5 мМ в течение 30 мин, затем среду заменяли на обычную. Через 4 ч выполняли измерение

<sup>1</sup> ФГБНУ “НИИ фармакологии имени В.В. Закусова”, Москва, Россия

\*e-mail: tata-sosnovka@mail.ru

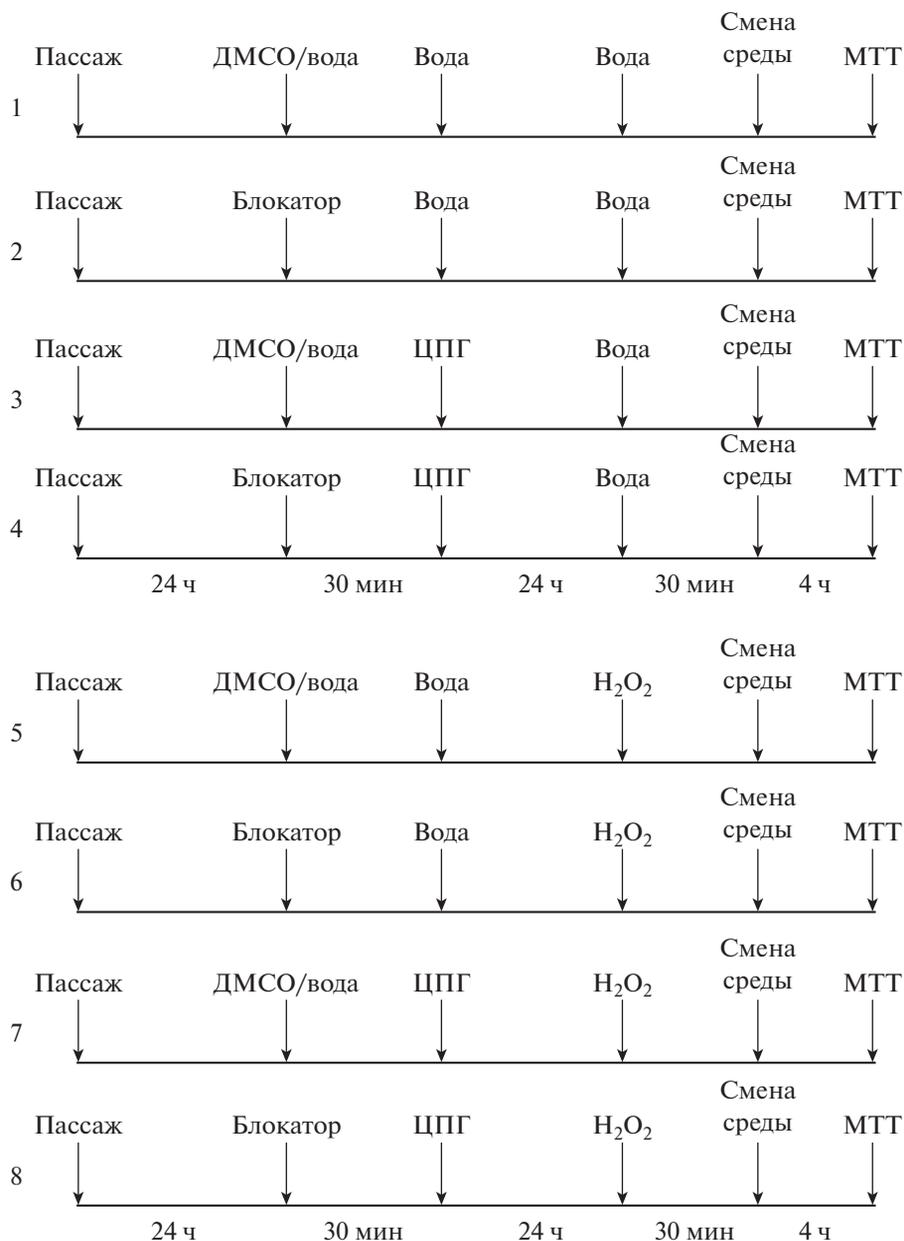


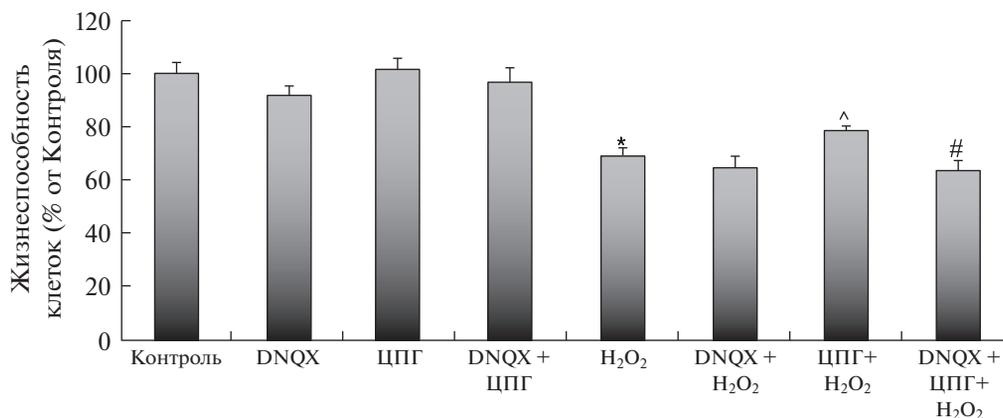
Рис. 1. Схема эксперимента. Группы: 1 – контроль, 2 – блокатор, 3 – ЦПГ, 4 – блокатор+ЦПГ, 5 – H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, 6 – блокатор + H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, 7 – ЦПГ + H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, 8 – блокатор + ЦПГ + H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.

жизнеспособности клеток методом МТТ-теста с использованием 0.5% водного раствора бромида 3-(4,5-диметилтиазол-2-ил)-2,5-дифенил-тетразолия [18], измеряя оптическую плотность при 600 нм. Статистическую обработку данных проводили с использованием критерия Краскела–Уоллиса с последующим тестом по Данну (ANOVA) или U-критерия Манна–Уитни. Данные представлены в виде  $m \pm s.d.$

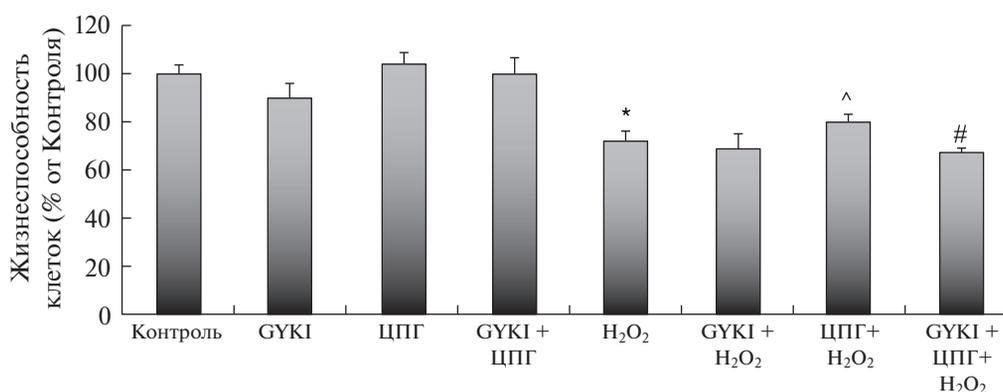
ЦПГ, растворенный в стерильной деионизованной воде в конечной концентрации  $10^{-6}$  М, вносили в культуру клеток за 24 ч до окислитель-

ного стресса. Все блокаторы вносили за 30 мин до ЦПГ через 24 ч после пассажа. При этом K252a в 0.2% ДМСО вносили в конечной концентрации 0.2 мкМ [19], DNQX, также растворенный в 0.2% ДМСО, вносили в конечной концентрации 20 мкМ [20], блокатор GYKI 52466, растворенный в воде, вносили в конечной концентрации 100 мкМ [21]. Схема эксперимента по группам представлена на рис. 1.

Внесение конкурентного антагониста АМРА-рецепторов DNQX, или ЦПГ, или обоих соединений в культуру гиппокампальных клеток НТ-22



**Рис. 2.** Конкурентный антагонист AMPA-рецепторов DNQX снимает нейропротекторное действие ЦПГ на модели окислительного стресса. \*—  $p < 0.05$  по сравнению с группой “Контроль”, ^—  $p < 0.05$  по сравнению с группой “H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>”, #—  $p < 0.05$  по сравнению с группой “ЦПГ+H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>” (с использованием критерия Краскела–Уоллиса с последующим тестом по Данну (ANOVA)). Данные представлены в виде  $m \pm s.d.$



**Рис. 3.** Неконкурентный антагонист AMPA-рецепторов GYKI 52466 снимает нейропротекторное действие ЦПГ на модели окислительного стресса. \*—  $p < 0.05$  по сравнению с группой “Контроль”, ^—  $p < 0.05$  по сравнению с группой “H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>”, #—  $p < 0.05$  по сравнению с группой “ЦПГ+H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>” (с использованием критерия Краскела–Уоллиса с последующим тестом по Данну (ANOVA)). Данные представлены в виде  $m \pm s.d.$

при отсутствии повреждающего агента не оказывало статистически значимого влияния на жизнеспособность нейронов (рис. 2). Внесение H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> снижало жизнеспособность клеток достоверно по сравнению с контролем. Внесение DNQX не влияло на повреждающий эффект перекиси водорода. ЦПГ достоверно восстанавливал жизнеспособность клеток, а его нейропротекторный эффект предотвращался внесением антагониста DNQX.

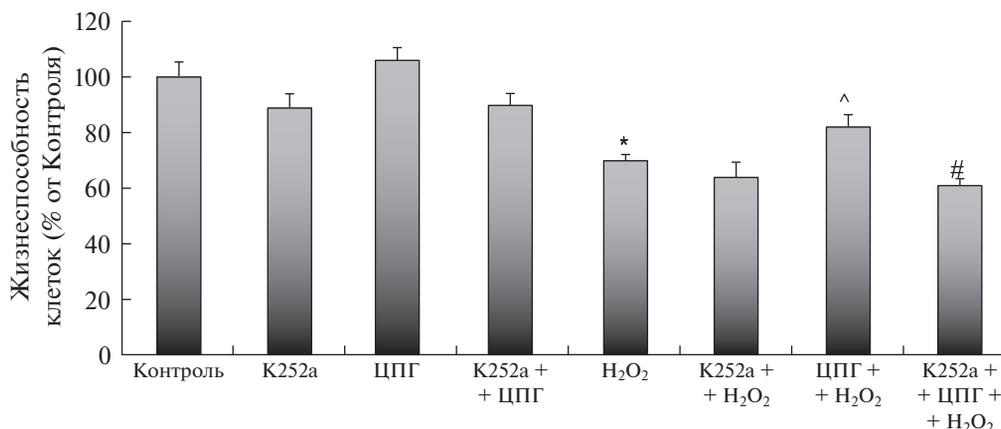
Аналогично, внесение неконкурентного антагониста AMPA-рецепторов GYKI 52466, ЦПГ или обоих соединений в культуру клеток HT-22 без повреждения не приводило к изменению жизнеспособности нейронов (рис. 3). Внесение GYKI 52466 не влияло на повреждающий эффект перекиси водорода. ЦПГ достоверно повышал жизнеспособность клеток в присутствии перекиси во-

дорода, чего не наблюдалось в случае предварительного внесения неконкурентного антагониста GYKI 52466.

Таким образом, можно полагать, что AMPA-рецепторы включены в механизмы нейропротекторной активности ЦПГ.

Блокатор Trk-рецепторов K-252a и ЦПГ по отдельности или вместе не приводили к изменениям жизнеспособности в культуре клеток HT-22 (рис. 4). Соединение K252a не изменяло характера действия перекиси водорода. ЦПГ достоверно восстанавливал жизнеспособность клеток, что полностью снималось предварительным внесением K252a.

Полученные данные свидетельствуют в пользу участия BDNF/TrkB сигналинга в нейропротекторной активности ЦПГ.



**Рис. 4.** Блокатор Trk-рецепторов K252a снимает нейропротекторное действие ЦПГ на модели окислительного стресса. \*—  $p < 0.05$  по сравнению с группой “Контроль”, ^—  $p < 0.05$  по сравнению с группой “H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>”, #—  $p < 0.05$  по сравнению с группой “ЦПГ+H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>” (с использованием критерия Манна–Уитни).

Данные представлены в виде  $m \pm s.d.$

Совокупность полученных результатов позволяет сделать заключение об участии опосредованного AMPA-рецепторами TrkB-зависимого сигналинга в нейропротекторном действии ЦПГ, который, вероятно, является эндогенным модулятором AMPA-рецепторов.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Gudasheva T.A., Ostrovskaya R.U., Maksimova F.V., et al. Proline-based topologic pyracetam analogs and their nootropic activity // *Pharm. Chem. J.* 1989. V. 23. P. 203–208.
- Gudasheva T.A., Boyko S.S., Akparov V.Kh., et al. Identification of a novel endogenous memory facilitating cyclic dipeptide cyclo-propylglycine in rat brain // *FEBS Letters.* 1996. V. 391. P. 149–152.
- Kang D., Waldvogel H.J., Wang A., et al. The autocrine regulation of insulin-like growth factor-1 in human brain of Alzheimer’s disease // *Psychoneuroendocrinology.* 2021 V. 127. P. 105191.
- Gudasheva T.A., Konstantinopol’skii M.A., Ostrovskaya R.U., et al. Anxiolytic activity of endogenous nootropic dipeptide cyclopropylglycine in elevated plus-maze test // *Bulletin of experimental biology and medicine.* 2001. V. 131. № 5. P. 464–466.
- Колясникова К.Н., Григорьевич О.С., Аляева А.Г., Гудашева Т.А. Изучение вовлеченности TrkB-рецепторов в антигипоксическое действие нейропептида цикло-пролилглицина // *Вопросы биологической, медицинской и фармацевтической химии.* 2022. Т. 25. № 1. С. 39–42.
- Gudasheva T.A., Grigoriev V.V., Koliashnikova K.N., et al. Neuropeptide cyclopropylglycine is an endogenous positive modulator of AMPA receptors // *Doklady Biochemistry and Biophysics.* 2016. V. 471. № 1. P. 387–389.
- Lauteborn J.C., Lynch G., Vanderklisch P., et al. Positive Modulation of AMPA Receptors Increases Neurotrophin Expression by Hippocampal and Cortical Neurons // *Journal of Neuroscience.* 2000. V. 20. № 1. P. 8–21.
- Jourdi H., Hsu Y.-T., Zhou M., et al. Positive AMPA Receptor Modulation Rapidly Stimulates BDNF Release and Increases Dendritic mRNA Translation // *Journal of Neuroscience.* 2009. V. 29. № 27. P. 8688–8697.
- Gudasheva T.A., Koliashnikova K.N., Antipova T.A., Sereidenin S.B. Neuropeptide cyclopropylglycine increases the levels of brain-derived neurotrophic factor in neuronal cells // *Doklady Biochemistry and Biophysics.* 2016. V. 469, № 1. P. 273–276.
- Ferro J.N., de Aquino F.L., de Brito R.G., et al. Cyclo-Gly-Pro, a cyclic dipeptide, attenuates nociceptive behaviour and inflammatory response in mice // *Clin Exp Pharmacol Physiol.* 2015. V. 42. № 12. P. 1287–1295.
- Schmidt H.D., Duman R.S. Peripheral BDNF Produces Antidepressant-Like Effects in Cellular and Behavioral Models // *Neuropsychopharmacology.* 2010. V. 35. P. 2378–2391.
- Bathina S., Das U.N. Brain-derived neurotrophic factor and its clinical implications // *Archives of Medical Science.* 2015. V. 11. № 6. P. 1164–1178.
- Gudasheva T.A., Povarnina P.Y., Koliashnikova K.N., et al. The Anxiolytic Effect of the Neuropeptide Cyclopropylglycine Is Mediated by AMPA and TrkB Receptors // *Doklady Biochemistry and Biophysics.* 2020 V. 493. № 1. P. 190–192.
- Sheardown M.J., Nielsen E.O., Hansen A.J., et al. 2,3-Dihydroxy-6-nitro-7-sulfamoyl-benzo(F)quinoxaline: a neuroprotectant for cerebral ischemia // *Science.* 1990. V. 247. № 4942. P. 571–574.
- Birch P.J., Grossman C.J., Hayes A.G. 6,7-Dinitro-quinoxaline-2,3-dione and 6-nitro,7-cyano-quinoxaline-2,3-dione antagonise responses to NMDA in the rat spinal cord via an action at the strychnine-insensitive gly-

- cine receptor // *European Journal of Pharmacology*. 1988. V. 156. № 1. P. 177–180.
16. *Sólyom S., Tarnawa I.* Non-competitive AMPA antagonists of 2,3-benzodiazepine type // *Current Pharmaceutical Design*. 2002. V. 8. № 10. P. 913–939.
  17. *Jackson G.R., Werrbach-Perez K., Ezell E.L., Post J.F., Perez-Polo J.R.* Nerve growth factor effects on pyridine nucleotides after oxidant injury of rat pheochromocytoma cells // *Brain Research*. 1992. V. 592. № 1–2. P. 239–248.
  18. *Ueda Y., Walsh E., Nakanishi H., Yoshida K.* A colorimetric assay method for the evaluation of neurotrophic activity in vitro // *Neuroscience Letters*. 1994. V. 165. P. 203–207.
  19. *Chang J.H., Mellon E., Schanen N.C., Twiss J.L.* Persistent TrkA Activity Is Necessary to Maintain Transcription in Neuronally Differentiated PC12 Cells // *Journal of Biological Chemistry*. 2003. V. 278. № 44. P. 42877–42885.
  20. *Lee S.-H., Govindaiah G., Cox C.L.* Selective excitatory actions of DNQX and CNQX in rat thalamic neurons // *Journal of Neurophysiology*. 2010. V. 103. № 4. P. 1728–1734.
  21. *Mathiesen C., Varming T., Jensen L.H.* *In vivo* and *in vitro* evaluation of AMPA receptor antagonists in rat hippocampal neurones and cultured mouse cortical neurones // *European Journal of Pharmacology*. 1998. V. 353. № 2–3. P. 159–167.

## NEUROPROTECTIVE EFFECT OF CYCLOPROLYLGLYCINE NEUROPEPTIDE DEPENDS ON AMPA- AND TRKB-RECEPTOR ACTIVATION

**Corresponding Member of the RAS T. A. Gudasheva<sup>a, #</sup>, K. N. Koliashnikova<sup>a</sup>, A. G. Alyaeva<sup>a</sup>, S. V. Nikolaev<sup>a</sup>, T. A. Antipova<sup>a</sup>, and Academician of the RAS S. B. Seredenin<sup>a</sup>**

<sup>a</sup> *V. V. Zakusov Research Institute of Pharmacology, Moscow, Russian Federation*

<sup>#</sup> *e-mail: tata-sosnovka@mail.ru*

Previously, we have shown that the endogenous neuropeptide cycloprolylglycine (CPG) is the positive modulator of AMPA receptors, and we have revealed the dependence of its anxiolytic and antihypoxic action on BDNF/Trk signaling. In the present work we conducted for the first time *in vitro* experiments using AMPA receptor blockers: DNQX and GYKI 52466, and Trk receptor blocker K252A, that revealed the neuroprotective effect of CPG depends on the activation of both AMPA and Trk receptors.

*Keywords:* cycloprolylglycine, neuroprotective activity, brain-derived neurotrophic factor (BDNF), AMPA

УДК 599.426: 577.112.3: 574.24

## ОЦЕНКА СЕЗОННОЙ ИЗМЕНЧИВОСТИ СПЕКТРА СВОБОДНЫХ АМИНОКИСЛОТ ПЛАЗМЫ КРОВИ БОРЕАЛЬНОГО ВИДА ФАУНЫ РУКОКРЫЛЫХ УРАЛА – ПРУДОВОЙ НОЧНИЦЫ *Myotis dasycneme* (VOIE, 1825)

© 2022 г. Л. А. Ковальчук<sup>1,\*</sup>, В. А. Мищенко<sup>1,2</sup>, Л. В. Черная<sup>1</sup>,  
В. П. Снитыко<sup>3</sup>, академик РАН В. Н. Большаков<sup>1</sup>

Поступило 14.07.2022 г.  
После доработки 06.08.2022 г.  
Принято к публикации 10.08.2022 г.

Впервые представлен сравнительный анализ содержания свободных аминокислот в плазме крови у представителя рукокрылых фауны Урала *Myotis dasycneme* (Voie, 1825) в сезонные периоды их годового жизненного цикла. В плазме крови прудовой ночницы отмечен полный спектр незаменимых аминокислот: треонин, валин, лизин, лейцин, изолейцин, метионин, фенилаланин, аргинин, гистидин, триптофан. Значительная аккумуляция метаболически активного глюконопластического аланина в крови прудовых ночниц в осенний (в 2.5 раза) и зимний (в 2.2 раза) периоды свидетельствует о его роли низкотемпературного адаптогена.

*Ключевые слова:* прудовая ночница, свободные аминокислоты, сезонная изменчивость

DOI: 10.31857/S2686738922060154

Летучие мыши (Chiroptera) представляют исключительный интерес для исследователей в значительной степени как животные, обладающие стратегией выживания, связанной с их экологическими особенностями [1–5]. Среди них можно назвать у некоторых видов фауны России значительные сезонные перелеты. У других видов – длительные (несколько месяцев) зимовки в пределах летних территорий обитания. Авторами отмечена вариабельность параметров крови рукокрылых, вызванная изменениями физиологического состояния и экстремальными особенностями пространственного размещения населения оседлых летучих мышей, обусловленными их сезонным жизненным циклом [6, 7]. Проведены исследования с целью оценки сезонной изменчи-

вости аминокислотного спектра плазмы крови бореального зимующего вида фауны рукокрылых Урала прудовой ночницы (*Myotis dasycneme* Voie, 1825).

Прудовая ночница отловлена в области высокой численности рукокрылых и в местах размещения их колоний (летних и зимовочных) на Южном и Среднем Урале в период 2013–2015 гг. Животные отловлены паутинными сетями на территории Челябинской области в окрестностях озера Малое Миассово (55°10'04" с.ш., 60°21'08" в.д.), а на территории Свердловской области в окрестностях Смолинской пещеры (Каменский район) и в самой пещере (56°25'44" с.ш., 61°36'44" в.д.). Этот вид был выбран неслучайно. На Урале прудовые ночницы имеют широкое распространение: на территории Пермского края – это сравнительно редкий вид, в Челябинской, Курганской областях – обычный вид. На территории Свердловской области – это широкораспространенный вид, занесенный в Красную книгу Свердловской области как “уязвимый вид”, III категория [8]. Уязвимость прудовой ночницы заключается в больших скоплениях особей на зимовках в Уральских пещерах – так в Смолинской пещере в некоторые годы зимовало более 1500 животных, в Аракаевской – более 200 [9]. Большинство пещер с зимовками активно посещаются туристами, и без специально охраняемого статуса этих пещер в них может происходить

<sup>1</sup> Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт экологии растений и животных Уральского отделения Российской академии наук, Екатеринбург, Россия

<sup>2</sup> Екатеринбургский научно-исследовательский институт вирусных инфекций ФБУН ГНЦ ВБ “Вектор” Роспотребнадзора, Екатеринбург, Россия

<sup>3</sup> Южно-Уральский федеральный научный центр минералогии и геоэкологии Уральского отделения Российской академии наук, Ильменский государственный заповедник, Миасс, Россия

\*e-mail: kovalchuk@ipae.uran.ru

гибель животных из-за беспокойства во время спячки.

Исследования взрослых летучих мышей (*adultus*) без признаков заболеваний из природных популяций проведены летом (вторая декада июля – период воспроизводства популяции), осенью (третья декада сентября в период завершающей стадии подготовки к зимнему сезону), зимой (третья декада февраля в период продолжительного гипобиоза) и весной (первая декада апреля в завершающий период гипотермии и оцепенения). По данным зоологов, в спячку животные впадают в последней декаде сентября – начале октября, и первые пробуждения отмечены в третьей декаде апреля [9]. В период отлова среднесуточная температура воздуха на местности была в апреле от +3°C до +8°C, в июле +21°C...+23°C, в сентябре +5°C...+7°C. В феврале среднесуточная температура воздуха на местности была от –16°C до –20°C. Прудовая ночница зимует в глубине пещеры при температуре от 0°C до +2°C в условиях чрезвычайно высокой влажности: 90–100% [9].

Отлов и содержание животных ( $n = 65$ ), доставленных в лабораторию, осуществляли с соблюдением международных принципов Хельсинкской декларации о гуманном отношении к животным, используемых для экспериментальных и научных целей [10]. Физиологическое состояние животных оценивали по температуре тела (измеряли ректально датчиком электротермометра ТПЭМ-1) и по параметрам основного обмена (регистрировали по потреблению кислорода (мл/г час) с помощью газоанализатора МН-5130 (Россия)). Массу тела исследуемых животных определяли взвешиванием на электронных весах (Acculab PP-200d11) с точностью  $\pm 0.1$  г. Забор крови (400–800 мкл) осуществляли после декапитации животных в стерильные охлажденные вакуумные пробирки “BD Vacutainer” с ЭДТА (Великобритания). Плазму получали центрифугированием крови в рефрижераторной ультрацентрифуге К-23 D (Германия) в течение 15 мин при 3000 об/мин. Триглицериды определяли в плазме крови энзиматическим колориметрическим методом с использованием наборов фирмы “BioSystems” (Испания). Содержание свободных аминокислот (АК) определяли методом ионообменной хроматографии на анализаторе ААА-339М (Microtechna, Чехия). Выполнен анализ 946 аминокислотных проб.

Результаты обработаны с использованием пакета лицензионных прикладных программ “Statistica v. 10.0”. Метод главных компонент (РСА) реализован посредством статистической среды R (R 3.1.2, пакеты “Vegan” и “Ade4”) [11].

Фонд свободных аминокислот плазмы крови исследованных особей *M. dasycneme* представлен 22 АК и их дериватами. Отмечен полный спектр

незаменимых АК: треонин, валин, лизин, лейцин, изолейцин, метионин, фенилаланин, аргинин, гистидин, триптофан. Многомерный непараметрический анализ показал отсутствие значимых гендерных различий у рукокрылых по суммарной концентрации 14 свободных АК в сезонные периоды их годового жизненного цикла (табл. 1).

Фонд свободных АК в плазме крови самцов и самок снижается в ряду времен года: лето  $\geq$  осень  $\geq$  зима  $>$  весна ( $p = 0.0001$ ) (табл. 1). В аминокислотном спектре плазмы не обнаружены пролин и цитруллин. Триптофан (осень-зима) и аспарагин (осень-зима-весна) определены в следовых количествах в период продолжительной гибернации летучих мышей. Максимальные концентрации свободных АК:  $1420.5 \pm 143.4$  мкмоль/л в плазме крови наблюдались летом – в период размножения и активного набора массы тела ( $14.7 \pm 0.2$  г) рукокрылых. Осенью, в третьей декаде сентября при подготовке насекомоядных рукокрылых к продолжительной гибернации, продолжающейся более полугода, в их крови отмечено снижение уровня аминокислотного обмена на 23% (табл. 1).

При этом ректальная температура самцов прудовой ночницы повышается на 20% по сравнению с летним периодом, тогда как у самок она остается стабильной. В осенний период у животных показана повышенная интенсивность основного обмена ( $5.6 \pm 0.4$  мл/г час,  $p = 0.001$ ). Активация основного обмена в 1.6 раза по сравнению с летним периодом отмечена и у летучих мышей в состоянии гипобиоза зимой. В третьей декаде февраля в период длительного гипобиоза у животных наблюдается на 25%, а у весенних особей – на 33% падение массы тела относительно осенних животных ( $p = 0.0001$ ). В заключительный период гибернации, продолжающийся более шести месяцев (первая декада апреля), в крови весенних особей отмечено минимальное содержание фонда свободных АК:  $681.3 \pm 46.4$  мкмоль/л ( $p = 0.0002$ ). Ректальная температура у самок поддерживается на уровне показателей зимних животных  $26.5 \pm 2.8^\circ\text{C}$  ( $p = 0.52$ ), но у самцов в первой декаде апреля она снижается до  $15.5 \pm 0.8^\circ\text{C}$ .

Содержание в крови триглицеридов, ответственных за липидный обмен в зимний период торпора, возрастает у самок в 3 раза и у самцов в 1.7 раза ( $p = 0.04$ ) в сравнении с осенним периодом. Полученные данные подтверждают, что протяженные во времени экстремальные условия среды предполагают срочное вовлечение энергетической и пластической систем в процессы адаптации и аварийного регулирования, и участие в данных условиях АК играют решающую роль. Доминирующими аминокислотами в летний период у летучих мышей являются аланин, глутамин, глицин и сульфаминокислота таурин.

**Таблица 1.** Сезонная динамика аминокислот в плазме крови *M. dasycneme* (самцы+самки)

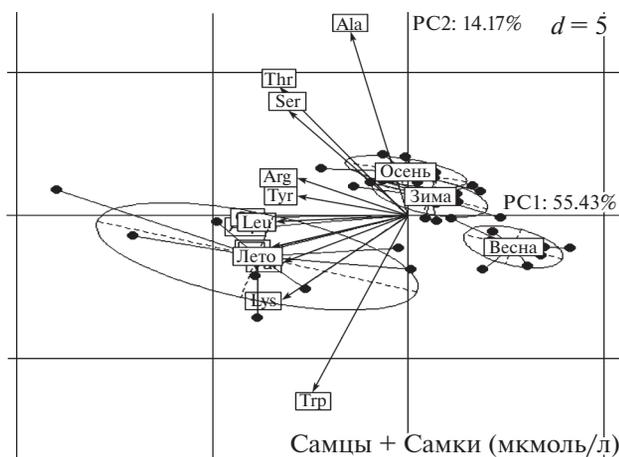
АК, %	I. Лето (n = 9)	II. Осень (n = 9)	III. Зима (n = 15)	IV. Весна (n = 10)	F <sub>obs</sub> p <sup>©</sup>
	$\bar{X}_{boot} \pm SE_{boot}$ [95% CI <sub>boot</sub> ]				
Taurine	8.0 ± 1.2 [5.9–10.3]	11.7 ± 2.2 [7.7–16.4]	9.5 ± 0.6 [8.4–10.8]	32.8 ± 3.1* <sup>▲</sup> [26.6–38.6]	35.5 0.0001
Aspartic acid	4.9 ± 0.4 [4.2–5.6]	3.6 ± 0.4 [2.8–4.4]	2.7 ± 0.3* [2.1–3.3]	2.7 ± 0.5* [1.8–3.7]	6.2 0.003
Threonine	4.7 ± 0.4 [3.9–5.5]	6.7 ± 0.4* [5.9–7.6]	5.7 ± 0.4 [5.1–6.5]	3.2 ± 0.5* <sup>¶</sup> [2.3–4.1]	10.2 0.0002
Serine	4.9 ± 1.0 [3.2–7.0]	6.6 ± 0.9 [5.2–8.5]	5.9 ± 0.5 [5.0–7.0]	3.5 ± 0.7* <sup>¶</sup> [2.3–4.8]	2.8 0.05
Glutamine	9.1 ± 0.5 [8.2–10.0]	6.9 ± 0.7* [5.7–8.2]	6.7 ± 0.3* [6.1–7.3]	8.2 ± 0.8 [6.7–9.8]	3.9 0.01
Alanine	9.8 ± 0.9 [8.1–11.6]	24.4 ± 1.5* [21.5–27.4]	20.7 ± 1.4* [18.2–23.4]	10.5 ± 1.3* <sup>¶</sup> [8.2–13.9]	25.3 0.0001
Valine	3.6 ± 0.6 [2.3–4.7]	2.3 ± 0.3 [1.8–2.8]	2.5 ± 0.2 [2.1–2.8]	3.6 ± 0.3* <sup>¶</sup> [2.9–4.2]	3.6 0.02
Isoleucine	1.6 ± 0.2 [1.3–2.0]	1.2 ± 0.1 [1.0–1.5]	0.9 ± 0.1* <sup>▲</sup> [0.7–1.0]	0.8 ± 0.1* <sup>▲</sup> [0.6–1.0]	9.3 0.0002
Leucine	2.5 ± 0.3 [1.9–3.2]	2.0 ± 0.2 [1.5–2.4]	2.5 ± 0.2 [2.2–2.9]	1.9 ± 0.2 [1.6–2.4]	2.1 0.13
Tyrosine	1.6 ± 0.2 [1.2–2.1]	1.2 ± 0.1 [1.0–1.4]	1.7 ± 0.1* <sup>▲</sup> [1.5–2.0]	1.0 ± 0.3 <sup>¶</sup> [0.5–1.6]	3.3 0.03
Tryptophan	2.3 ± 0.4 [2.5–4.1]	следы	следы	1.7 ± 0.3* [1.2–2.3]	40.3 0.0001
Lysine	5.6 ± 0.4 [4.7–6.4]	3.0 ± 0.3* [2.5–3.6]	4.7 ± 0.4* <sup>▲</sup> [4.1–5.5]	4.7 ± 0.4* <sup>▲</sup> [3.9–5.5]	6.3 0.002
Histidine	1.0 ± 0.3 [0.6–1.5]	0.9 ± 0.1 [0.7–1.1]	1.5 ± 0.1* <sup>▲</sup> [1.3–1.8]	1.1 ± 0.1 [0.9–1.4]	3.6 0.02
Arginine	2.4 ± 0.4 [1.6–3.4]	1.9 ± 0.3 [1.2–2.5]	2.5 ± 0.3 [2.0–3.1]	следы	13.2 0.0001
ГТАК, гликогенные АК	66.2 ± 1.5 [63.3–69.2]	75.1 ± 1.8* [71.3–78.5]	68.0 ± 1.1* <sup>▲</sup> [65.8–70.2]	46.4 ± 3.1* <sup>▲</sup> [40.6–52.8]	34.3 0.0001
Фонд АК, мкмоль/л	1420.5 ± 143.4 [1158.6–1720.6]	1098.3 ± 72.1 [963.6–1241.4]	914.1 ± 43.5* [829.7–1000.0]	681.3 ± 46.4* <sup>▲</sup> [586.9–767.6]	12.9 0.0001

\* – статистически значимые различия: I и II, I и III, I и IV ( $p < 0.05$ ); <sup>▲</sup> – статистически значимые различия: II и III, II и IV ( $p < 0.05$ ); <sup>¶</sup> – статистически значимые различия: III и IV ( $p < 0.05$ );  $\bar{X}_{boot} \pm SE_{boot}$  – среднее арифметическое и ошибка среднего бутстреп-распределения; [95% CI<sub>boot</sub>] – доверительный интервал бутстреп-распределения; <sup>©</sup> –  $p = \Pr(F_{ran} \geq F_{obs})$  – двухфакторный дисперсионный анализ с перестановочным тестом (рандомизация).

Их суммарный пул (571 мкмоль/л) составляет 40% от общего фонда свободных АК (табл. 1).

Осенью при подготовке летучих мышей к периоду гibernации отмечается значительная аккумуляция гликогенных АК (75.1% от фонда АК), связанных с межклеточным обменом белков, жиров и углеводов, и, соответственно, участвующих в механизмах низкотемпературной адаптации. Следует отметить в фонде АК прудовых ночниц

возрастание процентного содержания аланина осенью перед началом зимнего гипобиоза до 24.4% и в зимний период до 20.6%. Значительная аккумуляция метаболически активного гликопластического аланина в крови прудовой ночницы в осенний (в 2.5 раза) и зимний (в 2.2 раза) периоды активизирует скорость синтеза гликогена и глюкозы из других источников, что позволяет предполагать криопротекторную роль аминокис-



**Рис. 1.** Свободные аминокислоты плазмы крови (мкмоль/л) самцов и самок прудовой ночницы в разные сезоны (весна, лето, осень, зима) года в пространстве первых двух главных компонент. PC1, PC2 – оси главных компонент, % – процент дисперсии данных, объясненных главной компонентой; стрелки отражают корреляцию главных компонент 1 и 2 с исходными показателями (аминокислоты); эллипсы представляют собой 95% доверительные области.

лоты в условиях низкоположительных и околонулевых температур среды обитания. Весной при выходе животных из гипобиоза в плазме крови отмечали снижение в общем фонде свободных АК пула глюкогенных АК до 46.4%. Однако на фоне снижения общего фонда свободных АК в плазме крови прудовой ночницы в завершающий весенний период гибернации обращает на себя внимание статистически значимое 4-х кратное возрастание таурина – АК, обладающей антиоксидантными и мембраностабилизирующими свойствами ( $p = 0.0003$ ). Достаточно интенсивная аккумуляция сульфаминокислоты таурина весной существенно компенсирует снижение пулов таких АК, как аланин в 1.9 раза, валин в 2.3 раза, аспарат в 4.0 раза, треонин в 3.3 раза, глутамин в 2.2 раза, глицин в 4.9 раза ( $p = 0.001$ ). Серосодержащим АК и их дериватам принадлежит связующая роль в интеграции основных метаболических процессов, что связано не только с энергетическим обменом и участием в синтезе нуклеиновых кислот, коллагена и других белков, но и с обеспечением клеточного и гуморального иммунитета в предстоящий период активного летнего роста и развития в условиях сезонной акклимации. Результаты исследования показали, что у летучих мышей, находящихся в состоянии гибернации, практически отсутствуют половые различия по количественной структуре аминокислотного спектра, что, несомненно, указывает на единство обменных процессов самцов и самок, направленных на поддержание гомеостаза в условиях дли-

тельного воздействия низких положительных и околонулевых температур.

