

СОДЕРЖАНИЕ

Том 56, номер 5, 2022

ВИРУСНЫЕ ИНФЕКЦИИ: ОТ МЕХАНИЗМОВ РЕПЛИКАЦИИ И ПАТОГЕНЕЗА К ПОДХОДАМ ТЕРАПИИ

- Физиологические среды в исследованиях метаболизма клеток
в норме и при патологии
М. В. Голиков, В. Т. Валув-Эллистон, О. А. Смирнова, А. В. Иванов 687
- Повышение бактерицидного эффекта антибиотиков путем ингибирования
ферментов, вовлеченных в генерацию сероводорода у бактерий
Т. А. Серегина, К. В. Лобанов, Р. С. Шакулов, А. С. Миронов 697
- Мышиные модели хронических вирусных инфекций и ассоциированных
с ними опухолей
Д. В. Авдошина, А. С. Кондрашова, М. Г. Беликова, Е. О. Баярова 710
- Механизмы выживания опухолевых клеток, инфицированных цитомегаловирусом
Г. Р. Виноградская, А. В. Иванов, А. А. Куц 732
- Онколитические вирусы в терапии лимфопролиферативных заболеваний
*П. О. Воробьев, Ф. Э. Бабаева, А. В. Панова, Я. Шакиба,
С. К. Кравченко, А. В. Соболева, А. В. Липатова* 751
- Блокирование двух альтернативных путей выживания клеток КАСУМИ-1
с помощью рибонуклеазы биназы и ингибитора киназ АКТ1/2
*В. А. Митькевич, И. Ю. Петрушанко, М. Г. Энгельгардт,
О. И. Кечко, А. А. Макаров* 764
- Моделирование инфекции SARS-CoV-2 у мышей за счет транзientной экспрессии
гена ACE2 человека путем интраназального введения AAV-hACE2
*Д. В. Глазкова, Е. В. Богословская, Ф. А. Урусов, Н. П. Карташова,
Е. А. Глубокова, А. В. Грачева, Е. Б. Файзулов, Г. В. Трунова,
В. А. Хохлова, О. А. Безбородова, А. А. Панкратов,
И. А. Ленева, Г. А. Шипулин* 774
- Белок HBx потенцирует реактивацию вируса гепатита В
*С. А. Брезгин, А. П. Костюшева, Н. И. Пономарева, В. И. Гегечкори,
Н. П. Кирдяшкина, С. Р. Айвазян, Л. Н. Дмитриева, Л. Н. Кокорева,
В. П. Чуланов, Д. С. Костюшев* 783
- Экспрессия обратной транскриптазы ВИЧ-1 вызывает усиление дыхательной
активности митохондрий в клетках аденокарциномы мышей
*Н. Ф. Закирова, А. С. Кондрашова, М. В. Голиков, О. Н. Иванова,
А. В. Иванов, М. Г. Исагуляни, Е. О. Баярова* 795
-

ОБЗОРЫ

- Дормантность: туда и обратно
Е. С. Пшениникова, А. С. Воронина 808
- Транскрипционный фактор Sp1 в регуляции экспрессии генов, кодирующих
компоненты сигнальных путей MAPK, JAK/STAT и PI3K/Akt
К. А. Иваненко, В. С. Прасолов, Э. Р. Хабушева 832
-

МОЛЕКУЛЯРНАЯ БИОЛОГИЯ КЛЕТКИ

Получение “усиленных” естественных киллерных клеток с нокаутом генов *CISH* и *B2M* и оценка их цитотоксичности на культурах первичной глиобластомы

*Г. М. Юсубалиева, Э. Б. Дашиниматов, А. А. Горчаков, С. В. Кулемзин,
О. А. Бровкина, А. А. Калинин, А. Г. Винокуров, М. В. Ширманова,
А. В. Таранин, В. П. Баклаушев*

848

МЕТОДЫ

Биочип для генотипирования полиморфизмов, ассоциированных с цветом глаз, волос, кожи, группой крови, половой принадлежностью, основной гаплогруппой Y-хромосомы, и его использование для исследования славянской популяции

*Д. О. Фесенко, И. Д. Ивановский, П. Л. Иванов, Е. Ю. Земскова, А. С. Агапитова,
С. А. Поляков, О. Е. Фесенко, М. А. Филиппова, А. С. Заседателев*

860

**ВИРУСНЫЕ ИНФЕКЦИИ: ОТ МЕХАНИЗМОВ РЕПЛИКАЦИИ
И ПАТОГЕНЕЗА К ПОДХОДАМ ТЕРАПИИ**

УДК 578.2

**ФИЗИОЛОГИЧЕСКИЕ СРЕДЫ В ИССЛЕДОВАНИЯХ МЕТАБОЛИЗМА
КЛЕТОК В НОРМЕ И ПРИ ПАТОЛОГИИ**© 2022 г. М. В. Голиков^а, В. Т. Валуев-Эллистон^а, О. А. Смирнова^а, А. В. Иванов^а *^аИнститут молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта Российской академии наук, Москва, 119991 Россия

*e-mail: aivanov@yandex.ru

Поступила в редакцию 17.01.2022 г.

После доработки 22.02.2022 г.

Принята к публикации 01.03.2022 г.

Изменения клеточного метаболизма сопровождают развитие широкого спектра патологий, включая рак, аутоиммунные и воспалительные заболевания. В связи с этим одна из стратегий создания терапевтических средств заключается в использовании ингибиторов ферментов измененных метаболических путей. Однако исследования нарушений метаболизма клеток затруднены, в том числе вследствие значительного влияния используемых культуральных сред, которые сами могут изменить многие процессы в клетке, которая в этом случае становится далекой от реальной. Многие группы, занимающиеся изучением аспектов метаболизма, сталкиваются с невозпроизводимостью результатов, полученных *in vitro*, при переходе к пациентам. В последнее десятилетие в биохимии появился подход, заключающийся в изменении классических культуральных сред с целью приближения их состава к составу плазмы крови. И в 2017–2019 гг. были предложены две культуральные плазмаподобные среды: Plasmaх и HPLM. Данный обзор посвящен анализу недостатков классических сред, а также различий в метаболизме клеток при культивировании в общераспространенных и плазмаподобных средах в норме и при патологии.

Ключевые слова: культуральная среда, клетки, метаболизм, окислительный стресс, вирусы**DOI:** 10.31857/S002689842205007X**ВВЕДЕНИЕ**

Основное условие получения достоверных результатов биомедицинских исследований *in vitro* — правильное культивирование клеточных линий [1]. Большинство работ в этой области основано на использовании в экспериментах разнообразных линий клеток человека, млекопитающих и других эукариот; при этом многие авторы, особенно занимающиеся исследованиями метаболизма клеток, зачастую сталкиваются с проблемами, связанными непосредственно с культивированием клеточных линий. Иногда эти проблемы касаются того, что определенные клеточные линии не могут нормально культивироваться в стандартных (широко распространенных во всем научном мире) средах: DMEM, MEM, RPMI, DMEM-F12 и т.д. В других случаях выбранный вектор исследования вынуждает авторов искать возможность максимально приблизить формат эксперимента к реальным условиям *in vivo*, в том числе адаптируя культивирование и приближая состав культуральных сред к составу и концентрациям внеклеточных метаболитов в тканях.

Основными клеточными культурами для современной биомедицинской науки стали разно-

образные линии опухолевых клеток. Различные виды рака занимают, пожалуй, главенствующее место среди всех исследуемых патологических процессов ввиду широкой распространенности, сложности и разнообразия молекулярных механизмов возникновения. Заметим, что сама по себе опухоль — это сложная, объемная, динамичная и гетерогенная структура внутри организма, включающая смешанные популяции нормальных, а также раковых (дифференцированных и недифференцированных) клеток, которые находятся в тесной взаимосвязи друг с другом и имеют уникальные черты в каждом случае. Но несмотря на это, практически все исследования проводятся с однородными раковыми клетками (линиями), растущими в виде монослоя (2D-культура). Эти исследования внесли огромный вклад в понимание основных клеточных процессов и механизмов канцерогенеза, а также многих других патологий. Однако нельзя отрицать, что используемые многими исследователями лабораторные модели воспроизводят далеко не все процессы реальной опухоли.

Один из факторов, определяющих отличие процессов в лабораторных клеточных моделях от процессов в клетках тканей, — разный процент кислорода вокруг клеток. Так, большин-

ство исследователей работает в нормальной атмосфере, содержащей 21% кислорода, к которой прибавляют 5% CO₂ (и доля кислорода составляет 18.6%) [2]. Процент кислорода в окружении клеток ниже этого значения из-за ограниченной диффузии через слой культуральной среды. В то же время в тканях уровень кислорода составляет 3.4–6.8% [2, 3], причем в опухолях уровень кислорода снижен по сравнению с нормальными тканями [2]. Таким образом, обычные условия культивирования на самом деле представляют не нормоксию, а гипероксию, что может нарушать многие редоксзависимые процессы и сигнальные пути, опосредованные в том числе факторами транскрипции HIF-1, NF-κB и др. [2].