Анализ данных методом главных компонент (РСА) позволил визуализировать сезонную изменчивость аминокислотного спектра в плазме крови прудовой ночницы, подтверждая результаты представленного выше статистического анализа (рис. 1). Анализ сезонной динамики свободных АК (мкмоль/л) в плазме крови прудовой ночницы показал, что 55.43% общей дисперсии приходится на первую главную компоненту PC1 и 14.17% – на вторую PC2. По первой главной компоненте показана сезонная вариабельность содержания АК плазмы крови летучих мышей и их дифференциация на три сезонных группы животных: летняя, осенняя+зимняя и весенняя. Выявлены высокие коэффициенты корреляции с PC1 и значимый вклад в компоненту восьми АК: глицина (10.47%), изолейцина (10.34%), аспарагиновой кислоты (10.21%), глутамина (9.53%), лейцина (8.91%), треонина (8.33%), лизина (8.18%), валина (8.07%). Вторая главная компонента PC2, с которой коррелируют аланин (0.76), триптофан (–0.74), треонин (0.53), сформировала три сезонные группы: весенняя, летняя, осенняя+зимняя. Значимый вклад в компоненту отмечен для аланина (31.68%), триптофана (29.33%), треонина (15.40%) при достаточно высоких коэффициентах корреляции с PC2 (рис. 1).

Таким образом, впервые представлен сравнительный анализ содержания свободных аминокислот в плазме крови у представителей рукокрылых фауны Урала *Myotis dasycneme* (Voie, 1825) в сезонные периоды их годового жизненного цикла. Результаты исследований подтверждают регуляторную роль свободных аминокислот в формировании адаптивной стратегии, обеспечивающей устойчивость популяционного гомеостаза прудовой ночницы в условиях перманентно меняющегося температурного режима сравнительно короткого уральского лета и продолжительной холодной зимы.

#### ИСТОЧНИК ФИНАНСИРОВАНИЯ

Работа выполнена при финансовой поддержке Министерства образования и науки РФ в рамках государственного задания Института экологии растений и животных УрО РАН (№ 122021000091-2).

#### СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Отлов и содержание животных в лаборатории осуществляли с соблюдением международных принципов Хельсинкской декларации о гуманном отношении к животным, используемых для экспериментальных и научных целей [10].

### КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы не имеют конфликта интересов.

### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Voigt C.C., Kingston T. (eds) Bats in the Anthropocene: Conservation of bats in a Changing World. Springer International Publishing, 2016.
2. Zukal J., Pikula J., Bandouchova H. Bats as bioindicators of heavy metal pollution: history and prospect // Mammalian Biology. 2015. V. 80 (3). P. 220–227.
3. Russo D., Ancillotto L. Sensitivity of bats to urbanization: a review // Mammalian Biology. 2015. V. 80 (3). P. 205–212.
4. Breed A.C., Field H.E., Smith C.S., et al. Bats Without Borders: Long-Distance Movements and Implications for Disease Risk Management // EcoHealth. 2010. V. 7. P. 204–212.
5. Первушина Е.М., Замшина Г.А., Николаева Н.В., и др. Трофические связи насекомоядных рукокрылых на юге Среднего Урала // Вестник Удмуртского университета. Серия биология. Науки о Земле. 2011. № 3. С. 65–74.
6. Kovalchuk L., Mishchenko V., Chernaya L., et al. Haematological parameters of pond bats (*Myotis dasycneme* Boie, 1825, Chiroptera: Vespertilionidae) in the Ural Mountains // Zoology and Ecology. 2017. V. 27. № 2. P. 168–175.
7. Ковальчук Л.А., Мищенко В.А., Черная Л.В., и др. Особенности иммуногематологических параметров перелетного (*Vespertilio murinus* Linnaeus, 1758) и оседлого (*Myotis dasycneme* Boie, 1825) видов рукокрылых фауны Урала // Доклады РАН. Науки о жизни. 2021. Т. 501. № 6. С. 543–546.
8. Красная книга Свердловской области: животные, растения, грибы / отв. ред. Н.С. Корытин. Екатеринбург: ООО Мир, 2018.
9. Большаков В.Н., Орлов О.Л., Снитко В.П. Летучие мыши Урала. Екатеринбург, 2005.
10. Yarri D. The Ethics of Animal Experimentation. Oxford: Oxford University Press. 2005.
11. Chessel D., Dufour A.B., Thioulouse J. The age4 package-I: One-table methods / R News. 2004. № 4. P. 5–10.

## ASSESSMENT OF SEASONAL VARIABILITY OF THE SPECTRUM OF FREE AMINO ACIDS IN THE BLOOD PLASMA OF THE BOREAL BAT SPECIES (*MYOTIS DASYCNE ME* BOIE, 1825) OF THE URAL FAUNA

L. A. Kovalchuk<sup>a,#</sup>, V. A. Mishchenko<sup>a,b</sup>, L. V. Chernaya<sup>a</sup>, V. P. Snit'ko<sup>c</sup>,  
and Academician of the RAS V. N. Bolshakov<sup>a</sup>

<sup>a</sup> Federal State Budgetary Institution of Science Institute of Plant and Animal Ecology of the Ural Branch of the Russian Academy of Sciences, Yekaterinburg, Russian Federation

<sup>b</sup> Yekaterinburg Research Institute of Viral Infections of the SSC VB "Vector" Rosпотребнадзор, Yekaterinburg, Russian Federation

<sup>c</sup> South Ural Federal Scientific Centre of Mineralogy and Environmental Geology, Ural Branch of the Russian Academy of Sciences, Ilmen Reserve, Miass, Russian Federation

<sup>#</sup>e-mail: kovalchuk@ipae.uran.ru

For the first time, a comparative analysis of the content of free amino acids in the blood plasma of a representative of the bat fauna of the Urals, *Myotis dasycneme* (Boie, 1825), in seasonal periods of their annual life cycle are presented. The blood plasma of the pond bats contains a full spectrum of essential amino acids: threonine, valine, lysine, leucine, isoleucine, methionine, phenylalanine, arginine, histidine, tryptophan. A significant accumulation of metabolically active glucoplastic alanine in the blood of *M. dasycneme* in the autumn (2.5 times) and winter (2.2 times) periods indicates its role as a low-temperature adaptogen.

**Keywords:** pond bats, free amino acids, seasonal variability

УДК 612.821

## ЗАВИСИМОСТЬ ОБУЧЕНИЯ УПРАВЛЕНИЮ МОЗГ-КОМПЬЮТЕРНЫМ ИНТЕРФЕЙСОМ ОТ ЛИЧНОСТНЫХ ХАРАКТЕРИСТИК

© 2022 г. Е. В. Боброва<sup>1</sup>, В. В. Решетникова<sup>1</sup>, Е. А. Вершинина<sup>1</sup>, А. А. Гришин<sup>1,\*</sup>, М. Р. Исаев<sup>2,3</sup>, П. Д. Бобров<sup>2,3</sup>, член-корреспондент РАН Ю. П. Герасименко<sup>1</sup>

Поступило 17.05.2022 г.

После доработки 11.08.2022 г.

Принято к публикации 11.08.2022 г.

Личностные характеристики (ЛХ) являются предикторами успешности управления интерфейсами “мозг-компьютер” (ИМК), однако неизвестно, как ЛХ, оптимальные для управления ИМК, изменяются при обучении. В работе впервые проведен анализ связей ЛХ и точности классификации состояний мозга (ТК) при воображении движений кистей, стоп и локомоции при 10-дневном обучении 10 волонтеров управлению ИМК. В первые три дня обучения ТК выше у более напряженных и тревожных волонтеров, в последние дни – у более спокойных. В середине периода обучения ТК выше при низкой демонстративности, в большей степени при воображении движений стоп. Корреляции низкой демонстративности, а также предусмотрительности и самоконтроля с ТК при воображении движений стоп выявлены значимо чаще, чем при воображении кистей и локомоции. Практически во всем периоде обучения ТК при воображении локомоции выше у индивидуалистов. Результаты дают возможность предложить индивидуально-ориентированные рекомендации по использованию для реабилитации пациентов с двигательными нарушениями ИМК, основанном на воображении движений.

*Ключевые слова:* мозг-компьютерные интерфейсы, личностные характеристики, обучение воображению движений, воображение раскрытия кисти, воображение сгибания стопы, воображение локомоции

**DOI:** 10.31857/S268673892206004X

### ВВЕДЕНИЕ

Известно, что ЛХ пользователя могут быть предикторами успешности управления ИМК, и около 30% людей не могут управлять ИМК [1]. В различных исследованиях выявлены такие предикторы, как способность к концентрации внимания [2], способность к кинестетическому воображению движений [3], уровень напряженности, уверенность в себе, мечтательность, способность к ментальному вращению фигур [4], пространственные способности, зрительно-пространственная память, независимость мышления [5], ясность зрительного воображения [5, 6], эмоциональная стабильность, аккуратность [6], настрое-

ние и мотивация [4, 7], убеждение в способности контролировать технологии [8], терпеливость и настойчивость [9], параметры ЭЭГ [10–12], возраст [6]. В наших экспериментах выявлена зависимость предикторов от того, осуществляется воображение движений правой или левой руки [13–15], а также от скрытой леворукости [14]. Отсутствие способности к управлению ИМК может быть особенно важно при использовании ИМК в нейрореабилитации, когда использование этой методики для пациента, проявившего неспособность работать с ИМК, может быть приостановлено. Вместе с тем можно предположить, что разным людям требуется разное время для освоения работы с ИМК. В литературе, однако, нет сведений о том, как связь ЛХ с успешностью управления ИМК меняется в ходе обучения, а также как это зависит от типа воображаемого движения. В данной работе проводится анализ динамики обучения управлению ИМК при воображении нескольких типов движений (кистей, стоп или локомоции) и изучаются связи ЛХ с ТК при управлении ИМК в ходе обучения.

<sup>1</sup> ФГБУН Институт физиологии Российской академии наук им. И.П. Павлова, Санкт-Петербург, Россия

<sup>2</sup> ФГБУН Институт высшей нервной деятельности и нейрофизиологии Российской академии наук, Москва, Россия

<sup>3</sup> Институт трансляционной медицины ГБОУ ВПО Российского национального исследовательского медицинского университета им. Н.И. Пирогова, Москва, Россия

\*e-mail: agrishin@infran.ru

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В экспериментах принимали участие 10 здоровых волонтеров (5 мужчин и 5 женщин) в возрасте 21–35 лет. Каждый волонтер участвовал в 10 сессиях, по одной в день. В каждой сессии было три сеанса управления ИМК, основанном на кинестетическом воображении движений: 1) раскрытие правой или левой кисти, 2) тыльное сгибание правой или левой стопы, 3) локомоция, начинающаяся с правой или левой ноги.

На экране монитора в случайном порядке возникали команды испытуемому – треугольники, направленные вправо, влево или вверх, согласно которым испытуемые должны были, соответственно, воображать движения или пребывать в состоянии покоя. Первые 117 с происходило обучение классификатора для распознавания ЭЭГ при этих трех командах. После обучения классификатора испытуемый получал обратную связь в виде зеленого круга в центре монитора, радиус которого увеличивался при успешном воображении движения, а при неуспешном – уменьшался. Длительность одного сеанса (включая обучение классификатора) составляла 390 с.

ЭЭГ регистрировалась 32-канальным энцефалографом SmartBCI. Для выделения из сигнала ЭЭГ значимых для классификации признаков применялся метод Common Spatial Patterns [16]. Полученные признаки использовались для обучения и тестирования с помощью квадратичного дискриминантного анализа. ТК, характеризующая успешность управления ИМК, оценивалась при помощи средней вероятности правильного распознавания [17].

Все испытуемые однократно проходили тестирование по тесту Айзенка на темперамент, 16-факторному личностному опроснику Кеттелла, тесту Спилбергера-Ханина на определение личностной и ситуативной тревожности и 5-факторному опроснику личности, т.н. “большая пятерка” (БП).

Статистический анализ включал определение значимости корреляционных связей между численными оценками каждой ЛХ и величинами ТК, полученными в каждой из 10 экспериментальных сессий. Для описания особенностей ЛХ, выявивших значимые связи с ТК, введено понятие частоты встречаемости ЛХ, оценивающее степень ее связи с ТК, – число случаев на протяжении всех 10 сессий, когда имеет место значимая корреляция данной ЛХ с ТК. Частоты встречаемости оценивали для каждого из условий воображения движения (кистей, стоп или локомоции). Оценку значимости различий между частотами встречаемости данной ЛХ в зависимости от условия воображения движения проводили, используя сравнение частот по критерию Хи-квадрат. Расчеты

проводились с использованием программного комплекса SPSS Inc.

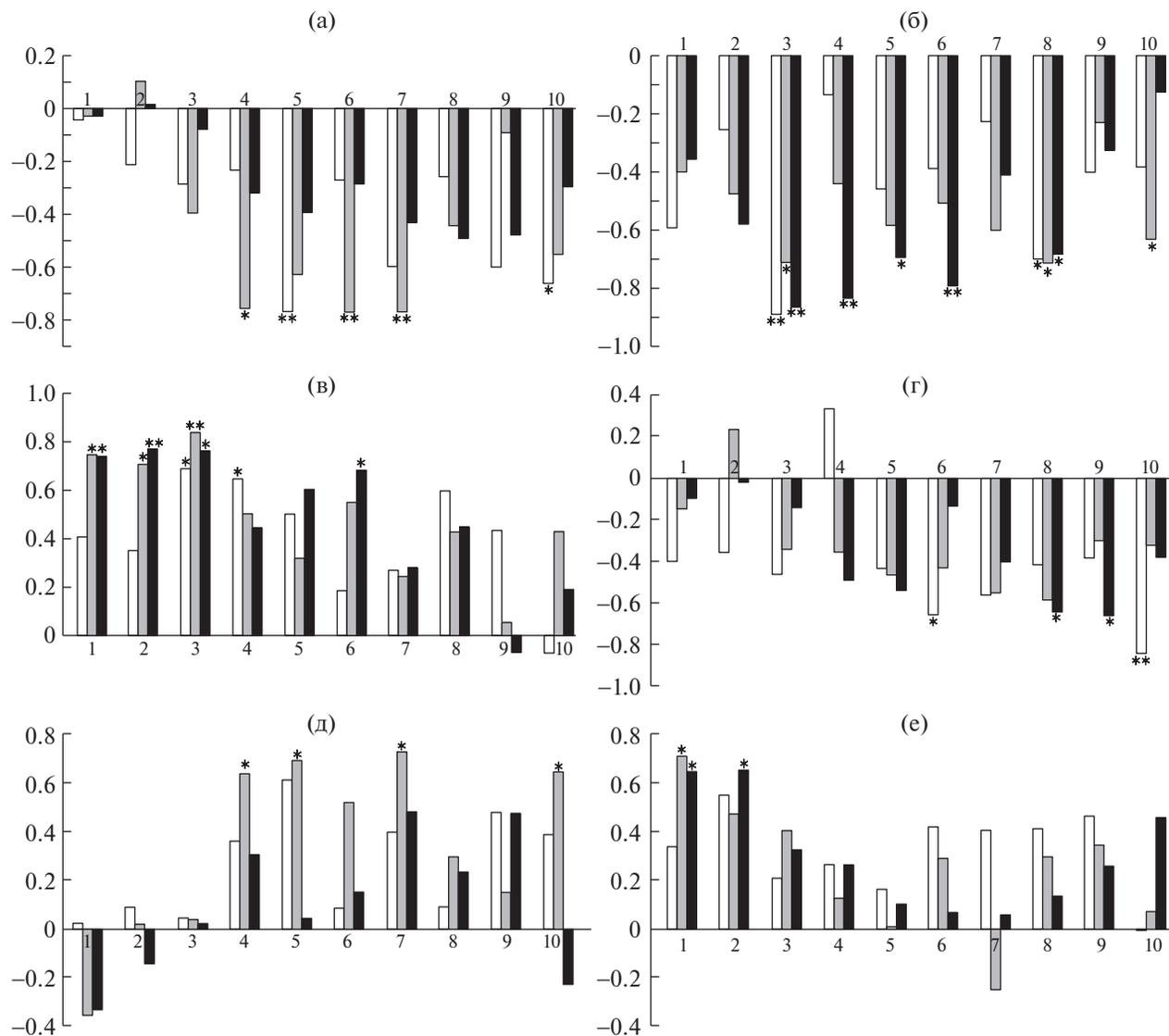
## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Результаты анализа ЭЭГ показали, что при воображении движений кистей и стоп ТК меняется на протяжении периода обучения, значительно увеличиваясь к 3-му дню обучения. От 3-го к 5-му дню ТК при воображении движений кистей значительно уменьшается и вновь увеличивается к 8-му дню. Колебания ТК для стоп не так очевидны, однако в 4-й и 10-й день она значительно меньше, чем в 5-й и 7-й день, а в 6-й – чем в 7-й. При воображении локомоции значимых изменений ТК не выявлено.

Анализ корреляционных связей ТК и ЛХ выявил значимые связи, отличающиеся в зависимости от дня обучения и от типа воображаемого движения. ЛХ, выявившие значимые связи с ТК, были сгруппированы в 7 основных групп, связь ТК и ЛХ для этих групп иллюстрируется рядом примеров на рис. 1.

Группа 1. Низкая демонстративность. К этой группе отнесены следующие факторы, отрицательно коррелирующие с ТК (здесь и ниже в скобках указана частота встречаемости данного фактора по всем экспериментальным условиям, т.е. во все дни и для всех типов воображаемых движений, знак коэффициента корреляции (+ или –) и, после запятой через дефис, отдельно для условий воображения движений кистей, стоп и локомоции соответственно): любознательность (10–, 4–5–1), артистичность (8–, 3–6–1), любопытство (7–, 2–5–0), экспрессивность БП (6–, 2–4–0, рис. 1 а), доминирование (4–, 1–3–0), общительность БП (3–, 0–3–0), привлечение внимания (2, 1–1–0). Общая частота встречаемости факторов этой группы 42, она максимальна для стоп (27), меньше для кистей (13) и локомоции (2). Сравнение частот по критерию Хи-квадрат показало, что все три частоты (стоп, кистей и локомоции) в совокупности значительно отличаются друг от друга ( $p < 0.01$ ), при этом корреляции при воображении движений стоп выявлены значительно чаще, чем кистей ( $p = 0.027$ ) и локомоции ( $p < 0.001$ ), для кистей чаще, чем для локомоции ( $p = 0.005$ ). Для стоп больше всего значимых корреляций факторов этой группы с ТК в 4–7 и в 10 сессии, для кистей в 5 сессии.

Группа 2. Индивидуализм (замкнутость, отстраненность, эмоциональная холодность). К этой группе отнесены следующие факторы, отрицательно коррелирующие с ТК: привязанность (9–, 2–3–4, рис. 1 б), сотрудничество (8–, 1–2–5), теплота (7–, 3–1–3), уважение других (7–, 2–2–3), понимание (7–, 1–4–2), ответственность (3–, 1–1–1), пластичность (2–, 1–1–0). Общая



**Рис. 1.** Коэффициенты корреляции личностных характеристик (а – экспрессивности, б – привязанности, в – напряженности, г – тревожности, д – самоконтроля поведения, е – экстраверсии) и точности классификации сигналов мозга при воображении движений кистей (белый), стоп (серый) и локомоции (черный) с 1-го по 10-й дни обучения управлению ИМК. \* – значимость  $p < 0.05$ , \*\* – значимость  $p < 0.01$ .

частота встречаемости этих факторов 43, она максимальна для локомоции (18), меньше для стоп (14) и кистей (11). Для кистей и стоп больше этих признаков в 3 и 8 дни обучения (что соответствует дням с увеличенной ТК), для локомоции более равномерно.

**Группа 3. Напряженность и тревожность.** К этой группе отнесены следующие факторы, как положительно, так и отрицательно коррелирующие с ТК: напряженность (9+, 2–3–4, рис. 1 в), тревожность (5–, 2–1–2, рис. 1 г), высокая тревожность (3+–, 2–1–0), нейротизм (2+, 1–1–0), эмоциональная неустойчивость (2 +–, 2–1–0), эмоциональная стабильность (2–, 0–1–1), эмоциональная лабильность (1–, 1–0–0), ситуатив-

ная тревожность (1+, 0–0–1). Общая частота встречаемости этих факторов 25, для кистей, стоп и локомоции 9, 8 и 8 соответственно. В первые 4 дня эксперимента значимые корреляции свидетельствуют о большой напряженности и тревожности у более успешных пользователей (14+, 5–6–3), а в последние 3 дня – о меньшей тревожности у более успешных пользователей (8–, 4–1–2). Это означает, что первые 4 дня эксперимента ТК выше у напряженных субъектов, в последние 3 дня – у более спокойных.

**Группа 4. Предусмотрительность и самоконтроль.** К этой группе отнесены следующие факторы, положительно коррелирующие с ТК: предусмотрительность (7+, 3–3–1), самоконтроль по-

ведения (4+, 0–4–0, рис. 1 д), самоконтроль (1+, 0–1–0), аккуратность (1+, 0–1–0). Общая частота встречаемости этих факторов 13; для кистей, стоп и локомоции 3, 9 и 1 соответственно. Сравнение частот по критерию Хи-квадрат показало, что все три частоты в совокупности отличаются друг от друга ( $p = 0.018$ ), при этом корреляции при воображении движений стоп выявлены значимо чаще, чем локомоции ( $p = 0.01$ ) и кистей (тенденция  $p = 0.083$ ), для кистей и локомоции значимых отличий не выявлено.

Группа 5. Экстраверсия и активность. К этой группе отнесены следующие факторы, положительно коррелирующие с ТК: экстраверсия (3+, 0–1–2, рис. 1 е), экспрессивность К (2+, 1–0–1), смелость (2+, 0–1–1), активность (2+, 0–1–1), общительность (1+, 1–0–0). Общая частота встречаемости этих факторов 10; для кистей, стоп и локомоции 2, 3 и 5 соответственно.

Группа 6. Доверчивость. К этой группе отнесены следующие факторы, как положительно, так и отрицательно коррелирующие с ТК: доверчивость (3+, 3–0–0), неконформизм (3–, 1–1–1), подозрительность (2–, 0–0–2). Общая частота встречаемости этих факторов 8; для кистей, стоп и локомоции 4, 1 и 3 соответственно.

Группа 7. Склонность к логическому мышлению. К этой группе отнесены следующие факторы: высокий интеллект (2+, 2–0–0), мечтательность, т.е. склонность к абстрагированию в противовес конкретности, *abstractedness* (2+–, 1–0–1). Корреляции с точностью классификации с разным знаком: при воображении движений кистей эти корреляции положительные, а локомоции – отрицательные. Общая частота встречаемости факторов этой группы 4; для кистей, стоп и локомоции 3, 0 и 1 соответственно.

Результаты показывают, что для каждого экспериментального дня и типа воображаемого движения характерен свой набор ЛХ, являющихся предикторами успешности воображения соответствующего движения. Иначе говоря, предикторы успешности управления ИМК изменяются в процессе обучения, эти изменения зависят от того, какое движение воображается. Вследствие относительно небольшого размера группы испытуемых и большого разброса данных, получение значимых корреляций говорит в пользу их надежности, для 29 значимых корреляций  $p < 0.001$ , для остальных 116 –  $p < 0.05$ . Процесс обучения управлению ИМК со зрительной обратной связью может быть описан так:

1) В 1-й день обучения разжимание кистей успешнее воображают абстрактно-мыслящие холодные конформные субъекты с высоким интеллектом, а движения нижних конечностей напряженные и не склонные к сотрудничеству экстраверты.

2) На 2-й день обучения разжимание кистей успешнее воображают доверчивые люди, а для стоп и локомоции сохраняются приблизительно те же индивидуальные особенности, что и в 1-й день, которые дополняются конформностью.

3) На 3-й день (когда имеет место значимое увеличение ТК при воображении движений и кистей, и стоп) факторы напряженности и индивидуализма становятся важны не только для воображения локомоции и движений стоп, но и кистей. Количество значимых корреляций с факторами группы 2 (Индивидуализм) в этот день увеличено и высоко значимо (восемь ЛХ коррелируют с ТК, по сравнению с двумя и тремя в первые два дня). Кроме того, для воображения стоп становятся важны предусмотрительность (группа 4) и низкая артистичность (группа 1).

4) В следующие 4 дня обучения, с 4-го по 7-й день, успешность ТК при воображении движений стоп определяют факторы группы 4 и, в особенности, группы 1. Частота встречаемости этих факторов максимальна в 7-й день обучения, и в этот день также наблюдается значимое увеличение ТК при воображении движений стоп. Это, по-видимому, означает, что различимость сигналов мозга при воображении движений стоп в 7-й день обучения увеличена благодаря субъектам с низкой демонстративностью и высоким самоконтролем. Для успешности воображения разжимания кистей роль факторов групп 1 и 4 существенно меньше, для локомоции – факторов группы 4 слабо выражена, а группы 1 не выявлена.

5) В 8-й день оптимально работают индивидуалисты, успешность воображения локомоции определяется еще и отрицательной тревожностью.

6) Последние дни обучения характеризуются отрицательными корреляционными связями ТК для всех типов воображаемых движений с тревожностью, т.е. успешнее работают более спокойные индивидуумы. В последний 10-й день только факторы этой группы (3 группа) коррелируют с успешностью воображения разжимания кистей.

Таким образом, динамика изменений ЛХ, оптимальных для управления ИМК, имеет свою специфику для воображения движений разных типов, однако есть и общие основные тенденции: 1) лучшие показатели ТК у более напряженных людей в первые дни обучения и у более спокойных – в конце обучения; 2) оптимальность управления ИМК при воображении кистей и, в особенности стоп (но не локомоции) людьми с низкой демонстративностью в середине 10-дневного периода обучения; 3) важность индивидуализма для успешности воображения локомоции практически во всем периоде обучения.

Полученные результаты об изменении успешности управления ИМК в зависимости от факторов напряженности и тревожности соответствуют данным о том, что тревожность ухудшает обучение движениям [18]. В наших экспериментах в первые дни обучения различимость сигналов мозга при воображении движений всех типов была больше у волонтеров с высокой напряженностью, при воображении движений стоп также с высокой тревожностью и эмоциональной неустойчивостью, однако в последние дни обучения более успешны в воображении движений были более спокойные люди. Можно предположить, задача обучения воображению движений, как и задача обучения реальным движениям сложнее для людей с высокой тревожностью, что отражается в меньшей разделимости сигналов мозга при анализе ЭЭГ для управления ИМК у таких людей на последнем этапе обучения. Сведения о важности низкой демонстративности поведения для обучения как реальным, так и воображаемым движениям кистей и стоп, а также индивидуализма для обучения локомоции, нами в литературе не обнаружено.

Применительно к практическому использованию ИМК в нейрореабилитации данные, по-видимому, могут свидетельствовать о том, что пациенты, неспособные к напряженной работе, нуждаются в большем количестве сеансов обучения, чем те, кто имеет такую способность (поскольку фактор напряженности, способствующий улучшению управления ИМК, согласно нашим данным, теряет свою важность после 3–4 дня обучения (рис. 1 в)), и что по мере обучения более спокойные пациенты будут более успешны в управлении ИМК. Следует учесть, однако, что результаты получены на группе из 10 здоровых волонтеров, и при увеличении выборки, возраста испытуемых, длительности обучения, могут иметь место изменения значимости тех или иных ЛХ в те или иные дни обучения. Тем не менее сам факт изменения ЛХ, оптимальных для управления ИМК, в ходе обучения, может быть использован при разработке индивидуально-ориентированных программ реабилитации движений.

#### КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

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

#### ИСТОЧНИК ФИНАНСИРОВАНИЯ

Исследование выполнено при финансовой поддержке Российского научного фонда в рамках научно-го проекта № 22-25-00624.

#### СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Все исследования были проведены в соответствии с Хельсинкской декларацией Всемирной медицинской ассоциации. Все лица, участвовавшие в исследовании, дали добровольное согласие на участие в исследовании.

Исследование одобрено Этической комиссией Института физиологии им. И.П. Павлова РАН.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Jeunet C., N'Kaoua B., Subramanian S., et al.* Predicting mental imagery-based BCI performance from personality, cognitive profile and neurophysiological patterns // *PloS one*. 2015. V. 10. № 12. P. e0143962.
2. *Hammer E.M., Kaufmann T., Kleih S.C., et al.* Visuomotor coordination ability predicts performance with brain-computer interfaces controlled by modulation of sensorimotor rhythms (SMR) // *Front. Hum. Neurosci.* 2014. V. 8. P. 574.
3. *Vuckovic A., Osuagwu B.A.* Using a motor imagery questionnaire to estimate the performance of a Brain-Computer Interface based on object-oriented motor imagery // *Clin. Neurophysiol.* 2013. V. 124. № 8. P. 1586–1595.
4. *Kubler A., Nijboer F., Mellinger J., et al.* Patients with ALS can use sensorimotor rhythms to operate a brain-computer interface // *Neurol.* 2005. V. 64. № 10. P. 1775–1777.
5. *Hagedorn L.J., Leeuwis N., Alimardani M.* Prediction of Inefficient BCI Users based on Cognitive Skills and Personality Traits // *bioRxiv* 2021.09.28.461955.
6. *Leeuwis N., Paas A., Alimardani M.* Vividness of visual imagery and personality impact motor-imagery brain computer interfaces // *Front. Hum. Neurosci.* 2021. V. 15. P. 634748.
7. *Nijboer F., Birbaumer N., Kubler A.* The influence of psychological state and motivation on brain-computer interface performance in patients with amyotrophic lateral sclerosis—a longitudinal study // *Front. Neurosci.* 2010. V. 4. P. 55.
8. *Witte M., Kober S.E., Ninaus M., et al.* Control beliefs can predict the ability to up-regulate sensorimotor rhythm during neurofeedback training // *Front. Hum. Neurosci.* 2013. V. 7. P. 478.
9. *Zapala D., Malkiewicz M., Francuz P., et al.* Temperament predictors of motor imagery control in BCI // *J. Psychophysiol.* 2019. V. 34. № 4. P. 246–254.
10. *Ahn M., Ahn S., Hong J.H., et al.* Gamma band activity associated with BCI performance: simultaneous MEG/EEG study // *Front. Hum. Neurosci.* 2013. V. 7. P. 848.
11. *Bamdadian A., Guan C., Ang K.K., et al.* The predictive role of pre-cue EEG rhythms on MI-based BCI classification performance // *J. Neurosci. Methods.* 2014. V. 235. P. 138–144.
12. *Grosse-Wentrup M., Schölkopf B.* High gamma-power predicts performance in sensorimotor-rhythm brain-computer interfaces // *J. Neural Eng.* 2012. V. 9. № 4. P. 6046001.

13. *Bobrova E.V., Reshetnikova V.V., Vershinina E.A., et al.* Interhemispheric Asymmetry and Personality Traits of Brain-Computer Interface Users in Hand Movement Imagination // *Doklady Biological Sciences*. 2020. V. 495. P. 265–267.
14. *Bobrova E.V., Reshetnikova V.V., Vershinina E.A., et al.* Success of hand movement imagination depends on personality traits, brain asymmetry, and degree of handedness // *Brain Sci*. 2021. V. 11. № 7. P. 853.
15. *Reshetnikova V.V., Bobrova E.V., Vershinina E.A., et al.* Relationship between success in motor imagery of the right and left hands and users' personality traits // *Neurosci. Behav. Physiol*. 2022. V. 6. P. 12.
16. *Dornhege G., Blankertz B., Curio G., et al.* Increase in information transfer rates in BCI by CSP extension to multi-class // *NIPS*. 2003. P. 733–740.
17. *Frolov A., Husek D., Bobrov P.* Comparison of Four Classification Methods for Brain-Computer Interface // *Neural Network World*. 2011. V. 21. № 2. P. 101–115.
18. *Sporn S., Hein T., Ruiz M.H.* Alterations in the amplitude and burst rate of beta oscillations impair reward-dependent motor learning in anxiety // *Elife*. 2020. V. 9. P. e50654.

## DEPENDENCE OF BRAIN-COMPUTER INTERFACE CONTROL TRAINING ON PERSONALITY TRAITS

**E. V. Bobrova<sup>a</sup>, V. V. Reshetnikova<sup>a</sup>, E. A. Vershinina<sup>a</sup>, A. A. Grishin<sup>a,#</sup>, M. R. Isaev<sup>b,c</sup>, P. D. Bobrov<sup>b,c</sup>, and Corresponding Member of the RAS Yu. P. Gerasimenko<sup>a</sup>**

<sup>a</sup> *Pavlov Institute of Physiology of the Russian Academy of Sciences, Saint Petersburg, Russian Federation*

<sup>b</sup> *Institute of Higher Nervous Activity and Neurophysiology of the Russian Academy of Sciences, Moscow, Russian Federation*

<sup>c</sup> *Institute of Translational Medicine of the Russian National Research Medical University, Moscow, Russian Federation*

<sup>#</sup>*e-mail: agrishin@infran.ru*

Personality traits (PT) are predictors of the success of control of brain-computer interfaces (BCI), however, it is unknown how the PT, optimal for BCI control, changes during training. The paper for the first time analyzes the connections of PT and the accuracy of the classification of brain states (AC) in imagining the movements of the hands, feet and locomotion during 10-day training of 10 volunteers in BCI control. In the first three days of training, AC is higher for more stressed and anxious volunteers, in the last days – for calmer ones. In the middle of the training period, TC is higher in low demonstrativeness persons, it is more pronounced when imagining foot movements. Correlations of low demonstrativeness, as well as of foresight and self-control with AC when imagining foot movements are revealed significantly more often than when imagining hands and locomotion. In almost the entire period of training, AC with imagination locomotion is higher in individualists. The results make it possible to offer individually-oriented recommendations for the use of BCI based on the imagination of movements for the rehabilitation of patients with motor disorders.

*Keywords:* brain-computer interfaces, personality traits, learning to imagine movements, imagination of opening the hand, imagination of flexion of the foot, imagination of locomotion

УДК 616-006:577:17

## ИССЛЕДОВАНИЯ ПРОТИВООПУХОЛЕВОЙ АКТИВНОСТИ ЙОДАЦЕТАТА В ЛИПОСОМАЛЬНОЙ ФОРМЕ

© 2022 г. Д. А. Коршунов<sup>1,\*</sup>, М. А. Булдаков<sup>1</sup>, Е. Е. Серeda<sup>1,2</sup>,  
М. В. Буктеров<sup>2</sup>, И. В. Мильто<sup>2</sup>, И. В. Кондакова<sup>1</sup>

Представлено академиком РАН Е.Л. Чойнзоновым

Поступило 30.06.2022 г.

После доработки 18.08.2022 г.

Принято к публикации 18.08.2022 г.

Метаболическое перепрограммирование стало новым отличительным признаком рака. Углеводный обмен является ключевым компонентом метаболических преобразований в опухолях. На сегодняшний день было идентифицировано множество терапевтических агентов, которые нацелены на белки и ферменты, участвующие в транспорте и метаболизме глюкозы, с многообещающими результатами в исследованиях культур клеток и моделях опухолей животных. В своих исследованиях мы обнаружили, что перспективным среди них является ингибитор гликолиза йодоацетат. Изучение этого агента показало, что йодоацетат в липосомальной форме обладает наилучшими показателями. При курсовом введении его антималярийная и противоопухолевая активность достигала значимых индексов торможения роста. При этом липосомы с йодоацетатом имели практически полностью безопасный токсикологический профиль по сравнению с самостоятельной формой и, как следствие, имеют большой потенциал в полихимиотерапии.

*Ключевые слова:* йодоацетат, высокоэффективная жидкостная хроматография, липосомальные лекарственные формы, противоопухолевый эффект

**DOI:** 10.31857/S2686738922060142

### ВВЕДЕНИЕ

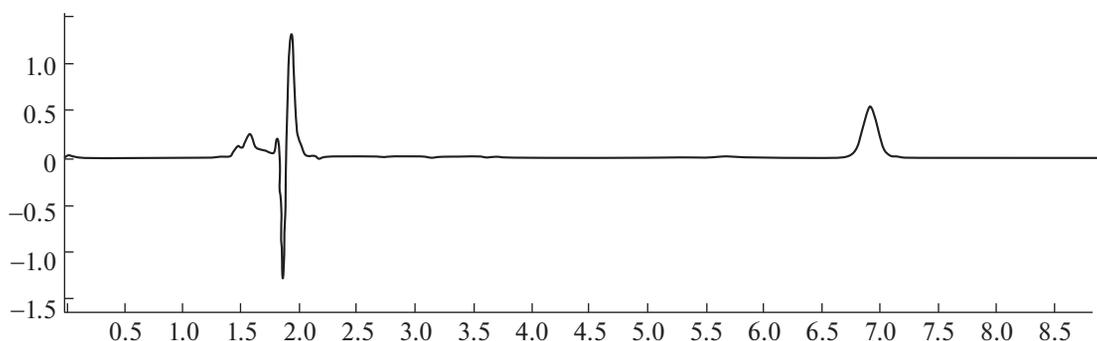
Серьезной проблемой в терапии рака остается разработка новых подходов к лечению, которые будут избирательно воздействовать на опухолевые клетки с минимальным воздействием на здоровые ткани [1]. Использование в качестве мишеней белков, формирующих метаболическое перепрограммирование, является одним из наиболее перспективных направлений противоопухолевой терапии [2]. Одной из важнейших перестроек в метаболизме раковых клеток является формирование эффекта Варбурга. Успехи в понимании сложных клеточных и молекулярных механизмов, связанных с эффектом Варбурга и другими метаболическими перестройками, стали основой для создания новых специфических агентов [3]. Однако одна из ключевых проблем, связанных с соединениями, препятствующими гликолизу в

опухолевых клетках, заключается в том, что они препятствуют метаболизму нормальных клеток. Несмотря на успешные доклинические испытания, многие новые противоопухолевые препараты с антигликолитической активностью не прошли I или II фазы клинических испытаний [4]. Эта ситуация требует поиска и разработки селективных антималярийных средств с низкой токсичностью или использования методов адресной доставки, улучшающих биораспределение и снижающих токсические побочные эффекты. Адресная доставка лекарств с помощью липосом является одним из подходов к снижению токсического эффекта и повышению терапевтического индекса [5]. Среди ингибиторов гликолиза можно выделить ряд соединений, обладающих высоким синергизмом с липосомами благодаря своим индивидуальным свойствам. В частности, такой ингибитор, как йодоацетат (ЙА), обладает противоопухолевой активностью и наименьшим токсическим потенциалом по сравнению с другими аналогичными ингибиторами гликолиза [5, 6]. Цель настоящего исследования заключалась в оценке противоопухолевой активности этого ингибитора с использованием липосом для снижения его системной токсичности.

<sup>1</sup> Научно-исследовательский институт онкологии, Томский национальный исследовательский медицинский центр Российской академии наук, Томск, Россия

<sup>2</sup> Сибирский государственный медицинский университет, Томск, Россия

\*e-mail: ieved@ya.ru



**Рис. 1.** Хроматограмма йодоацетата, инкапсулированного в липосому 400 нм. Пик йодоацетата на 9 мин, пик компонентов липосом с растворителем на 2 мин.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Терапевтическое действие ингибитора оценивали на мышах (самцах) линии C57BL/6j массой 25–30 г, полученных из СПФ вивария лабораторных животных ИЦиГ СО РАН (свидетельство № 10305258095, Новосибирск, Россия). Исследования проводились с соблюдением правил лабораторной практики при доклинических исследованиях в Российской Федерации (ГОСТ Р 51000.3-96 и ГОСТ Р 51000.4-96), международных рекомендаций “Европейской конвенции по защите позвоночных животных, используемых для экспериментов или других целей”. Научные цели” (Страсбург, 1986 г.) и директивы Европейской комиссии 86/609/ЕЕС для экспериментов на животных.

Операции проводили с использованием изофлюрана (Baxter, США) на станции анестезии животных (Braintree Scientific, EZ-7000-320, США). Для внутривенного введения использовали катетер 27G длиной 10 мм (Sci-cat, Россия). Ве-

ны животных катетеризировали по протоколу за два дня до начала забора крови или терапии [21].

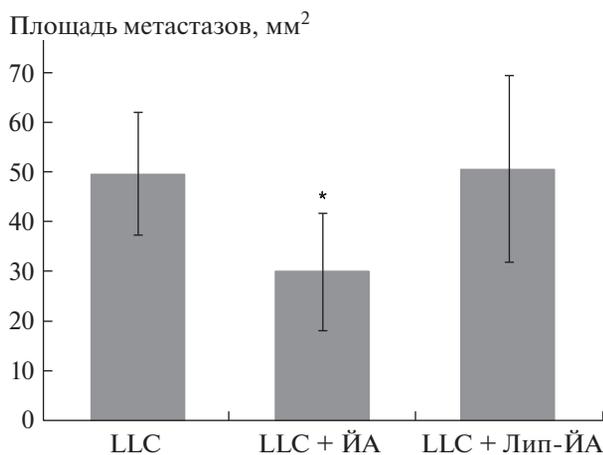
Кровь для биохимического анализа брали из яремной вены и затем собирали в пробирки, предварительно заполненные гепарином (B. Braun Melsungen, Германия). Кровь анализировали с помощью биохимического анализатора Architect (Abbot, США).

Для получения эмульсии полых липосом использовали 1,2-дипальмитоил-глицеро-3-фосфохолин и холестерин (Sigma Aldrich, США). Ингибитор гликолиза йодоацетат (ЙА, Sigma-Aldrich, США) помещали в камеру экструдера, содержащую липосомальную эмульсию. Суспензию эмульсии липидных пленок и препаратов фильтровали 12 раз через поликарбонатные фильтры диаметром 100 или 400 нм (Sartorius, Германия) при температуре 25–55°C в экструдере и давлении аргона в диапазоне от 2 до 10 МПа. Полученные липосомы очищали от невключенного ком-

**Таблица 1.** Влияние введения йодоацетата на биохимические показатели крови у животных с острой интоксикацией и при однократном и двукратном введении его липосомальной формы в течение 12 дней

Параметры	Интактные (справочные данные)	Контроль (1 день после операции)	Контроль (12 день после операции)	ЙА, острая интоксикация	Лип-ЙА (однократная инъекция)	Лип-ЙА (двойные инъекции)
ЛДГ	150 ± 10 (370–720)	160 ± 12	129 ± 13 <sup>1</sup>	1500 ± 30 <sup>1</sup>	137 ± 9 <sup>3</sup>	147 ± 10 <sup>2,3</sup>
АЛАТ	10 ± 2 (24–40)	6 ± 2 <sup>1</sup>	10 ± 2	16 ± 4 <sup>1</sup>	6 ± 1 <sup>1,3</sup>	8 ± 2 <sup>3</sup>
АСАТ	38 ± 5 (40–60)	35 ± 5	34 ± 3	740 ± 20 <sup>1,2</sup>	251 ± 15 <sup>1,2,3</sup>	31 ± 2 <sup>1,3</sup>
Общая амилаза	670 ± 25 (607–744)	445 ± 17 <sup>1</sup>	707 ± 30 <sup>1</sup>	2030 ± 50 <sup>1</sup>	655 ± 18 <sup>2,3</sup>	670 ± 21 <sup>3</sup>
Прямой билирубин	0.11 ± 0.02 (0.09–0.13)	1.43 ± 0.12 <sup>1</sup>	1.05 ± 0.09 <sup>1</sup>	11.45 ± 2.15 <sup>1</sup>	1.30 ± 0.25 <sup>1,2,3</sup>	1.00 ± 0.10 <sup>1,3</sup>
Общий билирубин	0.46 ± 0.05 (0.21–0.68)	1.85 ± 0.15 <sup>1</sup>	1.15 ± 0.08 <sup>1</sup>	13.87 ± 1.5 <sup>1</sup>	1.30 ± 0.20 <sup>1,2,3</sup>	1.00 ± 0.12 <sup>1,3</sup>
Щелочная фосфатаза	86 ± 10 (80–100)	13 ± 4 <sup>1</sup>	35 ± 4 <sup>1</sup>	73 ± 9 <sup>2</sup>	32 ± 5 <sup>1,3</sup>	27 ± 5 <sup>1,3</sup>

ЙА – йодоацетат, Лип-ЙА – липосомальная форма йодоацетата, ЛДГ – лактатдегидрогеназа, АЛАТ – аланинаминотрансфераза, АСАТ – аспаратаминотрансфераза. 1 – по сравнению с интактной группой; 2 – по сравнению с контрольной группой через 12 дней после операции; 3 – по сравнению с группой с острой интоксикацией. Данные представлены как среднее значение ± ос,  $p < 0.05$ .



**Рис. 2.** Площадь метастазов в легких. ЙА – площадь метастазов в легких у мышей, получавших йодоацетат в течение 4 сут; ЛИП-ЙА – область метастазов в легких у мышей, получавших липосомальную форму йодоацетата. Данные представлены как среднее  $\pm$  ос. \*  $p < 0.05$ .

понента с помощью диализной мембраны (ROTH, США).

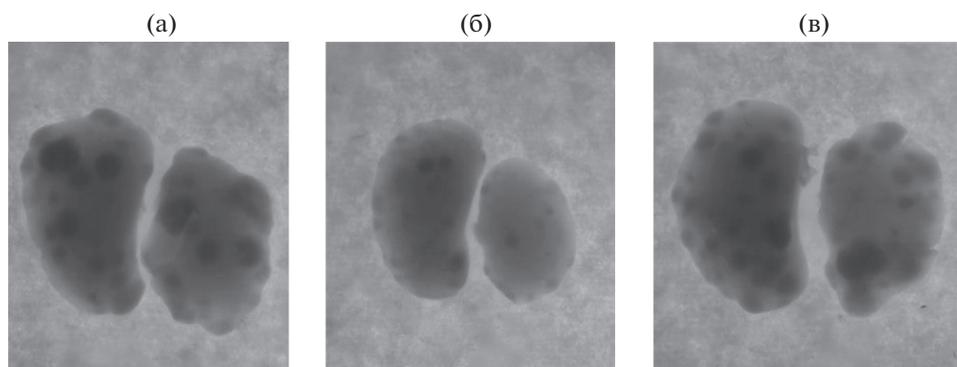
Высокоэффективную жидкостную хроматографию (ВЭЖХ) проводили для анализа количества включенного агента в липосомы. В качестве неподвижной фазы использовали аминопропил-силикагель, в качестве подвижной фазы – раствор ацетонитрила (УФ-ИК-ВЭЖХ (градиент) ACS, Panreac, Испания) с водой в соотношении 50: 50 с добавлением 60 ммоль/л уксусной кислоты (Scharlab, Испания) и формиата аммония (ACROS Organics, США). Йодоацетат определяли на колонке ZorbaxNH<sub>2</sub> размером 4.6  $\times$  150 мм, 5 мкм (Agilent Technologies, США) при длине волны  $\lambda = 260$  нм на жидкостном хроматографе Aligen 1260 (Agilent Technologies, США) с детектором на диодной матрице.

Моделирование карциномы легкого Льюис (LLC) у животных проводили путем одновременной инокуляции в мышцу бедра 1.5 млн опухолевых клеток LLC в 0.2 мл 0.9% NaCl. Объем бедра и размер метастазов определяли штангенциркулем. Объем опухоли рассчитывали как (длина  $\times$  ширина<sup>2</sup>)/2. Количество метастазов в легкие определяли путем подсчета количества метастатических узелков на поверхности легких. Фотографии легких были сделаны в проходящем свете с помощью камеры Canon DSLR.

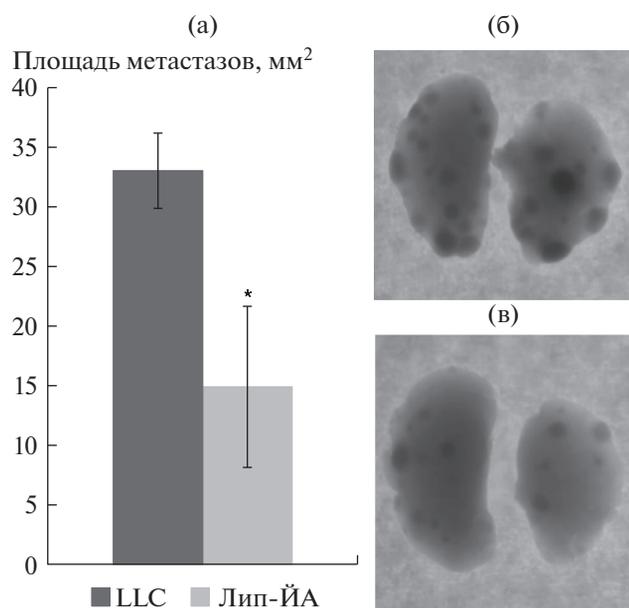
В исследованиях на животных размер группы составлял 6–8 животных. Торможение роста опухоли (ТРО) рассчитывали по формуле:  $\text{ТРО} = (V_c - V_t) \times 100\% / V_c$  ( $V_c$  – средний объем опухоли в контрольной группе;  $V_t$  – средний объем опухоли в группе, получавшей лечение). Уровень ингибирования метастазов в легкие (ИМ) рассчитывали по формуле:  $\text{ИМ} = (M_k - M_t) \times 100\% / M_k$  ( $M_k$  – средняя площадь метастазов в легких в контрольной группе;  $M_t$  – средняя площадь метастазов в легких в группе лечения).

В схеме лечения йодоацетатом в липосомах (Лип-ЙА) и самостоятельной форме использовали введение препаратов один раз в сутки в хвостовую вену в течение 4 дней в максимально переносимой дозе (9 мг/кг/сут) для краткосрочного режима. Для курсовой терапии, продолжительность которой составила 12 дней, липосомы вводили через катетер (Sci-cat, Россия), введенный в яремную вену (схема введения № 2). Животные, получавшие курсовую терапию, были выведены из эксперимента на 18-е сутки. При оценке показателей биохимии крови животные получили дозу Лип-ЙА однократно и дважды в сутки с промежутком в 4 ч.

Экспериментальные данные представлены в виде средних значений и стандартного отклонения среднего. Критерий Манна–Уитни использовали для сравнения различий между независи-



**Рис. 3.** Фотографии метастазов в легких на 21-е сутки при кратковременной терапии. (а) – легкие с метастазами у мышей контрольной группы; (б) – метастазы в легкие у мышей, получавших йодоацетат; (в) – липосомы с йодоацетатом. На фото видны легкие с метастазами объемом, близким к среднему.



**Рис. 4.** Площадь метастазов в легких мышей. Влияние терапии липосомами с йодоацетатом (Лип-ЙА) в течение 12 дней и изображения легких мышей с метастазами карциномы Льюиса (LLC) на фоне терапии. (б) – контрольная группа; (в) – группа с Лип-ЙА терапией в течение 12 дней. Данные представлены как среднее  $\pm$  ос. \*  $p < 0.05$ .

мыми выборками с распределением, отличным от нормального. Значение  $p$  менее 0.05 считалось статистически значимым.

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

На первом этапе для оценки содержания ЙА в липосомах потребовалось разработать валидный метод количественного анализа, а также оценить его токсикологический профиль и подобрать оптимальную схему лечения.

В аналитических исследованиях для метода ВЭЖХ были подобраны оптимальные хроматографические условия. Коэффициент разрешения между пиками  $R_s$  для ЙА составил 13.4 при требовании минимального значения 1.5 ед. Количественный анализ количества ЙА в липосомах выявил, что независимо от их размера как при диаметре 100 нм, так и 400 нм предельная концентрация составляет 9 мг/кг (рис. 1). В результате испытаний мы установили, что оптимальным вариантом для приготовления и исследований методом экстракции являются липосомы с размером 400 нм.

Предварительную оценку токсического влияния ЙА для свободной и липосомальной форм ЙА при курсовом его введении через яремную вену проводили по биохимическим показателям крови, которые отражают основные пути повре-

ждения организма ингибитором. Анализ показателей крови выявил, что наиболее существенные отклонения при острой интоксикации ЙА коснулись показателей АсАТ, ЛДГ и общей амилазы (табл. 1).

Однако полученные результаты демонстрируют, что, несмотря на увеличение этих показателей в 10–20 раз, это происходит на фоне нормального уровня активности АЛАТ, являющейся маркером целостности клеток печени. Этот безопасный для печени профиль придает препарату большой потенциал в качестве липосомальной формы, поскольку известно, что они накапливаются в печени, селезенке и непосредственно в опухолевых образованиях [7]. Наши данные о влиянии иммерсионного ЙА в липосомы показали высокую эффективность в снижении системной токсичности препарата. Все показатели были на уровне нормальных значений после курсового введения как при однократном приеме (доза 9 мг/кг/сут), так и при двукратном варианте введения (18 мг/кг/сут).

Исследование противоопухолевой активности Лип-ЙА показало по схеме терапии № 1, что их противоопухолевая активность по сравнению с его самостоятельной формой была снижена в отношении торможения роста метастазов, но несколько повышалась в отношении первичного очага. Так, максимальная эффективность ТРО ингибитора ЙА в свободной форме достигала 15%. В группе лечения Лип-ЙА терапевтический эффект увеличивался до 25%, что является умеренным показателем противоопухолевого эффекта для данной модели. Среднее значение ИМ для группы составило около 45% (рис. 2 и 3). Лип-ЙА не ингибировал рост метастазов. При этом анализ внутригруппового разброса показателей говорит о том, что более длительный курс введения Лип-ЙА, возможно, может изменить эту ситуацию.

При курсовом введении в течение 12 сут Лип-ЙА показал колебания ТРО в первичном очаге на уровне 20–40%. Наибольшее отклонение наблюдалось к концу терапии. При этом, несмотря на сложности модели при катетеризации, в том числе ограничения по количеству вводимого препарата, нам удалось получить антиметастатический эффект Лип-ЙА. В группе животных, получавших липосомы с ЙА в течение 12 сут, наблюдалось торможение диссеминации опухолевых клеток в среднем на 51% (рис. 4).

Таким образом, установлено, что ингибитор гликолиза йодоацетат обладает высокой токсичностью, что в конечном итоге может привести к поражению сердца и других органов, но не оказывает токсического действия на печень. Было показано, что липосомальная форма йодоацетата является более безопасной лекарственной фор-

мой. Оценка противоопухолевой активности показала, что влияние обеих форм йодоацетата на рост первичной опухоли было умеренным. Анти-метастатический эффект липосомальной формы ингибитора проявляется в условиях длительного приема.

#### СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Исследования проводились с соблюдением правил лабораторной практики при доклинических исследованиях в Российской Федерации (ГОСТ Р 51000.3–96 и ГОСТ Р 51000.4–96), международных рекомендаций “Европейской конвенции по защите позвоночных животных, используемых для экспериментов или других целей”. Научные цели” (Страсбург, 1986 г.) и директивы Европейской комиссии 86/609/ЕЕС для экспериментов на животных.

#### ИНФОРМАЦИЯ О ПОЛУЧЕНИИ РАЗРЕШЕНИЯ НА ПРОВЕДЕНИЕ ИССЛЕДОВАНИЯ С УЧАСТИЕМ ЖИВОТНЫХ

Исследование проведено в соответствии с рекомендациями Хельсинкской декларации и одобрено Этическим комитетом НИИ онкологии Томского НМИЦ (дата утверждения протокола 30.10.2017).

#### КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

У авторов отсутствуют потенциальные и явные конфликты интересов, связанные с рукописью.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Gonzalez-Valdivieso J., Girotti A., Schneider J., et al.* Advanced nanomedicine and cancer: Challenges and opportunities in clinical translation. // *International Journal of Pharmaceutics*. 2021. V. 599. P. 120438.
2. *Lee Y.T., Tan Y.J., Oon C.E.* Molecular targeted therapy: Treating cancer with specificity. // *European Journal of Pharmacology*. 2018. V. 834. P. 188–196.
3. *Korshunov D.A., Kondakova I.V., Shashova E.E.* Modern perspective on metabolic reprogramming in malignant neoplasms. // *Biochemistry (Moscow)*. 2019. V. 84. P. 1129–1142.
4. *Amoedo N.D., Obre E., Rossignol R.* Drug discovery strategies in the field of tumor energy metabolism: Limitations by metabolic flexibility and metabolic resistance to chemotherapy. // *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) – Bioenergetics*. 2017. V. 1858. № 8. P. 674–685.
5. *Shi Y.* Clinical translation of nanomedicine and biomaterials for cancer immunotherapy: Progress and perspectives. // *Advanced Therapeutics*. 2020. V. 3. № 9. P. 1900215.
6. *Korshunov D.A., Kondakova I.V., Klimov I.A., et al.* Glycolysis inhibitors monoiodoacetate and 2-deoxyglucose as antitumor agents: Experimental study on lewis lung carcinoma model. // *Bulletin of Experimental Biology and Medicine*. 2018. V. 165. P. 695–697.
7. *Man F., Gawne P.J., De Rosales R.T.M.* Nuclear imaging of liposomal drug delivery systems: A critical review of radiolabelling methods and applications in nanomedicine. // *Advanced Drug Delivery Reviews*. 2019. V. 143. P. 134–160.

## STUDIES OF THE ANTITUMOR ACTIVITY OF IODOACETATE IN LIPOSOMAL FORM

**D. A. Korshunov<sup>a, #</sup>, M. A. Buldakov<sup>a</sup>, E. E. Sereda<sup>a, b</sup>, I. V. Kondakova<sup>a</sup>, M. V. Bukterov<sup>b</sup>, and I. V. Milto<sup>b</sup>**

<sup>a</sup> *Tomsk National Research Medical Center of the Russian Academy of Sciences, Tomsk, Russian Federation*

<sup>b</sup> *Siberian State Medical University, Tomsk, Russian Federation*

<sup>#</sup> *e-mail: ieved@ya.ru*

Presented by Academician of the RAS E.L. Choyznov

The current problem of high toxicity and drug resistance of antitumor drugs has led to the development of various directions. Over the past 15 years, a new class of antitumor agents has been developed in oncology, associated with the impact on the elements of metabolic reprogramming. One of the important signs of metabolic reprogramming is the dysregulation of bioenergetic metabolism. Most cancer cells synthesize ATP through anaerobic glycolysis. This metabolic switch is known as the “Warburg effect”. The adaptive mechanisms that maintain a high rate of glycolysis are either unique to cancer or subject to drug-controlled toxicity. Advances in understanding the complex cellular and molecular mechanisms associated with the Warburg effect have led to the development of new selective and specific agents, some of which have now reached clinical trials. Despite successful preclinical trials, many new glycolysis inhibitor antineoplastic agents have failed in phase I or II clinical trials, demonstrating systemic toxicity. This situation requires the search for selective antiglycolytic agents with low toxicity and high efficiency or the use of methods that would reduce toxic side effects.

*Keywords:* iodoacetate, high performance liquid chromatography, liposomal dosage forms, antitumor effect

УДК 577.3:599.323.4

## РАДИОЗАЩИТНОЕ ДЕЙСТВИЕ НАНОЦЕРИЯ ПРИ ОБЛУЧЕНИИ МЫШЕЙ СРЕДНИМИ И ЛЕТАЛЬНЫМИ ДОЗАМИ ИОНОВ УГЛЕРОДА

© 2022 г. Член-корреспондент РАН В. Е. Балакин<sup>1</sup>, О. М. Розанова<sup>2</sup>, Е. Н. Смирнова<sup>2</sup>, Т. А. Белякова<sup>1,\*</sup>, Н. С. Стрельникова<sup>1</sup>, А. В. Смирнов<sup>1</sup>, А. Г. Васильева<sup>3</sup>

Поступило 20.07.2022 г.

После доработки 17.08.2022 г.

Принято к публикации 20.08.2022 г.

Представлены данные исследования радиопротекторных свойств наночерия ( $n\text{CeO}_2$ ) при тотальном облучении мышей ионами углерода в средних и летальных дозах по микроядерному тесту и критерию 30 суточной выживаемости. Значительный защитный эффект  $n\text{CeO}_2$  при облучении в средних дозах наблюдался при пероральном введении в течение 5 сут до облучения, т.е. при длительном профилактическом применении. В отличие от результатов МЯ-теста данные по выживаемости мышей показывают отсутствие защитного действия  $n\text{CeO}_2$  при пероральном введении. При инъекциях как  $n\text{CeO}_2$ , так и физиологического раствора за 24 ч до или сразу после облучения радиопротекторный эффект выявлен с помощью обоих использованных методов. Полученные данные выявили зависимость наблюдаемых эффектов от способов и времени введения  $n\text{CeO}_2$ , влияния растворителя, уровня доз и качества излучения, а также демонстрируют возможность использования препаратов наночерия для защиты организмов от излучений с высокими значениями ЛПЭ и важность дальнейших исследований радиозащитных свойств новых наноматериалов.

*Ключевые слова:* наночастицы черия, ионы углерода, микроядра, выживаемость, мыши

**DOI:** 10.31857/S2686738922060038

В последнее десятилетие активно исследуются особенности биологического действия тяжелых заряженных частиц на организм [1]. Благодаря активному внедрению методов лучевой терапии с использованием высокоэнергетических протонов и ионов углерода были достигнуты значительные успехи в лечении резистентных злокачественных новообразований [2, 3]. Специфика действия тяжелых заряженных частиц позволяет повышать дозы облучения опухоли, значительно увеличивая биологически эффективную дозу, снижая при этом дозу облучения близко расположенных критических органов и здоровых тканей [4]. В последние годы продолжается планирование длительных экспедиций в дальний космос, при которых экипажи будут постоянно подвер-

гаться воздействию галактического космического излучения (ГКИ), в спектре которого преобладают (85–90%) высоко заряженные протоны с энергией 100 МэВ, а также ионы углерода и железа, которые за счет высоких значений линейной передачи энергии (ЛПЭ) обладают высокой биологической эффективностью. Вклад ГКИ на околоземной орбите на высоте 400 км составляет около 50% от суммарной дозы от всех источников космической радиации, а при межпланетных миссиях может достигать 75%. В связи с этим актуальным остается поиск новых радиопротекторов, которые бы защищали здоровые ткани и организмы от генотоксического действия высокоэнергетических частиц, к которым относятся тяжелые ионы, нейтроны и протоны со значениями ЛПЭ > 4 кэВ/мкм. К настоящему моменту известно, что многие радиопротекторы достаточно эффективны при действии фотонных излучений, но не проявляют своих свойств при облучении биологических объектов частицами с высокими значениями ЛПЭ [5]. Это объясняется не только спецификой физического взаимодействия частиц с веществом и распределением дозы в мишени, но и резко различающимися молекулярными механизмами индукции повреждений в клетках, способов их репарации и путями формирования отдаленных эффектов. Современный ра-

<sup>1</sup> Филиал “Физико-технический центр” Федерального государственного бюджетного учреждения науки Физического института им. П.Н. Лебедева Российской академии наук, Протвино, Россия

<sup>2</sup> Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт теоретической и экспериментальной биофизики Российской академии наук, Пущино, Россия

<sup>3</sup> Федеральное государственное бюджетное учреждение “Институт физики высоких энергий имени

А.А. Логунова Национального исследовательского центра “Курчатовский институт”, Протвино, Россия

\*e-mail: belyakovata@lebedev.ru

диопротектор должен быть нетоксичным, эффективным в широком диапазоне доз при разных режимах введения не только до облучения, но и после; длительно действовать и желателно при неинвазивных методах введения, иметь хорошо изученную динамику распределения в организме. Большинство изученных радиопротекторов оказывают эффективное действие при применении их в субтоксических дозах при внутривенном или внутрибрюшинном введении в короткое время 10–30 мин до облучения и требуют специфических растворителей [6]. В последнее время успешное развитие технологий привело к синтезу наноматериалов, которые используются не только для эффективных систем доставки лекарств и улучшения биологической доступности препаратов, но и открывают возможности поиска новых радиопротекторов, поскольку некоторые наночастицы благодаря своему строению и механизмам действия обладают радиозащитными свойствами [7]. В недавних исследованиях *in vitro* и *in vivo* показано, что низкие дозы наночастиц оксида церия ( $\text{nCeO}_2$ ) демонстрируют значительный антиоксидантный потенциал с очень низкой токсичностью [8]. В работе [9] при исследовании *in vivo* токсичности наночастиц диоксида церия размером 3–5 нм при внутрибрюшинном введении в течение 4 дней концентраций 0.135, 1.35, 13.5 и 135 мг/кг в течение 21 дня не наблюдалось гибели животных и каких-либо побочных эффектов, а при вскрытии животных не обнаружено патологий органов. В этой же работе показано, что введение за 15 мин до облучения наночастиц диоксида церия в концентрации 0.00001 мг/кг в качестве радиопротектора является более эффективным, чем радиозащитный препарат амифостин в дозе 150 мг/кг, который широко применяется в клинической практике. При наблюдении после фракционированного облучения в суммарной дозе 30 Гр за гибелью животных, которые были обработаны наночерием или амифостином, было обнаружено, что 50% мышей выживали в группе при введении наночерия к 225 сут, в облученной группе к 132 сут, а половина мышей, обработанные амифостином, погибали уже к 81 сут. Фармакокинетика  $\text{nCeO}_2$  в экспериментах на животных достаточно хорошо изучена, хотя публикаций на эту тему среди общего количества работ по биомедицинскому применению препарата немного. При внутривенном введении цитрат-стабилизированный наночерий (4 нм, 10 мг/кг) в течение 0.5 ч обнаруживается в мозге, сердце, почках, печени и селезенке, затем его концентрация уменьшается или увеличивается в зависимости от органа при наблюдении до 24 ч [10]. Для  $\text{nCeO}_2$  показана критическая зависимость распределения и времени выведения в разных тканях организма как от характеристик самого препарата, его дозы, так и способа, и места введения и даже линии жи-

вотного [10]. В обзоре [11] были суммированы экспериментальные данные по биокинетике  $\text{nCeO}_2$ , полученные при различных путях воздействия в широком диапазоне доз (6–750 мг/кг) и размеров частиц (3–55 нм), в разных органах и тканях крыс. На основе этих данных была создана модель фармакокинетики при внутривенном введении цитрат-стабилизированного наночерия с размером частиц 30 нм, которая была калибрована до размера частиц 5 нм, модифицирована и проверена также для ингаляционного, орального, внутривенного и внутритрахеального введения препарата. Авторы отмечают, что модель адекватно описывает кинетику  $\text{nCeO}_2$  в различных тканях при внутривенном введении, но с трудностью предсказывает его распределение при других способах введения из-за крайне низких концентраций в тканях ниже порога определения. Было предложено несколько возможных механизмов защитного действия  $\text{nCeO}_2$  при воздействии фотонного излучения [12, 13], и, гипотетически, некоторые из этих механизмов могут участвовать и при действии излучений с высокими значениями ЛПЭ.

Мы предположили, что  $\text{nCeO}_2$  является перспективным соединением для исследования защитных нормальных клеток *in vivo* на мышах при действии ускоренных ионов углерода с энергией 400 МэВ/нуклон. Для исследования протекторных свойств  $\text{nCeO}_2$  в условиях *in vivo* были выбраны методы, обладающие высокой генотоксической чувствительностью, отражающие краткосрочные реакции стволовых клеток органов кроветворения и иммунитета при разных уровнях доз облучения: микроядерный тест (МЯ-тест) выявляет реакцию стволовых клеток костного мозга на низкие и средние дозы радиации, которые отражают дозовые нагрузки от ГКИ и при ионной терапии; а также тест на выживаемость животных при облучении в летальных дозах, который характеризует системный ответ тканей и органов организма в отдаленные сроки после облучения.

Эксперименты проводили на 8–9-недельных самцах аутбредных мышей колонии SHK (31–35 г,  $n = 155$ ), которых разводили и содержали в стандартных условиях вивария ИТЭБ РАН (Пушино, Россия) [14]. Протокол экспериментов был одобрен Комиссией ИТЭБ РАН по биобезопасности и биоэтике (протокол № 26 от 09.02.2021).

В работе использовали водный золь нанокристаллического оксида церия ( $\text{nCeO}_2$ ), стабилизированный цитрат-ионами [15]. Согласно данным электронной микроскопии полученный золь состоял из слабоагрегированных частиц  $\text{CeO}_2$  размером 3–4 нм, имеющих форму, близкую к изотропной. Концентрация наночастиц  $\text{CeO}_2$  в золе определялась по условиям синтеза и составляла 0.01 М, рН золя  $\text{nCeO}_2$  находился в диапазоне

7.2–7.4. На основе наших предыдущих работ по изучению радиозащитного действия наночерия на клеточных культурах и животных [13] и рекомендаций по особенностям изучения общетоксического действия лекарственных средств и средств медицинского назначения, содержащих наночастицы [16], наночерий ресуспендировали в физиологическом растворе (ФР) (0.9% раствора NaCl) непосредственно перед введением животным, которым вводили раствор  $n\text{CeO}_2$  ( $10^{-6}$  М) из расчета 8.3 нМ на грамм веса. Использовали несколько схем введения  $n\text{CeO}_2$  и ФР: 1) внутрибрюшинная инъекция (в/б) в объеме 0.1 мл за 24 ч до облучения, 2) пероральное введение (per os) в объеме 0.1 мл ежедневно в течение 5 дней до облучения; 3) внутрибрюшинная инъекция (0.1 мл) сразу после облучения.

Облучение ионами углерода осуществлялось моноэнергетическим пучком с энергией на выходе ускорителя 400 МэВ/нуклон на установке “Радиобиологический стенд на углеродном пучке У-70” НИЦ “Курчатовский институт” – ИФВЭ (г. Протвино). Животных облучали тотально в модифицированном пике Брэгга шириной 30 мм в водном фантоме, каждую мышшь помещали в хорошо вентилируемый контейнер и попарно располагали в воздушной камере, перпендикулярно направлению пучка. Профили пучка и равномерность поперечного облучения контролировали радиохромной пленкой ЕВТ-3 (GafChromic, США).

Генотоксическое действие  $n\text{CeO}_2$  и ионного излучения оценивали в клетках костного мозга мышшь ( $n = 55$ ) по появлению полихроматофильных эритроцитов (ПХЭ), содержащих микроядра (МЯ), после облучения в дозе 1.5 Гр. Через 28 ч после облучения мышшь эвтаназировали декапитацией и готовили цитологические препараты костного мозга. Время было выбрано с учетом радиационной задержки клеточного деления для фиксации максимального уровня повреждений клеток костного мозга [17]. На каждую экспериментальную точку использовали 5 животных, анализировали не менее 2000 ПХЭ на мышшь [16].

Радиозащитный эффект при разных режимах введения  $n\text{CeO}_2$  животным определяли после облучения ионами углерода в дозе 6.5 Гр. Мыши были разделены на группы по 10–30 особей. В течение месяца ежедневно регистрировались гибель животных, их вес и количество потребляемой воды и пищи. По итогам наблюдения были определены 30-суточная выживаемость, динамика гибели и средняя продолжительность жизни (СПЖ) погибших мышшь.

При статистической обработке результатов по МЯ-тесту вычисляли стандартную ошибку среднего, а сравнение между контрольными и опытными группами проводили по критерию Стьюдента. Показатели выживаемости мышшь сравни-

вали с помощью непараметрических критериев: Гехана-Вилкоксона для оценки продолжительности жизни погибших от облучения животных и логрангового критерия для сравнения 30-суточной выживаемости. Различия считали статистически значимыми при  $p \leq 0.05$ .

В табл. 1 представлена зависимость выхода ПХЭ с МЯ в костном мозге мышшь от способов и времени введения  $n\text{CeO}_2$  при облучении ионами углерода в дозе 1.5 Гр. С помощью МЯ-теста было выявлено отсутствие генотоксичности наночерия в выбранной концентрации при однократном внутрибрюшинном и ежедневном введении per os в течение 5 дней. При оценке противолучевой эффективности  $n\text{CeO}_2$  было выявлено значительное снижение цитогенетического повреждения во всех вариантах применения как  $n\text{CeO}_2$ , так и ФР, относительно облученного контроля. Ранее нами было показано, что при внутрибрюшинном и внутривенном введении мышсам  $n\text{CeO}_2$  также наблюдался радиозащитный эффект при действии рентгеновского излучения в дозе 1.5 Гр, однако ФР за 15 мин или 24 ч до облучения не влиял на величину цитогенетического повреждения в клетках костного мозга [13].

Для оценки эффективности препаратов по критерию фактора изменения дозы (ФИД) использовали дозовую зависимость выхода ПХЭ с МЯ в контроле в диапазоне доз 0–1.5 Гр ионного облучения, для которой был проведен регрессионный анализ:  $y = 0.4 + 4.9x$ , где  $y$  – % ПХЭ с МЯ;  $x$  – доза облучения (Гр) (рис. 1). Значение ФИД получали отношением поглощенной дозы 1.5 Гр к расчетной равноэффективной дозе в контроле (табл. 1).

Значительный защитный эффект наночерия (ФИД = 2.59) в отличие от ФР (ФИД = 1.50) наблюдался при пероральном введении в течение 5 сут до облучения, т.е. при длительном профилактическом применении. При количественной оценке радиопротекторных свойств в радиобиологии принято считать, что препарат или способ защиты является эффективным, если величина ФИД больше 1.2. Известно, ФИД наиболее мощных из известных радиопротекторов цистамина и препарата Б-190 составляет величины 1.3–1.5 [18].

Облучение мышшь ионами углерода в летальной дозе 6.5 Гр вызывало резкое развитие желудочно-кишечной формы острой лучевой болезни и уже на 3 сут после облучения регистрировали гибель 40% животных контрольной группы при потере веса до 30%, а на 7 сут наблюдали 100% гибель животных.

В период развития острой лучевой болезни во всех группах наблюдались прогрессивное снижение массы тела животных и угнетение двигательной активности. Наиболее резкое изменение веса наблюдалось в экспериментальных группах при

**Таблица 1.** Зависимость выхода ПХЭ с МЯ в костном мозге мышей, облученных ионами углерода в дозе 1.5 Гр, от способов и времени введения нСеО<sub>2</sub>

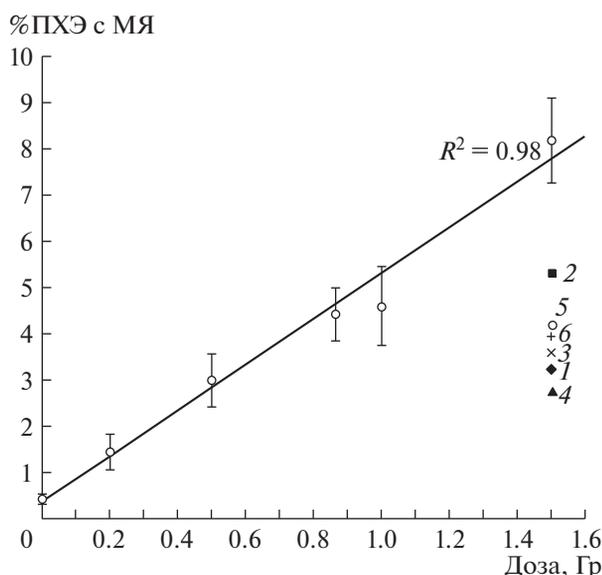
Условия воздействия	Число животных	% ПХЭ с МЯ	Равноэффективная доза в контроле, Гр	ФИД
контроль	10	0.40 ± 0.12	—	—
нСеО <sub>2</sub> (в/б)	5	0.65 ± 0.06	—	—
нСеО <sub>2</sub> (per os)	6	0.48 ± 0.07	—	—
0.9% NaCl (в/б)	5	0.39 ± 0.02	—	—
1.5 Гр	5	8.16 ± 0.96	—	—
нСеО <sub>2</sub> (per os) через 24 ч + 1.5 Гр	5	3.23 ± 0.70*	0.58	2.59
0.9% NaCl (per os) через 24 ч + 1.5 Гр	5	5.30 ± 0.35*	1.00	1.50
нСеО <sub>2</sub> (в/б) через 24 ч + 1.5 Гр	5	3.58 ± 0.43*	0.65	2.31
0.9% NaCl (в/б) через 24 ч + 1.5 Гр	5	2.75 ± 0.51*	0.48	3.13
1.5 Гр через 15 мин + нСеО <sub>2</sub> (в/б)	5	4.18 ± 0.82*	0.77	1.95
1.5 Гр через 15 мин + 0.9% NaCl (в/б)	5	3.93 ± 0.71*	0.72	2.10

\* $p \leq 0.05$  по сравнению с 1.5 Гр <sup>12</sup>C. Значение ФИД было вычислено с помощью регрессионного анализа. В/б — внутривенное введение, per os — пероральное введение, ПХЭ — полихроматофильные эритроциты, МЯ — микроядра.