Еще один фактор – геометрия культуры клеток. Подавляющее большинство исследований выполняется на 2D-культурах. В последнее десятилетие широко обсуждалось применение 3D-культур (сфероиды, органоиды), в которых клетки в большей степени приближены к реальным условиям, что, в свою очередь, позволяет получать более достоверные результаты [4]. Хотя такие культуры частично воссоздают микроокружение клеток, трудоемкость работы с ними и чувствительность к таким факторам, как качество реагентов, профессионализм экспериментатора и другим, резко ограничивают их применение.

Наконец, третий фактор – культуральные среды, так как состав и концентрации метаболитов в них могут влиять на рост и дифференцировку клеток, статус сигнальных путей и, как следствие, на результаты эксперимента. В последние годы появились новые среды для культивирования, имитирующие состав плазмы крови человека, которые получают распространение в мире.

Цель представленного нами обзора – показать примеры нарушения различных клеточных процессов в клетках, культивируемых при использовании традиционных сред, и представить немногочисленные литературные данные по изменениям метаболизма, которые происходят при переходе к новым, плазмаподобным, культуральным средам.

ПРИМЕРЫ ВЛИЯНИЯ НЕФИЗИОЛОГИЧНОГО СОСТАВА КУЛЬТУРАЛЬНЫХ СРЕД НА ПРОЦЕССЫ В КЛЕТКАХ

Традиционные (нефизиологические, стандартные) питательные среды для клеточных культур известны с 1950-х годов [5–7]. DMEM, RPMI и другие среды разрабатывались с целью насытить культуры клеток необходимыми питательными элементами, поддерживать стабильный и максимально быстрый рост и пролиферацию раковых клеток в течение длительного периода. И подавляющее большинство экспериментов, связанных с исследова-

нием метаболизма клеток, проводили именно в подобных средах [8].

Во многих классических средах отсутствуют некоторые природные метаболиты, присутствующие в плазме крови человека/животных, а концентрации других зачастую сильно отличаются от таковых *in vivo*. Примером может служить концентрация глюкозы. Так, в изначальном составе среды DMEM концентрация глюкозы составляла 1 г/л, что соответствует физиологической (5.5 мМ). Однако затем ее уровень был повышен до 4.5 г/л, что соответствует условиям гипергликемии. Именно эту среду чаще всего используют в работах с культурами прикрепленных клеток, причем большинство исследователей не обращает внимания на важность выбора адекватной концентрации глюкозы. Стоит отметить, что такое повышение концентрации глюкозы, как минимум, приводит к усилению продукции активных форм кислорода (АФК) вследствие повышения уровней экспрессии ряда изоформ NADPH-оксидаз (NOX) (данные суммированы в обзоре [9]). В свою очередь, активация в ответ на окислительный стресс защитного каскада Nrf2/ARE, приводящая к повышению уровня экспрессии NADPH-хиноноксидоредуктазы (Nqo1) [10], усиливает гликолиз [11]. Аномально высокий уровень глюкозы может вызывать и стресс эндоплазматического ретикулума и последующий ответ на несвернутые белки (unfolded protein response) [12]. Таким образом, использование культуральных сред с повышенным уровнем глюкозы приводит к тому, что процессы в клетках становятся заведомо нефизиологичными.

Наиболее известным обоснованием применения высокоглюкозных сред считается эффект Варбурга – усиленный гликолиз, характерный для большинства опухолевых клеток, и его разобщение с циклом Кребса [13]. Действительно, многие используемые линии раковых клеток характеризуются высоким уровнем поглощения глюкозы и ее превращения в пируват и затем в лактат [14]. Однако установлено, что на самом деле в микроокружении опухоли уровень глюкозы не повышен, а снижен – в 3–10 раз [15, 16]. Элегантный подход к моделированию таких условий предложила группа К. Bisroy [17]. Он заключается в постоянном восполнении глюкозы в среде на аппарате Nutrostat. Авторы обнаружили, что линии раковых клеток различаются по уровням окислительного фосфорилирования и, как следствие, чувствительности к бигуанидам (в том числе метформину). Примечательно, что при использовании стандартной среды эти различия “маскируются”.

Как показали Balsa и соавт. [18], высокое содержание глюкозы снижает активность системы окислительного фосфорилирования, тогда как сниже-

ние ее уровня усиливает дыхательную активность митохондрий. В условиях нормального или сниженного содержания глюкозы в культуральной среде происходит сборка “респирасом” (дыхательных суперкомплексов), а ключевую роль в этом процессе играет фактор транскрипции ATF4. Стоит отметить, что этот фактор активируется в ответ на “интегративный” стресс, который тесно связан с уровнями аминокислот и стрессом эндоплазматического ретикула [19].

Еще один компонент культуральных сред, высокий уровень которого оказывает влияние на клеточный метаболизм, — пируват. Известно, что многие линии раковых клеток зависят от глутаминолиза — процесса превращения глутамин в глутамат и далее в α -кетоглутарат (метаболит цикла Кребса). Учитывая, что в опухолевых клетках *in vitro* гликолиз направлен не в цикл Кребса, а на выработку лактата, глутамин становится одним из основных доноров углерода для цикла. Соответственно ингибиторы глутаминазы, которая катализирует ключевую стадию глутаминолиза, рассматривают как потенциальные противоопухолевые препараты [20]. Однако сообщалось, что наличие в среде пирувата резко снижает чувствительность клеток к ингибиторам глутаминазы [21]. Примечательно, что концентрация пирувата в культуральных средах (например, 1 мМ в DMEM) существенно превосходит его концентрацию в плазме крови (0.05–0.1 мМ [22]). И хотя активно используются и среды без пирувата, многие исследователи рассматривают эту добавку не как возможный регулятор метаболических и сигнальных путей, а как одно из питательных веществ, которое увеличивает скорость роста клеток.

Некоторые научные группы все же пытались найти выход и создать некое подобие физиологически обоснованной среды, которая позволила бы повысить достоверность результатов экспериментов. Например, была создана особая среда BrainPhys с пониженной концентрацией нейрональных ионов и аминокислот по сравнению с классическими средами [23]. Эта специализированная среда позволила исследователям изучать электрическую активность нейронов. Практически одновременно другая группа ученых для изучения метаболизма клеток глиобластомы и рака молочной железы разработала среду SMEM с концентрациями аминокислот, пирувата и витаминов, приближенными к таковым в крови человека [24, 25]. Однако в состав этой среды не входили многие компоненты крови: карнитин, метаболиты цикла Кребса и др.

Подобное стремление научного сообщества максимально приблизиться к условиям *in vivo* вызвано и тем, что результаты исследований последних лет показали, что данные от используемых

in vitro моделей не всегда воспроизводятся *in vivo* и не подтверждаются данными, полученными от пациентов. В области исследования клеточного метаболизма таким примером может служить очень сильная антипролиферативная активность ингибиторов глутаминазы в отношении линий различных видов рака *in vitro*, но отсутствие противопухоловой активности этих соединений *in vivo* — как показано на примере рака поджелудочной железы [26].

ПЛАЗМАПОДОБНЫЕ КУЛЬТУРАЛЬНЫЕ СРЕДЫ

Группа S. Tardito, предложившая среду SMEM [27], и группа D. Sabatini/J. Cantor [28] продолжили работы по усовершенствованию состава культуральных сред. Они предложили две похожие культуральные среды, состав которых имитирует плазму крови человека: HPLM (Human Plasma-Like Medium) и PlasmaX. За их основу была взята стандартная смесь неорганических солей EBSS (Earle's Balanced Salt Solution), к которой добавили витамины и полярные метаболиты, присутствующие в плазме в концентрациях не ниже 2 мкМ [27, 28]. Концентрация глюкозы в них составила 1 г/л (как в исходном варианте среды DMEM), а пирувата — 0.05–0.1 мМ. Еще одной важной добавкой стал лактат, который присутствует в крови человека в норме в концентрации не менее 1 мМ [22] и относится к важным питательным веществам для клеток многих тканей [29, 30]. Кроме того, эти среды содержали и непротеиногенные аминокислоты, и интермедиаты цикла Кребса: цитрат и ацетат, — а также карнитин и ацетилкарнитин, которые участвуют в метаболизме жирных кислот и ацетил-кофермента А (Ac-CoA) и важны для поддержания активной системы окислительного фосфорилирования [31–33].

Авторы подчеркивали важность уникальных метаболитов в составе разработанных ими сред. Например, мочевая кислота (конечный метаболит катаболизма пуринов) регулирует биосинтез пиримидиновых нуклеотидов за счет ингибирования урацилмонофосфатсинтетазы. В доказательство своей правоты J. Santog и соавт. [28] показали, что цитотоксическая активность 5-фторурацила в клетках, культивируемых в среде HPLM, ниже, чем в классических средах.