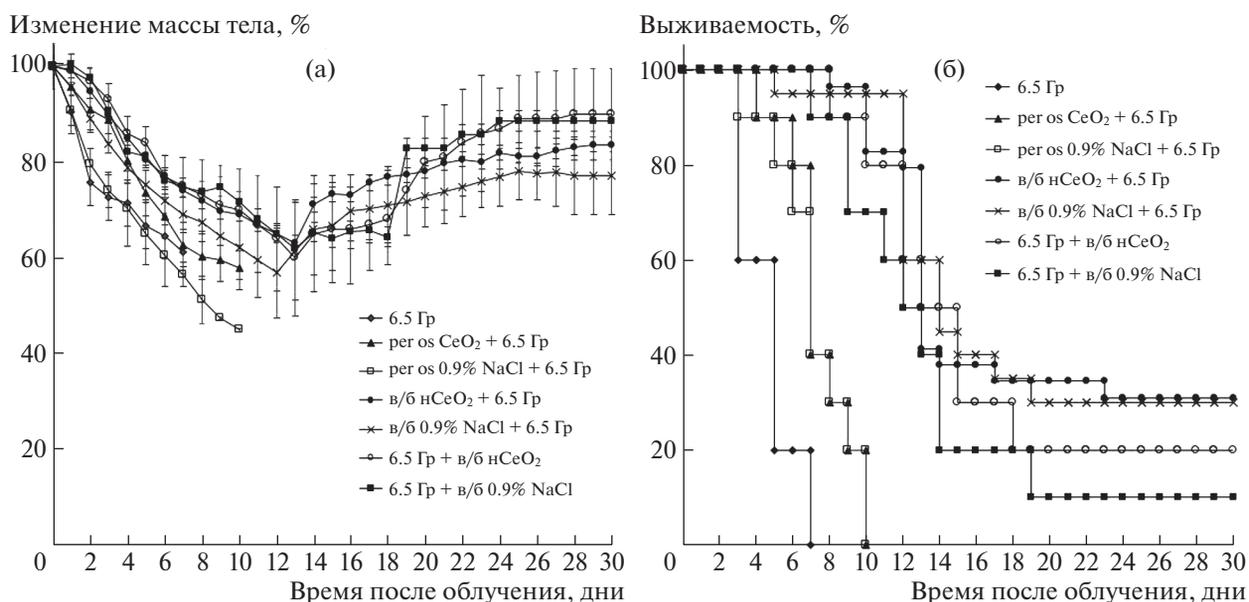
введении растворов per os, которое не отличалось от только облученной группы. При введении растворов в/б 30% потеря веса регистрировалась на 8–12 сут после облучения. К 24-м сут масса выживших мышей восстанавливалась и изменения составляли 10–20% от первоначального веса (рис. 2 а). Среди исследованных схем наиболее эффективными оказались инъекции нСеО<sub>2</sub> и ФР, при которых наблюдали защиту от тяжелого течения кишечной формы, и сдвиг основной гибели животных к 10–16 сут в период костномозгового

синдрома. При инъекции нСеО<sub>2</sub> и ФР за 24 ч до облучения 30 сут выживаемость составила 31% и 30%, а при инъекции растворов сразу после облучения — 20 и 10% соответственно; при введении растворов per os продолжительность жизни составляла 10 сут и различий в выживаемости животных не было (рис. 2 б). СПЖ погибших мышей в группах, получивших инъекцию растворов, достоверно отличалась от контрольной группы, и для всех групп составила  $14 \pm 2$  сут по сравнению с  $6 \pm 2$  сут в только облученной группе. СПЖ погибших животных при введении растворов per os составило  $8 \pm 3$  сут. Полученные результаты по выживаемости мышей показывают отсутствие защитного действия нСеО<sub>2</sub> на фоне ФР: оба раствора при инъекциях за 24 ч до или сразу после облучения приводили к значительному снижению гибели животных и изменению динамики течения острой лучевой болезни за счет смягчения повреждений желудочно-кишечного тракта.

Таким образом, полученные результаты показали, что введение нСеО<sub>2</sub> мышам per os до облучения ионами углерода в терапевтической дозе 1.5 Гр значительно снижает уровень цитогенетических повреждений в наиболее чувствительных клетках костного мозга, что свидетельствует о высокой радиозащитной эффективности профилактического применения нСеО<sub>2</sub> при неинвазивном способе введения. В отличие от результатов МЯ-теста данные по выживаемости мышей показывают отсутствие защитного действия нСеО<sub>2</sub> при пероральном введении. При инъекциях как нСеО<sub>2</sub>, так и ФР, за 24 ч до или сразу после облучения радиопротекторный эффект был выявлен обоими тестами. Данные показали зависимость биологических эффектов нСеО<sub>2</sub> от длительности и способа введения, влияния растворителя, а также уровня доз облучения и качества излучения. Следует отметить, что в нашей работе с использо-



**Рис. 1.** Дозовая зависимость выхода полихроматофильных эритроцитов с микроядрами в костном мозге мышей после облучения ионами углерода в диапазоне 0–1.5 Гр и при различных вариантах введения нСеО<sub>2</sub> и ФР при дозе облучения 1.5 Гр: 1 — per os нСеО<sub>2</sub>; 2 — per os 0.9% NaCl; 3 — в/б нСеО<sub>2</sub> за 24 ч до облучения; 4 — в/б 0.9% NaCl за 24 ч до облучения; 5 — в/б нСеО<sub>2</sub> сразу после облучения; 6 — в/б 0.9% NaCl сразу после облучения.



**Рис. 2.** Изменение массы тела (а) и динамика гибели (б) мышей после тотального облучения ионами углерода в дозе 6.5 Гр при различных вариантах введения нCeO<sub>2</sub> и ФР.

ванием ионов углерода выявлен радиозащитный эффект ФР при некоторых режимах введения, в отличие от данных [10] на мышах при внутривенном введении ФР за 15 мин до или после облучения рентгеновскими лучами. В ряде работ исследователи указывали на существенное влияние ФР на различные биологические эффекты [19], а также режима и способа введения нCeO<sub>2</sub>, типа тканей и даже линии животных при исследовании воздействий, приводящих к острому окислительному стрессу [10]. В связи с этим актуальной остается проблема подбора адекватных методов и животных моделей для доклинических исследований наноматериалов в условиях *in vivo* [16, 20]. Полученные данные демонстрируют принципиальную возможность использования препаратов наночерия для защиты от действия низких и высоких доз излучений с высокими значениями ЛПЭ и перспективность дальнейших исследований новых наноматериалов и способов их введения.

#### БЛАГОДАРНОСТИ

Авторы выражают искреннюю благодарность Зав. Лаборатории роста клеток и тканей ИТЭБ РАН А.Л. Попову за предоставленный препарат нанокристаллического оксида церия и интерес к нашим исследованиям.

#### ИСТОЧНИКИ ФИНАНСИРОВАНИЯ

Работа по исследованию радиозащитного действия наночерия при облучении мышей средними и летальными дозами ионов углерода выполнена в рамках фундаментальных научных исследований по темам, которые соответствуют ГЗ № 075-00381-21-00 (ИТЭБ РАН) и частичной финансовой поддержке договора НИР с ФТЦ ФИАН № 07/21.

#### КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

#### СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Все применимые международные, национальные и институциональные принципы ухода и использования животных при выполнении работы были соблюдены. Исследования проводили в соответствии с требованиями Федерации европейских научных ассоциаций по содержанию и использованию лабораторных животных в научных исследованиях (Federation of European laboratory animal science association, FELASA), а план экспериментов был одобрен Комиссией ИТЭБ РАН по биологической безопасности и биоэтике (протокол № 26/2021 от 09.02.2021).

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Tinganelli W., Durante M.* Carbon Ion Radiobiology // *Cancers (Basel)*. 2020. V. 12. № 10. P. 3022.
2. *Grau C., Durante M., Georg D., et al.* Particle therapy in Europe // *Mol. Oncol.* 2020. V. 14. № 7. P. 1492–1499.
3. *Seidensaal K., Mattke M., Haufe S., et al.* The role of combined ion-beam radiotherapy (CIBRT) with protons and carbon ions in a multimodal treatment strategy of inoperable osteosarcoma // *Radiother. Oncol.* 2021. V. 159. P. 8–16.
4. *Thomas H., Timmermann B.* Paediatric proton therapy // *Br. J. Radiol.* 2020. V. 93. № 1107. P. 20190601.
5. *Cortese F., Klokov D., Osipov A., et al.* Vive la radiorésistance!: converging research in radiobiology and biogerontology to enhance human radioresistance for deep space exploration and colonization // *Oncotarget.* 2018. V. 9. № 18. P. 14692–14722.

6. *Vasun M.B.* Классификация противолучевых средств как отражение современного состояния и перспективы развития радиационной фармакологии // Радиационная биология. Радиоэкология. 2013. Т. 53. № 5. С. 459–467.
7. *Xie J., Wang C., Zhao F., et al.* Application of Multifunctional Nanomaterials in Radioprotection of Healthy Tissues // *Adv. Healthc. Mater.* 2018. V. 7. № 20. P. 1800421.
8. *Stephen Inbaraj B., Chen B.H.* An overview on recent in vivo biological application of cerium oxide nanoparticles // *Asian J. Pharm. Sci.* 2020. V. 15. № 5. P. 558–575.
9. *Colon J., Herrera L., Smith J., et al.* Protection from radiation-induced pneumonitis using cerium oxide nanoparticles // *Nanomedicine.* 2009. V. 5. № 2. P. 225–231.
10. *Yokel R.A., Tseng M.T., Butterfield D.A., et al.* Nanoceria distribution and effects are mouse-strain dependent // *Nanotoxicology.* 2020. V. 14. № 6. P. 827–846.
11. *Carlander U., Moto T.P., Desalegn A.A., et al.* Physiologically based pharmacokinetic modeling of nanoceria systemic distribution in rats suggests dose- and route-dependent biokinetics // *International journal of nanomedicine.* 2018. V. 13. P. 2631–2646.
12. *Popova N.R., Popov A.L., Ermakov A.M., et al.* Ceria-Containing Hybrid Multilayered Microcapsules for Enhanced Cellular Internalisation with High Radioprotection Efficiency // *Molecules.* 2020. V. 25. № 13. P. 2957.
13. *Popov A.L., Zaichkina S.I., Popova N.R. et al.* Radioprotective effects of ultra-small citrate-stabilized cerium oxide nanoparticles in vitro and in vivo // *RSC Advances.* 2016. V. 6. № 108. P. 106141–106149.
14. *Smith J.A., van den Broek F.A., Martorell J.C., et al.* Principles and practice in ethical review of animal experiments across Europe: summary of the report of the FELASA working group on ethical evaluation of animal experiments // *Laboratory Animals.* 2007. V. 41. № 2. P. 143–160.
15. *Ivanova O.S., Ivanov V.K., Shcherbakov A.B., et al.* One-stage synthesis of ceria colloid solutions for biomedical use // *Doklady Chemistry.* 2011. V. 437. № 2. P. 103–106.
16. *Дурнев А.Д., Арзамасцев Е.В., Бухман В.М., и др.* Особенности изучения общетоксического действия лекарственных средств и средств медицинского назначения, содержащих наночастицы. В кн.: Миронов А.Н., ред. Руководство по проведению клинических исследований лекарственных средств. М.: Гриф и К; 2012. С. 25–34.
17. *Заичкина С.И., Кондакова Н.В., Розанова О.М., и др.* Тестирование противолучевого действия биологически активных веществ в диапазоне средних и малых доз облучения с использованием цитогенетического показателя – микроядерного теста // *Химико-фармацевтический журнал.* 2004. Т. 38. № 8. С. 405–410.
18. *Vasun M.B.* Противолучевые лекарственные средства. М.: Российская медицинская академия последипломного образования; 2010.
19. *Head K., Snidvongs K., Glew S., et al.* Saline irrigation for allergic rhinitis // *Cochrane Database Syst Rev.* 2018. V.6. № 6. CD012597. Published 2018 Jun 22.
20. *Kazimirova A., Baranokova M., Staruchova M., et al.* Titanium dioxide nanoparticles tested for genotoxicity with the comet and micronucleus assays in vitro, ex vivo and in vivo // *Mutat. Res. Genet. Toxicol. Environ. Mutagen.* 2019. Vol. 843. P. 57–65.

## RADIOPROTECTIVE EFFECT OF NANOCERIUM BY IRRADIATION OF MICE WITH CARBON IONS IN MEDIUM AND LETHAL DOSES

Corresponding Member of the RAS **V. E. Balakin<sup>a</sup>, O. M. Rozanova<sup>b</sup>, E. N. Smirnova<sup>b</sup>, T. A. Belyakova<sup>a,#</sup>, N. S. Strelnikova<sup>a</sup>, A. V. Smirnov<sup>a</sup>, and A. G. Vasilyeva<sup>c</sup>**

<sup>a</sup>Branch “Physical-Technical Center” of P.N. Lebedev Physical Institute of the Russian Academy of Sciences, Protvino, Russian Federation

<sup>b</sup>Institute of Theoretical and Experimental Biophysics of the Russian Academy of Sciences, Pushchino, Russian Federation

<sup>c</sup>Institute for High Energy Physics named by A.A. Logunov of National Research Centre “Kurchatov Institute”, Protvino, Russian Federation

<sup>#</sup>e-mail: belyakovata@lebedev.ru

The data of the study of the radioprotective properties of nanocerium (nCeO<sub>2</sub>) after total irradiation of mice with carbon ions in medium and lethal doses according to the micronucleus test and the criterion of 30-day survival are presented. A significant protective effect of nCeO<sub>2</sub> upon irradiation at medium doses was observed at per os introducing for 5 days before irradiation, that is, with long-term prophylactic use. Mice survival data show no protective effect of per os introducing nCeO<sub>2</sub> in contrast to micronucleus test results. The radioprotective effect was observed with injections of both nCeO<sub>2</sub> and saline solution 24 h before or immediately after irradiation for both methods used. The data obtained revealed the dependence of the observed effects on the mode and time of nCeO<sub>2</sub> introducing, the influence of the solvent, the level of doses and the quality of radiation, and also demonstrate the possibility of using nanocerium preparations to protect organisms from radiation with high LET values and the importance of further studies of the radioprotective properties of new nanomaterials.

**Keywords:** cerium nanoparticles, carbon ions, micronucleus, survival, mice

УДК 574.522:591.1 (268)

## ЭНТРОПИЯ И ЭФФЕКТИВНОСТЬ РОСТА У МОРСКИХ ВИДОВ РЫБ АРКТИКИ

© 2022 г. Л. И. Карамушко<sup>1,\*</sup>

Представлено академиком РАН Г.Г. Матишовым

Поступило 30.06.2022 г.

После доработки 10.07.2022 г.

Принято к публикации 11.07.2022 г.

На основании собственных экспериментальных данных и литературных сведений исследованы механизмы процессов обмена энергией у рыб, обитающих в высокоширотных районах Арктики. Показано, что потребление энергии в расчете на единицу роста становится тем экономнее, чем медленнее они растут (низкая удельная скорость роста). В этом случае процесс роста у рыб при более низких температурах становится все более эффективным, и они могут расти с минимальными затратами энергии. При низких температурах внутренние процессы замедляются и отходы накапливаются медленнее, что приводит к высвобождению меньшего количества лишнего тепла, которое генерируется метаболическими процессами и ежедневной деятельностью. У пойкилотермных животных эта стратегия использования низкоэнтропийной энергии и “сбрасывания” высокоэнтропийной теплоты при низких температурах весьма эффективна.

*Ключевые слова:* энергетический обмен, энтропия, рост, адаптации, рыбы Арктики

**DOI:** 10.31857/S2686738922060105

При исследовании энергетики пойкилотермных водных организмов главным определяющим термодинамическим параметром является температура, которая, влияя на скорость и регуляцию биохимических реакций, в значительной степени изменяет интенсивность метаболизма в целом и соотношение между отдельными метаболическими путями. Следовательно, влияние температуры будет отражаться и на величине метаболического потока, который определяет общие энергетические затраты организма. В результате этого воздействие низких температур в значительной степени может изменять качественные и количественные показатели метаболических и продукционных процессов у морских животных, обитающих в высокоширотных районах Арктики, где условия существования видов изменяются в результате значительных пространственно-временных колебаний абиотических и биотических факторов.

В целом эффекты, вызываемые изменениями температуры, обусловлены восприимчивостью биохимических процессов, в том числе функций ферментов, и тем самым направляются адаптаци-

онными возможностями организма. Выявлению основных принципов организации таких адаптаций придается большое значение, поскольку их главные “консервативные” цели состоят в приспособлении интенсивности энергетического обмена, сохранении надлежащей структуры макромолекул, и, что еще очень важно, в регуляции клеточного метаболизма [1]. И хотя для каждого функционального компонента характерны свои специфические реакции на температуру, разным биохимическим системам свойственны некоторые общие особенности температурных эффектов и способов адаптации.

Живой организм – это открытая биологическая система, которая никогда не находится в равновесии и функционирует за счет свободной энергии (полезной части внутренней энергии), при этом постоянно совершая работу против навязываемого внешними условиями равновесия [2]. Как известно, общая энергия, получаемая организмом, равна:

$$\Delta H = \Delta G + T\Delta S,$$

т.е. внутренняя энергия  $\Delta H$  равна сумме свободной  $\Delta G$  и связанной энергии  $T\Delta S$ , и где  $\Delta G$  – это свободная энергия активации (полезная часть внутренней энергии, являющаяся функцией состояния);  $\Delta H$  – энтальпия активации (внутренняя или суммарная энергия);  $\Delta S$  – изменение энтропии,  $T\Delta S$  – связанная энергия, которая не мо-

<sup>1</sup> Мурманский морской биологический институт  
Российской академии наук (ММБИ РАН),  
Мурманск, Россия

\*e-mail: karamushkol@yahoo.com

жет быть использована для полезной работы (обесцененная часть внутренней энергии), и которая способна переходить только в теплоту и рассеиваться. Свободная энергия активации  $\Delta G$  для той или иной метаболической реакции не есть постоянная величина, она может изменяться в соответствии с температурными условиями обитания животных. Вклад  $\Delta H$  и  $\Delta S$  в  $\Delta G$  различен для разных химических реакций и, что особенно важно, для одних и тех же реакций, катализируемых несколько различающимися ферментами.

Особое значение для температурных эффектов имеют две энергетические характеристики — это энтальпия ( $\Delta H$  — тепловая функция, внутренняя или суммарная энергия) и энтропия ( $\Delta S$ ). Энтальпия — определенное качество вещества, указывающее на уровень энергии, характеризующий среднюю скорость движения реакционноспособных молекул, т.е. — это доступная для преобразования в теплоту энергия при сопутствующих значениях давления и температуры. Именно с величиной  $\Delta H$  связаны значительные изменения скорости реакции при относительно небольших сдвигах температуры. Такие изменения взаимоотношений между скоростью реакции, сдвигом температуры и энтальпией активации можно считать одним из важнейших способов биохимической адаптации к температуре [1].

Все это становится весьма актуальным при исследовании процессов метаболизма и роста у эктотермных животных, обитающих в высокоширотных районах Арктики в относительно узком диапазоне низких температур и имеющих низкую скорость энергетического обмена и ограниченный аэробный метаболический объем. При вопросе о том, как холодноводные эктотермные организмы могут поддерживать максимальные аэробные скорости активного обмена, возникают важные соображения: во-первых, не могут ли рассматриваться низкие температуры, как фактор “давления” на их энергетику, и второй момент касается взаимоотношения биоэнергетической специфики с процессами роста и воспроизводства у рыб при низких температурах. Изучение особенностей метаболизма и роста у полярных морских видов рыб на уровне процессов обмена энергией и составило предмет настоящего сообщения.

#### *Энергетический обмен.*

#### *Эффективность роста и энтропия*

В течение своей жизни организму необходимо столько потребить энергетических ресурсов, сколько он “сбрасывает” в окружающую себя среду, в основном в виде тепловых отходов, вырабатываемых его жизнеобеспечивающими системами. При этом следует отметить, что в каче-

ственном отношении не все типы энергии эквивалентны, поскольку они различны по происхождению [3]. Обесцененная энергия, отдаваемая живым организмом окружающей среде, находится в состоянии значительной неупорядоченности и обладает высокой энтропией. Поэтому такую энергию невозможно использовать для какой-либо полезной работы. Анализ связи между теплотой и энтропией выводит нас на следующий механизм: организм, потребляя высококачественную энергию, использует ее для поддержания и развития своих упорядоченных структур, производя при этом уже низкокачественную энергию в виде тепловых и других отходов. Под потоком теплоты подразумевается не само вещество, а определенное качество этого вещества. Поток теплоты и поток энтропии очень тесно связаны и, как говорят физики, “энтропия путешествует на волне теплоты”. Когда энергия течет через систему, она уносит прочь энтропию, подерживая, таким образом, или даже порождая, порядок на своем пути.

Функция под названием “энтропия” позволяет выявить различия между свободной энергией активации (полезной части внутренней энергии) и связанной энергией (диссипированной, обесцененной части внутренней энергии), которая теряется необратимо [4]. Ключевое слово в этом объяснении — “необратимость” (центральное свойство всякого развития), поскольку именно необратимые процессы обуславливают производство энтропии внутри организма. И. Пригожиным было показано, что разные формы энергии продуцируют качественно различающиеся изменения энтропии в открытой биологической системе, и энтропия связана именно с внутренней энергией (это важный момент, так как в обратимом процессе параллель между энтропией и энергией заканчивается). Если обозначить  $dS$  — полное приращение энтропии за интервал времени  $dt$ ,  $deS$  — относящееся к обмену энергией с внешней средой, а  $diS$  — к производству энтропии вследствие необратимых процессов внутри системы, то уравнение Пригожина имеет вид:

$$dS/dt = deS/dt + diS/dt,$$

при этом увеличение внутренней энтропии организма не изменяет знак при обмене тепла с окружающей средой, величина приращения энтропии  $diS$  может быть только положительной. А составляющая  $deS$  может быть как положительной, так и отрицательной. Таким образом, для открытой биологической системы любые изменения энтропии не равнозначны, в этом и заключается смысл уравнения  $dS/dt = deS/dt + diS/dt$ , [5]. Вероятное изменение внутренней энтропии  $diS$  отличается от изменения  $deS$ , обуславливаемого колебаниями таких факторов, как температура, конвекция, излучение. Например, низкие темпе-

ратуры ведут к снижению  $deS$ , а значит и к увеличению свободной энергии.

В живых организмах используется такой механизм энергетического сопряжения, что системы, переносящие энергию, заряжаются в одних условиях, а разряжаются в других, и в первом случае система удаляется от того равновесия, к которому она будет возвращаться во втором [1]. Такой анализ показывает нам, что все анаболические или связанные с выполнением клеткой работы реакции сопряжены с катаболическими реакциями, приводящими к синтезу АТФ (аденозинтрифосфата). Химическая основа сопряжения таких реакций как раз и состоит в переносе энергии между этими блоками в форме АТФ. Сопряжение осуществляется при участии структурных элементов клетки, при этом, несомненно, биосинтетический процесс различных специфических клеточных компонентов в организме сопровождается генерированием энтропии, интенсивность которой определяется пространственной структурой макромолекул синтезируемого продукта. И чем сложнее структура этого продукта, тем в большей степени уменьшается энтропия при синтезе ( $diS$ ), но при этом наблюдается больший прирост диссипативной энтропии ( $deS$ ) [4].

При низких температурах обитания и сезонной ограниченности кормовых ресурсов пойкилотермные организмы высокоширотных районов Арктики растут значительно медленнее по сравнению с умеренными и тропическими видами. Проводимые нами исследования с тремя видами камбал — *Liopsetta glacialis* полярной камбалой, *Pleuronectes platessa* морской камбалой и *Scophthalmus maeoticus* черноморским калканом, показали, что у полярной камбалы, которая проводит значительную часть года при отрицательных придонных температурах [6], удельная скорость роста ( $C_w$ ) самая низкая (рис. 1).

Несомненно, значительное влияние на изменение потока энтропии оказывают такие важнейшие функциональные процессы клеточного метаболизма, как биосинтез, рост, интеграция. Рост организмов в основном поддерживается процессами, протекающими с потреблением большого количества энергии — это белковый рост и сохранение баланса между синтезом и распадом белков [7]. Поэтому усиление энергообмена, связанного с метаболическим выделением теплоты в результате переваривания и абсорбции пищи (так называемое специфическое динамическое действие, СДД), вызывает увеличение скорости синтеза и оборота белка и тем самым отражает энергетические расходы, связанные с ростом, что описывается уравнением:  $Q = rP$ , где  $P$  — энергетические затраты на рост организма,  $r$  — коэффициент пропорциональности, описывающий энергетическое содержание единицы роста. Исследовать эту

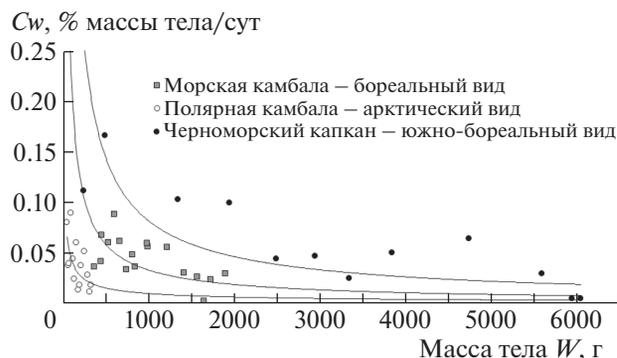


Рис. 1. Изменение скорости роста  $C_w$  с массой тела  $W$  у рыб семейства Pleuronectidae, обитающих в разных областях Мирового океана.

зависимость можно на основании свойств и взаимодействий двух процессов — энергетического обмена и роста, и предположить, что у рыб усиление интенсивности синтеза белка объясняет большую часть расходов энергии на СДД пищи. Результаты наших экспериментальных исследований показывают, что абсолютное увеличение энергетических затрат (максимальные значения пищевого обмена) на специфическое динамическое действие пищи для рыб, обитающих при низких температурах, ниже, чем для рыб умеренных и тропических широт. Однако это приводит к большей продолжительности СДД и тем самым снижает удельную скорость потребления пищи. Анализ рассчитанных нами годовых рационов рыб в природных условиях подтверждает этот вывод: потребление пищи у рыб высоких широт ниже, чем у рыб, обитающих в средних и низких широтах (табл. 1). Основываясь на полученных данных, следует отметить, что такая минимизация потребления энергетических ресурсов в течение года и может являться одним из механизмов адаптации к жизни у пойкилотермных организмов, обитающих в высокоширотных районах Арктики.

Рассматривая биохимические адаптации в их взаимосвязи, мы отмечаем, как два отдельных, но энергетически сопряженных этапа метаболического процесса могут привести к перестройкам других особенностей организма в целом. Например, нами ранее показаны низкие скорости энергетического обмена у арктических видов рыб [8]. Этот факт позволяет нам полагать, что адаптивной стратегией в экстремальных высокоширотных условиях для пойкилотермных организмов может быть экономия энергетических затрат на поддерживающие жизнедеятельность функции, обеспечивающая освобождение части энергии для роста. При низких температурах у рыб такая экономия энергии может быть максимальной. Поскольку усвоенная организмом энергия пищи, необходимая для роста, может быть получена

**Таблица 1.** Годовые рационы арктических и бореальных видов рыб в природных условиях

Возраст, лет	Годовой рацион, % массы тела				
	Атлантическая треска (Северное море, $t = 8^\circ$ )	Атлантическая треска (Баренцево море, $t = 2^\circ$ )	Сайка (Арктика)	Ледяная треска (Арктика)	Морская камбала (Баренцево море)
1–2	758.9	524.8	400.9	–	409.6
2–3	540.8	402.3	330.7	–	334.8
3–4	464.9	364.0	337.5	–	280.1
4–5	388.6	322.1	313.1	–	279.5
5–6	355.1	292.6	276.4	269.8	181.7
6–7	337.7	270.6	276.0	238.1	178.8
7–8	328.4	253.3	–	–	167.8
8–9	319.5	239.3	–	219.1	163.6
9–10	310.3	227.7	–	207.9	159.6

Рационы определены по данным собственных респирометрических экспериментов.

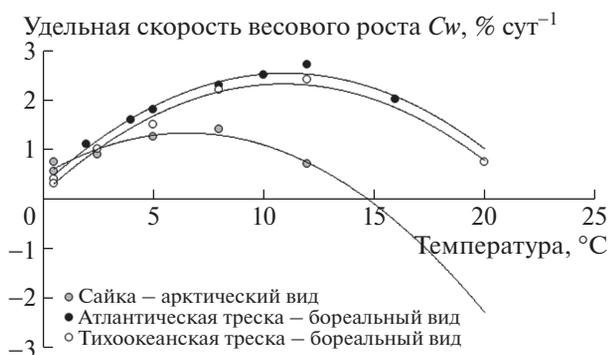
только двумя путями: либо за счет подавления других энергоемких функций, включенных в базальные энергетические затраты на поддержание жизнедеятельности, либо путем увеличения эффективности преобразования пищи в энергию ковалентных связей в молекулах белков, жиров и углеводов в процессе роста организма.

Биоэнергетические исследования количественных закономерностей соотношений соматического, генеративного и энергетического обмена мы также проводили и на некоторых представителях семейства тресковых – это *Boreogadus saida* сайка, *Gadus morhua* атлантическая треска и *Gadus macrocephalus* тихоокеанская треска. В этих работах на основе собственных экспериментальных измерений скорости роста при различных температурах и в режиме кормления до насыщения (при максимальных рационах) показано, что для всех трех видов тресковых удельная скорость

роста с повышением температуры начинает быстро расти (рис. 2). С приближением к температурному оптимуму значения скорости роста достигают максимума и выходят на низкое плато. После чего кривая зависимости резко снижается под влиянием высоких температур, особенно у арктического вида – сайки.

Арктические виды рыб, например сайка, обитают большую часть года в воде, покрытой льдом, с отрицательной температурой. Поэтому температурный оптимум роста, как и следовало ожидать, сдвигается в направлении от арктического к бореальному виду, т.е. сдвиг происходит в сторону более высоких температур (рис. 2). А температуры, превышающие оптимальные для роста, приводят, как правило, к снижению эффективности конвертирования пищи [10], что может оказывать существенное влияние на способность эффективно использовать энергетические ресурсы на процессы роста и размножения. Следует отметить, что при низких температурах (около  $0^\circ\text{C}$ ) скорость весового роста  $C_w$  у арктического вида – сайки, выше, чем у бореальных холодноводных рыб. Что указывает на более высокую степень эффективности прироста соматических и генеративных тканей у арктических видов.

Таким образом, анализ механизмов, лежащих в основе процессов обмена энергией у рыб, обитающих в высокоширотных районах Арктики, показывает, что потребление энергии в расчете на единицу роста становится тем экономнее, чем медленнее они растут (низкая удельная скорость роста). То есть процесс роста у рыб при более низких температурах становится все более эффективным, и они могут расти с минимальными затратами энергии. А поскольку при низких температурах все внутренние процессы замедляются и отходы накапливаются медленнее, то организм высвобождает меньше лишнего тепла, генерируе-



**Рис. 2.** Изменение скорости роста  $C_w$  с температурой у рыб семейства Gadidae, обитающих в разных областях Мирового океана. Все значения рассчитаны по нашим экспериментальным данным при кормлении в режиме *ed libitum*, для трески из Берингова моря определяли по [9].

мого его метаболическими процессами и ежедневной деятельностью. В этом и заключается эффективная стратегия использования низкоэнтропийной энергии и “сбрасывания” высокоэнтропийной теплоты при низких температурах у пойкилотермных животных. Организм и окружающая его среда, таким образом, участвуют в термодинамическом действии — организм выпускает излишек теплоты, что приводит к снижению энтропии, тогда как среда принимает эту теплоту и повышает свою энтропию. То есть рост энтропии среды компенсирует снижение энтропии, благодаря внутренним процессам биосинтеза при низких температурах, — и тем самым обеспечивает рост суммарной энтропии.

И в заключение хотелось бы отметить, что все живое находится в глубокой связи не только между собой, но также со звездами, планетами и другими упорядоченными структурами: жизнь — это еще одно средство, при помощи которого Вселенная высвобождает энтропийный потенциал, запертый в веществе [11].

#### ИСТОЧНИК ФИНАНСИРОВАНИЯ

Работа выполнена по теме “Биология, экофизиология и разнообразие рыб Арктики” (№ госрегистрации 121091600098-9) в рамках государственного задания ММБИ РАН.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Hochachka P.W., Somero G.N.* Biochemical Adaptation: Mechanism and Process in Physiological Evolution. Oxford; N.Y.: Oxford Univ. Press, 2002. 466 p.
2. *Бауэр Э.С.* Теоретическая биология. // М.-Л.: Изд-во ВИЭМ, 1935. 206 с.
3. *Иванов К.П.* Новые биологические проблемы в энергетике живых систем // Успехи современной биологии. 2016. Т. 136. № 6. С. 586–592.
4. *Пригожин И.* Введение в термодинамику необратимых процессов. М.: Иностранная литература, 1960. 150 с.
5. *Пригожин И., Стенгерс И.* Порядок из хаоса. Новый диалог человека с природой. М.: Прогресс, 1986. 432 с.
6. *Андрияшев А.П.* Рыбы северных морей СССР. М.; Л.: Изд-во АН СССР, 1954. 556 с.
7. *Fraser K.P.P., Rogers A.D.* Protein metabolism in marine animals: the underlying mechanism of growth // Adv. Mar. Biol. 2007. V. 52. P. 267–362.
8. *Карамушко Л.И., Шатуновский М.И.* Адаптивная значимость различных форм метаболических процессов у морских видов рыб высоких широт // Успехи современной биологии. 2018. Т. 138. № 1. С. 12–17.
9. *Laurel B.J., Spencer M., Iseri P., et al.* Temperature-dependent growth and behavior of juvenile Arctic cod (*Boreogadus saida*) and co-occurring North Pacific gadids // Polar Biology. 2016. V. 39. iss. 6. P. 1127–1135.
10. *Jobling M.* Fish Bioenergetics. London: Chapman & Hall., 1994. 309 p.
11. *Грин Б.* До конца времен: Сознание, материя и поиск смысла в меняющейся Вселенной / Брайан Грин; Пер. с англ. — М.: Альпина нон-фикшн, 2021. 548 с.

## ENTROPY AND EFFICIENCY OF GROWTH IN MARINE FISH SPECIES OF THE ARCTIC

L. I. Karamushko<sup>a,#</sup>

<sup>a</sup> *Murmansk Marine Biological Institute, Russian Academy of Sciences (MMBI RAS), Murmansk, Russian Federation*

<sup>#</sup>*e-mail: karamushkol@yahoo.com*

Presented by Academician of the RAS G.G. Matishov

The mechanisms of the energy exchange processes in fish living in high-latitude regions of Arctic were investigated on the basis of our native experimental data and literature knowledge. It is shown that energy consumption per unit of growth becomes more sparingly when they grow slower (low specific growth rate). In this case, the growth process of fish at lower temperatures becomes more and more efficient, and they can grow with minimal energy expenditure. At low temperatures, internal processes slow down and waste accumulates more slowly, which leads to the release of less excess heat generated by metabolic processes and daily activities. In poikilothermic animals this strategy of using low-entropic energy and “dumping” high-entropic heat at low temperatures is very effective.

*Keywords:* energy metabolism, entropy, growth, adaptations, fishes of the Arctic

УДК 616.92

## ВЗАИМОСВЯЗЬ ГЕНОТИПА ГЛАВНОГО КОМПЛЕКСА ГИСТОСОВМЕСТИМОСТИ КЛАССА I С ЛЕТАЛЬНОСТЬЮ COVID-19 У ПАЦИЕНТОВ С САХАРНЫМ ДИАБЕТОМ

© 2022 г. М. Ю. Шкурников<sup>1,2,\*</sup>, Д. А. Аверинская<sup>1</sup>, А. Г. Комаров<sup>3</sup>, И. А. Карбышев<sup>3</sup>,  
Г. И. Спешилов<sup>3</sup>, И. А. Штинова<sup>3</sup>, Д. А. Дорошенко<sup>4</sup>,  
В. И. Вечорко<sup>4</sup>, академик РАН О. М. Драпкина<sup>5</sup>

Поступило 11.08.2022 г.

После доработки 31.08.2022 г.

Принято к публикации 02.09.2022 г.

В многочисленных исследованиях было показано, что сахарный диабет (СД) повышает риск летального исхода COVID-19 в пять раз. Принято считать, что высокая летальность COVID-19 на фоне СД обусловлена основными осложнениями данного заболевания: микро- и макроангиопатиями, сердечной и почечной недостаточностью. Кроме того, показано, что острая респираторная вирусная инфекция увеличивает выработку интерферона гамма и повышает резистентность мышц к инсулину, модулирует активность эффекторных CD8+ Т-лимфоцитов. Способность CD8+ Т-лимфоцитов распознавать зараженные SARS-CoV-2 клетки зависит не только от гуморальных факторов, но и от индивидуальных генетических особенностей, в том числе индивидуального набора молекул главного комплекса гистосовместимости класса I (ГКГС-I). В данном исследовании на выборке из 222 пациентов была изучена взаимосвязь генотипа ГКГС-I пациентов с СД в возрасте не старше 60 лет с исходом COVID-19. Показано, что летальные исходы COVID-19 у пациентов с СД связаны с низкой аффинностью взаимодействия индивидуального набора молекул ГКГС-I с пептидами SARS-CoV-2.

*Ключевые слова:* COVID-19, HLA, ГКГС-I, сахарный диабет

**DOI:** 10.31857/S2686738922060324

### ВВЕДЕНИЕ

В многочисленных исследованиях было показано, что сахарный диабет (СД) повышает риск летального исхода COVID-19 в пять раз [1, 2]. Принято считать, что высокая летальность от COVID-19 на фоне СД обусловлена основными осложнениями данного заболевания: микро- и макроангиопатиями, сердечной и почечной не-

достаточностью. Кроме того, показано, что острая респираторная вирусная инфекция увеличивает выработку интерферона гамма и повышает резистентность мышц к инсулину, что осложняет течение СД. Резистентность к инсулину, в свою очередь, приводит к компенсаторной гиперинсулинемии для поддержания нормального уровня глюкозы. Следует отметить, что гиперинсулинемия может повышать противовирусный иммунитет за счет прямой стимуляции функциональной активности CD8+ эффекторных Т-клеток [3].

Эффекторные CD8+ Т-лимфоциты играют ключевую роль в противовирусном иммунитете на начальных этапах COVID-19 [4]. Молекулы главного комплекса гистосовместимости (ГКГС) класса I определяют эффективность презентации антигенов COVID-19. Сразу после попадания в клетку SARS-CoV-2 индуцирует трансляцию своих белков. Часть из них попадает в протеасому инфицированной клетки, расщепляется до пептидов длиной 8–12 аминокислотных остатков и связывается с молекулами ГКГС класса I. После связывания комплекс, состоящий из молекулы ГКГС класса I и вирусного пептида, переносится из комплекса Гольджи на поверхность клетки, где

<sup>1</sup> НИУ Высшая школа экономики, Факультет биологии и биотехнологии, Москва, Россия

<sup>2</sup> Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова Российской академии наук, Москва, Россия

<sup>3</sup> ГБУЗ “Диагностический центр (Центр лабораторных исследований) Департамента здравоохранения города Москвы”, Москва, Россия

<sup>4</sup> ГБУЗ “Городская клиническая больница № 15 им. О.М. Филатова” Департамента здравоохранения г. Москвы, Москва, Россия

<sup>5</sup> ФГБУ “Национальный медицинский исследовательский центр терапии и профилактической медицины” Министерства здравоохранения Российской Федерации, г. Москва, Россия

\*e-mail: mshkurnikov@hse.ru

он может быть распознан Т-клеточным рецептором CD8<sup>+</sup> эффекторного Т-лимфоцита. В ответ на взаимодействие CD8<sup>+</sup> Т-лимфоцит активируется и разрушает инфицированную клетку с помощью перфоринов и сериновых протеаз [5].

Молекулы ГКГС класса I кодируются генами HLA-A, HLA-B и HLA-C, каждый из которых может быть представлен в двух вариантах (аллелях). В популяции существуют десятки вариантов каждого аллеля, кодирующих молекулы ГКГС-I с индивидуальной способностью взаимодействовать с чужеродными пептидами. Индивидуальные комбинации молекул ГКГС-I существенно влияют на тяжесть многих инфекционных заболеваний [6].

Ранее нами было показано, что генотип HLA-I является значимым фактором риска тяжелого течения COVID-19 только у пациентов в возрасте не старше 60 лет [6]. Целью данного исследования была оценка вклада HLA-I генотипа у пациентов с СД в возрасте не старше 60 лет в исход COVID-19.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В исследование были включены 36 пациентов с сахарным диабетом 1 и 2 типа (коды МКБ E10 и E11), переболевшие COVID-19. В качестве группы сравнения была подобрана сопоставимая по возрасту группа из 186 пациентов, переболевших COVID-19 без сахарного диабета в анамнезе. Протокол исследования был одобрен этическим комитетом ГБУЗ ГКБ № 15 им. О.М. Филатова ДЗМ. Все пациенты подписали информированное согласие.

Оценка уровня D-димера осуществлялась на коагулометре ACL TOP 700 (IL Werfen, США) с помощью набора реагентов D-Dimer HS 500 (№ 0020500100). Уровень С-реактивного белка (СРБ) определялся с помощью набора реагентов CRP\_2 (№ 06522059) на биохимическом анализаторе ADVIA 1800 (Siemens, ФРГ).

Геномную ДНК выделяли из замороженных образцов цельной крови с использованием набора реагентов ПРОБА-ГС-ГЕНЕТИКА (ООО "НПО ДНК-Технология", Россия). Библиотеки для секвенирования 2 и 3 экзоны генов HLA-A, HLA-B и HLA-C готовили с помощью набора реагентов HLA-Эксперт (ООО "ДНК-Технологии", Москва, Россия). Секвенирование осуществляли с помощью платформы MiSeq (Illumina, Сан-Диего, Калифорния, США) в режиме парноконцевого чтения по 250 нуклеотидов с использованием набора реагентов набора реагентов MiSeq 600 cycles v3. Аннотирование результатов секвенирования осуществлялось с использованием базы данных последовательностей основного комплекса гистосовместимости человека IMGT/HLA v3.41.0 [7].

Оценку отклонения распределений частот генотипов от канонического распределения Харди-Вайнберга проводили с помощью критерия Хи-квадрат, оценку степени различий по частоте аллелей между исследуемыми группами проводили с помощью точного критерия Фишера. Сравнение значимости различий в уровне D-димера и СРБ проводили с использованием критерия Вилкоксона. Статистический анализ результатов осуществлялся в среде R.

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Была сформирована выборка из 222 пациентов, переболевших COVID-19, выполнено HLA-генотипирование и проведен анализ данных уровня D-димера и С-реактивного белка. Характеристика пациентов представлена в табл. 1. Группы сравнения значимо различались по исходу заболевания. Так, в группе пациентов с СД было отмечено 8 летальных исходов против 18 в группе сравнения (отношение шансов (ОШ) – 2.65,  $p = 0.4$ , 95% доверительный интервал (ДИ) 0.9–7.2). Подобная частота летальных исходов в два раза превосходит полученные ранее результаты для сопоставимой по возрасту выборки пациентов с СД [8]. Более высокая летальность может быть связана с тем, что в наше исследование вошли пациенты со среднетяжелым и тяжелым течением COVID-19. Необходимо отметить высокую частоту встречаемости ожирения (ОШ – 9.1, ДИ 3.8–22.3,  $p = 7.4e-08$ ) и гипертонической болезни (ОШ – 5.1, ДИ 2.3–12.1,  $p = 1.6e-05$ ) в группе пациентов с СД.

Анализ уровня СРБ показал, что его концентрация в плазме крови во время COVID-19 значимо выше у пациентов с СД (рис. 1а). Так, у пациентов без СД максимальный уровень СРБ составлял 60 (8–117) мг/л против 123 (62–170) мг/л у пациентов с СД ( $p < 0.01$ ). СРБ преимущественно вырабатывается гепатоцитами в ответ на воздействие провоспалительных цитокинов, прежде всего интерлейкинов 6 и 1 [9, 10]. Принято считать, что высокий уровень СРБ характерен для бактериальных инфекций, так как он способен связываться с полисахаридами бактериальной стенки и инициировать комплекс комплемента через C1q [11]. При COVID-19 СРБ может не только подавлять сопутствующую бактериальную инфекцию, но и активизировать Т-клеточный иммунитет. Связываясь с фосфатидилхолином на поверхности апоптозных альвеоцитов, СРБ усиливает классический путь активации комплемента, что облегчает их поглощение макрофагами, имеющими рецепторы для комплемента CR3 и CR4 [12].

В группе пациентов с СД также был отмечен повышенный уровень D-димера (рис. 1б). У пациентов без СД максимальный уровень D-димера

**Таблица 1.** Характеристика выборки пациентов с COVID-19

Показатель	Пациенты с СД	Пациенты без СД	<i>p</i>
<i>n</i>	36	186	
Возраст, медиана [25%–75%]	50.5 [44–58]	47.5 [44–51]	0.07
Пол (муж./жен.)	23/13	106/80	0.47
Тяжесть			
Средняя	26	141	0.68
Тяжелая	10	45	
Исход			
Летальный	8	18	<b>0.04</b>
Выписан	28	168	
Ожирение	19	20	<b>7.4e-08</b>
Сердечно-сосудистые заболевания	8	19	0.053
Гипертония	24	52	<b>1.6e-05</b>
Заболевания органов дыхания	4	10	0.25
Онкологические заболевания в стадии ремиссии	2	8	0.67

составлял 830 (453–1578) нг/мл при максимальных значениях у пациентов с СД 1591 (1182–5014) нг/мл ( $p < 0.01$ ). D-димер – продукт распада фибрина. Его высокий уровень при COVID-19 ассоциирован с микротромбозом капилляров и обструкцией легочных сосудов [13]. В то же время показано, что уровень D-димера не является независимым фактором риска для пациентов в возрасте до 70 лет [14].

HLA-генотипирование пациентов показало, что наиболее частыми аллелями в группе пациентов без СД были HLA-A\*02:01 (частота 0.26) и HLA-A\*01:01 (частота 0.14), что характерно для популяции московского региона [6]. Малый объем выборки не позволил выявить взаимосвязи отдельных аллелей HLA-I с СД (табл. 2). Тем не менее был оценен индекс риска тяжелого течения

**Таблица 2.** Характеристика частот аллелей ГКГС-I в выборке пациентов с COVID-19

Аллель	Частота аллели в группе		<i>p</i>	ОШ
	без СД	СД		
HLA-A*02:01	0.26	0.38	0.1	1.86
HLA-A*01:01	0.14	0.07	0.2	0.48
HLA-C*04:01	0.14	0.15	0.84	1.14
HLA-A*03:01	0.13	0.17	0.41	1.38
HLA-C*07:02	0.13	0.09	0.51	0.65
HLA-C*07:01	0.11	0.17	0.27	1.65
HLA-C*12:03	0.11	0.12	0.83	1.08
HLA-C*06:02	0.1	0.07	0.64	0.72
HLA-A*11:01	0.09	0.04	0.22	0.44
HLA-B*07:02	0.09	0.09	1	0.93

COVID-19 [6], отражающий интегральную способность индивидуального набора молекул ГКГС-I презентировать пептиды SARS-CoV-2 (рис. 2). Различия в индексе риска между пациентами без СД оказались недостоверными ( $p = 0.69$ ). Однако в группе пациентов с СД индекс риска значительно различался между выздоровевшими пациентами и пациентами с летальным исходом ( $p = 0.011$ ). При пороговом уровне индекса риска 53 чувствительность прогноза летального исхода составила 100%, а специфичность – 39.3% (AUC = 0.8). В группе пациентов с СД и индексом риска более 53 было отмечено 7 летальных исходов против 1 в группе с индексом риска менее 53 (ОШ – 10.2,  $p = 0.4$ , 95% ДИ 1.1–514). Данные результаты могут свидетельствовать о существенном вкладе способности ГКГС-I презентировать пептиды вируса SARS-CoV-2 в тяжесть течения COVID-19 у пациентов с СД.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

1. Анализ уровня СРБ и D-димера подтверждает данные о более сильной воспалительной реакции и микротромбозе у пациентов с СД по сравнению с пациентами с нормальным гликемическим контролем.

2. Летальные исходы COVID-19 у пациентов с СД связаны с низкой аффинностью взаимодействия индивидуального набора молекул ГКГС-I с пептидами SARS-CoV-2.

3. Настоящее исследование демонстрирует дополнительные возможности в оценке риска тяжести течения COVID-19 у пациентов с СД.

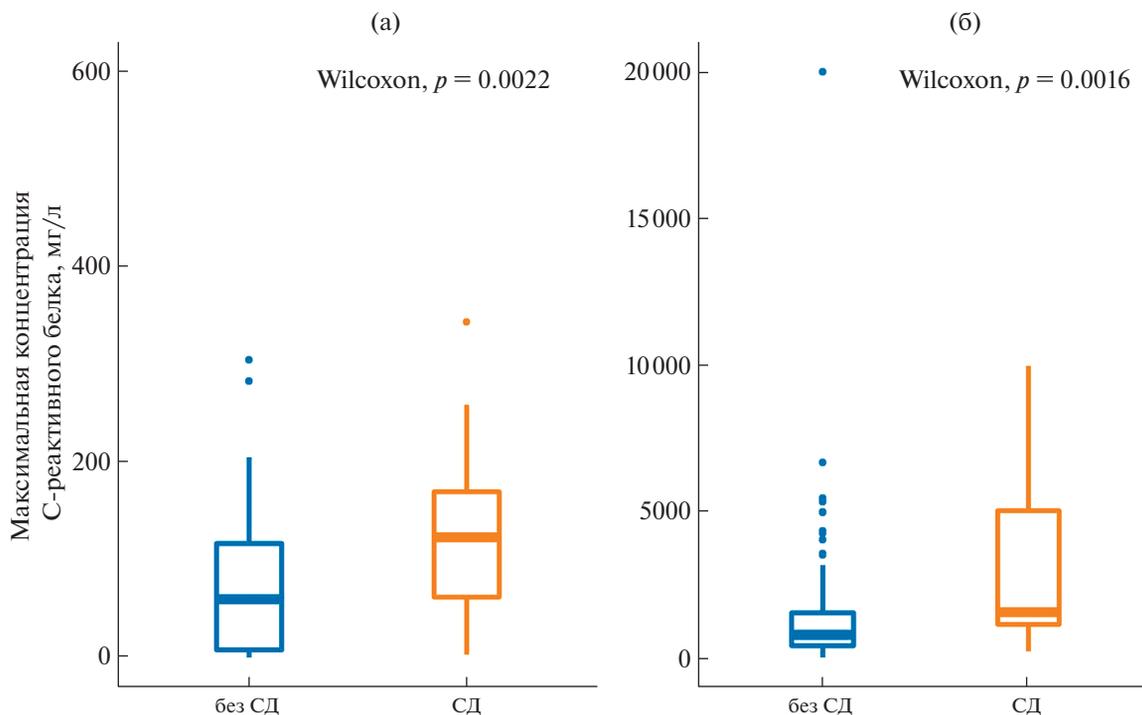


Рис. 1. Панель а – максимальная концентрация СРБ в группах сравнения. Панель б – максимальная концентрация D-димера в группах сравнения.

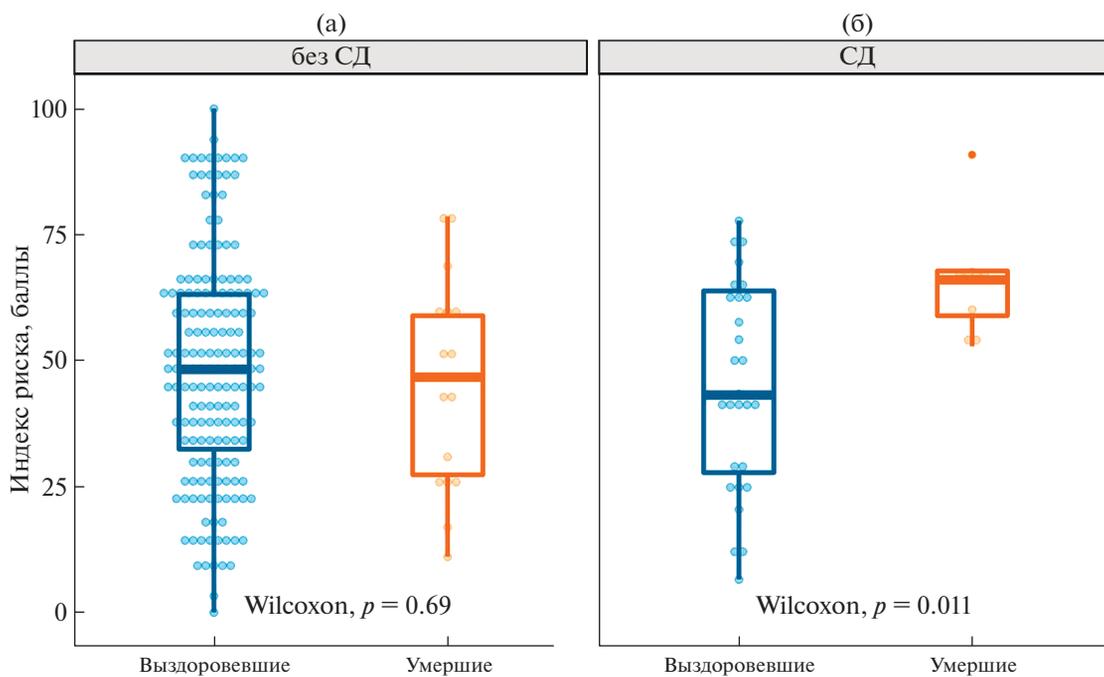


Рис. 2. Взаимосвязь индекса риска тяжелого течения COVID-19 с фактическим течением заболевания в группах сравнения.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Все авторы сообщают об отсутствии конфликта интересов.

ИСТОЧНИКИ ФИНАНСИРОВАНИЯ

Работа выполнена в рамках реализации программы ДЗМ “Научное обеспечение столичного здравоохра-

нения на 2020–2022 гг.”.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Shafiee A., Teymouri Athar M.M., Nassar M., et al.* Comparison of COVID-19 outcomes in patients with Type 1 and Type 2 diabetes: A systematic review and meta-analysis // *Diabetes & Metabolic Syndrome: Clinical Research & Reviews*. 2022. V. 16. № 6. P. 102512.
2. *Yang J.K., Feng Y., Yuan M.Y., et al.* Plasma glucose levels and diabetes are independent predictors for mortality and morbidity in patients with SARS. // *Diabet Med*. 2006. V. 23. № 6. P. 623–628.
3. *Šestan M., Marinović S., Kavazović I., et al.* Virus-Induced Interferon- $\gamma$  Causes Insulin Resistance in Skeletal Muscle and Derails Glycemic Control in Obesity // *Immunity*. 2018. V. 49. № 1. P. 164–177.e6.
4. *Kusnadi A., Ramírez-Suástegui C., Fajardo V., et al.* Severely ill COVID-19 patients display impaired exhaustion features in SARS-CoV-2-reactive CD8+ T cells. // *Sci Immunol*. 2021. V. 6. № 55.
5. *Wherry E.J., Ahmed R.* Memory CD8 T-cell differentiation during viral infection. // *J Virol. American Society for Microbiology (ASM)*, 2004. V. 78. № 11. P. 5535–5545.
6. *Shkurnikov M., Nersisyan S., Jankevic T., et al.* Association of HLA Class I Genotypes With Severity of Coronavirus Disease-19 // *Front Immunol. Frontiers*, 2021. V. 12. P. 641900.
7. *Robinson J., Barker D.J., Georgiou X., et al.* IPD-IMGT/HLA Database // *Nucleic Acids Res*. 2020. V. 48. № D1. P. D948–D955.
8. *Shestakova M.V., Vikulova O.K., Isakov M.A., et al.* Diabetes and COVID-19: analysis of the clinical outcomes according to the data of the russian diabetes registry // *Problems of Endocrinology*. 2020. V. 66. № 1. P. 35–46.
9. *du Clos T.W., Mold C.* C-Reactive Protein: An Activator of Innate Immunity and a Modulator of Adaptive Immunity // *Immunol Res*. 2004. V. 30. № 3. P. 261–278.
10. *Szalai A.J., van Ginkel F.W., Dalrymple S.A., et al.* Testosterone and IL-6 requirements for human C-reactive protein gene expression in transgenic mice. // *J Immunol*. 1998. V. 160. № 11. P. 5294–5299.
11. *Volanakis J.* Human C-reactive protein: expression, structure, and function // *Mol Immunol*. 2001. V. 38. № 2–3. P. 189–197.
12. *Pittoni V., Valesini G.* The clearance of apoptotic cells: implications for autoimmunity. // *Autoimmun Rev*. 2002. V. 1. № 3. P. 154–161.
13. *Goudot G., Chocron R., Augy J.-L., et al.* Predictive Factor for COVID-19 Worsening: Insights for High-Sensitivity Troponin and D-Dimer and Correlation With Right Ventricular Afterload // *Front Med (Lausanne)*. 2020. V. 7.
14. *Chocron R., Duceau B., Gendron N., et al.* D-dimer at hospital admission for COVID-19 are associated with in-hospital mortality, independent of venous thromboembolism: Insights from a French multicenter cohort study // *Arch Cardiovasc Dis*. 2021. V. 114. № 5. P. 381–393.

## ASSOCIATION OF HLA CLASS I GENOTYPE WITH MORTALITY IN PATIENTS WITH DIABETES MELLITUS AND COVID-19

**M. Yu. Shkurnikov<sup>a,b,#</sup>, D. A. Averinskaya<sup>a</sup>, A. G. Komarov<sup>c</sup>, I. A. Karbyshev<sup>c</sup>, G. I. Speshilov<sup>c</sup>, I. A. Shtinova<sup>c</sup>, D. A. Doroshenko<sup>d</sup>, V. I. Vechorko<sup>d</sup>, and Academician of the RAS O. M. Drapkina<sup>e</sup>**

<sup>a</sup> Faculty of Biology and Biotechnology, HSE University, Moscow, Russian Federation

<sup>b</sup> Shemyakin-Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry, Russian Academy of Sciences, Moscow, Russian Federation

<sup>c</sup> Moscow City Public Institution of Health Care Diagnostic Center (Laboratory Testing Center) of Moscow Health Department, Moscow, Russian Federation

<sup>d</sup> Moscow City Public Institution of Health Care O.M. Filatov City Clinical Hospital of Moscow Health Department, Moscow, Russian Federation

<sup>e</sup> National Medical Research Center for Therapy and Preventive Medicine, Moscow, Russian Federation

<sup>#</sup>e-mail: mshkurnikov@hse.ru

Numerous studies have shown that diabetes mellitus (DM) increases the risk of death from COVID-19 by five times. It is generally accepted that the high lethality of COVID-19 against the background of DM is due to the main complications of this disease: micro- and macroangiopathies, heart and kidney failure. In addition, it has been shown that acute respiratory viral infection increases interferon-gamma production and muscle resistance to insulin, modulating the activity of effector CD8+ T-lymphocytes. The ability of CD8+ T lymphocytes to recognize SARS-CoV-2 infected cells depends on the individual set of major histocompatibility complex class I (MHC-I) molecules. In this study, on a sample of 222 patients, the association of the MHC-I genotype of patients with diabetes aged less than 60 years with the outcome of COVID-19 was studied. It has been shown that lethal outcomes of COVID-19 in patients with DM are associated with the low affinity of the interaction of an individual set of MHC-I molecules with SARS-CoV-2 peptides.

**Keywords:** COVID-19, HLA, MHC-I, CD

УДК 577.1-612.011-611-018.54

## ЛИПОПРОТЕИДЫ ПЛАЗМЫ КРОВИ: ОКИСЛЯЕМОСТЬ И УЧАСТИЕ В ТРАНСПОРТЕ АЦИЛГИДРОПЕРОКСИ-ПРОИЗВОДНЫХ ФОСФОЛИПИДОВ

© 2022 г. В. З. Ланкин<sup>1,\*</sup>, А. К. Тихазе<sup>1</sup>, В. Я. Косач<sup>1</sup>, А. Д. Дорошук<sup>1</sup>

Представлено академиком РАН М.А. Островским

Поступило 08.07.2022 г.

После доработки 31.08.2022 г.

Принято к публикации 02.09.2022 г.

Окислительно модифицированные липопротеиды плазмы крови играют важную роль в молекулярных механизмах повреждения стенки сосудов при атеросклерозе и сахарном диабете. Установлено, что окисляемость липопротеидов низкой плотности (ЛНП) более чем на порядок выше окисляемости липопротеидов высокой плотности (ЛВП). Показано, что ацилгидроперокси-производные фосфолипидов окисленных биомембран преимущественно захватываются частицами ЛНП, но не ЛВП, что опровергает гипотезу об участии ЛВП в обратном транспорте липогидропероксидов (ЛООН). Результаты работы свидетельствуют о возможности различных механизмов накопления ЛООН в ЛНП: вследствие повышенной окисляемости ЛНП и вследствие эффективного трансмембранного переноса ЛООН частицами ЛНП.

*Ключевые слова:* липопротеиды низкой и высокой плотности, ацилгидроперокси-фосфолипиды, окисляемость липопротеидов, трансмембранный перенос липопероксидов, окислительный стресс

**DOI:** 10.31857/S2686738922060166

Нарушение транспорта липидов играет важную роль в механизме повреждения стенки сосудов при атеросклерозе и сахарном диабете [1]. Липид-транспортирующая система организма представлена двумя основными классами липид-белковых наноструктур плазмы крови – липопротеиды низкой плотности (ЛНП) и липопротеиды высокой плотности (ЛВП), которые существенно различаются по метаболическим функциям, а также по размеру и химическому составу частиц. Частицы ЛВП содержат апопротеины А<sub>1</sub>, С<sub>2</sub> и Е, тогда как частицы меньших по размеру ЛНП содержат единственный белок – апоВ-100. Образующиеся в печени ЛНП транспортируют липиды в периферические ткани, а ЛВП осуществляют обратный транспорт липидов для их утилизации в печени. Апопротеин В-100 частиц ЛНП может подвергаться химической модификации с участием низкомолекулярных дикарбониллов, образующихся при свободнорадикальном окислении полиеновых липидов (таких как 4-гидроксинафеналь и малоновый диальдегид) и

при ферментативном окислении или автоокислении глюкозы и других 6 атомных углеводов соответственно (таких как глиоксаль и метилглиоксаль) [1]. Частицы окислительно модифицированных ЛНП активно захватываются scavenger-рецепторами клеток сосудистой стенки, что сопровождается возникновением предатерогенных повреждений сосудов при атеросклерозе и диабете [2]. Кроме того показано, что частицы окисленных ЛНП могут образовывать комплекс с рецептором LOX-1 эндотелиоцитов, стимулируя запуск апоптоза, приводящий к дисфункции эндотелия [3]. Таким образом очевидно, что окислительные превращения липопротеидов могут играть ведущую роль в молекулярных механизмах развития атеросклероза и сахарного диабета [1, 4]. Тем не менее в литературе не существует общего мнения относительно сравнительной окисляемости частиц ЛНП и ЛВП [5–7], поскольку при сравнении скорости окисления обычно используют не только различные (зачастую некорректные) методы анализа, но и производят расчеты на количество белка, что при большой разнице в содержании апопротеинов в частицах ЛНП и ЛВП существенно искажает результаты и не позволяет сделать однозначных выводов. Было показано, что частицы ЛВП могут не только ингибировать окисление ЛНП при совместной инкубации этих

<sup>1</sup> ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр кардиологии им. акад. Е.И. Чазова» Минздрава РФ, Москва, Россия

\*e-mail: lankin0309@mail.ru

частиц *in vitro* [8], но и осуществлять “антиоксидантный” эффект *in vivo*, подавляя окисление ЛНП в кровотоке [9, 10]. Кроме того, была высказана гипотеза о том, что частицы ЛНП способны аккумулировать окисленные фосфолипиды с надмолекулярных липид-белковых комплексов (липопротеидов и биомембран) и транспортировать их в печень для ферментативной детоксикации липопероксидов [10]. К сожалению, эта гипотеза не была подтверждена экспериментально с использованием адекватных подходов и методов, позволяющих получить неопровержимые результаты. Исходя из вышесказанного, в настоящей работе исследовали потенциальную способность частиц ЛНП и ЛВП к свободнорадикальному перекисному окислению, а также способность этих липопротеидов абсорбировать гидроперокси-производные фосфолипидов с поверхности окисленных биомембран.

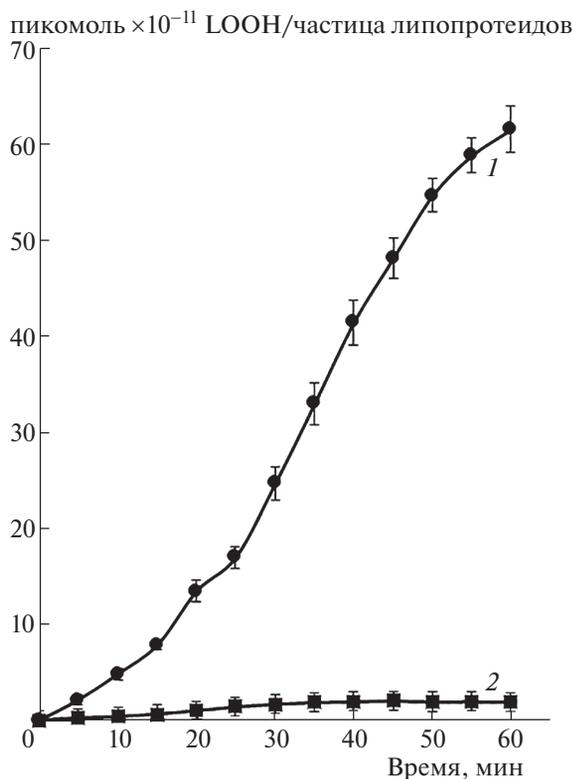
Препаративное выделение ЛНП и ЛВП проводили методом ультрацентрифугирования в градиенте плотности  $\text{NaBr}$  на ультрацентрифуге Beckman Optima XPN-80 (США) с использованием ротора Ti-60 [11]. После диализа содержание белка в образцах липопротеидов определяли по методу Лоури, а затем пробы разбавляли до 50 мкг белка/мл раствором, содержащим 0.154 М  $\text{NaCl}$  в 50 мМ  $\text{K,Na}$ -фосфатном буфере pH 7.4 и окисленные частицы ЛНП и ЛВП при 37°C индуцировали введением в среду инкубации 30 мкМ  $\text{CuSO}_4$ , после чего через фиксированные интервалы времени измеряли накопление липогидропероксидов (LOOH) при 233 нм на спектрофотометре UV-2600 Shimadzu (Япония) [4]. Содержание липогидропероксидов (конъюгированные диены –  $\Delta D_{233}$ ) в частицах ЛНП и ЛВП рассчитывали, используя коэффициент молярной экстинкции  $22\,000\text{ моль}^{-1}\text{ см}^{-1}$  для LOOH и исходя из содержания апопротеинов B-100 и  $A_1$ , измеренных на анализаторе Abbott Architect C8000 (США) при использовании тест-наборов этой же фирмы.

Для выделения митохондрий печень крыс (самцы линии WKY, 250–300 г) перфузировали охлажденным изотоническим раствором  $\text{KCl}$  и гомогенизировали (1:10 вес/объем) в гомогенизаторе Поттера с тефловым пестиком в 0.25 М растворе сахарозы, содержащем 10 мМ MOPS и 1 мМ ЭДТА [12]. Ядра и дебрис осаждали при 700 г в течение 10 мин в рефрижераторной центрифуге Eppendorf 5804R (Германия) и супернатант подвергали повторному центрифугированию при 8000 г в течение 10 мин для осаждения “тяжелых” митохондрий. Осадок ресуспендировали в среде выделения без ЭДТА и дважды переосаждали митохондрии, после чего органеллы вновь ресуспендировали в изотоническом  $\text{K,Na}$ -фосфатном буфере pH 7.4 (1 мг белка/мл) и свободнорадикальное окисление полиеновых фосфолипидов

митохондриальных мембран индуцировали внесением 0.5 мМ аскорбата для восстановления эндогенного железа. Кинетику свободнорадикального окисления митохондрий в аэробных условиях измеряли при 233 нм на спектрофотометре UV-2600 Shimadzu (Япония) с интегрирующей сферой ISR-2600, позволяющей проводить анализы в мутных средах. После 4-часовой инкубации (достижение плато на кинетической кривой) окисление митохондрий ингибировали внесением 1 мМ ЭДТА. Осадок окисленных митохондрий (8 мкмоль LOOH/мг белка) ресуспендировали в среде инкубации без аскорбата, содержащей 1 мМ ЭДТА, дважды переосаждали при 8000 г в течение 10 мин и осадок вновь ресуспендировали (1 мг белка/мл) в изотоническом  $\text{K,Na}$ -фосфатном буфере pH 7.4, содержащем 1 мМ ЭДТА. После этого в среду вносили ЛНП или ЛВП (200 мкг белка/мл) и проводили инкубацию в течение 6 ч. Через определенные интервалы времени отбирали аликвоты инкубационной среды, центрифугировали при 10000 г в течение 10 мин для осаждения митохондрий и фрагментов их мембран, а затем в супернатанте, содержащем только частицы липопротеидов, измеряли поглощение конъюгированных диенов при 233 нм.

Результаты исследования сравнительной кинетики окисляемости частиц ЛНП и ЛВП представлены на рис. 1. Как видно из рис. 1, при расчете на 1 частицу скорость свободнорадикального окисления частиц ЛНП *in vitro* в идентичных условиях более чем на два порядка превышает скорость окисления частиц ЛВП.

Из полученных данных следует, что частицы ЛНП и в условиях *in vitro* должны быть значительно более чувствительны к индукции свободнорадикального окисления в наружном фосфолипидном слое, чем частицы ЛВП. Следует отметить, что исходное содержание липогидропероксидов (ацилгидроперокси-производных фосфолипидов) в изолированных ЛНП составляло  $4.2 \pm 0.11$  пикомоль  $\times 10^{-11}$  LOOH на частицу, тогда как исходное содержание первичных продуктов свободнорадикального окисления в ЛВП составляло  $0.20 \pm 0.04$  пикомоль  $\times 10^{-11}$  LOOH на частицу. Таким образом, исходная окисленность частиц ЛНП *in vivo* также была на порядок выше окисленности частиц ЛВП. Из этого следует, что скорость свободнорадикального окисления в частицах ЛНП *in vivo* должна быть на порядок выше, чем скорость окисления в частицах ЛВП, поскольку при деструкции липогидропероксидов (LOOH) из них образуются алкоксильные свободные радикалы ( $\text{LO}^\bullet$ ), способные инициировать дальнейшее свободнорадикальное окисление липидного субстрата по цепному механизму. Поскольку повышенная чувствительность частиц ЛНП к индукции в них свободнорадикального

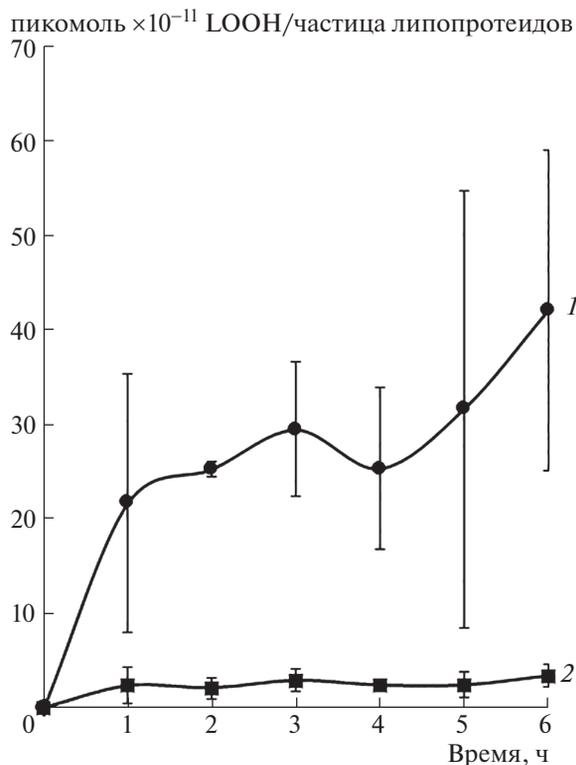


**Рис. 1.** Сравнительная кинетика свободнорадикального  $\text{Cu}^{2+}$ -индуцируемого окисления ЛНП (кривая 1) и ЛВП (кривая 2) при расчете на одну частицу.

окисления (susceptibility to oxidation) определяется, преимущественно, особенностями структуры этих частиц, можно полагать, что и в условиях *in vivo* при инициации окисления активными формами кислорода (АФК) в процессе развития окислительного стресса частицы ЛНП будут подвергаться свободнорадикальному окислению в значительно большей степени, чем частицы ЛВП.

Результаты исследования возможности переноса ацилгидроперокси-производных фосфолипидов с окисленных биомембран на частицы ЛНП и ЛВП представлены на рис. 2.

Полученные данные свидетельствуют о том, что нативные частицы ЛНП при совместной инкубации с окисленными митохондриями могут активно захватывать ацилгидроперокси-производные фосфолипидов, тогда как скорость дрейфа окисленных фосфолипидов с биомембран на частицы ЛВП весьма незначительна (рис. 2, кривые 1 и 2). Таким образом, высказанная ранее гипотеза о возможности обратного транспорта окисленных липидов частицами ЛВП в печень [10] в наших экспериментах подтверждения не получила. Следует отметить, что принципиальная возможность переноса ацилгидроперокси-производных фосфолипидов с окисленных мембран (“теней” эритроцитов) в ЛНП при совместной инкубации этих биоструктур была продемон-



**Рис. 2.** Кинетика встраивания гидроперокси-производных фосфолипидов из подвергнутых свободнорадикальному окислению мембран митохондрий печени крысы в частицы ЛНП (кривая 1) и ЛВП (кривая 2). Условия эксперимента описаны при изложении методов исследования.

стрирована ранее [13] и не представляется чем-то необычным. Важно другое — что именно частицы ЛНП способны не только легко подвергаться эффективному свободнорадикальному окислению, но и активно захватывать окисленные фосфолипиды с других липид-белковых надмолекулярных комплексов при взаимодействии с ними. Обогащенные гидроперокси-производными фосфолипидов частицы ЛНП подвергаются модификации вторичными продуктами деструкции липогидропероксидов —  $\alpha$ , ох-альдегидами, такими как окси- и гидроксиналенали и малоновый диальдегид [14], причем карбонильная модификация апопротеина В-100 частиц ЛНП, вероятно, играет ключевую роль в пусковых механизмах атерогенеза [1] и сахарного диабета [1, 3, 4]. Полученные нами данные свидетельствуют о существовании различных механизмов, приводящих к обогащению “атерогенных” частиц ЛНП первичными и, как следствие этого, вторичными продуктами свободнорадикального окисления, что в конечном итоге лишний раз подтверждает опасность патогенетически важной окислительной трансформации этих частиц *in vivo* [1–3], тогда как “антиоксидантная” функция ЛВП [15] остается не доказанной. Результаты наших исследований свидетельствуют о необходимости медикаментозных мероприятий, направленных на снижение окисленности частиц ЛНП для подавления молекулярных механизмов повреждения стенки сосудов при атеросклерозе и сахарном диабете.

#### БЛАГОДАРНОСТИ

Авторы признательны к.б.н. Г.Г. Коноваловой и А.А. Панферовой за помощь в проведении отдельных экспериментов и участие в обсуждении результатов.