Практически всегда в стандартные лабораторные среды вносят 10–20% эмбриональной сыворотки крупного рогатого скота (FBS). В ее состав входят многочисленные факторы роста, гормоны и микроэлементы, необходимые для обеспечения стабильной пролиферации широкого диапазона клеточных культур. Однако сыворотка, помимо этого, привносит неопределенный и обычно не учитываемый пул полярных метаболитов и липидов, который может отличаться в зависимости от

лота сыворотки и ее происхождения, и этот состав практически никогда не анализируется. Существуют и специализированные культуральные среды, содержащие вместо сыворотки альбумин, трансферрин, инсулин, факторы роста и/или пептиды или гидролизаты белков [34]. Они поддерживают рост клеток, но их применение сильно ограничено из-за высокой стоимости и необходимости оптимизации протоколов культивирования. Для того, чтобы снизить влияние сыворотки на состав метаболитов в плазме, создатели среды Plasmax уменьшили ее содержание до 2.5%, в то время как создатели среды HPLM заменили обычную сыворотку на диализованную, то есть лишенную поллярных метаболитов.

Наконец, следует отметить, что эксперименты с физиологическими средами, имитирующими плазму крови человека, не всегда можно напрямую экстраполировать на животных. Так, группа J. Cantor [28] выявила различия в составе плазмы крови мыши и человека и продемонстрировала, что у мыши на порядок ниже концентрация мочевой кислоты (о значении которой говорилось выше) и в такой низкой концентрации она не подавляет биосинтез пиримидиновых нуклеотидов. Нельзя исключать, что различия в концентрации других низкомолекулярных соединений, а также гормонов и факторов роста также вносят существенные изменения в метаболизм клеток.

ИССЛЕДОВАНИЕ РАЗЛИЧИЙ В МЕТАБОЛИЗМЕ КЛЕТОК ПРИ КУЛЬТИВИРОВАНИИ В СТАНДАРТНЫХ И ПЛАЗМАПОДОБНЫХ СРЕДАХ

Использование физиологических сред в биологических исследованиях только начинается, но уже опубликованы результаты нескольких научных групп, показывающие и доказывающие актуальность и целесообразность использования таких сред.

Физиологические среды оказывают значительное влияние на метаболизм раковых клеток *in vitro*. Один из микроэлементов среды Plasmax, меняющий метаболизм, — селен, присутствующий в среде в форме селенита. Селеносодержащие белки, и прежде всего, глутатионпероксидаза-4 (GPx4), защищают клетки от окислительного стресса и от перекисного окисления липидов в частности (например, [35]). J. Vande Voorde и др. [27] продемонстрировали, что при низкой плотности классических сред (например, DMEM-F12) клетки гибнут по механизму ферроптоза. Использование же содержащей селенит физиологической среды Plasmax предотвращает гибель даже единичных клеток. Следует особо подчеркнуть, что данный подход может быть востребован и лабораториями, занимающимися клональной селекцией.

Использование физиологически обоснованных сред оказывало влияние на морфологию и скорость роста клеток некоторых клеточных линий (что проиллюстрировано на примере линии MDA-MB-468), а также на плотность межклеточных контактов [27]. Сходные данные получены и нашей группой для следующих линий клеток: гепатокарциномы Huh7.5, рака шейки матки HeLa и почки зеленой мартышки Vero E6, — которые при культивировании в среде Plasmax становились более вытянутыми и образовывали менее плотные контакты между собой [36].

Известно, что утилизация клетками глутамина сопровождается выработкой аммония, который токсичен и замедляет рост клеток [37]. С целью избежать этого некоторые группы исследователей добавляют пируват — для быстрого роста клеток. Однако установлено, что в обычно используемой концентрации (1–2 мМ) пируват может вызывать псевдогипоксический фенотип при нормоксии, что достигается стабилизацией фактора транскрипции HIF-1 α [27]. И опять следует отметить существование обратной связи, так как HIF-1 α регулирует экспрессию ключевых генов ферментов гликолиза [38].

Кроме того, на примере трижды негативного рака молочной железы продемонстрировано, что культивируемые в физиологической среде клетки потребляют в 2–3 раза меньше глутамина, лейцина, изолейцина, серина, цистина/цистеина и тирозина и характеризуются различными уровнями потребления других аминокислот, но сходным уровнем гликолиза и продукции лактата [27].

К наиболее заметным изменениям метаболизма в классических средах по сравнению с плазмаподобными относится нарушение цикла мочевины, который отвечает за утилизацию токсичного аммиака и превращение его в мочевины. В часто используемой среде DMEM-F12 концентрация аргинина, субстрата ключевого фермента цикла аргиназы, повышена по сравнению с природной в 10 (!) раз (700 vs 64 мкМ). Vande Voorde и соавт. [27] при помощи ¹³C-меченого аргинина показали, что основная часть этой аминокислоты превращается не в орнитин (продукт аргиназы), а в аргининосукцинат. Следовательно, в среде DMEM-F12 цикл мочевины “идет в обратную сторону”. Примечательно, что в плазмаподобных средах этого нарушения нет. Хотя авторы этой работы не исследовали другие классические культуральные среды (например, DMEM), логично предположить, что повышенный уровень аргинина (398 мкМ) может вызывать нарушение цикла мочевины. Это ставит под сомнение результаты исследований сопряженных метаболических систем, полученные с использованием классических сред, по связанным с циклом мочевины процессам: утилизации аммиака, продукции NO при превраще-

нии аргинина в цитруллин NO-синтазами, метаболизме синтезирующихся из орнитина полиаминов. И действительно, согласно полученным нами предварительным результатам, в клетках, культивируемых в среде Plasmach, существенно снижены уровни биогенных полиаминов (*данные не приведены*). Однако, учитывая важность этого класса соединений в процессах роста и дифференцировки клеток [39–41], можно ожидать измененной взаимосвязи между этой метаболической системой и ростом, и функциями клеток.

Физиологические культуральные среды влияют и на процессы дыхания (окислительного фосфорилирования). На четырех различных линиях клеток (Huh7.5, A549, HeLa и Vero E6) мы показали, что замена классических сред на Plasmach приводит к резкому росту дыхательной активности митохондрий без заметного изменения их массы [36]. Стоит отметить, что для каждой из этих линий в качестве стандартной использовали различные культуральные среды: DMEM, DMEM-F12 и MEM. Сходное усиление дыхательной активности клеток описано и другими исследователями для других линий клеток: рака молочной железы MCF7, аденокарциномы простаты LNCaP и остеосаркомы SaOS2 [42, 43]. Более того, в последней работе описано усиление дыхательной активности и в условиях гипоксии. Это имеет огромное значение, так как стандартные условия культивирования в обычной атмосфере, на самом деле, обеспечивают повышенные уровни кислорода (корректнее называть гипероксией): в тканях уровень кислорода находится в диапазоне 3.4–6.8% [2, 3]. Интересно, что усиление дыхания сопровождается образованием протяженной митохондриальной сети, что отмечено для различных линий клеток человека и животных [17].

Стоит отметить и существенные различия в оценке влияния среды на гликолиз. Так, F. Moradi и соавт. [42] сообщали о снижении гликолиза в клетках остеосаркомы, рака молочной железы и простаты, культивируемых в плазмаподобной среде. По нашим данным, эффект зависит от линии клеток: среда Plasmach не вызвала изменений гликолитической активности в клетках карциномы печени Huh7.5, снижала в клетках линий HeLa и Vero E6 и повышала в клетках рака легкого A549 [36].

Еще одно изменение, возникающее в клетках при использовании физиологической среды по сравнению с различными стандартными, – резкое снижение массы (количества) лизосом [36]. Известно, что лизосомы участвуют в хранении ряда аминокислот [44], поэтому изменение их содержания должно сказываться на метаболизме клеток. F. Moradi и соавт. [43] обнаружили снижение интенсивности митофагии, что также вносит вклад в увеличение длины и разветвленности митохондриальных сетей. Однако заметим, что дан-

ных об изменениях в активности аутофагии в литературе пока нет.

Наконец, замена классических сред на физиологические влияет и на редокс-статус клеток. Так, усиление дыхательной активности клеток Huh7.5, A549, HeLa и Vero E6 сопровождается усилением продукции АФК в целом и супероксид-анионов в митохондриях в частности [36]. Это можно объяснить повышенными уровнями (но не процентом) утечки электронов из цепи передачи электронов в дыхательных комплексах митохондрий. Не согласуются с этими данными результаты Moradi и соавт. [43], которые выявили снижение продукции пероксида водорода в миофибробластах линии C2C12, культивируемых в плазмаподобной среде в условиях нормоксии (21% кислорода). Авторы связывают этот эффект с возможной повышенной активностью и экспрессией антиоксидантных ферментов. В этой же работе продемонстрировано и отличие в чувствительности клеток к эстрадиолу E2 и селективным модуляторам рецепторов эстрогена. Так, при культивировании клеток C2C12 в классической среде эстрадиол E2 индуцировал снижение уровня пероксида водорода, но не оказывал влияния на клетки, которые росли в физиологической среде.