#### ИСТОЧНИК ФИНАНСИРОВАНИЯ

Работа выполнена при финансовой поддержке гранта Российского научного фонда № 22-15-00013.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Lankin V.Z., Tikhaze A.K.* Role of Oxidative Stress in the Genesis of Atherosclerosis and Diabetes Mellitus: A Personal Look Back on 50 Years of Research // *Curr Aging Sci* 2017. V. 10. № 1. P. 18–25.
2. *Lankin V.Z., Tikhaze A.K., Kumskova E.M.* Macrophages actively accumulate malonyldialdehyde-modified but not enzymatically oxidized low density lipoprotein // *Mol Cell Biochem* 2012. V. 365. № 1–2. P. 93–98.
3. *Sun Y., Chen X.* Ox-LDL-induced LOX-1 expression in vascular smooth muscle cells: role of reactive oxygen species // *Fundam Clin Pharmacol*, 2011. V. 25. № 5. P. 572–579.
4. *Lankin V.Z., Konvalova G.G., Tikhaze A.K., Shumaev K.B., Kumskova E.M., Viigimaa M.* The Initiation of the Free Radical Peroxidation of Low-Density Lipoproteins by Glucose and Its Metabolite Methylglyoxal: a Common Molecular Mechanism of Vascular Wall Injury in Atherosclerosis and Diabetes // *Mol. Cell. Biochem.* 2014. V. 395. № 1/2. P. 241–252.
5. *Raveh O., Pinchuk I., Fainaru M., Lichtenberg D.* Kinetics of lipid peroxidation in mixtures of HDL and LDL, mutual effects. *Free Radic Biol Med.* 2001. V. 31. № 11. P. 1486–1497.
6. *Fumiaki I., Tomoyuki I.* High-Density Lipoprotein (HDL) Triglyceride and Oxidized HDL: New Lipid Biomarkers of Lipoprotein-Related Atherosclerotic Cardiovascular Disease. *Antioxidants(Basel).* 2020. V. 9. № 5. P. 362.
7. *Bowry V.W., Stanley K.K., Stocker R.* High density lipoprotein is the major carrier of lipid hydroperoxides in human blood plasma from fasting donors // *Proc Natl Acad Sci USA* 1992. V. 89. № 21. P. 10316–10320.
8. *Klimov A.N., Kozhemyakin L.A., Pleskov V.M., Andreeva L.I.* Antioxidative effect of high density lipoproteins in the oxidation of low density lipoproteins // *Bull Exptl. Biol. Med.* 1987. V. 103. P. 550–556.
9. *Klimov A.N., Gurevich V.S., Nikiforova A.A., Shatilina L.V., Kuzmin A.A., Plavinsky S.L., Teryukova N.P.* Antioxidative activity of high density lipoproteins *in vivo* // *Atherosclerosis* 1993. V. 100. № 1. P. 13–18.
10. *Klimov A.N., Nikiforova A.A., Kuzmin A.A., Kuznetsov A.S., Mackness M.I.* Is high density lipoprotein a scavenger for oxidized phospholipids of low density lipoprotein? *Advances in Lipoprotein and Atherosclerosis Research, Diagnostics and Treatment.* Jena: Gustav Fisher Verlag; 1998, P. 78–82.
11. *Lindgren F.T.* Preparative ultracentrifugal laboratory procedures and suggestions for lipoprotein analysis. In: *Analysis of lipids and lipoproteins*, Ed. *Perkins E.G.*, Champaign: Amer. Oil. Chemists Soc., 1975, P. 204–224.
12. *Saporito-Magrina C., Musacco-Sebio R., Acosta J.M., Bajicoff S., Paredes-Fleitas P., Boveris A., Repetto M.G.* Rat liver mitochondrial dysfunction by addition of copper (II) or iron (III) ions // *J Inorganic Biochem* 2017 V. 166. № 1. P. 5–11.
13. *Vila A., Korytowski W., Girotti A.W.* Spontaneous transfer of phospholipid and cholesterol hydroperoxides between cell membranes and low-density lipoprotein: assessment of reaction kinetics and prooxidant effects // *Biochemistry* 2002. V. 41. № 46. P. 13705–13716.
14. *Amarnath V., Amarnath K.* Scavenging 4-Oxo-2-nonenal // *Chem Res Toxicol* 2015.V. 28. № 10. P. 1888–1890.
15. *Mackness B., Mackness M.* The antioxidant properties of high-density lipoproteins in atherosclerosis // *Panminerva Med* 2012. V. 54. № 2. P. 83–90.

## BLOOD PLASMA LIPOPROTEIDS: OXIDIZABILITY AND PARTICIPATION IN THE TRANSPORT OF ACYLHYDROPEROXY-DERIVATIVES OF PHOSPHOLIPIDS

V. Z. Lankin<sup>a,#</sup>, A. K. Tikhaze<sup>a</sup>, V. Ya. Kosach<sup>a</sup>, and A. D. Doroshchuk<sup>a</sup>

<sup>a</sup> National Medical Research Center of Cardiology, Ministry of Health of the Russian Federation, Moscow, Russian Federation

<sup>#</sup>e-mail: lankin0309@mail.ru

Presented by Academician of the RAS M.A. Ostrovsky

Oxidatively modified plasma lipoproteins play an important role in the molecular mechanisms of vascular wall damage in atherosclerosis and diabetes mellitus. It was found that the oxidizability of low-density lipoproteins (LDL) is more than one order of magnitude higher than that of high-density lipoproteins (HDL). It was shown that acylhydroperoxy derivatives of phospholipids of oxidized biomembranes are predominantly captured by LDL particles but not by HDL, which refutes the hypothesis about the participation of HDL in the reverse transport of lipohydroperoxides (LOOH). The results suggest the possibility of different mechanisms of LOOH accumulation in LDL: due to the increased oxidizability of LDL and due to the effective transmembrane transport of LOOH by LDL particles.

*Keywords:* low and high density lipoproteins, acylhydroperoxy phospholipids, lipoprotein oxidizability, transmembrane lipoperoxide transport, oxidative stress

УДК 571.27+577.2+577.29

## РАЗЛИЧИЯ В ПРЕЗЕНТАЦИИ ПЕПТИДОВ ВАРИАНТОВ Омикрон-штамма ВА.1–ВА.5 ВИРУСА SARS-CoV-2 МОЛЕКУЛАМИ ГКГС

© 2022 г. С. А. Нерсисян<sup>1,2,\*</sup>, М. Ю. Шкурников<sup>1,2</sup>, А. П. Жиянов<sup>1,2</sup>,  
В. О. Новосад<sup>1,2</sup>, член-корреспондент РАН А. Г. Тоневицкий<sup>1,2</sup>

Поступило 01.09.2022 г.

После доработки 09.09.2022 г.

Принято к публикации 09.09.2022 г.

В настоящей работе анализировали аффинности связывания мутантных пептидов вариантов Омикрон-штамма ВА.1–ВА.5 и наиболее распространенных в мировой популяции вариантов главного комплекса гистосовместимости (ГКГС). Биоинформатический анализ проводили с помощью веб-портала T-CoV. Показано, что для всех пяти вариантов вируса мутации приводят к значительному снижению числа высокоаффинных пептидов для молекул HLA-B\*07: 02 и HLA-C\*01: 02, в то время как для аллели HLA-A\*32: 01 мутации приводят к появлению новых потенциальных эпитопов (аффинность взаимодействия менее 50 нМ). В случае ГКГС класса II мутации оказывают разнонаправленный эффект на аффинности взаимодействий вирусных пептидов и HLA-DRB1\*03: 01. А именно, мутации в Spike белке варианта ВА.1 приводят к более чем стократному уменьшению аффинности связывания эпитопа PINLVRDLPQGFSAL, а также к десятикратному уменьшению аффинности связывания этого эпитопа в случае вариантов ВА.2, ВА.4, ВА.5, и к увеличению аффинности на 30% для варианта ВА.3.

**Ключевые слова:** SARS-CoV-2, Омикрон, ГКГС, презентация пептидов, мутации, T-CoV

Список сокращений: ГКГС – главный комплекс гистосовместимости, ИФА – иммуноферментный анализ.

**DOI:** 10.31857/S2686738922060233

T-клеточный иммунный ответ играет ключевую роль в патогенезе COVID-19 [1, 2]. Два основных класса T-клеток выполняют важнейшие функции для борьбы с инфекцией: цитотоксические T-лимфоциты (CD8 T-клетки) разрушают зараженные вирусом клетки, одной из главных функций T-хелперов (CD4 T-клетки) является доставка второго активирующего сигнала B-клеткам, необходимого для производства антител. Ключевым этапом активации T-клеток является взаимодействие T-клеточного рецептора с вирусным пептидом в составе главного комплекса гистосовместимости (ГКГС). Существует большое количество различных аллелей, кодирующих молекулы ГКГС, причем каждый из соответствующих вариантов молекул ГКГС обладает собствен-

ным, специфичным набором пептидов, с которыми он может связываться с высокой аффинностью. Ранее были выявлены аллели ГКГС, ассоциированные с тяжестью течения COVID-19 [3–5].

Известно, что мутации вируса SARS-CoV-2 могут приводить к существенным изменениям аффинностей взаимодействий соответствующих пептидов с молекулами ГКГС [6, 7]. Ранее нами был разработан биоинформатический алгоритм и веб-портал T-CoV (<https://t-cov.hse.ru>), позволяющий проводить исчерпывающий анализ влияния мутаций на эффективность презентации линейных пептидов SARS-CoV-2 молекулами ГКГС [8]. Помимо анализа индивидуальных аллелей, портал предусматривает возможность анализа на уровне гаплотипов [9].

Согласно данным портала Nextstrain (<https://nextstrain.org>) доминирующим вариантом SARS-CoV-2 в 2022 г. является Омикрон-штамм. Известно, что большое число мутаций в Spike белке позволяет Омикрону эффективно уклоняться от антител против Spike белка базового штамма [10]. Также Spike белок данного варианта потерял способность взаимодействия с серино-

<sup>1</sup> Лаборатория микрофлюидных технологий для биомедицины, Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова Российской академии наук, Москва, Россия

<sup>2</sup> Факультет биологии и биотехнологии, Национальный исследовательский университет “Высшая школа экономики”, Москва, Россия

\*e-mail: snersisyan@hse.ru

вой протеазой TMPRSS2, вследствие чего эффективность репликации вируса значительно снизилась [11]. Нами ранее было показано, что мутации в вариантах Омикрон-штамма BA.1 и BA.2 приводят к критическому снижению аффинности взаимодействия HLA-DRB1\*03:01 и единственного эпитопа Spike белка, соответствующего данной молекуле ГКГС (биоинформатический анализ и ИФА) [9]. Интересно, что к падению аффинности приводили две различные мутации, затрагивающие единый регион: делеция N211, замена L212I и вставка EPE 212–214 в случае варианта BA.1, замена V213G в случае BA.2. Насколько нам известно, подобный анализ не проводился для вариантов BA.3, BA.4 и BA.5.

Целью настоящей работы было проведение сравнительного анализа эффективности презентации вирусных пептидов вариантов Омикрон-штамма BA.1–BA.5 наиболее распространенными вариантами молекул ГКГС.

Первичные последовательности белков различных вариантов SARS-CoV-2 получали из портала GISAID [12] в формате FASTA, используя следующие идентификаторы:

- Уханьский базовый штамм: EPI\_ISL\_402125;
- Омикрон BA.1: EPI\_ISL\_6699752;
- Омикрон BA.2: EPI\_ISL\_9884589;
- Омикрон BA.3: EPI\_ISL\_9854919;
- Омикрон BA.4: EPI\_ISL\_11873073;
- Омикрон BA.5: EPI\_ISL\_13302233.

Полученные аминокислотные последовательности разбивали на всевозможные перекрывающиеся линейные пептиды длины 8–14 в случае ГКГС класса I (ГКГС-I) и 15–20 в случае ГКГС класса II (ГКГС-II). Аффинности взаимодействий вирусных пептидов и наиболее распространенных в мировой популяции молекул ГКГС (64 аллели ГКГС-I, 105 аллелей ГКГС-II) предсказывали с помощью программ netMHCpan версии 4.1 и netMHCIIpan версии 4.0 [13], интегрированных в алгоритм T-CoV [8]. Шкалу предсказанных аффинностей разбивали на три группы:  $\leq 50$  нМ – высокая аффинность связывания, от 50 до 500 нМ – средняя аффинность, более 500 нМ – низкая аффинность или отсутствие связывания. Существенным увеличением или снижением аффинности связывания пептида называли ситуацию, когда предсказанная аффинность попадала или выходила из диапазона высокой аффинности связывания соответственно.

Обработку данных проводили с помощью языка Python версии 3.8. Построение тепловых карт с иерархической кластеризацией строк/столбцов проводили с помощью библиотеки seaborn версии 0.11.2 [14].

На рис. 1 приведена диаграмма мутаций вариантов Омикрон BA.1–BA.5 вируса SARS-CoV-2

(89 уникальных мутаций). Значительная часть мутаций была общей для нескольких вариантов: 24 мутации (27%) были общими для всех вариантов, 9 мутаций (10%) были общими для четырех вариантов, 13 мутаций (15%) – для трех вариантов, 11 мутаций (12%) – для двух вариантов. Остальные изменения (36%) были специфичны для различных вариантов Омикрона. Более половины от всех изменений (46 из 89 мутаций, 52%) приходились на Spike белок. Важно отметить, что специфические мутации были равномерно распределены по всем белкам SARS-CoV-2 (точный тест Фишера применяли для каждого белка в отдельности,  $p > 0.3$  во всех случаях).

Нами ранее было показано, что большое количество вирусных эпитопов по всей протеоме вируса (включая вспомогательные и неструктурные белки) ограничивает возможность уклонения вируса от презентации антигена за счет единиц–десятков мутаций [9]. Вследствие этого мы сосредоточили дальнейший анализ на Spike белке SARS-CoV-2, так как на использовании данного белка основано значительное число вакцин против COVID-19. В случае анализа ГКГС класса I были получены согласованные изменения аффинностей мутантных пептидов различных вариантов Омикрона. А именно, для всех пяти вариантов было обнаружено существенное снижение аффинностей взаимодействий вирусных пептидов из Spike белка с молекулами ГКГС, кодируемыми аллелями HLA-B\*07:02 и HLA-C\*01:02. В первом случае (HLA-B\*07:02) тысячекратное снижение аффинности было следствием аминокислотной замены P681H (оригинальный эпитоп – SPRRARSVA), во втором случае (HLA-C\*01:02) пятикратное снижение аффинности объяснялось заменой Y505H, попавшей в эпитоп YQPVRVVVL (обе замены P681H и Y505H присутствовали во всех вариантах Омикрона, см. рис. 1). Также были найдены мутации, существенно повышающие аффинность связывания некоторых пептидов с молекулами ГКГС-I. Так, три соседние замены на позициях 371, 373, 375 Spike белка приводили к появлению эпитопов с аффинностью меньше 50 нМ для HLA-A\*32:01: VLYNLAPFF (BA.1), VLYNFAPFF (BA.2–BA.5). Позициям 373 и 375 соответствовали замены S373P и S375F, присутствующие в вариантах BA.1–BA.5, позиции 371 соответствовала замена S371L в случае варианта BA.1 и S371F для остальных вирусов.

Менее согласованная картина наблюдалась в случае аллелей ГКГС класса II. Для вышеупомянутой аллели HLA-DRB1\*03:01 существует единственный пептид Spike белка с предсказанной аффинностью связывания менее 50 нМ (PINLYRDLPPQGFSAI, 27 нМ), при этом аффинность снижается на два порядка вследствие мутаций BA.1 (делеция N211, замена L212I, вставка 212–214 EPE) и на один порядок в случае BA.2



**Рис. 1.** Распределение мутаций по пяти вариантам (BA.1–BA.5) Омикрон-штамма SARS-CoV-2. Подписи строк включают в себя название вирусного белка и идентификатор мутации (в локальных координатах соответствующего белка). Цвета на вертикальной полосе слева соответствуют вирусным белкам.

(замена V213G). Предсказанные с помощью методов биоинформатики изменения были ранее валидированы нами экспериментально с использованием ИФА [9]. Интересно, что последовательности вариантов Омикрон BA.4 и BA.5 в данном регионе оказались идентичны BA.2 (замена V213G), тогда как в случае BA.3 наблюдались де-

лечения N211 и замена L212I, приводящие к неожиданному увеличению аффинности связывания на 30% (рис. 2). Таким образом, эффект наблюдаемых мутаций в случае аллели HLA-DRB1\*03:01 можно разделить на три класса: вставка 212–214 EPE ведет к полной потере взаимодействия, замена V213G уменьшает аффинность взаимодей-

Базовый штамм Reference strain		Аффинность связывания с HLA-DRB1*03:01 binding affinity
	TPINLVR---DLPQGFSALEPL	27 nM
BA.1	TPI-IVREPEDLDPQGFSALEPL	>5000 nM
BA.2	TPINLGR---DLPQGFSALEPL	147 nM
BA.4	TPINLGR---DLPQGFSALEPL	
BA.5	TPINLGR---DLPQGFSALEPL	
BA.3	TPI-IVR---DLPQGFSALEPL	19 nM

**Рис. 2.** Мутации в эпитопе PINLVRDLPQGFSALEPL (выделен курсивом) приводят к изменению аффинности взаимодействия с HLA-DRB1\*03:01. Жирным шрифтом выделены мутации.

ствия на порядок, тогда как замена L212I двукратно увеличивает аффинность связывания (делеция N211 не является релевантной, так как соответствует фланговой части пептида).

Схожий по силе эффект наблюдался для семейства аллелей HLA-DRB1\*15 (HLA-DRB1\*15:01, HLA-DRB1\*15:02, HLA-DRB1\*15:03). В случае вирусов BA.2, BA.4, BA.5 наблюдалось появление нового эпитопа YSVLYNFAPFFAFKC (44 нМ) вследствие четырех колокализованных мутаций S371F, S373P, S375F, T376A. В случае же вирусов BA.1 и BA.3, отличающихся отсутствием мутации T376A, повышения предсказанной аффинности связывания не происходило.

Таким образом, было показано, что пептиды пяти вариантов Омикрон-штамма SARS-CoV-2 обладают различными профилями аффинностей связывания с молекулами главного комплекса гистосовместимости. Полученные результаты свидетельствуют о необходимости изучения Т-клеточного иммунного ответа к каждому из вариантов Омикрон BA.1–BA.5 по отдельности. Результаты анализа штаммов BA.3, BA.4 и BA.5 добавлены на портал T-CoV.

## ИСТОЧНИКИ ФИНАНСИРОВАНИЯ

Исследование выполнено при поддержке гранта Министерства науки и высшего образования Российской Федерации (соглашение № 075-15-2021-1049).

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Sekine T., Perez-Potti A., Rivera-Ballesteros O., Strålin K., Gorin J.-B., Olsson A., Llewellyn-Lacey S., Kamal H., Bogdanovic G., Muschiol S., Wullimann D.J., Kammann T., Emgård J., Parrot T., Folkesson E., Karolinska COVID-19 Study Group, Rooyackers O., Eriksson L.I., Henter J.-I., Sönnernborg A., Allander T., Albert J., Nielsen M., Klingström J., Gredmark-Russ S., Björkström N.K., Sandberg J.K., Price D.A., Ljunggren H.-G., Aleman S., Buggert M. Robust T Cell Immunity in Convalescent
2. Grifoni A., Sidney J., Vita R., Peters B., Crotty S., Weiskopf D., Sette A. SARS-CoV-2 human T cell epitopes: Adaptive immune response against COVID-19 // *Cell Host & Microbe* (2021). V. 29. P. 1076–1092.
3. Shkurnikov M., Nersisyan S., Jankevic T., Galatenko A., Gordeev I., Vechorko V., Tonevitsky A. Association of HLA Class I Genotypes With Severity of Coronavirus Disease-19 // *Frontiers in Immunology* (2021). V. 12. P. 641900.
4. Hovhannisyann A., Madelian V., Avagyan S., Nazaretyan M., Hyussyan A., Sirunyan A., Arakelyan R., Manukyan Z., Yepiskoposyan L., Mayilyan K.R., Jordan F. HLA-C\*04:01 Affects HLA Class I Heterozygosity and Predicted Affinity to SARS-CoV-2 Peptides, and in Combination With Age and Sex of Armenian Patients Contributes to COVID-19 Severity // *Frontiers in Immunology* (2022). V. 13. P. 769900.
5. Migliorini F., Torsiello E., Spiezia F., Oliva F., Tingart M., Maffulli N. Association between HLA genotypes and COVID-19 susceptibility, severity and progression: a comprehensive review of the literature. // *European Journal of Medical Research* (2021). V. 26. P. 84.
6. Agerer B., Koblichke M., Gudipati V., Montaño-Gutierrez L.F., Smyth M., Popa A., Genger, L. Endler, D.M. Florian, V. Mühlgrabner, M. Graninger J.-W., Aberle S.W., Husa A.-M., Shaw L.E., Lercher A., Gattinger P., Torralba-Gombau R., Trapin D., Penz T., Barreca D., Fae I., Wenda S., Traugott M., Walder G., Pickl W.F., Thiel V., Allerberger F., Stockinger H., Puchhammer-Stöckl E., Weninger W., Fischer G., Hoepler W., Pawelka E., Zoufaly A., Valenta R., Bock C., Paster W., Geyeregger R., Farlik M., Halbritter F., Huppa J.B., Aberle J.H., Bergthaler A. SARS-CoV-2 mutations in MHC-I-restricted epitopes evade CD8+ T cell responses // *Science Immunology* (2021). V. 6. P. eabg6461.
7. Motozono C., Toyoda M., Zahradnik J., Saito A., Nasser H., Tan T.S., Ngare I., Kimura I., Uriu K., Kosugi Y., Yue Y., Shimizu R., Ito J., Torii S., Yonekawa A., Shimono N., Nagasaki Y., Minami R., Taya T., Sekiya N., Fukuhara T., Matsuura Y., Schreiber G. Genotype to Phenotype Japan (G2P-Japan) Consortium, T. Ikeda, S. Nakagawa, T. Ueno, K. Sato, SARS-CoV-2 spike L452R variant evades cellular immunity and increases infectivity // *Cell Host & Microbe* (2021). V. 29. P. 1124–1136.e11.
8. Nersisyan S., Zhiyanov A., Shkurnikov M., Tonevitsky A. T-CoV: a comprehensive portal of HLA-peptide interactions affected by SARS-CoV-2 mutations // *Nucleic Acids Research* (2022). V. 50. P. D883–D887.
9. Nersisyan S., Zhiyanov A., Zakharova M., Ishina I., Kurbatskaia I., Mamedov A., Galatenko A., Shkurnikov M., A. Gabibov, A. Tonevitsky. Alterations in SARS-CoV-2 Omicron and Delta peptides presentation by HLA molecules // *PeerJ* (2022). V. 10. P. e13354.
10. Planas D., Saunders N., Maes P., Guivel-Benhassine F., Planchais C., Buchrieser J., Bolland W.-H., Porrot F., Staropoli I., Lemoine F., Péré H., Veyer D., Puech J., Rodary J., Baele G., Dellicour S., Raymenants J., Goriissen T., Geenen C., Vanmechelen B., Wawina-Bokalanga T., Marti-Carreras J., Cuypers L., Sève A., Hocqueloux L., Prazuck T., Rey F.A., Simon-Loriere E., Bruel T.,

- Mouquet H., André E., Schwartz O.* Considerable escape of SARS-CoV-2 Omicron to antibody neutralization // *Nature* (2022). V. 602. P. 671–675.
11. *Shuai H., Chan J.F.-W., Hu B., Chai Y., Yuen T.T.-T., Yin F., Huang X., Yoon C., Hu J.-C., Liu H., Shi J., Liu Y., Zhu T., Zhang J., Hou Y., Wang Y., Lu L., Cai J.-P., Zhang A.J., Zhou J., Yuan S., Brindley M.A., Zhang B.-Z., Huang J.-D., To K.K.-W., Yuen K.-Y., Chu H.* Attenuated replication and pathogenicity of SARS-CoV-2 B.1.1.529 Omicron // *Nature* (2022). V. 603. P. 693–699.
  12. *Elbe S., Buckland-Merrett G.* Data, disease and diplomacy: GISAID's innovative contribution to global health // *Global Challenges* (Hoboken, NJ) (2017). V. 1. P. 33–46.
  13. *Reynisson B., Alvarez B., Paul S., Peters B., Nielsen M.* NetMHCpan-4.1 and NetMHCIIpan-4.0: improved predictions of MHC antigen presentation by concurrent motif deconvolution and integration of MS MHC eluted ligand data // *Nucleic Acids Research* (2020). V. 48. P. W449–W454.
  14. *Waskom M., Seaborn:* statistical data visualization // *Journal of Open Source Software* (2021). V. 6. P. 3021.

## DIFFERENCES IN SARS-COV-2 OMICRON STRAIN VARIANTS BA.1–BA.5 PEPTIDES PRESENTATION BY HLA MOLECULES

S. A. Nersisyan<sup>a,b,#</sup>, M. Yu. Shkurnikov<sup>a,b</sup>, A. P. Zhiyanov<sup>a,b</sup>, V. O. Novosad<sup>a,b</sup>, and A. G. Tonevitsky<sup>a,b</sup>

<sup>a</sup> *Laboratory of microfluidic technologies for biomedicine, Shemyakin-Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry, Russian Academy of Sciences, Moscow, Russian Federation*

<sup>b</sup> *Faculty of Biology and Biotechnology, National Research University Higher School of Economics, Moscow, Russian Federation*  
<sup>#</sup>*e-mail: snersisyan@hse.ru*

In this manuscript we analyzed binding affinities of mutated peptides of Omicron strain variants BA.1–BA.5 and the worldwide prevalent HLA alleles. Bioinformatics analysis was conducted with the use of T-CoV web portal. We showed that for all five viral variants mutations cause a significant reduction in the number of tightly binding peptides for HLA-B\*07: 02 and HLA-C\*01: 02 molecules. At the same time, there were novel potential mutant epitopes (binding affinity less than 50 nM) in case of HLA-A\*32: 01 allele. Interestingly, mutations caused multidirectional effect on the binding affinities of the viral peptides and HLA-DRB1\*03: 01. Specifically, Spike protein mutations in BA.1 variant caused more than 100-fold decrease in PINLVRDLPGFSAL binding affinity, 10-fold decrease in affinity in the case of BA.2, BA.4, BA.5 variants, and 30% increase of affinity for the BA.3 variant.

*Keywords:* SARS-CoV-2, Omicron, HLA, peptide presentation, mutation, T-CoV

УДК 599.4 57.063.7

## ПАРАФИЛИЯ НЕТОПЫРЕЙ (*PIPISTRELLUS*; VESPERTILIONIDAE) ПОДТВЕРЖДАЕТСЯ АНАЛИЗОМ ЯДЕРНЫХ ГЕННЫХ МАРКЕРОВ

© 2022 г. С. С. Жукова<sup>1</sup>, Е. Н. Соловьева<sup>2</sup>, И. В. Артюшин<sup>1</sup>, С. В. Крускоп<sup>2,3,\*</sup>

Представлено академиком РАН В.В. Рожновым

Поступило 15.08.2022 г.

После доработки 01.09.2022 г.

Принято к публикации 08.09.2022 г.

Существуют свидетельства того, что и в ныне принятом составе род настоящих нетопырей, *Pipistrellus*, может быть парафилетичным. Нами впервые изучены филогенетические отношения между большинством надвидовых таксонов подтрибы *Pipistrellina* на основании анализа последовательностей трех ядерных генов (RAG2, APOB и DMP1). Наши данные свидетельствуют в пользу монофилии самой подтрибы, однако определенно показывают, что род *Pipistrellus* в современном понимании парафилетичен относительно вечерниц, *Nyctalus*, и толстопалых нетопырей, *Glischropus* (оба таксона хорошо обособлены морфологически). Более того, вечерницы оказались крайне близки к “западной” кладе *Pipistrellus*. Вероятно, *Pipistrellus* должен быть разделен на два или более самостоятельных рода, либо *Nyctalus* и *Glischropus* должны быть включены в его состав в качестве подродов.

**Ключевые слова:** рукокрылые, систематика, филогения, ядерная ДНК, границы таксонов

DOI: 10.31857/S2686738922060361

### ВВЕДЕНИЕ

На протяжении десятилетий род нетопыри, *Pipistrellus*, был своего рода таксономической “мусорной корзиной”, объединяя мелких гладконосых летучих мышей с одной парой малых предкоренных зубов в верхней челюсти [1, 2]. Однако в результате морфологических, кариологических и молекулярно-генетических исследований [3–5] многие виды были исключены из его состава и перенесены в самостоятельные рода, зачастую неродственные собственно *Pipistrellus* (такие как *Hypsugo*, *Falsistrellus*, *Neoromicia*, *Arielulus*, *Perimyotis* и др. [6]). В принятом ныне объеме, род *Pipistrellus* несомненно объединяет формы, связанные сравнительно близким родством [4, 7], однако вопрос его монофилии остается открытым. Группа видов “*rueppeli*”, очевидно делавшая *Pipistrellus* парафилетичным, была выделена в самостоятельный род *Vansonia* [8]. Однако монофилия остальных

ных *Pipistrellus* всерьез не обсуждалась, хотя отдельные опубликованные данные указывали на то, что настоящие нетопыри, вероятно, парафилетичны относительно таких признанных родов, как *Nyctalus* и *Glischropus* [7–9].

Объем подтрибы *Pipistrellina* здесь принят в понимании [10] и соответствует трибе *Pipistrellini* согласно [6, 11]. Чтобы проверить гипотезу о парафилии *Pipistrellus*, нами были получены последовательности трех ядерных генов для ряда видов этого рода, а также родственных родов, и на их основе осуществлен филогенетический анализ.

### МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

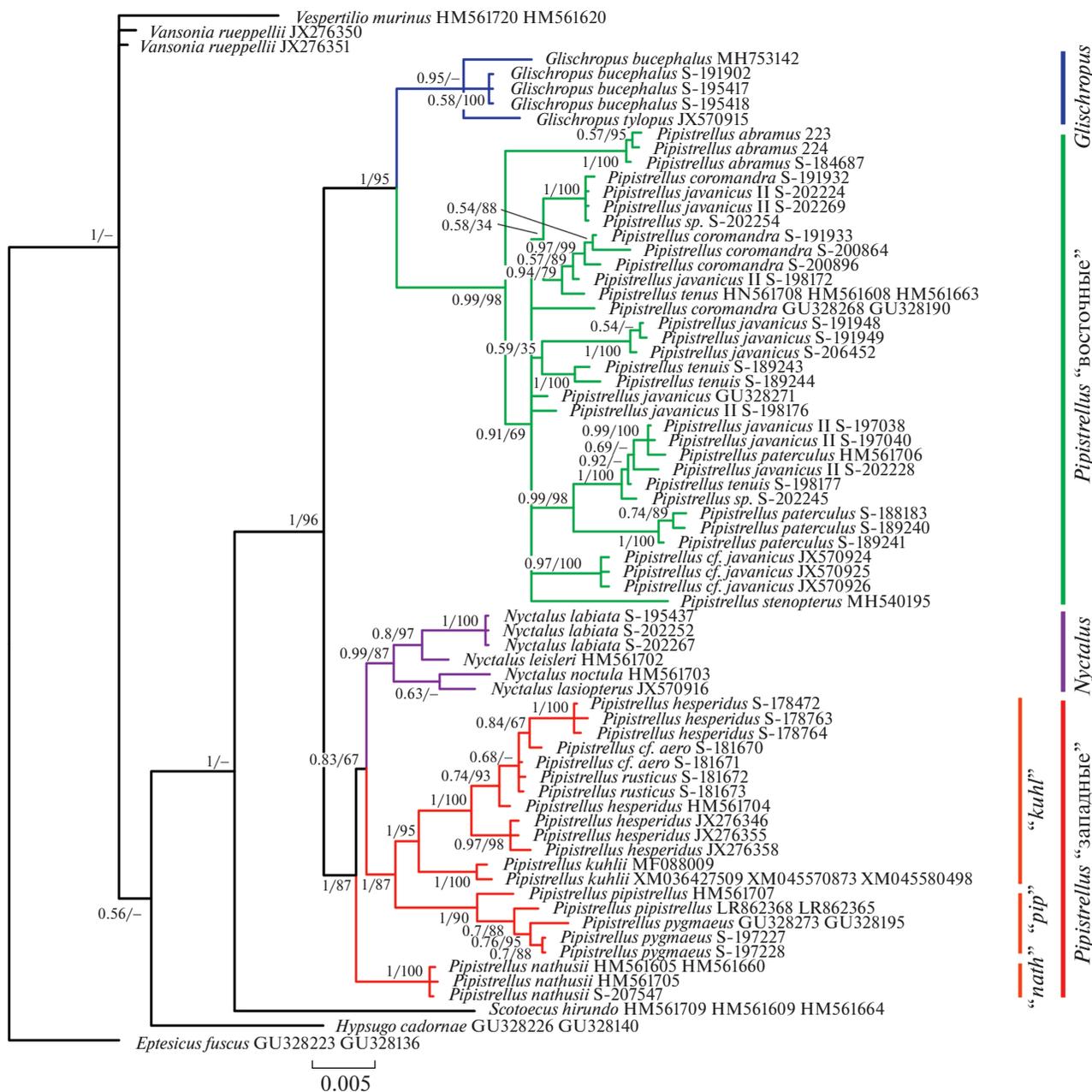
Геномную ДНК выделяли из фиксированных в этаноле проб тканей стандартным методом фенол-хлороформной депротеинизации [12]. Были получены последовательности трех ядерных генов (RAG2, 1234 bp; DMP1, 886 bp; и APOB, 889 bp). Выбор этих ядерных маркеров определен их вариабельностью и представленностью в ГенБанке, что позволило расширить анализируемую выборку. Последовательности праймеров взяты из опубликованных работ [13, 14]. Реакция амплификации осуществлялась при следующих условиях: первичная денатурация – 94°C в течение 3 мин; затем 35 циклов, включающих денатурацию – 94°C в течение 45 с, отжиг с функцией touch down – 68–65° в течение 1 мин, синтез – 72°C в течение 1 мин. Конечный синтез осуществлялся при 72°C в течение

<sup>1</sup> Биологический факультет Московского государственного университета имени М.В. Ломоносова, Москва, Россия

<sup>2</sup> Зоологический музей Московского государственного университета имени М.В. Ломоносова, Москва, Россия

<sup>3</sup> Совместный Российско-Вьетнамский Тропический научно-исследовательский и технологический центр, Ханой, Вьетнам

\*e-mail: selysius@mail.ru



**Рис. 1.** Дерево филогенетических отношений подтрибы Pipistrellina по расширенному набору последовательностей ядерных генов APOB, DMP1, RAG2, построенное методом Байеса (апостериорные вероятности получены для цепи в 5 000 000 генераций), поддержки над или под узлами обозначают апостериорные вероятности/значения бутстрепа, полученные анализом ML. Цветом выделены четыре основных обсуждаемые клады; группы видов нетопырей “западной” клады: “nath” – *nathusii*, “pip” – *pipistrellus*, “kuhl” – *kuhl*.

ние 7 мин. Опыты выполнены на приборе Му Cyclar BioRAD. Контроль амплификации проводили в 1% агарозном геле. Очистку продуктов ПЦР проводили с помощью набора Diatom DNA Clean-Up. Автоматическое секвенирование проведено на секвенаторе ABI PRISM 3500xl. Всего получено 119 последовательностей ядерных генов для 11 видов; еще 66 последовательностей 10 видов были получены из ГенБанка. Виды ро-

дов *Eptesicus*, *Vespertilio* и *Hypsugo* взяты в качестве внешней группы. Номера использованных музейных экземпляров (обозначены литерой S) и номера ГенБанка указаны на рис. 1–2.

Последовательности выровнены с помощью программ BioEdit v7.1.3. и SeqMan Pro v.7.1. [15, 16] и скорректированы вручную. Анализ конкатенированных последовательностей выполнен в двух вариантах: “расширенном”, с максимальным

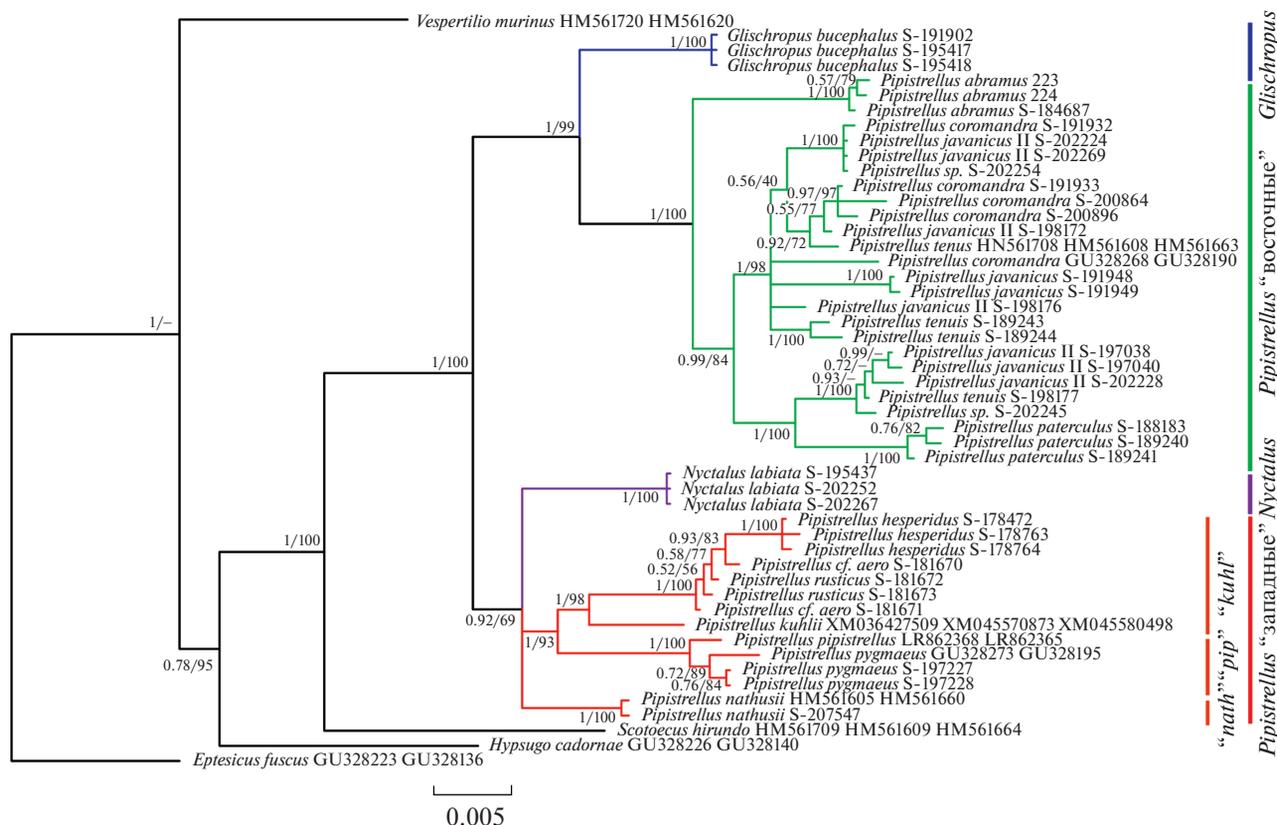


Рис. 2. Дерево филогенетических отношений подтрибы Pipistrellina по сокращенному набору последовательностей ядерных генов APOB, DMP1, RAG2, построенное методом Байеса (апостериорные вероятности получены для цепи в 5000000 генераций), цифры над узлами обозначают апостериорные вероятности/значения бутстрэпа, полученные анализом ML. Обозначения таксонов как в рис. 1.

таксономическим покрытием, и “сокращенном”, куда включены только экземпляры, для которых получены последовательности хотя бы двух генов из трех.

Реконструкция филогенетических деревьев выполнена методами максимального правдоподобия (ML) при помощи программы IQ-Tree и методом байесова анализа (BA) с помощью программы MrBayes 3.1.2. Для определения достоверности полученной топологии ML использовали процедуру “bootstrap” с 1000 репликами. Некорректированные меж- и внутригрупповые *p*-дистанции посчитаны в программе MEGA.

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Наши данные как по каждому отдельному гену, так и по конкатенированным последовательностям в целом согласуются с ранее опубликованными (напр., [7, 9]). Топологии деревьев, построенных методами Байеса и ML, не имели существенных различий. Монофилия подтрибы Pipistrellina относительно *Eptesicus* и *Vespertilio* поддержана на дереве, построенном по конкатенату методом Байеса (рис. 1, 2). Положение рода

*Hypsugo* (представленного видом *H. cadornae*) спорно, в ряде реконструкций он занимает сестринское положение к Pipistrellina либо корневое положение внутри нее. Роды *Vansonia* (*V. rueppeli*) и *Scotoecus* (*S. hirundo*), судя по полученным реконструкциям, принадлежат к кладе Pipistrellina, но их положение относительно друг друга неоднозначно.

Монофилия клады Pipistrellina в узком смысле (*Pipistrellus*+*Nyctalus*+*Glischropus*) имеет высокие поддержки на всех полученных реконструкциях. Она разделяется на две клады следующего порядка, одна из которых включает “западные” виды нетопырей (группы видов “pipistrellus”, “kuhlii” и “nathusii”) и род *Nyctalus*, а вторая — “восточные” виды нетопырей (группы видов “javanicus” и “stenopterus”) и род *Glischropus*.

В “западной” кладе все три группы видов нетопырей монофилетичны и имеют максимальные поддержки. Положение *Nyctalus* неоднозначно: на некоторых деревьях, построенных по отдельным генам, вечерницы объединяются с группой видов “nathusii”; при “сокращенном” наборе таксонов формируется неразрешимая трихотомия

**Таблица 1.** Некорректированные *p*-дистанции (%) по расширенному набору конкатенатов генов яДНК: межгрупповые дистанции под диагональю, внутригрупповые – на диагонали, над диагональю – стандартная ошибка. Дистанции для *P. abramus* рассчитаны отдельно от остальных “восточных” *Pipistrellus*

	<i>P. abramus</i>	<i>Glischropus</i>	“восточные” <i>Pipistrellus</i>	группа видов “ <i>kuhlii</i> ”	<i>P. nathusii</i>	<i>Nyctalus</i>	группа видов “ <i>pipistrellus</i> ”
<i>P. abramus</i>	<b>0.08</b>	0.39	0.22	0.35	0.40	0.36	0.38
<i>Glischropus</i>	2.53	<b>0</b>	0.33	0.37	0.57	0.38	0.43
“восточные” <i>Pipistrellus</i>	1.99	2.40	<b>1.17</b>	0.31	0.36	0.30	0.34
группа видов “ <i>kuhlii</i> ”	3.70	2.80	3.64	<b>0.63</b>	0.29	0.26	0.26
<i>P. nathusii</i>	3.69	2.71	3.49	1.96	<b>0</b>	0.28	0.41
<i>Nyctalus</i>	3.55	2.76	3.26	2.17	1.63	<b>0</b>	0.28
группа видов “ <i>pipistrellus</i> ”	3.71	3.11	3.51	2.15	2.71	2.17	<b>0.48</b>

**Таблица 2.** Некорректированные *p*-дистанции (%) по сокращенному набору конкатенатов генов яДНК: межгрупповые дистанции под диагональю, внутригрупповые – на диагонали, над диагональю – стандартная ошибка

	“восточные” <i>Pipistrellus</i>	<i>Glischropus</i>	<i>Nyctalus</i>	“западные” <i>Pipistrellus</i>
“восточные” <i>Pipistrellus</i>	<b>1.33</b>	0.33	0.31	0.29
<i>Glischropus</i>	2.41	<b>0.00</b>	0.39	0.37
<i>Nyctalus</i>	3.29	2.76	<b>0.00</b>	0.23
“западные” <i>Pipistrellus</i>	3.59	2.88	2.13	<b>1.44</b>

*Nyctalus* – группа “*nathusii*” – группы “*pipistrellus*” и “*kuhlii*”.

В “восточной” кладе на всех реконструкциях род *Glischropus* занимает базальное положение. Все включенные в анализ “восточные” нетопыри формируют хорошо поддержанную монофилетическую группу. При этом базальное положение в ней занимает *P. abramus*, а не морфологически обособленный *P. stenopterus*.

Анализ каждого из ядерных генов дает в среднем более низкие поддержки большинства узлов, однако в целом топология этих деревьев не противоречит вышеописанной. Все три гена поддерживают монофилию подтрибы *Pipistrellina*, при этом во всех случаях род *Scotoecus* занимает в ней базальное положение. Разделение нетопырей на “западных” и “восточных” также поддержано каждым из генов, однако по гену *RAG2* монофилия “западной” клады имеет низкую поддержку, а данные по гену *DMP1* исключают *Glischropus* из “восточной” клады, делая равноценным членом неразрешенной трихотомии. Род *Nyctalus* на всех реконструкциях объединяется с “западной” кладой нетопырей.

Стоит отметить, что значение генетических *p*-дистанций между “восточными” и “западными” нетопырями выше, чем между этими кладами (и входящими в них группами видов) и родами

*Glischropus* и *Nyctalus* (табл. 1, 2). Аналогичную ситуацию демонстрируют опубликованные ранее дистанции по митохондриальным генам, хоть и посчитанные для меньшей таксономической выборки [9].

Таким образом, по нашим данным, род *Pipistrellus* в современном понимании безусловно парафилетичен относительно родов *Nyctalus* и *Glischropus*. Более того, генетическая линия морфологически обособленного рода *Nyctalus* с высокой вероятностью располагается внутри “западной” клады *Pipistrellus*, будучи обособленной от групп видов “*pipistrellus*” и “*kuhlii*” не в большей степени, чем группа “*nathusii*”. Все это говорит о необходимости пересмотра границ рода *Pipistrellus* и в целом таксономических границ в подтрибе *Pipistrellina*.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Наши данные полностью подтверждают предположение о парафилии рода *Pipistrellus* в современном его понимании. Из ныне признанных надвидовых таксонов подтрибы *Pipistrellina* в нашем анализе отсутствует только род *Scotozous* (который еще не был изучен генетически). Однако его добавление в филогенетическую реконструкцию будет ставить вопрос только о его собствен-

ном статусе и не должно повлиять на относительное положение *Pipistrellus*, *Nyctalus* и *Glischropus*. Таким образом, “восточная” клада нетопырей должна быть выделена в самостоятельный таксон группы рода (род или подрод). При этом абсолютное большинство названий таксонов группы рода в пределах *Pipistrellus* s. lato было предложено для представителей “западной” клады (напр., [17]); единственное исключение — название *Alionoctula*, предложенное для морфологически обособленной группы видов “*stenopterus*” [9]. Таким образом, выделение “восточной” клады в самостоятельный род должно быть сопряжено с введением нового названия. Однако описание такого таксона требует уточнения его границ (за счет увеличения числа проанализированных видов) и составления его морфологического диагноза. Такая работа, определенно, должна быть сделана в ближайшем будущем.

Трактовка уровня таксономических различий между полученными кладами неоднозначна. Вечерниц традиционно рассматривают как хорошо обособленный самостоятельный род, однако его положение на филогенетическом дереве предполагает, что не только группа видов “*javanicus*”, но, возможно, и группа видов “*nathusii*” должны рассматриваться как самостоятельные роды. Альтернативным вариантом может быть рассмотрение всех групп видов нетопырей, а также *Nyctalus* и *Glischropus* как подродов в составе *Pipistrellus*, что противоречит предполагаемому времени дивергенции этих таксонов (средний миоцен [18, 19]). Аналогичные ситуации можно наблюдать и в других таксонах рукокрылых, например, в Molossinae (см. [20]). Таким образом, наше исследование, помимо решения конкретной таксономической проблемы, приобретает и методологическое значение.

#### БЛАГОДАРНОСТИ

Авторы крайне признательны администрации Института проблем экологии и эволюции им. А.Н. Северцова РАН и Российско-Вьетнамского совместного научного и технологического тропического центра за возможность работы с материалами с территории Вьетнама. Работа выполнена на материальной базе Кафедры зоологии позвоночных биологического факультета и Зоологического музея МГУ им. М.В. Ломоносова, при содействии администрации этих подразделений, и соответствует теме НИР Зоологического музея № 121032300105-0.

#### ИСТОЧНИК ФИНАНСИРОВАНИЯ

Исследование выполнено при финансовой поддержке Российского научного фонда (№ гранта 22-24-00017).

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Hill J.E., Harrison D.L. The baculum in the Vespertilioninae (Chiroptera: Vespertilionidae) with a systematic review, a synopsis of *Pipistrellus* and *Eptesicus*, and the descriptions of a new genus and subgenus // Bulletin of the British Museum (Natural History), 1987. V. 52. P. 225–305.
2. Koopman K.F. Chiroptera: Systematics, VIII. Mammalia, part 60. New York: Walter de Gruyter, 1994. 217 p.
3. Horaček I., Hanak V. Generic status of *Pipistrellus savii* and comments on classification of the genus *Pipistrellus* (Chiroptera, Vespertilionidae) // Myotis, 1986. V. 23–24. P. 9–16.
4. Volleth M., Bronner G., Göpfert M.C., et al. Karyotype comparison and phylogenetic relationships of *Pipistrellus*-like bats (Vespertilionidae; Chiroptera; Mammalia) // Chromosome Research, 2001. V. 9. № 1. P. 25–46.
5. Kearney T.C., Volleth M., Contrafatto G., Taylor P.J. Systematic implications of chromosome GTG-band and bacula morphology for southern African *Eptesicus* and *Pipistrellus* and several other species of Vespertilioninae (Chiroptera: Vespertilionidae) // Acta Chiropterologica, 2002. V. 4. № 1. P. 55–76.
6. Moratelli R., Burgin C., Cláudio V., et al. Family Vespertilionidae (Vesper Bats) / Eds Wilson D.E., Mittermeier R.A. Handbook of the Mammals of the World, Volume 9: Bats. Barcelona: Lynx Edicions, 2019. 1008 p.
7. Roehrs Z.P., Lack J.B., Van Den Bussche R.A. Tribal phylogenetic relationships within Vespertilioninae (Chiroptera: Vespertilionidae) based on mitochondrial and nuclear sequence data // Journal of Mammalogy, 2010. V. 91. № 5. P. 1073–1092.
8. Koubínová D., Irwin N., Hulva P., et al. Hidden diversity in Senegalese bats and associated findings in the systematics of the family Vespertilionidae // Frontiers in Zoology, 2013. V. 10. № 48. P. 1–16.
9. Kruskop S.V., Solovyeva E.N., Kaznadzey A.D. Unusual *Pipistrellus*: taxonomic position of the Malayan Noctule (*Pipistrellus stenopterus*; Vespertilionidae; Chiroptera) // Zoological Studies, 2018. V. 57. № 60. P. 1–15.
10. Крусков С.В. Отряд Chiroptera / Ред Павлинов И.Я., Лисовский А.А. Млекопитающие России: систематико-географический справочник. Москва: Т-во научных изданий КМК, 2012. 604 с.
11. Hooper S.R., Van den Bussche R.A. Molecular phylogenetics of the chiropteran family Vespertilionidae // Acta Chiropterologica, 2003. V. 5. Suppl. P. 1–63.
12. Sambrook J., Fritsch E.F., Maniatis T. Molecular cloning — a laboratory manual. Sec. ed. N.Y.: Cold Spring Harbour Lab. Press, 1989. 385 p.
13. Baker R.J., Porter C.A., Patton J.C., Van Den Bussche T.A. Systematics of bats of the family Phyllostomidae based on Rag2 DNA sequences // Occasional Papers of Museum of the Texas Technical University, 2000. V. 202. P. 1–16.
14. Artyushin I.V., Kruskop S.V., Lebedev V.S., Bannikova A.A. Molecular phylogeny of Serotines (Mammalia, Chiroptera, *Eptesicus*): evolutionary and taxonomical aspects of the *E. serotinus* species group // Biology Bulletin, 2018. V. 45. № 5. P. 469–477.

15. Hall T.A. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT // Nucleotide, 1999. V. 41. P. 95–98.
16. Burland T.G. DNASTAR's lasergene sequence analysis software // Methods in Molecular Biology, 1999. V. 132. P. 71–91.
17. Ellerman J.R., Morrison-Scott T.C.S. Checklist of Palearctic and Indian Mammals 1758 to 1946. Second ed. London: British Museum (Natural History), 1966. 810 p.
18. Lack J.B., Van Den Bussche R.A. Identifying the confounding factors in resolving phylogenetic relationships in Vespertilionidae // Journal of Mammalogy, 2010. V. 91. № 6. P. 1435–1448.
19. Rosina V.V., Sinitsa M.V. Bats (Chiroptera, Mammalia) from the Turolian of Ukraine: phylogenetic and biostratigraphic considerations // Neues Jahrbuch für Geologie und Paläontologie, 2014. V. 272. № 2. P. 147–166.
20. Ammerman L.K., Lee D.N., Tipps T.M. First molecular phylogenetic insights into the evolution of free-tailed bats in the subfamily Molossinae (Molossidae, Chiroptera) // Journal of Mammalogy, 2012. V. 93. № 1. P. 12–28.

## PARAPHYLY OF THE PIPISTRELLES (*PIPISTRELLUS*; VESPERTILIONIDAE) IS CONFIRMED BY THE ANALYSIS OF THE NUCLEAR GENE MARKERS

S. S. Zhukova<sup>a</sup>, E. N. Solovyeva<sup>b</sup>, I. V. Artyushin<sup>a</sup>, and S. V. Kruskop<sup>b,c,#</sup>

<sup>a</sup> Biological faculty of Moscow M.V. Lomonosov State University, Moscow, Russian Federation

<sup>b</sup> Zoological Museum of Moscow M.V. Lomonosov State University, Moscow, Russian Federation

<sup>c</sup> Joint Russian-Vietnamese Tropical Scientific Research and Technology Center, Hanoi, Vietnam

<sup>#</sup> e-mail: selysius@mail.ru

Presented by Academician of the RAS V.V. Rozhnov

There are evidences that the genus *Pipistrellus* (true pipistrelles) in its current understanding may be paraphyletic. We have studied for the first time the phylogenetic relationships between the majority of supraspecific taxa of the subtribe Pipistrellina based on the analysis of the sequences of three nuclear genes (RAG2, APOB, and DMP1). Our data support the monophyly of the subtribe itself, but definitely show that the genus *Pipistrellus* in the modern sense is paraphyletic with respect to noctules, *Nyctalus*, and thick thumb pipistrelles, *Glischropus* (which both are morphologically distinct taxa). Moreover, noctules are extremely close to the “western” clade of *Pipistrellus*. The latter genus should probably be divided into two or more separate genera, or *Nyctalus* and *Glischropus* should be treated as its subgenera.

**Keywords:** Chiroptera, taxonomy, phylogeny, nuclear DNA, taxonomic boundaries

УДК 616.24-036.12:615.214:577.1

## НОРТРИПТИЛИН МОДУЛИРУЕТ МИГРАЦИЮ ЛИМФОЦИТОВ И МОНОЦИТОВ ПЕРИФЕРИЧЕСКОЙ КРОВИ ПАЦИЕНТОВ С ХРОНИЧЕСКОЙ ОБСТРУКТИВНОЙ БОЛЕЗНЬЮ ЛЕГКИХ

© 2022 г. А. Г. Кадушкин<sup>1,\*</sup>, А. Д. Таганович<sup>1</sup>, Л. В. Мовчан<sup>2</sup>, Т. С. Колесникова<sup>1</sup>,  
Е. В. Ходосовская<sup>1</sup>, Т. В. Шман<sup>2</sup>

Представлено академиком РАН Л.П. Титовым

Поступило 13.05.2022 г.

После доработки 28.06.2022 г.

Принято к публикации 02.07.2022 г.

В настоящем исследовании с помощью метода проточной цитометрии изучено влияние нортриптилина (1 и 10 мкМ), будесонида (10 нМ) и их комбинации на миграцию лимфоцитов и моноцитов периферической крови пациентов с хронической обструктивной болезнью легких (ХОБЛ) к хемокинам CCL5 и CXCL10. Нортриптилин (10 мкМ), самостоятельно и в сочетании с будесонидом, подавлял миграцию к CCL5 и CXCL10 Т-хелперов, цитотоксических Т-лимфоцитов, НК-клеток и В-лимфоцитов, а также ускорял перемещение к этим хемокинам моноцитов. Сочетание нортриптилина (1 мкМ) и будесонида превосходило способность одного будесонида подавлять хемотаксис субпопуляций лимфоцитов к CXCL10, но не к CCL5. Комбинация нортриптилина (10 мкМ) и будесонида супрессировала миграцию к CCL5 и CXCL10 субпопуляций лимфоцитов и активировала хемотаксис к обоим хемокинам моноцитов более значительно, чем один будесонид. Результаты исследования демонстрируют способность нортриптилина самостоятельно модулировать миграцию лимфоцитов и моноцитов периферической крови пациентов с ХОБЛ и потенцировать эффекты будесонида.

**Ключевые слова:** нортриптилин, будесонид, стероидорезистентность, ХОБЛ, хемотаксис, CCL5, CXCL10

DOI: 10.31857/S2686738922050122

### ВВЕДЕНИЕ

В настоящее время от 300 до 400 млн человек во всем мире страдают от хронической обструктивной болезни легких (ХОБЛ). Это заболевание ежегодно уносит жизни до 3 млн пациентов [1]. По оценкам экспертов, в глобальном масштабе ХОБЛ приводит к экономическим издержкам в размере 2.1 трлн. долларов США. Ожидается, что к 2030 г. эти цифры могут увеличиться более чем вдвое [1].

Несмотря на риск развития серьезных побочных эффектов, ингаляционные глюкокортико-

стероиды (ИГКС), лекарственные средства (ЛС) с противовоспалительным механизмом действия широко используются для лечения ХОБЛ. Добавление ИГКС к бронходилататору (длительно действующему β<sub>2</sub>-агонисту (ДДБА) или комбинации ДДБА и длительно действующего антихолинэргического препарата) снижает риск будущих обострений у пациентов с предшествующими обострениями ХОБЛ [2]. Однако глюкокортикоиды (ГКС) имеют ограниченную эффективность в снижении риска смерти и уровня провоспалительных медиаторов, улучшении функции легких и качества жизни пациентов с ХОБЛ [3, 4].

Исследования, направленные на поиск ЛС, способных потенцировать действие ГКС, привели к выявлению нортриптилина как ЛС, обладающего такими свойствами [5, 6]. Нортриптилин относится к группе трициклических антидепрессантов (ТЦА) и одновременно является активным метаболитом amitriptилина, который также принадлежит к группе ТЦА. Нортриптилин используется для лечения депрессии, тревоги и

<sup>1</sup> Учреждение образования “Белорусский государственный медицинский университет”, Минск, Беларусь

<sup>2</sup> Государственное учреждение “Республиканский научно-практический центр детской онкологии, гематологии и иммунологии”, Минский район, Беларусь  
\*e-mail: kadushkyn@gmail.com

никотиновой зависимости у пациентов с ХОБЛ [7, 8]. Проведенные нами ранее исследования позволили установить синергичное супрессирующее действие нортриптилина и ГКС в отношении секреции цитокинов мононуклеарными клетками периферической крови (МКПК) больных ХОБЛ [9, 10].

Привлечение лимфоцитов и моноцитов в легкие, где они продуцируют провоспалительные медиаторы, происходит под воздействием хемокинов — лигандов для хемокиновых рецепторов, локализованных на поверхности клеток. Полагают, что основное значение в перемещении клеток крови пациентов с ХОБЛ в легкие играют лиганд-рецепторные пары CCR5-CCL5 и CXCR3-CXCL9/CXCL10/CXCL11 [11, 12]. На это в том числе указывают данные об увеличенной миграции МКПК пациентов с ХОБЛ в направлении CCL5, CXCL9, CXCL10 и CXCL11 по сравнению со здоровыми курящими и некурящими людьми [13]. Сообщается о подавлении хемотаксиса полиморфноядерных клеток в места воспаления под влиянием нортриптилина [14]. Однако сведения о способности этого ЛС потенцировать эффекты ГКС, связанные с угнетением миграции МКПК, отсутствуют.

Целью исследования явилось оценить способность комбинации нортриптилина и ГКС влиять на перемещение лимфоцитов и моноцитов крови пациентов с ХОБЛ в направлении хемокинов CCL5 и CXCL10.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

**Характеристика пациентов.** Донорами крови для проведения исследования явились 8 больных ХОБЛ (6 мужчин и 2 женщины), в возрасте 61.5 (59.0–68.3) лет [медиана (25-й – 75-й процентиля)], имеющих индекс курящего человека 39.0 (16.3–43.8) пачка/лет и 2–3 степень тяжести заболевания (в соответствии с критериями Глобальной инициативы по хронической обструктивной болезни легких). Критериями исключения из исследования явились наличие у пациентов бронхиальной астмы, заболеваний соединительной ткани с изменениями функции дыхательной системы, онкологических и аутоиммунных заболеваний, нарушений свертывающей системы крови, а также прием системных ГКС или обострение ХОБЛ в течение 6 нед до начала исследования.

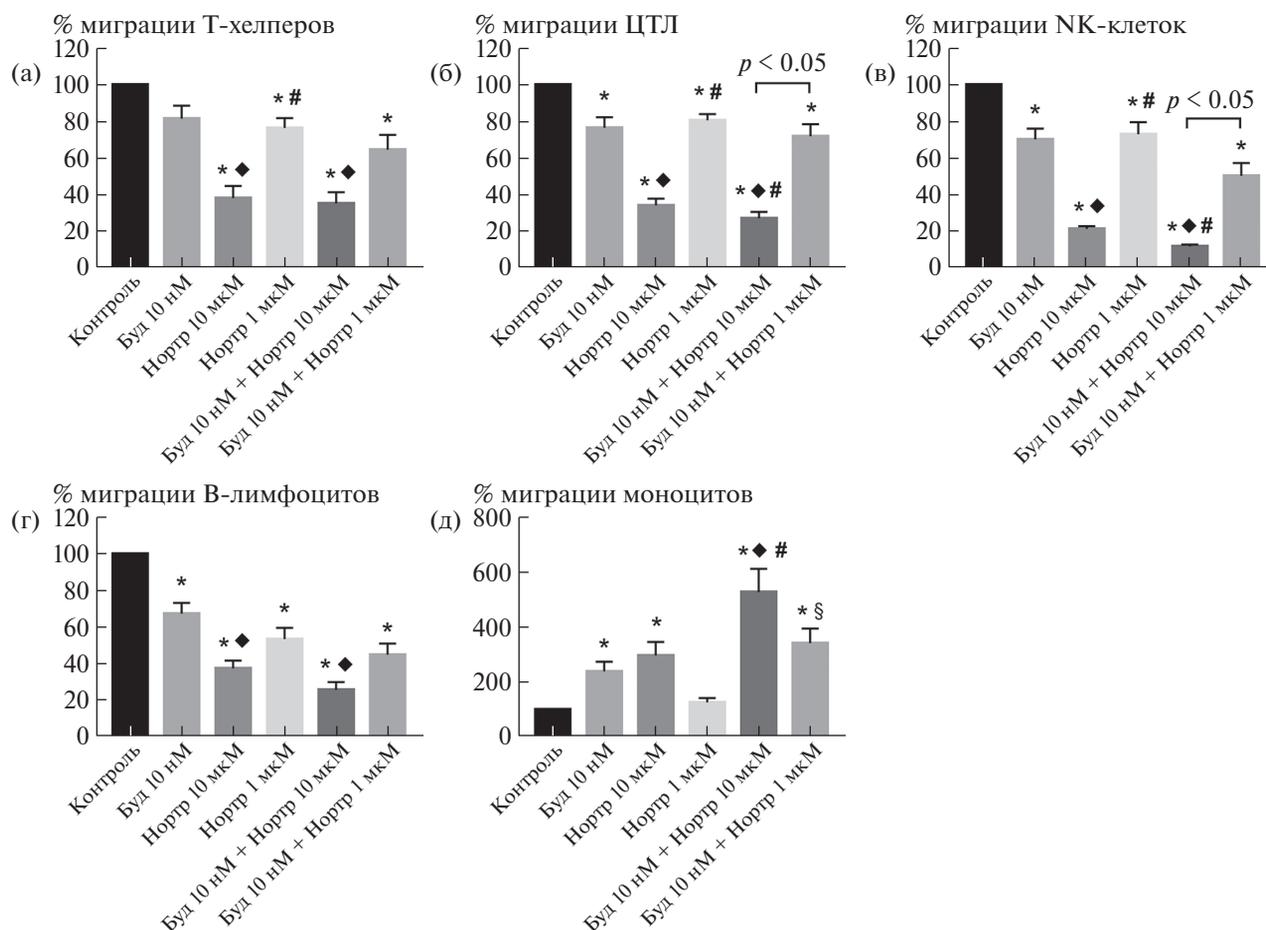
**Выделение МКПК.** Венозную кровь у пациентов забирали утром натощак в объеме 15 мл в пробирку, содержащую гепарин натрия (Белмедпрепараты, Беларусь) в концентрации 10 ЕД/мл в качестве антикоагулянта. МКПК выделяли из периферической крови путем центрифугирования на градиенте плотности 1.077 с использова-

нием раствора Lymphopure (Biolegend, США). Клетки ресуспендировали в концентрации  $1 \times 10^6$ /мл в культуральной среде RPMI 1640 (Gibco, США), обогащенной 1% фетальной телячьей сывороткой (ФТС, Capricorn Scientific, Германия).

**Инкубация МКПК с лекарственными средствами.** В стерильные пробирки помещали 1 мл клеточной суспензии и инкубировали с ГКС будесонидом (10 нМ, Glentham Life Sciences Ltd, Великобритания), нортриптилином (1 и 10 мкМ, Sigma-Aldrich, США) или их комбинацией в увлажненной 5% CO<sub>2</sub>/95% воздушной среде при 37°C. Спустя 1 ч 100 мкл клеточной суспензии (100 000 клеток) переносили в верхние камеры (съёмные вставки) 24-луночного миграционного планшета, имеющие поры диаметром 5 мкм (Costar Corning, США). В нижние камеры миграционного планшета помещали 600 мкл миграционного буфера, состоящего из культуральной среды RPMI 1640, обогащенной 1% ФТС и хемокинами CCL5 (10 нМ, R&D systems, США) или CXCL10 (10 нМ, Gibco, США). В качестве нестимулированного контроля использовали миграционный буфер, не содержащий хемокины. Далее планшеты инкубировали при 37°C, 5% CO<sub>2</sub>/95% атмосферного воздуха. По окончании 2 ч клетки, мигрировавшие в нижнюю камеру, собирали, отмывали при помощи фосфатного солевого буфера (ФСБ, Cell Wash, BD Biosciences, Польша) (условия центрифугирования: 500 g, 5 мин, комнатная температура) и ресуспендировали в ФСБ. Добавляли коктейль моноклональных антител, состоящий из CD3-FITC/CD14-PE/CD19-ECD/CD4-PerCP-Cy5.5/CD56-PC7/CD8-APC/CD45-APC Alexa Fluor 750 (Beckman Coulter, Франция; Exbio, Чехия; BD Biosciences, США), после чего клетки инкубировали в темноте в течение 20 мин при температуре 4°C. Далее клетки отмывали при помощи 3 мл ФСБ, содержащего 0.2% бычий сывороточный альбумин (BD Biosciences, США), и фиксировали путем внесения в пробирку 300 мкл 1% раствора параформальдегида. Используя проточный цитометр Navios (Beckman Coulter, США), настроенный на среднюю скорость потока клеток, подсчитывали их количество в течение 100 с.

Образцы анализировали с использованием программного обеспечения Kaluza (Beckman Coulter). Т-хелперы идентифицировали как CD45<sup>+</sup>CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>, цитотоксические Т-лимфоциты (ЦТЛ) — CD45<sup>+</sup>CD3<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>, В-лимфоциты — CD45<sup>+</sup>CD19<sup>+</sup>, NK-клетки — CD45<sup>+</sup>CD3<sup>+</sup>CD56<sup>+</sup>, моноциты — CD14<sup>+</sup> клетки.

**Статистическая обработка данных.** Статистическая обработка данных осуществлялась с использованием программы GraphPad Prism версия 7.00 (GraphPad Software, США). Оценка результатов исследования проводилась методом однофак-



**Рис. 1.** Влияние нортриптилина и будесонида на хемотаксис мононуклеарных клеток периферической крови в направлении CCL5. Представлены графики, демонстрирующие влияние нортриптилина (Нортр, 1 и 10 мкМ), будесонида (Буд, 10 нМ) и их сочетания на миграцию Т-хелперов (а), цитотоксических Т-лимфоцитов (ЦТЛ) (б), NK-клеток (в), В-лимфоцитов (г) и моноцитов (д), индуцированную 10 нМ CCL5. Здесь и на рис. 2: результаты представлены в виде среднего  $\pm$  стандартная ошибка среднего;  $n = 8$ . \*  $p < 0.05$  по сравнению с контролем (клетками крови, находившимися в присутствии хемокина, но в отсутствии лекарственных средств); #  $p < 0.05$  по сравнению с Буд 10 нМ; §  $p < 0.05$  по сравнению с Нортр 1 мкМ.

торного дисперсионного анализа (ANOVA) с последующим апостериорным попарным сравнением показателей с помощью критерия Тьюки. При всех видах статистического анализа критическое значение уровня значимости принимали как равное 5%.

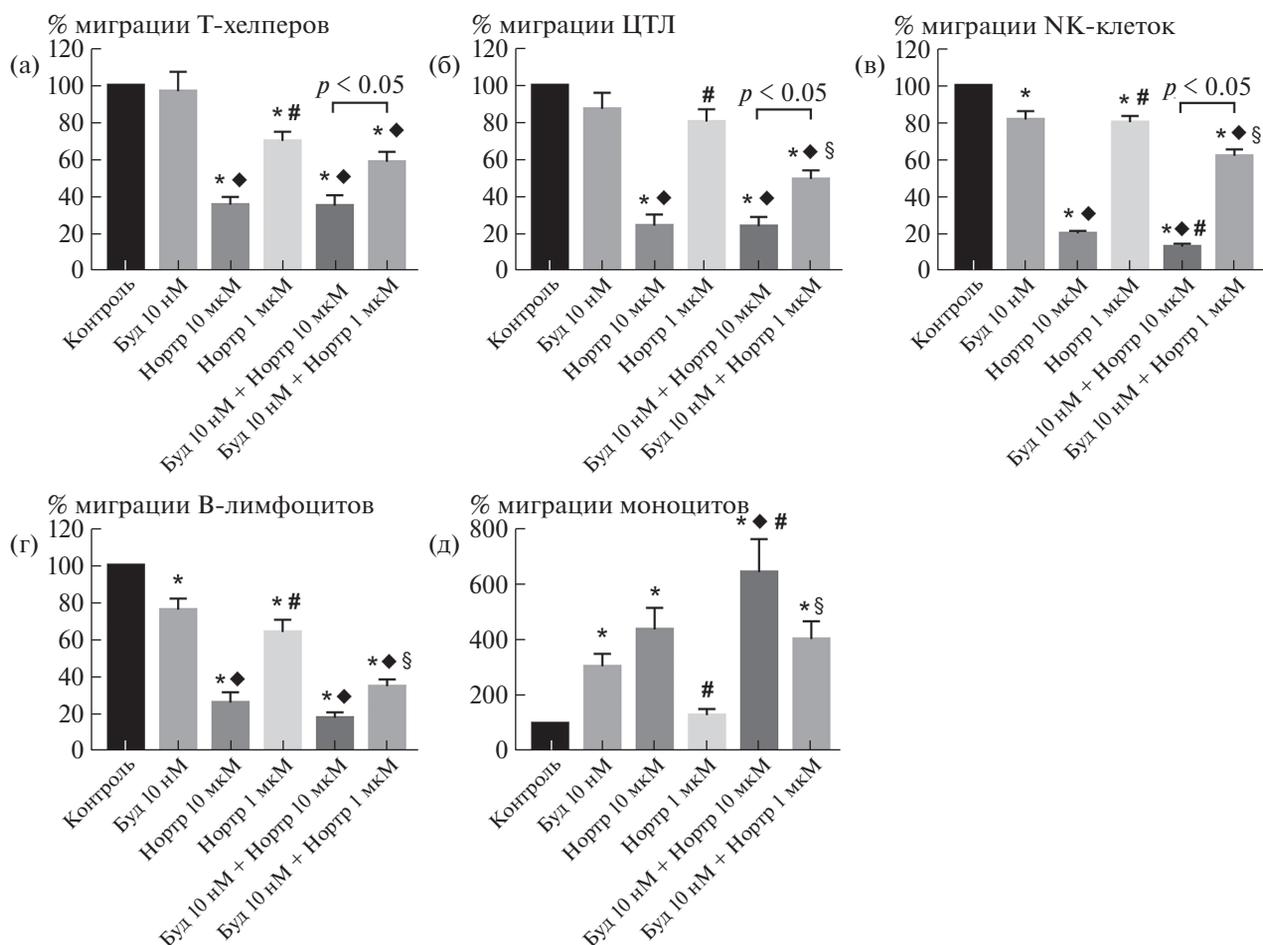
## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

В настоящем исследовании будесонид подавлял миграцию ЦТЛ, NK-клеток, В-лимфоцитов и ускорял перемещение моноцитов к хемокину CCL5 (рис. 1). Схожим образом ГКС влияли на хемотаксис NK-клеток, В-лимфоцитов и моноцитов в направлении CXCL10, но не были способны изменить миграцию к этому хемокину Т-хелперов и ЦТЛ (рис. 2).

Добавление к клеточной суспензии нортриптилина в обеих концентрациях (1 и 10 мкМ) при-

водило к снижению миграции Т-хелперов, ЦТЛ, NK-клеток и В-лимфоцитов в направлении CCL5. В минимальной концентрации (1 мкМ) нортриптилин не влиял на перемещение ЦТЛ и моноцитов к CXCL10, зато подавлял хемотаксис к этому лиганду рецепторов CXCR3 Т-хелперов, NK-клеток и В-лимфоцитов. Вместе с тем применение ТЦА в более высокой концентрации (10 мкМ) продемонстрировало его выраженное ингибирующее действие на миграцию к CXCL10 субпопулирующей лимфоцитов и активирующее влияние на перемещение к нему моноцитов.

Комбинация будесонида и нортриптилина (1 мкМ) не имела преимуществ по сравнению с одним будесонидом в отношении миграции МКПК к CCL5, но превосходила способность ГКС подавлять хемотаксис лимфоцитов к CXCL10. Сочетанное использование будесонида и нортриптилина в концентрации 10 мкМ сопровождало



**Рис. 2.** Влияние нортриптилина и будесонида на хемотаксис мононуклеарных клеток периферической крови в направлении CXCL10. Представлены графики, демонстрирующие влияние нортриптилина (Нортр, 1 и 10 мкМ), будесонида (Буд, 10 нМ) и их сочетания на миграцию Т-хелперов (а), цитотоксических Т-лимфоцитов (ЦТЛ) (б), НК-клеток (в), В-лимфоцитов (г) и моноцитов (д), индуцированную 10 нМ CXCL10.

лось более существенным (ингибирующим – на лимфоциты, активирующим – на моноциты) влиянием на хемотаксис клеток крови к CCL5 и CXCL10 по сравнению с эффектом одного будесонида. Способность изменять миграцию лимфоцитов крови к обоим хемокинам оказалась лишь незначительно лучше у комбинации нортриптилина (10 мкМ) с будесонидом, чем у одного ТЦА в той же концентрации, тогда как сочетанное действие этих же лекарственных средств на хемотаксис моноцитов крови было более выраженным по сравнению с одним нортриптилином (10 мкМ).