ПРИМЕНЕНИЕ ПЛАЗМАПОДОБНЫХ СРЕД В БИМЕДИЦИНСКИХ ИССЛЕДОВАНИЯХ

За последние несколько лет появились примеры использования плазмаподобных культуральных сред в различных областях биологии. Физиологические среды позволяют исследовать причины и механизмы, лежащие в основе резистентности некоторых типов раковых клеток к аспарагиназе. Этот фермент применяют для снижения уровня экзогенного аспарагина, биосинтез которого нарушен в клетках лимфобластного лейкоза. В исследовании M. Chiu и др. [45] использована физиологически обоснованная среда Plasmach в эксперименте, направленном на изучение обмена аминокислот (аспарагин и глутамин) стромальными мезенхимальными клетками, в том числе при культивировании совместно с клетками острого лимфобластного лейкоза. Выявлено, что стромальные клетки в присутствии аспарагина в среде поглощают из среды как аспарагин, так и глутамин, в то время как в отсутствие аспарагина в среде стромальные клетки, напротив, аспарагин секретируют; причем около четверти этого аспарагина синтезируется из поступающего из среды глутамина. Таким образом, стромальные клетки могут использовать внеклеточный глутамин для синтеза и секреции необходимого бластным клеткам аспарагина, что снижает терапевтическую эффективность аспарагиназы.

Известно, что во многих случаях в клетках глиобластомы, опухолей желудочно-кишечного трак-

та, лейкоза и других видов злокачественных образований имеет место гомозиготная делеция гена метилтиоаденозинфосфорилазы (МТАР) [46]. В связи с тем, что этот фермент важен для метаболизма пуринов и биогенных полиаминов, отсутствие кодирующего его гена создает уязвимость для раковых клеток. Так, для них *in vitro* описано повышение внутриклеточной концентрации субстрата этого фермента – метилтиоаденозина (МТА) [47]; при этом высокие концентрации МТА снижают чувствительность клеток к аргинин-N-метилтрансферазе, что может быть использовано для противоопухолевой терапии. При использовании физиологической среды Plasmax Y. Varekatain и соавт. [48] показали, что описанная выше мутация не вызывает накопления МТА в клетках, но способствует его секреции. Более того, секретлируемый МТА может поглощаться стромальными клетками *in vivo*, что продемонстрировано в эксперименте по совместному культивированию клеток глиобластомы и макрофагов. Авторы высказали гипотезу, что различия в уровнях некоторых соединений (цистеина, метионина и др.) в физиологической среде препятствуют накоплению МТА в первичных опухолях пациентов.

Продолжая тему цитотоксичности и эффективности противоопухолевых препаратов, Khadka S. и др. [49] выявили, что в клетках глиомы с делецией в гене енолазы (*ENO1*), одного из ферментов гликолиза, культивируемых в среде Plasmax, понижена зависимость от процессов глутаминолиза, но не гликолиза. Эти данные коррелируют с результатами исследований *in vivo*, в которых показано отсутствие заметной антипролиферативной активности ингибитора глутаминолиза против опухолей с делецией *ENO1* [49]. В то же время ингибитор глутаминазы одинаково активен против клеток с этой делецией и без нее, если клетки культивируют в стандартной среде. Это прекрасная иллюстрация того, что использование физиологических сред (из-за пониженных концентраций пирувата и 2-оксоглутарата) в подобных исследованиях целесообразно и позволяет более адекватно оценивать эффективность противоопухолевых препаратов. Кроме того, S. Khadka и др. [49] обнаружили и несколько минорных, но не менее интересных особенностей физиологических сред. Так, ими показано, что лактат, присутствующий в плазме крови и содержащийся в среде Plasmax, по-видимому, плохой донор углерода для клеточного цикла Кребса, тогда как пируват – гораздо более важный компонент восполнения цикла трикарбоновых кислот в раковых клетках. Следует упомянуть про полученные с использованием классических сред данные, где показано, что вклад лактата как донора углерода в цикл Кребса и, как следствие, в поддержание дыхательной активности клеток сильно зависит от типа ткани и клеток [29, 50]. На основании выше-

сказанного мы делаем вывод, что все эти данные требуют дополнительной верификации.

O. Bagshaw и соавт. [51] оценили влияние физиологических и нефизиологических концентраций цинка на различные аспекты метаболизма клеток гладких мышц аорты крысы и эндотелиальных клеток (RASMC и RAENDO), культивируемых в среде Plasmax. Выявлено нарушение экспрессии генов окислительного фосфорилирования, слияния и разобщения (*fusion-fission*) митохондрий при обработке клеток сульфатом цинка в обоих типах исследуемых клеток. К этим генам относились *Mff* (mitochondrial fission factor) и *Mfn2* (mitofusin 2), экспрессия которых повышалась. Используя технологию Seahorse, авторы провели визуализацию митохондриальных сетей, а также проанализировали митохондриальную функцию исследуемых клеточных линий. Показано, что увеличенные концентрации цинка по сравнению с физиологическими значениями индуцируют усиление процессов слияния/разобщения митохондрий, увеличивая как базовое, так и максимальное потребление кислорода. Полученные результаты позволят лучше понять, как применение, например, биоразлагаемых имплантов, содержащих цинк, может повлиять на клетки сосудов и сердечно-сосудистую систему человека.

N. Rossiter и соавт., разработчики среды HPLM [52], также представили результаты, полученные при исследовании эффектов, возникающих в клетках при переходе к физиологической среде. Они провели генетический скрининг с применением технологии CRISPR генов различных метаболических путей клеток хронического миелоидного лейкоза K562 и выявили 525 генов, экспрессия которых значительно повысилась при переходе к среде HPLM. Кроме того, им удалось выявить гены, изменение в экспрессии которых происходило при смене диализированной сыворотки на обычную. Одним из самых значимых результатов авторы считают наличие взаимосвязи аланинаминотрансферазы (ALT/GPT2) и митохондриального транспортера пирувата (mitochondrial pyruvate carrier, MPC). В клетках, культивируемых в физиологической среде с диализированной сывороткой, были повышены уровни обоих белков, что может способствовать синтезу аланина из пирувата.

Одна из наиболее интенсивно развивающихся областей биомедицинских исследований – иммунометаболизм [53]. Исследования в области иммунологии также имеет смысл проводить в средах с физиологическими концентрациями метаболитов. Например, M. Loney-Greene и др. [54] продемонстрировали, что в физиологической среде транскрипционный профиль Т-лимфоцитов значительно отличается от такового в стандартной среде RPMI. Кроме того, увеличивается уровень их активации в ответ на контакт с антигеном.

Также показано, что эти эффекты, главным образом, могут возникать из-за повышенной концентрации ионов кальция в физиологической среде HPLM. Повышение уровней экспрессии ряда генов метаболизма серина, аргинина, аспарагина и пролина (*ASS1, PHGDH, PYCRI, GOT1*), по-видимому, связано со значительно более низкой концентрацией аргинина в среде HPLM.

Следует сказать, что работа нашей группы была посвящена не только выявлению изменений клеточного метаболизма, но и эффектов, которые физиологическая среда может оказать на репликацию различных вирусов [36]. Нами показано, что клетки Huh7.5, A549 и Vero E6 при культивировании в среде Plasmaх поддерживают репликацию вируса гепатита С, вируса гриппа А и коронавируса-2, вызывающего тяжелый острый респираторный синдром (SARS-CoV-2), соответственно, хотя репликативная активность вирусов была ниже, чем при репродукции в тех же клетках, культивируемых в классических средах. Точные причины снижения уровней репликации вирусов неясны. Однако можно предположить, что репликация вирусов снижается с нефизиологически высоких уровней, характерных для суперпермиссивных клеточных линий (Vero E6, Huh7.5).

Ранее показано, что респираторные вирусы и вирус гепатита С вызывают окислительный стресс в инфицированных клетках [55, 56]. В среде Plasmaх способность вирусов нарушать редокс-статус клеток была гораздо сильнее выражена: уровни АФК были сопоставимы с таковыми для классических культуральных сред, хотя репликативная активность вирусов была на порядок ниже [36]. Это можно объяснить наличием в физиологической среде не только пирувата, но и лактата, соотношение которых определяет соотношение между NAD и NADH [57].

В недалеком будущем можно с уверенностью ожидать появления исследований, в которых будут найдены новые метаболические отклонения, вызванные применением классических/стандартных сред. Но даже на основании доступной на данный момент информации можно сделать вывод, что результаты исследований метаболических особенностей тех или иных клеток необходимо верифицировать в физиологически обоснованных средах. Особенно это касается изучения биохимических процессов в митохондриях, лизосомах, окислительно-восстановительного баланса в клетке, а также нарушений этих и других путей при различных патологиях и вирусных инфекциях.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Разработка и использование физиологических сред чрезвычайно важно для понимания биоло-

гических процессов и интерпретации данных, особенно в области исследований клеточного метаболизма. Такие среды позволяют воспроизводить процессы *in vivo* в условиях более простых – в системах *in vitro*. Кроме того, использование нестандартных культуральных сред, лишенных одного или нескольких метаболитов, позволяет исследовать зависимость роста клеток и статус сигнальных каскадов от метаболических путей.

Стоит заметить, что репродукция вирусов и их цитопатический эффект напрямую зависят от метаболизма клеток, а значит тоже сильно подвержены влиянию состава культуральной среды. Для более глубокого и полного понимания механизмов патогенеза различных инфекционных заболеваний необходимы дальнейшие исследования опосредованных вирусом нарушений в клетке-хозяине. Желательно, чтобы эти исследования были основаны на моделях, которые максимально адекватно имитируют условия *in vivo* и поэтому не искажают естественные процессы. Одна из доступных возможностей значительного улучшения (приближения к реальным условиям) существующих моделей – использование физиологически обоснованных сред.

Физиологические варианты среды могут быть полезны и удобны для решения различных задач, включая культивирование первичных клеток, наработку биомолекул (в том числе вирусных белков) и т.д. Стоит отметить, что варианты физиологических сред могут быть модифицированы для выполнения множества самых разнообразных задач: симуляции различных диет, патологических состояний определенных тканей, старения и иных процессов. Возможно, в будущем будут использоваться варианты таких сред с концентрациями метаболитов, соответствующими значениям у конкретного пациента, тем самым приближая практическую медицину к персонализированному формату.

Работа поддержана Российским фондом фундаментальных исследований (проект № 18-29-07066) (разделы по классическим средам) и Российским научным фондом (21-14-10146) (разделы по плазмаподобным средам).

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

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Cox J., McBeath D., Harper C., Daniel R. (2020) Co-occurrence of cell lines, basal media and supplementation in the biomedical research literature. *J. Data Inform. Sci.* 5(3), 161–177.
2. Pavlacky J., Polak J. (2020) Technical feasibility and physiological relevance of hypoxic cell culture models. *Front. Endocrinol.* (Lausanne). 11, 57.

3. Ikari R., Mukaiishi K.I., Kageyama S., Nagasawa M., Kubota S., Nakayama T., Murakami S., Taniura N., Tanaka H., Kushima R.P., Kawauchi A. (2021) Differences in the central energy metabolism of cancer cells between conventional 2D and novel 3D culture systems. *Int. J. Mol. Sci.* **22**(4), 1805.
4. Abbas M., Moradi F., Hu W., Regudo K.L., Osborne M., Pettipas J., Atallah D.S., Hachem R., Ott-Peron N., Stuart J.A. (2021) Vertebrate cell culture as an experimental approach – limitations and solutions. *Comp. Biochem. Physiol. B Biochem. Mol. Biol.* **254**, 110570.
5. Dulbecco R., Hartwell L.H., Vogt M. (1965) Induction of cellular DNA synthesis by polyoma virus. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **53**, 403–410.
6. Eagle H., Habel K. (1956) The nutritional requirements for the propagation of poliomyelitis virus by the HeLa cell. *J. Exp. Med.* **104**(2), 271–287.
7. Moore G.E., Gerner R.E., Franklin H.A. (1967) Culture of normal human leukocytes. *JAMA.* **199**(8), 519–524.
8. Ackermann T., Tardito S. (2019) Cell culture medium formulation and its implications in cancer metabolism. *Trends Cancer.* **5**(6), 329–332.
9. Amanso A.M., Griendling K.K. (2012) Differential roles of NADPH oxidases in vascular physiology and pathophysiology. *Front. Biosci. (Schol Ed.).* **4**(3), 1044–1064.
10. Ivanov A.V., Smirnova O.A., Ivanova O.N., Masalova O.V., Kochetkov S.N., Isagulants M.G. (2011) Hepatitis C virus proteins activate NRF2/ARE pathway by distinct ROS-dependent and independent mechanisms in HUH7 cells. *PLoS One.* **6**(9), e24957.
11. Dimri M., Humphries A., Laknaur A., Elattar S., Lee T.J., Sharma A., Kolhe R., Satyanarayana A. (2020) NAD(P)H quinone dehydrogenase 1 ablation inhibits activation of the phosphoinositide 3-kinase/Akt serine/threonine kinase and mitogen-activated protein kinase/extracellular signal-regulated kinase pathways and blocks metabolic adaptation in hepatocellular carcinoma. *Hepatology.* **71**(2), 549–568.
12. Irshad Z., Xue M., Ashour A., Larkin J.R., Thornalley P.J., Rabbani N. (2019) Activation of the unfolded protein response in high glucose treated endothelial cells is mediated by methylglyoxal. *Sci. Rep.* **9**(1), 7889.
13. Liberti M.V., Locasale J.W. (2016) The Warburg effect: how does it benefit cancer cells? *Trends Biochem. Sci.* **41**(3), 211–218.
14. Jose C., Bellance N., Rossignol R. (2011) Choosing between glycolysis and oxidative phosphorylation: a tumor's dilemma? *Biochim. Biophys. Acta.* **1807**(6), 552–561.
15. Hirayama A., Kami K., Sugimoto M., Sugawara M., Toki N., Onozuka H., Kinoshita T., Saito N., Ochiai A., Tomita M., Esumi H., Soga T. (2009) Quantitative metabolome profiling of colon and stomach cancer microenvironment by capillary electrophoresis time-of-flight mass spectrometry. *Cancer Res.* **69**(11), 4918–4925.
16. Urasaki Y., Heath L., Xu C.W. (2012) Coupling of glucose deprivation with impaired histone H2B monoubiquitination in tumors. *PLoS One.* **7**(5), e36775.
17. Birsoy K., Possemato R., Lorbeer F.K., Bayraktar E.C., Thiru P., Yucler B., Wang T., Chen W.W., Clish C.B., Sabatini D.M. (2014) Metabolic determinants of cancer cell sensitivity to glucose limitation and biguanides. *Nature.* **508**(7494), 108–112.
18. Balsa E., Soustek M.S., Thomas A., Cogliati S., Garcia-Poyatos C., Martin-Garcia E., Jedrychowski M., Gygi S.P., Enriquez J.A., Puigserver P. (2019) ER and nutrient stress promote assembly of respiratory chain supercomplexes through the PERK-eIF2 α axis. *Mol. Cell.* **74**(5), 877–890.e876.
19. Pakos-Zebrucka K., Koryga I., Mnich K., Ljujic M., Samali A., Gorman A.M. (2016) The integrated stress response. *EMBO Rep.* **17**(10), 1374–1395.
20. Yang W.H., Qiu Y., Stamatatos O., Janowitz T., Lukey M.J. (2021) Enhancing the efficacy of glutamine metabolism inhibitors in cancer therapy. *Trends Cancer.* **7**(8), 790–804.
21. Singleton D.C., Dechaume A.L., Murray P.M., Katt W.P., Baguley B.C., Leung E.Y. (2020) Pyruvate anaplerosis is a mechanism of resistance to pharmacological glutamine inhibition in triple-receptor negative breast cancer. *BMC Cancer.* **20**(1), 470.
22. Morrison M.A., Spriet L.L., Dyck D.J. (2000) Pyruvate ingestion for 7 days does not improve aerobic performance in well-trained individuals. *J. Appl. Physiol.* (1985). **89**(2), 549–556.
23. Bardy C., van den Hurk M., Eames T., Marchand C., Hernandez R.V., Kellogg M., Gorris M., Galet B., Palomares V., Brown J., Bang A.G., Mertens J., Bohnke L., Boyer L., Simon S., Gage F.H. (2015) Neuronal medium that supports basic synaptic functions and activity of human neurons in vitro. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **112**(20), E2725–E2734.
24. Tardito S., Oudin A., Ahmed S.U., Fack F., Keunen O., Zheng L., Miletic H., Sakariassen P.O., Weinstock A., Wagner A., Lindsay S.L., Hock A.K., Barnett S.C., Ruppin E., Morkve S.H., Lund-Johansen M., Chalmers A.J., Bjerkvig R., Niclou S.P., Gottlieb E. (2015) Glutamine synthetase activity fuels nucleotide biosynthesis and supports growth of glutamine-restricted glioblastoma. *Nat. Cell Biol.* **17**(12), 1556–1568.
25. Schug Z.T., Peck B., Jones D.T., Zhang Q., Grosskurth S., Alam I.S., Goodwin L.M., Smethurst E., Mason S., Blyth K., McGarry L., James D., Shanks E., Kalna G., Saunders R.E., Jiang M., Howell M., Lassailly F., Thin M.Z., Spencer-Dene B., Stamp G., van den Broek N.J., Mackay G., Bulusu V., Kamphorst J.J., Tardito S., Strachan D., Harris A.L., Aboagye E.O., Critchlow S.E., Wakelam M.J., Schulze A., Gottlieb E. (2015) Acetyl-CoA synthetase 2 promotes acetate utilization and maintains cancer cell growth under metabolic stress. *Cancer Cell.* **27**(1), 57–71.
26. Biancur D.E., Paulo J.A., Malachowska B., Quiles Del Rey M., Sousa C.M., Wang X., Sohn A.S.W., Chu G.C., Gygi S.P., Harper J.W., Fendler W., Mancias J.D., Kimmelman A.C. (2017) Compensatory metabolic networks in pancreatic cancers upon perturbation of glutamine metabolism. *Nat. Commun.* **8**, 15965.
27. Vande Voorde J., Ackermann T., Pfetzer N., Sumpston D., Mackay G., Kalna G., Nixon C., Blyth K., Gottlieb E., Tardito S. (2019) Improving the metabolic fidelity of cancer models with a physiological cell culture medium. *Sci. Adv.* **5**(1), eaau7314.
28. Cantor J.R., Abu-Remaileh M., Kanarek N., Freinkman E., Gao X., Louissaint A., Jr., Lewis C.A., Saba-