Как известно, у пациентов с ХОБЛ наблюдается скопление лимфоцитов в легочной ткани, где они синтезируют провоспалительные цитокины, металлопротеиназы, цитотоксические гранулы (перфорины, гранзим В). Эти белки способствуют привлечению в дыхательные пути нейтрофилов и разрушают протеины внеклеточного матрикса легких с последующим развитием эмфиземы [15, 16]. Приведенные в настоящем

исследовании данные в совокупности со значением лимфоцитов в патогенезе ХОБЛ дают основание полагать, что нортриптилин как самостоятельно, так и в совокупности с будесонидом, может замедлить прогрессирование ХОБЛ за счет снижения количества мигрировавших в легкие лимфоцитов.

Сообщается, что под влиянием ГКС наступает активация популяции противовоспалительных моноцитов, которые проявляют повышенную способность к миграции в очаг воспаления, продуцируют противовоспалительные медиаторы, обладают высокой фагоцитарной активностью и ограничивают активацию Т-лимфоцитов, что в конечном счете приводит к разрешению воспалительного процесса [17]. Учитывая такие сведения, мы предполагаем, что повышение хемотаксиса моноцитов к хемокинам CCL5 и CXCL10 под влиянием ГКС будесонида и нортриптилина (10 мкМ), выявленное в нашем исследовании, может быть связано с мобилизирующим действием

ЛС на противовоспалительные моноциты, что в последующем может способствовать подавлению воспаления. Для подтверждения данной гипотезы требуется проведение дополнительных исследований, в которых будет определен фенотип мигрировавших моноцитов.

Обобщая полученные данные, можно сделать заключение, что нортриптилин (10 мкМ), самостоятельно и в сочетании с будесонидом (10 нМ), подавляет миграцию к CCL5 и CXCL10 Т-хелперов, ЦТЛ, НК-клеток и В-лимфоцитов крови пациентов с ХОБЛ, а также ускоряет перемещение к этим хемокинам моноцитов крови. Комбинация нортриптилина (10 мкМ) и будесонида обладает более выраженным действием на миграцию клеток крови больных ХОБЛ (ингибирующим – на субпопуляции лимфоцитов и активирующим – на моноциты), чем один будесонид.

#### ИСТОЧНИК ФИНАНСИРОВАНИЯ

Исследование проведено при поддержке белорусской ГПНИ “Фундаментальные и прикладные науки – медицине” (задание № 2.56).

#### КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

#### СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Разрешение на проведение исследования с участием человека. Проведение исследования было одобрено комитетом по биомедицинской этике учреждения образования “Белорусский государственный медицинский университет” (протокол № 8 от 21.01.2019). Перед забором крови и определением функции внешнего дыхания все испытуемые дали письменное добровольное согласие на участие в исследовании.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Adeloye D., Agarwal D., Barnes P.J., et al.* Research priorities to address the global burden of chronic obstructive pulmonary disease (COPD) in the next decade // *J. Glob. Health.* 2021. V. 11. Art. 15003.
2. *Agusti A., Fabbri L.M., Singh D., et al.* Inhaled corticosteroids in COPD: friend or foe? // *Eur. Respir. J.* 2018. V. 52. Art. 1801219.
3. *Babu K.S., Kastelik J.A., Morjaria J.B.* Inhaled corticosteroids in chronic obstructive pulmonary disease: a pro-con perspective // *Br. J. Clin. Pharmacol.* 2014. V. 78. P. 282–300.
4. *Yang I.A., Clarke M.S., Sim E.H., et al.* Inhaled corticosteroids for stable chronic obstructive pulmonary disease // *Cochrane Database Syst. Rev.* 2012. V. 7. Article CD002991.
5. *Lehár J., Krueger A.S., Avery W., et al.* Synergistic drug combinations tend to improve therapeutically relevant selectivity // *Nat. Biotechnol.* 2009. V. 27. № 7. P. 659–666.
6. *Mercado N., To Y., Ito K., et al.* Nortriptyline reverses corticosteroid insensitivity by inhibition of phosphoinositide-3-kinase- $\delta$  // *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 2011. V. 337. № 2. P. 465–470.
7. *Howes S., Hartmann-Boyce J., Livingstone-Banks J., et al.* Antidepressants for smoking cessation // *Cochrane Database Syst. Rev.* 2020. V. 4. № 4. Article CD000031.
8. *Tselebis A., Pachi A., Ilias I., et al.* Strategies to improve anxiety and depression in patients with COPD: a mental health perspective // *Neuropsychiatr. Dis. Treat.* 2016. V. 12. P. 297–328.
9. *Kadushkin A., Tahanovich A., Movchan L., et al.* Nortriptyline enhances corticosteroid sensitivity of blood T cells from patients with chronic obstructive pulmonary disease // *J. Physiol. Pharmacol.* 2021. V. 72. № 5. P. 793–805.
10. *Kadushkin A.G., Tahanovich A.D., Movchan L.V., et al.* Nortriptyline overcomes corticosteroid resistance in NK and NKT-like cells from peripheral blood of patients with chronic obstructive pulmonary disease // *Research Results in Pharmacology.* 2022. V. 8. № 1. P. 59–70.
11. *Кадушкин А.Г., Таганович А.Д., Мовчан Л.В., и др.* Субпопуляционный состав В-лимфоцитов крови, коэкспрессирующих CD5 и хемокиновые рецепторы, у пациентов с хронической обструктивной болезнью легких // *Иммунология.* 2022. Т. 43. № 2. С. 197–207.
12. *Кадушкин А.Г., Таганович А.Д., Мовчан Л.В., и др.* Популяционная перестройка В-лимфоцитов, экспрессирующих хемокиновые рецепторы, у пациентов с хронической обструктивной болезнью легких // *Биомедицинская химия.* 2022. Т. 68. № 2. С. 134–143.
13. *Costa C., Traves S.L., Tudhope S.J., et al.* Enhanced monocyte migration to CXCR3 and CCR5 chemokines in COPD // *Eur. Respir. J.* 2016. V. 47. № 4. P. 1093–1102.
14. *Sacerdote P., Bianchi M., Panerai A.E.* Chlorimipramine and nortriptyline but not fluoxetine and fluvoxamine inhibit human polymorphonuclear cell chemotaxis in vitro // *Gen. Pharmacol.* 1994. V. 25. P. 409–412.
15. *Rovina N., Koutsoukou A., Koulouris N.G.* Inflammation and immune response in COPD: where do we stand? // *Mediators Inflamm.* 2013. V. 2013. Art. 413735.
16. *Polverino F., Seys L.J., Bracke K.R., et al.* B cells in chronic obstructive pulmonary disease: moving to center stage // *Am. J. Physiol. Lung Cell Mol. Physiol.* 2016. V. 311. № 4. P. L687–L695.
17. *Ehrchen J.M., Roth J., Barczyk-Kahlert K.* More Than Suppression: Glucocorticoid Action on Monocytes and Macrophages // *Front. Immunol.* 2019. V. 10. Art. 2028.

## NORTRIPTYLINE MODULATES THE MIGRATION OF PERIPHERAL BLOOD LYMPHOCYTES AND MONOCYTES IN PATIENTS WITH CHRONIC OBSTRUCTIVE PULMONARY DISEASE

A. G. Kadushkin<sup>a,#</sup>, A. D. Tahanovich<sup>a</sup>, L. V. Movchan<sup>b</sup>, T. S. Kolesnikova<sup>a</sup>,  
A. V. Khadasouskaya<sup>a</sup>, and T. V. Shman<sup>b</sup>

<sup>a</sup> Belarusian State Medical University, Minsk, Belarus

<sup>b</sup> Republican Scientific and Practical Center for Pediatric Oncology, Hematology and Immunology, Minsk Region, Belarus

<sup>#</sup>e-mail: kadushkyn@gmail.com

Presented by Academician of the RAS L.P. Titov

In the present study, the effect of nortriptyline (1 and 10  $\mu\text{M}$ ), budesonide (10 nM) and their combination on the migration of peripheral blood lymphocytes and monocytes from patients with chronic obstructive pulmonary disease (COPD) towards chemokines CCL5 and CXCL10 was evaluated by flow cytometry. Nortriptyline (10  $\mu\text{M}$ ), alone and in combination with budesonide, inhibited the migration of T helper cells, cytotoxic T lymphocytes, NK cells and B lymphocytes towards CCL5 and CXCL10, as well as enhanced monocyte migration towards these chemokines. The combination of nortriptyline (1  $\mu\text{M}$ ) and budesonide was superior to the ability of budesonide to suppress the chemotaxis of lymphocyte subpopulations towards CXCL10, but not towards CCL5. The combination of nortriptyline (10  $\mu\text{M}$ ) and budesonide was more potent at suppressing the migration of lymphocyte subpopulations towards CCL5 and CXCL10 and at increasing monocyte chemotaxis towards both chemokines than budesonide alone. The results of the study demonstrate the ability of nortriptyline alone to modulate the migration of peripheral blood lymphocytes and monocytes from patients with COPD and to potentiate the effects of budesonide.

**Keywords:** nortriptyline, budesonide, steroid resistance, COPD, chemotaxis, CCL5, CXCL10

УДК 575.22:595.773.4

## ТРАНСКРИПТОМ КЛЕТОК РАКА ЛЕГКОГО, УСТОЙЧИВЫХ К ЦИТОТОКСИЧЕСКОЙ АКТИВНОСТИ МАКРОФАГОВ

© 2022 г. О. В. Ковалева<sup>1,\*</sup>, П. А. Подлесная<sup>1</sup>, М. В. Васильева<sup>1</sup>,  
П. Б. Копнин<sup>1</sup>, А. С. Балкин<sup>2</sup>, А. О. Плотников<sup>2</sup>,  
академик РАН Н. Е. Кушлинский<sup>1</sup>, профессор РАН А. Н. Грачев<sup>1</sup>

Поступило 14.06.2022 г.

После доработки 02.07.2022 г.

Принято к публикации 02.07.2022 г.

Роль иммунной системы в прогрессии опухолей является предметом изучения уже более 100 лет с тех пор, как Пауль Эрлих выдвинул гипотезу, что наличие иммунной системы ограничивает возникновение онкологических заболеваний. Одним из механизмов, сдерживающих инициацию и прогрессию опухоли, является цитотоксическая активность макрофагов, однако, в ряде случаев, ее недостаточно для контроля опухолевого процесса. Это может быть вызвано как развитием устойчивости опухолевых клеток, к противоопухолевой активности макрофагов, так и развитием толерантного фенотипа макрофагов, не обладающих достаточной противоопухолевой активностью. В данной работе впервые были получены и охарактеризованы клетки рака легкого, устойчивые к цитотоксическому действию макрофагов, и выявлены гены, ассоциированные с наблюдаемыми изменениями. Понимание механизмов устойчивости опухолевых клеток к цитотоксической активности макрофагов и особенностями ее проявления в условиях опухолевого окружения критически важно для повышения эффективности существующих методов лечения онкологических заболеваний и разработки перспективных методов иммунотерапии опухолей.

*Ключевые слова:* немелкоклеточный рак легкого, толерантность, цитотоксичность, макрофаг, RNA-seq

DOI: 10.31857/S268673892205016X

Современные методы лечения злокачественных опухолей часто включают различные подходы к стимуляции противоопухолевой активности иммунной системы. Так, лекарственные препараты на основе моноклональных антител активируют антителозависимый клеточный фагоцитоз. Использование бактериальных продуктов или других стимуляторов классической активации макрофагов активирует антителонезависимую цитотоксичность последних. При этом, несмотря

на успехи данных методов лечения, остается неясным, почему в большом количестве случаев развивается устойчивость опухолей к проводимой терапии. Одним из потенциальных механизмов является приобретение опухолевыми клетками устойчивости к цитотоксической активности макрофагов.

Макрофаги, ассоциированные с опухолью (MAO), считаются основным регулятором противоопухолевого иммунного ответа и, как правило, характеризуются противовоспалительным фенотипом M2 [1]. Продуцируя факторы роста, протеолитические ферменты и белки-ингибиторы иммунных контрольных точек MAO способствуют прогрессии опухоли [2]. Все терапевтические стратегии, мишенями которых являются макрофаги, направлены на репрограммирование данного типа клеток с противовоспалительного на провоспалительный фенотип. Однако данная тактика не нашла применения в терапевтической

<sup>1</sup> Федеральное государственное бюджетное учреждение "Национальный медицинский исследовательский центр онкологии им. Н.Н. Блохина" Минздрава России, Москва, Россия

<sup>2</sup> Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт клеточного и внутриклеточного симбиоза Уральского отделения Российской академии наук, Оренбург, Россия

\*e-mail: ovkovaleva@gmail.com

**Таблица 1.** Дифференциально экспрессирующиеся днкРНК в образцах опухолевых клеток, устойчивых к цитотоксической активности

Gene ID	Изменение экспрессии	<i>p</i> значение
LINC00639	6.32	0.047
IGFL2-AS1	6.15	4.41E-07
POT1-AS1	2.91	0.001
MBNL1-AS1	2.51	0.010
ZNF710-AS1	2.30	0.026
PSMB8-AS1	2.03	3.27E-05
LINC01291	0.38	0.0004
LINC01508	0.14	0.047

практике ввиду довольно низкой эффективности [3, 4]. Каковы же тогда механизмы взаимодействия опухолевых клеток и цитотоксических макрофагов? В ответ на активность иммунной системы опухолевые клетки приобретают устойчивость к цитотоксичности [5]. Однако клеточные и молекулярные механизмы этого явления на данный момент практически не изучены.

Таким образом, целью данной работы стало выявление генов, потенциально ассоциированных с приобретением опухолевыми клетками устойчивости к цитотоксической активности макрофагов.

В качестве биологической модели использовали клетки немелкоклеточного рака легкого H1975 и их устойчивые производные – H1975(LPS), полученные в результате кокультивирования с цитотоксическими макрофагами, стимулированными липополисахаридом [5].

Исследование выполнено в соответствии с этическими нормами обращения с животными, принятыми Европейской конвенцией по защите позвоночных животных, используемых для исследовательских и иных научных целей. Проведение исследования одобрено комитетом по биоэтической этике ФГБУ “НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина” Минздрава России (протокол от 01.12.2021).

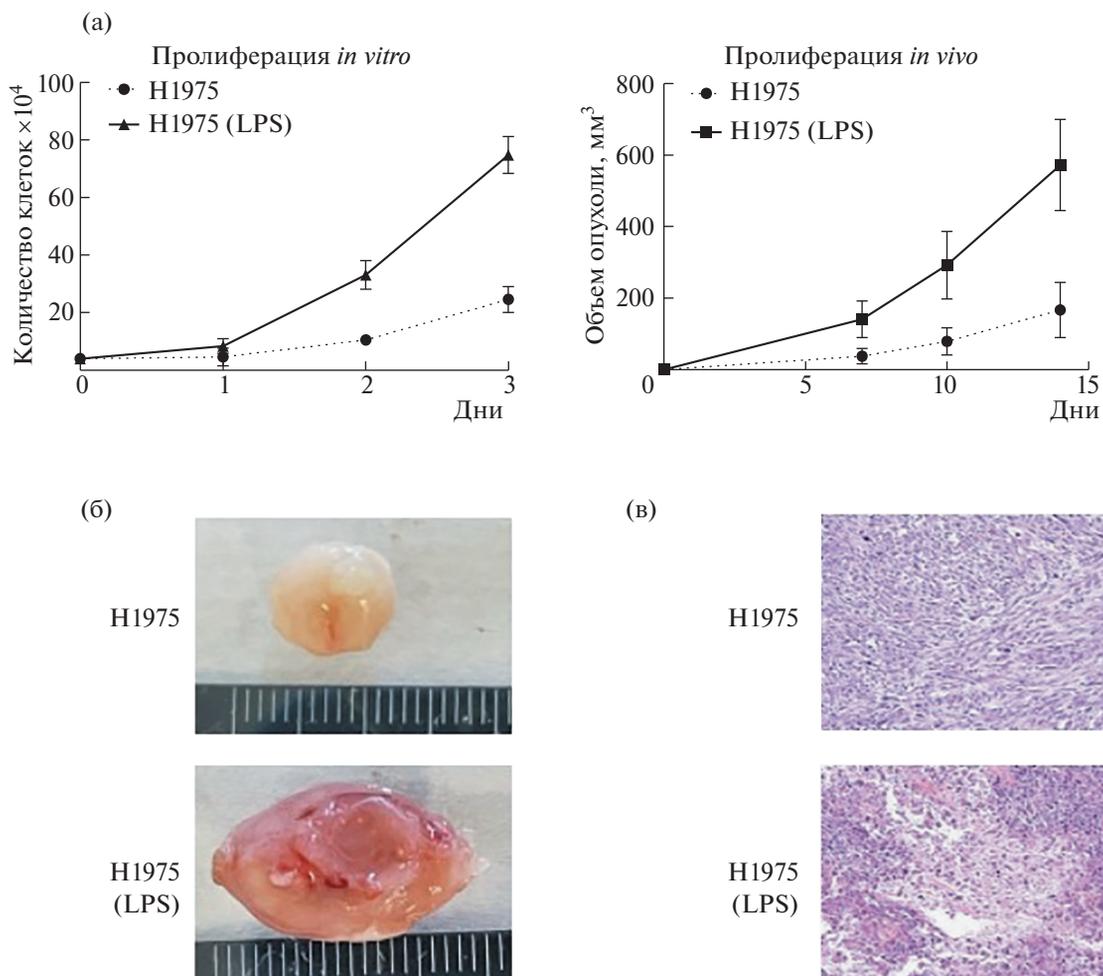
Приготовление кДНК библиотек и секвенирование на платформе Illumina HiSeq 2000 выполнялись в соответствии с протоколами Illumina для RNA-seq. Функциональная аннотация генов проводилась с использованием пакета R Homo.sapiens, Team BC (2015) и базы данных Ensembl. Анализ насыщенности метаболических путей проводили для достоверно дифференциально экспрессирующихся генов (ДЭГ) с использованием пакета R fgsea. Функциональная аннотация

дифференциально экспрессирующихся генов была проведена с использованием базы данных кластеров ортологичных групп генов (COG).

На первом этапе исследования проанализировали степень злокачественности полученных клеток, по сравнению с исходными клетками H1975. Для этого провели оценку пролиферации *in vitro* и скорости роста подкожных ксенографтов *in vivo*. Повышенная скорость деления является одной из основополагающих характеристик злокачественных клеток. Анализ динамики роста клеточных линий проводился при помощи прямого подсчета количества клеток в камере Горяева каждые 24 ч. Для оценки скорости роста клеток *in vivo* использовали самок бестимусных мышей линии BALB/c Nude в возрасте 6–8 нед, по 5 животных в каждой группе. Каждому животному подкожно прививалось по 2 опухоли, прививочная доза составляла  $5 \times 10^6$  клеток. Продолжительность эксперимента составляла 3 нед. Образовавшиеся опухоли использовали для гистологического анализа. Результаты экспериментов представлены на рис. 1.

Производные клеточной линии немелкоклеточного рака легкого, устойчивые к цитотоксической активности, статистически достоверно делаются быстрее контрольной линии – среднее время удвоения составляет 0.6 сут, в то время как для контрольной линии – 1.3 сут. Проведенные эксперименты на животных также показали, что клетки, обладающие устойчивостью к цитотоксической активности макрофагов, характеризуются более высокой скоростью роста подкожных ксенографтов по сравнению с клетками исходной линии. Дополнительно опухоли, образуемые клетками, устойчивыми к цитотоксической активности макрофагов, характеризовались значимо большим размером, большим количеством очагов некроза и повышенной васкуляризацией, что свидетельствует об их более высоком злокачественном потенциале. Полученные результаты свидетельствуют о том, что цитотоксические макрофаги способствуют отбору более малигнизированных опухолевых клеток, тем самым способствуя опухолевой прогрессии.

На следующем этапе работы проведен анализ транскриптома исследуемых клеточных линий. В результате проведенного анализа обнаружено 283 дифференциально экспрессирующихся гена, с достоверно ( $\log_2$  fold change >1, FDR corrected *p*-value <0.05) изменяющейся экспрессией в образцах H1975 (LPS) по сравнению с контролем. Среди них экспрессия 165 генов увеличивалась в образцах H1975 (LPS) по сравнению с контролем, экспрессия 118 генов снижалась. Результаты транскриптомного анализа были подтверждены для части генов при помощи количественной ОТ-ПЦР. На основе базы данных KEGG с использованием пакета fgsea были выявлены досто-



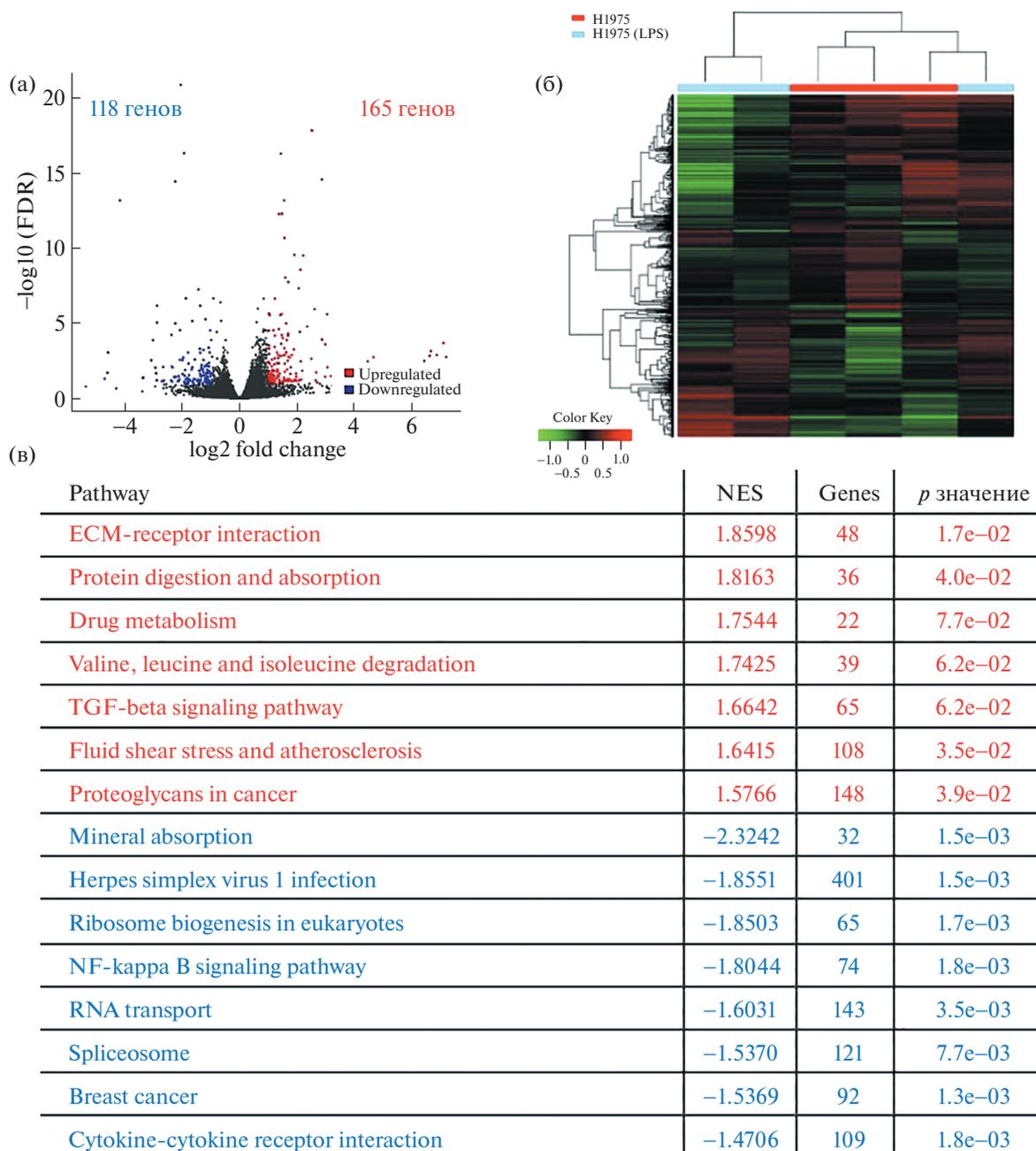
**Рис. 1.** Исследование пролиферативных характеристик клеточных линий, устойчивых к цитотоксической активности макрофагов. (а) Динамика роста клеток НМРЛ Н1975 и Н1975(LPS) *in vitro* и *in vivo*, (б) внешний вид подкожных ксенографтов, полученных в результате введения клеток НМРЛ Н1975 и Н1975(LPS) иммунодефицитным мышам BALB/c Nude, (в) гистологическое окрашивание срезов опухолей подкожных ксенографтов гематоксилин-эозином, увеличение 100х.

верно обогащенные сигнальные пути, потенциально вовлеченные в опухолевую прогрессию, например, интегрин-зависимый сигнальный путь и TGF $\beta$  сигнальный путь (рис. 2).

Помимо анализа дифференциально экспрессирующихся белок-кодирующих генов, дополнительно проведен анализ некодирующих РНК, экспрессия которых достоверно изменялась в экспериментальных образцах по сравнению с контролем. Все они относились к классу длинных некодирующих РНК (днкРНК). Результаты представлены в табл. 1.

Так как одним из основных изменений клеточных характеристик являлось усиление пролиферативных свойств клеток, для последующего анализа проведен выбор отдельных генов, потенциально вовлеченных в регуляцию пролиферации. Результаты представлены в табл. 2.

Проведенный анализ сравнения метаболических путей между исследуемыми группами позволил идентифицировать сигнальные пути, вовлеченные в регуляцию клеточной пролиферации. К таким сигнальным путям относятся, в частности, интегрин-зависимые сигнальные пути. Известно, что в процессе клеточной адгезии после взаимодействия интегринов со своими лигандами, в основном белками внеклеточного матрикса, к этому комплексу привлекаются различные сигнальные молекулы, в частности нерецепторная тирозинкиназа FAK, которая в результате последовательных фосфорилирований может играть существенную роль в активации Ras-зависимых сигнальных путей, что, в конечном итоге, приводит к активации ERK1/2 и усилению подвижности клеток [6]. Обратив внимание на усиление экспрессии интегринов, выдвинуто предположе-



**Рис. 2.** Транскриптомный анализ клеток НМРЛ, устойчивых к цитотоксической активности макрофагов. (а) Диаграмма рассеяния (Volcano plot), отображающая дифференциальную экспрессию генов; (б) Тепловая карта (Heatmap) дифференциально экспрессирующихся генов; (в) анализ насыщенности метаболических путей на основе базы данных KEGG.

ние, что возможными кандидатами на роль “активаторов” пролиферации могут служить МАР-киназы. Например, в литературе описаны механизмы активации пролиферации посредством р38 за счет активации с-Мус и последующей инициации митотических циклов с понижением потребности клетки во внешних митогенных сигналах [7]. Также стоит отметить, что при прогрессии

опухолей р38 часто ассоциирована с инвазивностью и химиорезистентностью различных солидных новообразований, а также со снижением безрецидивной выживаемости пациентов [8, 9].

Сигнальные пути, активируемые цитокином TGF-β, также регулируют различные биологические процессы, например деление клеток, их миграцию и дифференцировку, причем его эффек-

**Таблица 2.** Дифференциально экспрессирующиеся гены в образцах опухолевых клеток, устойчивых к цитотоксической активности, потенциально участвующие в регуляции пролиферации

Gene ID	Изменение экспрессии	<i>p</i> значение	Название
SDC2	8.40	0.005	syndecan 2
MAP2	7.36	7.16E-16	microtubule associated protein 2
TLR2	5.13	6.29E-06	toll like receptor 2
CHI3L1	4.20	1.73E-08	chitinase 3 like 1
TNFSF10	3.56	0.0006	TNF superfamily member 10
COL4A6	2.62	0.047	collagen type VIII alpha 1 chain
ITGA1	3.10	0.0005	integrin subunit alpha 1
OPG	3.01	0.011	TNF receptor superfamily member 11b
PLCD4	2.95	0.030	phospholipase C delta 4
PLAT	2.73	1.63E-16	plasminogen activator. tissue type
COL4A6	2.62	0.047	collagen type IV alpha 6 chain
CAVIN2	2.60	1.75E-12	caveolae associated protein 2
TGFB1	2.28	2.21E-05	transforming growth factor beta 1
DUSP1	0.49	0.013	dual specificity phosphatase 1
TP63	0.42	0.013	tumor protein p63
WNT10B	0.41	0.023	Wnt family member 10B
RRAGD	0.34	0.002	Ras related GTP binding D
NKD2	0.26	0.001	NKD inhibitor of WNT signaling pathway 2
SCIN	0.14	2.62E-06	scinderin
PLCB1	0.13	0.007	phospholipase C beta 1

ты варьируют в зависимости от типа клеток-мишеней и их микроокружения. Одним из основных механизмов действия TGF- $\beta$  является взаимодействие с белками Smad, приводящее к регуляции множества генов. С другой стороны, TGF- $\beta$  может активировать функцию MAP-киназ, в частности p38, через Smad-независимые механизмы. Также необходимо отметить, что по результатам транскриптомного секвенирования было выявлено повышение экспрессии остеопротегерина (OPG), являющегося представителем 11b суперсемейства рецепторов TNF (TNFRSF11B). Данный рецептор представляет собой растворимый белок, основная функция которого – ингибирование TRAIL – индуцированного апоптоза. Для различных солидных опухолей показана ассоциация содержания OPG с агрессивностью опухолей [10–13]. Показано, что секреция OPG опосредована активацией двух сигнальных каскадов, а именно p38 и ERK1/2, которые, в свою очередь, активируются в ответ на

влияние цитокина IL-1 $\beta$ , производимого макрофагами [14], что согласуется с полученными результатами.

Стоит отметить, что в изучаемых клетках, обладающих устойчивостью к цитотоксической активности, наблюдалось снижение экспрессии фосфатазы DUSP1, что также может объяснять повышение пролиферативных свойств клеток посредством активации киназы p38. Наблюдаемое нами снижение экспрессии некоторых других генов, например NKD2, также может объяснять усиление пролиферации клеток посредством других механизмов, таких как Wnt-сигнальный путь [15].

В данной работе также выявлены изменения в экспрессии длинных некодирующих РНК. Так, длинные некодирующие РНК (lncRNA) IGFL2-AS1 и POT1-AS1 участвуют в развитии и метастазировании рака желудка [16–18]. Помимо этого, для IGFL2-AS1 показано, что она принимает непосредственное участие в формировании проли-

феративного фенотипа клеток колоректального рака. Для длинной некодирующей РНК MBNL1-AS1 показано, что она играет важную роль в развитии рака мочевого пузыря [19]. Также стоит обратить внимание, что экспрессия двух некодирующих РНК LINC01291 и LINC01508 снижалась в исследуемых образцах по сравнению с контролем. Известно, что экспрессия LINC01508 снижена в цисплатин-резистентных клетках рака яичников. Оверэкспрессия LINC01508 повышает чувствительность клеток РЯ к цисплатину *in vitro* и *in vivo*, но является маркером плохого прогноза. Повышенный уровень LINC01508 может подавлять устойчивость клеток к цисплатину посредством ингибирования Hippo-YAP сигнального пути [20].

Таким образом, транскриптомный анализ позволил впервые выявить в клетках рака легкого, устойчивых к цитотоксическому действию макрофагов, изменение регуляции ряда ключевых сигнальных путей, каждый из которых может вносить свой вклад в ростовые характеристики опухолевых клеток. На основании полученных данных были выявлены гены-мишени, отвечающие за приобретение опухолевыми клетками устойчивости к цитотоксическому действию макрофагов.

#### ИСТОЧНИК ФИНАНСИРОВАНИЯ

Исследование выполнено за счет гранта Российского научного фонда № 22-15-00291.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Zhu S., Luo Z., Li X., et al. Tumor-associated macrophages: role in tumorigenesis and immunotherapy implications // *J Cancer*. 2021. V. 12. № 1. P. 54–64.
2. Mantovani A., Sozzani S., Locati M., et al. Macrophage polarization: tumor-associated macrophages as a paradigm for polarized M2 mononuclear phagocytes // *Trends Immunol*. 2002. V. 23. № 11. P. 549–55.
3. Wynn T.A., Chawla A., Pollard J.W. Macrophage biology in development, homeostasis and disease // *Nature*. 2013. V. 496. № 7446. P. 445–55.
4. Kowal J., Kornete M., Joyce J.A. Re-education of macrophages as a therapeutic strategy in cancer // *Immunotherapy*. 2019. V. 11. № 8. P. 677–89.
5. Подлесная П.А., Ковалева О.В., Самойлова Д.В. и др. Механизмы отбора опухолевых клеток под воздействием цитотоксической активности макрофагов // *Злокачественные опухоли*. 2019. V. 9s1. № P. 134.
6. Playford M.P., Schaller M.D. The interplay between Src and integrins in normal and tumor biology // *Oncogene*. 2004. V. 23. № 48. P. 7928–46.
7. Chen S., Qiong Y., Gardner D.G. A role for p38 mitogen-activated protein kinase and c-myc in endothelin-dependent rat aortic smooth muscle cell proliferation // *Hypertension*. 2006. V. 47. № 2. P. 252–8.
8. Donnelly S.M., Paplomata E., Peake B.M., et al. P38 MAPK contributes to resistance and invasiveness of HER2-overexpressing breast cancer // *Curr Med Chem*. 2014. V. 21. № 4. P. 501–10.
9. Esteva F.J., Sahin A.A., Smith T.L., et al. Prognostic significance of phosphorylated P38 mitogen-activated protein kinase and HER-2 expression in lymph node-positive breast carcinoma // *Cancer*. 2004. V. 100. № 3. P. 499–506.
10. Li X., Liu Y., Wu B., et al. Potential role of the OPG/RANK/RANKL axis in prostate cancer invasion and bone metastasis // *Oncology reports*. 2014. V. 32. № 6. P. 2605–11.
11. Tsukamoto S., Ishikawa T., Iida S., et al. Clinical significance of osteoprotegerin expression in human colorectal cancer // *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research*. 2011. V. 17. № 8. P. 2444–50.
12. Ito R., Nakayama H., Yoshida K., et al. Expression of osteoprotegerin correlates with aggressiveness and poor prognosis of gastric carcinoma // *Virchows Archiv : an international journal of pathology*. 2003. V. 443. № 2. P. 146–51.
13. Russmueller G., Moser D., Wurger T., et al. Upregulation of osteoprotegerin expression correlates with bone invasion and predicts poor clinical outcome in oral cancer // *Oral Oncol*. 2015. V. 51. № 3. P. 247–53.
14. Chung S.T., Geerts D., Roseman K., et al. Osteoprotegerin mediates tumor-promoting effects of Interleukin-1beta in breast cancer cells // *Molecular cancer*. 2017. V. 16. № 1. P. 27.
15. Zhao S., Kurenbekova L., Gao Y., et al. NKD2, a negative regulator of Wnt signaling, suppresses tumor growth and metastasis in osteosarcoma // *Oncogene*. 2015. V. 34. № 39. P. 5069–79.
16. Ma Y., Liu Y., Pu Y.S., et al. LncRNA IGFL2-AS1 functions as a ceRNA in regulating ARPP19 through competitive binding to miR-802 in gastric cancer // *Molecular carcinogenesis*. 2020. V. 59. № 3. P. 311–22.
17. Wright C.M., Kirschner M.B., Cheng Y.Y., et al. Long non coding RNAs (lncRNAs) are dysregulated in Malignant Pleural Mesothelioma (MPM) // *PloS one*. 2013. V. 8. № 8. P. e70940.
18. Chen W.M., Chen Y.M., Jiang S.Y., et al. LncRNA POT1-AS1 accelerates the progression of gastric cancer by serving as a competing endogenous RNA of microRNA-497-5p to increase PDK3 expression // *Journal of gastrointestinal oncology*. 2021. V. 12. № 6. P. 2728–42.
19. Wei X., Yang X., Wang B., et al. LncRNA MBNL1-AS1 represses cell proliferation and enhances cell apoptosis via targeting miR-135a-5p/PHLPP2/FOXO1 axis in bladder cancer // *Cancer medicine*. 2020. V. 9. № 2. P. 724–36.
20. Xiao L., Shi X.Y., Li Z.L., et al. Downregulation of LINC01508 contributes to cisplatin resistance in ovarian cancer via the regulation of the Hippo-YAP pathway // *J Gynecol Oncol*. 2021. V. 32. № 5. P. e77.

## TRANSCRIPTOME OF LUNG CANCER CELLS RESISTANT TO THE CYTOTOXIC ACTIVITY OF MACROPHAGES

**O. V. Kovaleva<sup>a,#</sup>, P. A. Podlesnaya<sup>a</sup>, M. V. Vasileva<sup>a</sup>, P. B. Kopnin<sup>a</sup>, A. S. Balkin<sup>b</sup>, A. O. Plotnikov<sup>b</sup>,  
Academician of the RAS N. E. Kushlinskii<sup>a</sup>, and Professor of the RAS A. N. Gratchev<sup>a</sup>**

<sup>a</sup> *N.N. Blokhin National Medical Research Center of Oncology, Moscow, Russian Federation*

<sup>b</sup> *Institute for Cellular and Intracellular Symbiosis of the Ural Branch of the Russian Academy of Sciences, Orenburg,  
Russian Federation*

<sup>#</sup>*e-mail: ovkovaleva@gmail.com*

The role of the immune system in tumor progression has been the subject of research for more than 100 years since Paul Ehrlich hypothesized that the presence of the immune system limits the occurrence of cancer. One of the mechanisms hindering the initiation and progression of the tumor is the cytotoxic activity of macrophages, however, in some cases, it is not enough to control the tumor process. This can be caused both by the development of resistance of tumor cells to the antitumor activity of macrophages, and the development of a tolerant phenotype of macrophages that do not have sufficient antitumor activity. In this work, for the first time, lung cancer cells resistant to the cytotoxic action of macrophages were obtained and characterized, and genes associated with the observed changes were identified. Understanding the mechanisms of resistance of tumor cells to the cytotoxic activity of macrophages and the peculiarities of its manifestation in a tumor environment is critically important for improving the effectiveness of existing methods of cancer treatment and developing novel methods for tumor immunotherapy.

*Keywords:* non-small cell lung cancer, tolerance, cytotoxicity, macrophage, RNA-seq