- tini D.M. (2017) Physiologic medium rewires cellular metabolism and reveals uric acid as an endogenous inhibitor of UMP synthase. *Cell*. **169**(2), 258–272.e217.
29. Hui S., Ghergurovich J.M., Morscher R.J., Jang C., Teng X., Lu W., Esparza L.A., Raya T., Le Z., Yanxiang Guo J., White E., Rabinowitz J.D. (2017) Glucose feeds the TCA cycle *via* circulating lactate. *Nature*. **551**(7678), 115–118.
 30. Rabinowitz J.D., Enerback S. (2020) Lactate: the ugly duckling of energy metabolism. *Nat. Metab.* **2**(7), 566–571.
 31. Bastiaansen J.A., Merritt M.E., Comment A. (2016) Measuring changes in substrate utilization in the myocardium in response to fasting using hyperpolarized [1-¹³C]butyrate and [1-¹³C]pyruvate. *Sci. Rep.* **6**, 25573.
 32. Arnold P.K., Jackson B.T., Paras K.I., Brunner J.S., Hart M.L., Newsom O.J., Alibeckoff S.P., Endress J., Drill E., Sullivan L.B., Finley L.W.S. (2022) A non-canonical tricarboxylic acid cycle underlies cellular identity. *Nature*. **603**(7901), 477–481.
 33. Stephens F.B., Constantin-Teodosiu D., Greenhaff P.L. (2007) New insights concerning the role of carnitine in the regulation of fuel metabolism in skeletal muscle. *J. Physiol.* **581**(Pt. 2), 431–444.
 34. Keenan J., Pearson D., Clynes M. (2006) The role of recombinant proteins in the development of serum-free media. *Cytotechnology*. **50**(1–3), 49–56.
 35. Brault C., Levy P., Duponchel S., Michelet M., Salle A., Pecheur E.I., Plissonnier M.L., Parent R., Vericel E., Ivanov A.V., Demir M., Steffen H.M., Odenthal M., Zoulim F., Bartosch B. (2016) Glutathione peroxidase 4 is reversibly induced by HCV to control lipid peroxidation and to increase virion infectivity. *Gut*. **65**(1), 144–154.
 36. Golikov M.V., Karpenko I.L., Lipatova A.V., Ivanova O.N., Fedyakina I.T., Larichev V.F., Zakirova N.F., Leonova O.G., Popenko V.I., Bartosch B., Kochetkov S.N., Smirnova O.A., Ivanov A.V. (2021) Cultivation of cells in a physiological Plasmax medium increases mitochondrial respiratory capacity and reduces replication levels of RNA viruses. *Antioxidants* (Basel). **11**(1), 97.
 37. Genzel Y., Ritter J.B., Konig S., Alt R., Reichl U. (2005) Substitution of glutamine by pyruvate to reduce ammonia formation and growth inhibition of mammalian cells. *Biotechnol. Prog.* **21**(1), 58–69.
 38. Khomich O., Ivanov A.V., Bartosch B. (2019) Metabolic hallmarks of hepatic stellate cells in liver fibrosis. *Cells*. **9**(1), 24.
 39. Smirnova O.A., Bartosch B., Zakirova N.F., Kochetkov S.N., Ivanov A.V. (2018) Polyamine metabolism and oxidative protein folding in the ER as ROS-producing systems neglected in virology. *Int. J. Mol. Sci.* **19**(4), 1219.
 40. Ivanova O.N., Snezhkina A.V., Krasnov G.S., Valuev-Elliston V.T., Khomich O.A., Khomutov A.R., Keinanen T.A., Alhonen L., Bartosch B., Kudryavtseva A.V., Kochetkov S.N., Ivanov A.V. (2018) Activation of polyamine catabolism by *N*¹,*N*¹¹-diethylnorspermine in hepatic HepaRG cells induces dedifferentiation and mesenchymal-like phenotype. *Cells*. **7**(12), 275.
 41. Pegg A.E. (2009) Mammalian polyamine metabolism and function. *IUBMB Life*. **61**(9), 880–894.
 42. Moradi F., Moffatt C., Stuart J.A. (2021) The effect of oxygen and micronutrient composition of cell growth media on cancer cell bioenergetics and mitochondrial networks. *Biomolecules*. **11**(8), 1177.
 43. Moradi F., Fiocchetti M., Marino M., Moffatt C., Stuart J.A. (2021) Media composition and O₂ levels determine effects of 17β-estradiol and selective estrogen receptor modulators on mitochondrial bioenergetics and cellular reactive oxygen species. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* **321**(1), C72–C81.
 44. Jonas A.J., Greene A.A., Smith M.L., Schneider J.A. (1982) Cystine accumulation and loss in normal, heterozygous, and cystinotic fibroblasts. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **79**(14), 4442–4445.
 45. Chiu M., Taurino G., Dander E., Bardelli D., Fallati A., Andreoli R., Bianchi M.G., Carubbi C., Pozzi G., Galluppo L., Mirandola P., Rizzari C., Tardito S., Biondi A., D’Amico G., Bussolati O. (2021) ALL blasts drive primary mesenchymal stromal cells to increase asparagine availability during asparaginase treatment. *Blood Adv.* **5**(23), 5164–5178.
 46. Menezes W.P., Silva V.A.O., Gomes I.N.F., Rosa M.N., Spina M.L.C., Carloni A.C., Alves A.L.V., Melendez M., Almeida G.C., Silva L.S.D., Clara C., da Cunha I.W., Hajj G.N.M., Jones C., Bidinotto L.T., Reis R.M. (2020) Loss of 5'-methylthioadenosine phosphorylase (MTAP) is frequent in high-grade gliomas; nevertheless, it is not associated with higher tumor aggressiveness. *Cells*. **9**(2), 492.
 47. Marjon K., Cameron M.J., Quang P., Clasquin M.F., Mandley E., Kunii K., McVay M., Choe S., Kernytzky A., Gross S., Konteatis Z., Murtie J., Blake M.L., Travins J., Dorsch M., Biller S.A., Marks K.M. (2016) MTAP deletions in cancer create vulnerability to targeting of the MAT2A/PRMT5/RIOK1 axis. *Cell Rep.* **15**(3), 574–587.
 48. Barekatin Y., Ackroyd J.J., Yan V.C., Khadka S., Wang L., Chen K.C., Poral A.H., Tran T., Georgiou D.K., Arthur K., Lin Y.H., Satani N., Ballato E.S., Behr E.I., deCarvalho A.C., Verhaak R.G.W., de Groot J., Huse J.T., Asara J.M., Kalluri R., Muller F.L. (2021) Homozygous MTAP deletion in primary human glioblastoma is not associated with elevation of methylthioadenosine. *Nat. Commun.* **12**(1), 4228.
 49. Khadka S., Arthur K., Barekatin Y., Behr E., Washington M., Ackroyd J., Crowley K., Suriyamongkol P., Lin Y.H., Pham C.D., Zielinski R., Trujillo M., Galligan J., Georgiou D.K., Asara J., Muller F. (2021) Impaired anaplerosis is a major contributor to glycolysis inhibitor toxicity in glioma. *Cancer Metab.* **9**(1), 27.
 50. TeSlaa T., Bartman C.R., Jankowski C.S.R., Zhang Z., Xu X., Xing X., Wang L., Lu W., Hui S., Rabinowitz J.D. (2021) The source of glycolytic intermediates in mammalian tissues. *Cell Metab.* **33**(2), 367–378.e5.
 51. Bagshaw O.R.M., Moradi F., Moffatt C.S., Thettwer H.A., Liang P., Goldman J., Drenlich J.W., Stuart J.A. (2021) Bioabsorbable metal zinc differentially affects mitochondria in vascular endothelial and smooth muscle cells. *Biomaterials and Biosystems*. **4**, 100027.

52. Rossiter N.J., Huggler K.S., Adelman C.H., Keys H.R., Soens R.W., Sabatini D.M., Cantor J.R. (2021) CRISPR screens in physiologic medium reveal conditionally essential genes in human cells. *Cell Metab.* **33**(6), 1248–1263.e9.
53. Muri J., Kopf M. (2021) Redox regulation of immunometabolism. *Nat. Rev. Immunol.* **21**(6), 363–381.
54. Leney-Greene M.A., Boddapati A.K., Su H.C., Cantor J.R., Lenardo M.J. (2020) Human plasma-like medium improves T lymphocyte activation. *iScience.* **23**(1), 100759.
55. Khomich O.A., Kochetkov S.N., Bartosch B., Ivanov A.V. (2018) Redox biology of respiratory viral infections. *Viruses.* **10**(8), 392.
56. Ivanov A.V., Valuev-Elliston V.T., Tyurina D.A., Ivanova O.N., Kochetkov S.N., Bartosch B., Isagulians M.G. (2017) Oxidative stress, a trigger of hepatitis C and B virus-induced liver carcinogenesis. *Oncotarget.* **8**(3), 3895–3932.
57. Hung Y.P., Albeck J.G., Tantama M., Yellen G. (2011) Imaging cytosolic NADH-NAD⁺ redox state with a genetically encoded fluorescent biosensor. *Cell Metab.* **14**(4), 545–554.

PHYSIOLOGICAL MEDIA IN STUDIES OF CELL METABOLISM

M. V. Golikov¹, V. T. Valuev-Elliston¹, O. A. Smirnova¹, and A. V. Ivanov^{1, *}

¹ Engelhardt Institute of Molecular Biology, Russian Academy of Sciences, Moscow, 119991 Russia

*e-mail: aivanov@yandex.ru

Changes in cell metabolism accompany development of a wide spectrum of pathologies including cancer, autoimmune and inflammatory diseases. Therefore, inhibitors of metabolic enzymes is considered a promising strategy for development of therapeutic agents. However, investigation of cellular metabolism is hampered by imprint of culture media that interfere with many cellular processes making cellular models non-relevant. There are numerous reports showing that the results from *in vitro* systems are not reproduced in *in vivo* models and in patients. During the last decade a novel approach has emerged which consists in adaptation of culture medium composition to the composition of blood plasma. In 2017–2019 two plasma-like media were proposed, Plasmax and HPLM. In the review, we summarized drawbacks of convenient media as well as changes in metabolism of cells cultivated in convenient and plasma-like media at normal state and in models of pathology.

Keywords: culture medium, cells, metabolism, oxidative stress, viruses

**ВИРУСНЫЕ ИНФЕКЦИИ: ОТ МЕХАНИЗМОВ РЕПЛИКАЦИИ
И ПАТОГЕНЕЗА К ПОДХОДАМ ТЕРАПИИ**

УДК 575.826

**ПОВЫШЕНИЕ БАКТЕРИЦИДНОГО ЭФФЕКТА АНТИБИОТИКОВ
ПУТЕМ ИНГИБИРОВАНИЯ ФЕРМЕНТОВ, ВОВЛЕЧЕННЫХ
В ГЕНЕРАЦИЮ СЕРОВОДОРОДА У БАКТЕРИЙ**© 2022 г. Т. А. Серегина^а, *, К. В. Лобанов^а, Р. С. Шакулов^а, А. С. Миронов^а^аИнститут молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта Российской академии наук, Москва, 119991 Россия

*e-mail: tatyana.s82@gmail.com

Поступила в редакцию 02.03.2022 г.

После доработки 28.03.2022 г.

Принята к публикации 28.03.2022 г.

Борьба с возникновением и распространением бактериальных патогенов с множественной лекарственной устойчивостью, провоцирующих развитие внутрибольничных инфекций, остается актуальной задачей здравоохранения во всем мире. В обзоре рассмотрены результаты недавних исследований, показывающих, что наряду с инактивацией специфических биохимических мишеней, многие антибиотики провоцируют в бактериальных клетках развитие окислительного стресса, который повреждает клеточные макромолекулы и повышает чувствительность бактерий к антибиотикам. Ранее мы установили, что генерация сероводорода (универсального протектора бактерий от окислительного стресса) различными бактериальными патогенами защищает их от бактерицидных антибиотиков. В дальнейшем была выявлена взаимосвязь между генерацией H₂S, метаболизмом цистеина и окислительным стрессом. Наконец, в наших последних работах показано, что малые молекулы, ингибирующие ферменты, вовлеченные в генерацию сероводорода, существенно повышают бактерицидный эффект антибиотиков различного типа, включая хинолоны, бета-лактамы и аминогликозиды *in vitro*, а также влияют на развитие инфекций в мышинных моделях. Кроме того, отобранные ингибиторы супрессируют толерантность бактерий к антибиотикам, нарушают образование биопленок и существенно снижают количество персистеров, переживающих обработку антибиотиками. Мы предполагаем, что агенты, ограничивающие биосинтез сероводорода, могут быть эффективным инструментом в борьбе с распространением бактериальных патогенов с множественной лекарственной устойчивостью.

Ключевые слова: бактерии, антибиотики, окислительный стресс, продукция сероводорода, ингибиторы ферментов биосинтеза сероводорода, антимикробные препараты

DOI: 10.31857/S0026898422050123

ВВЕДЕНИЕ

Распространение бактериальных патогенов с множественной лекарственной устойчивостью и внутрибольничные инфекции представляют одну из наиболее серьезных проблем здравоохранения в мире. Пандемия COVID-19 перевела эту проблему из разряда важных в разряд острых. Медленный прогресс в разработке новых противомикробных препаратов и быстрое появление резистентности к новым терапевтическим средствам вызывают серьезную озабоченность и ставят под сомнение эффективность методов лечения бактериальных инфекций [1–3]. Антибиотикорезистентность патогенных бактерий – это фундамент следующей пандемии, которая ждет человечество в обозримом будущем. В настоящее время от бактериальных инфекций, устойчивых к действию антибиотиков, в мире ежегодно умирает приблизительно 700000 человек. При повышении численности

резистентных форм опасных бактериальных инфекций смертность будет исчисляться миллионами жертв. Высокая летальность пациентов с бактериальными инфекциями и экономические потери будут значительно превосходить негативный эффект от пандемии COVID-19. Прогнозируется, что к 2050 году количество смертельных исходов, вызванных устойчивыми к антибиотикам бактериальными инфекциями, достигнет 10 млн. в год, а потери мировой экономики будут составлять внушительные 100 трлн. долларов США [4].

Устойчивость бактерий к действию антибиотиков, определяемая как наследственно закрепленная способность расти и размножаться в присутствии высокого уровня антибиотиков [3, 5], обеспечивается четырьмя главными механизмами: (1) модификациями мишени антибиотиков в результате мутаций; (2) снижением проницаемости оболочки бактериальной клетки для антибио-

тика; (3) снижением процесса импорта в клетку или увеличением эффективности экспорта антибиотиков из клетки, в результате чего антибиотик не может взаимодействовать с мишенью; (4) ферментативная деградация антибиотика или другие химические модификации, снижающие его сходство к мишени [7–12]. В то же время бактерии способны выживать в присутствии антибиотиков не в результате генетически детерминированной устойчивости, но путем временной остановки роста и снижения уровня метаболизма. Такое состояние называется толерантностью к антибиотикам, или персистенцией. В этих условиях выживает только небольшая часть бактериальной популяции, а выжившие бактерии получили наименование персистеров [13]. Помимо антибиотиков, образование персистеров может индуцироваться другими видами стресса, причем бактериальная популяция спонтанно генерирует небольшое количество персистеров для защиты от потенциальных генотоксических агентов [14].

Проблема толерантности к антибиотикам привлекла особое внимание исследователей в начале 2000, когда показали, что устойчивость бактериальных биопленок к высоким дозам антибиотиков обусловлена присутствием персистеров [15–19]. Образование биопленок сопровождается большинством инфекционных заболеваний человека, особенно часто это происходит в клинических условиях [13, 20]. Целый ряд хронических заболеваний человека сопровождается генерацией персистеров, борьба с которыми трудна и требует специальных подходов [14, 21–23]. Кроме того, все более очевидной становится роль персистеров как предшественников образования мутантов, устойчивых к антибиотикам [24–27]. Для успешной борьбы с персистерами необходима разработка специфических соединений – потенциаторов – обеспечивающих подавление их формирования в присутствии антибиотиков. В связи с этим особую актуальность приобретают работы, направленные на расшифровку механизмов, ответственных за летальное действие антибиотиков.

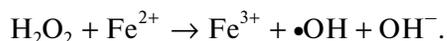
Недавние исследования показали, что помимо своей основной активности, многие антибиотики вызывают окислительный стресс, который повреждает клеточные макромолекулы и способствует бактерицидной активности антибиотиков [28–30]. Вовлечение активных форм кислорода (АФК), как нового фактора бактерицидного действия антибиотиков, расширило разработку новых экспериментальных подходов к поиску соединений, обладающих свойствами антиоксидантов, повышающих эффективность антибиотиков. Ранее мы установили, что бактерии производят сероводород (H_2S), который снижает окислительный стресс и обеспечивает существенную защиту широкого спектра бактериальных патогенов от бактерицидных антибиотиков [31]. Подавление

образования H_2S делает бактерии менее устойчивыми к первичному действию антибиотиков, усиливая тем самым их бактерицидную активность [32]. Практически у всех бактерий в продукции H_2S участвуют ферменты, ортологичные ферментам млекопитающих: цистатионин- γ -лиазы (CSE), цистатионин- β -синтазы (CBS) и 3-меркаптопируват-сульфотрансферазы (3MST) [33, 34]. Показано, что у ряда патогенов, включая *Staphylococcus aureus* и *Pseudomonas aeruginosa*, генетическое повреждение путей биосинтеза H_2S приводит к чувствительности к различным классам антибиотиков и иммунному ответу хозяина [35, 36]. Учитывая эти данные, мы отобрали специфические ингибиторы фермента CSE и показали способность таких ингибиторов усиливать действие бактерицидных антибиотиков на патогенные бактерии *S. aureus* и *P. aeruginosa*, а также подавлять формирование бактериальных персистеров. Прежде чем перейти к описанию H_2S -зависимой системы защиты бактерий от окислительного стресса и бактерицидных антибиотиков, мы более детально рассмотрим взаимосвязь между летальным действием антибиотиков и окислительным стрессом.

ВЗАИМОСВЯЗЬ МЕЖДУ БАКТЕРИЦИДНЫМ ДЕЙСТВИЕМ АНТИБИОТИКОВ И ОКИСЛИТЕЛЬНЫМ СТРЕССОМ

Молекулярные мишени основных классов бактерицидных антибиотиков изучены достаточно детально: бета-лактамы интерферируют с биосинтезом клеточной стенки; хинолоны ингибируют ДНК-гиразу грамотрицательных бактерий, одного из ключевых ферментов, участвующих в репликации бактериальной хромосомы на стадии формирования эфирной связи тирозилфосфата, в результате чего в основной цепи ДНК образуется разрыв; аминогликозиды связываются с рецепторами на 30S субъединице бактериальной рибосомы, вызывая ошибки трансляции [37]. Однако на протяжении последних десятилетий накапливались данные, свидетельствующие о том, что летальное действие антибиотиков невозможно объяснить исключительно их взаимодействием с первичными мишенями, оно зависит также от метаболических процессов, сопровождающихся генерацией АФК [38]. В бактериальных клетках обнаружены три типа АФК: супероксид-анион (O_2^-), пероксид водорода (H_2O_2) и гидроксил-радикал ($\bullet OH$), которые образуются как побочные продукты активности ферментов дыхательной системы [39]. Бактериальная клетка содержит ферменты, осуществляющие защиту от АФК: супероксиддисмутазы SodA, SodB и SodC восстанавливают супероксид-анион до кислорода и пероксида водорода, который в дальнейшем разлагается каталазами KatG, KatE и алкилгидропероксидазой AhpC с

образованием воды и кислорода [40]. Показано, что летальное действие пероксида водорода связано с присутствием в клетке свободных ионов железа Fe^{2+} [41, 42]. В этом случае пероксид водорода в реакции с ионом железа (реакция Фентона) превращается в гидроксил-радикал $\bullet OH$:



Радикал $\bullet OH$ характеризуется высокой стабильностью и способностью вызывать разрывы в цепи ДНК [43].

Первые указания на взаимосвязь бактерицидного действия антибиотиков и генерации АФК получены в работах, показывающих, что активация регулона *SoxRS* приводит к устойчивости бактерий к разным классам антибиотиков [44–46]. Похожий вывод сделан на основании данных, показавших, что обработка бактерий такими антиоксидантами, как витамин С или глутатион, вызывает повышение минимальной ингибирующей концентрации для антибиотиков классов хинолонов и аминогликозидов [47, 48]. Кроме того, в обработанных антибиотиками бактериальных клетках зафиксировано статистически значимое увеличение уровня АФК по сравнению с контролем [49, 50].

Прямые доказательства существования взаимосвязи между летальным эффектом антибиотиков и генерацией АФК получены в серии работ группы Коллинза. Главное наблюдение состояло в том, что летальное действие антибиотиков норфлоксацина, ампициллина и канамицина сопровождалось резким всплеском внутриклеточного уровня гидроксил-радикала, определяемого с помощью флуоресцирующего реагента НРФ, тогда как использование пяти бактериостатических антибиотиков не приводило к появлению флуоресцирующего сигнала [30, 51, 52]. Показано, что гибель бактерий под действием бактерицидных антибиотиков снижалась при добавлении хелатора железа (2,2-дипиридила) или гасителя АФК (тиомочевина) [30]. Выяснилось также, что мутанты *recA Escherichia coli* характеризуются более высокой чувствительностью к антибиотикам, что свидетельствует об участии АФК в повреждении ДНК, которое устраняется с помощью *RecA*-зависимой системы репарации. Важно подчеркнуть, что АФК не всегда негативно влияют на выживаемость бактерий, например, применение сублетальных доз супероксид-аниона или инактивация супероксиддисмутазы (*sodAB*) приводили не к увеличению, а, напротив, к снижению летального действия антибиотиков [53–55].

Важная роль АФК в реализации летального действия антибиотиков подтверждается данными о том, что двойные мутанты *sodA sodB* обладают большей устойчивостью к антибиотикам, тогда как генетические повреждения каталаз/пероксидаз (*katG katE*) увеличивают летальный эффект

антибиотиков всех трех классов в 10–100 раз [43]. Интересные выводы сделаны на основании транспозонного мутагенеза генома *E. coli*, проведенного в присутствии антибиотиков. Оказалось, что две трети транспозонных инсерций локализовались в генах, ответственных за перенос электронов, окислительное фосфорилирование или вовлеченных в образование железо-серных кластеров [56]. Все эти мутанты характеризуются снижением пула ферментов, вовлеченных в дыхание, потребление NADH или электронно-транспортную цепь, т.е. в процессы, которые должны снижать генерацию АФК [56]. Примечательно, что анализ чувствительности Keio коллекции *E. coli* [57] к 22 антибиотикам выявил повышенную чувствительность к бактерицидным антибиотикам у мутантов, содержащих инсерции в локусах *recA*, *recB* или *recC* [58]. Из этого следует, что индуцируемые АФК двухцепочечные разрывы в ДНК являются одним из факторов летального действия антибиотиков [59].

Следует подчеркнуть, что некоторые изменения в метаболизме бактерий, обусловленные действием бактерицидных антибиотиков, никак не связаны с функционированием их первичных мишеней. Например, неожиданно оказалось, что обработка бактерий *S. aureus* ДНК-повреждающим агентом ципрофлоксацином приводит к окислению жиров и гуанинового основания в ДНК с образованием 8-охо-dGTP [60]. Кроме того, обнаружена супрессия агрегации белков под действием канамицина в условиях суперпродукции пероксиредоксина *AhpF* [61] или супрессия опосредованного ампициллином и канамицином летального эффекта в условиях сверхэкспрессии ферментов *MutT* и *RibA*, вовлеченных в удаление 8-охо-dGTP – токсичного продукта окисления пула GTP под действием АФК [59].

Таким образом, совокупность данных о роли АФК в действии бактерицидных антибиотиков позволяет заключить, что низкие концентрации АФК могут быть полезными и запускать защитные системы клетки, тогда как высокие концентрации, как правило, приводят к летальному эффекту. В связи с этим возникает вопрос, каким образом бактериальная клетка распознает эти две альтернативные ситуации и как передается сигнал от первичного фактора, вызывающего стресс, к системе, генерирующей АФК? Одну из таких систем представляет пара токсин/антитоксин *MazF/MazE*. В условиях, когда бактериальная клетка подвергается стрессу, происходит деградация белка-антитоксина *MazE* и тем самым высвобождается белок-токсин *MazF*. Под действием белка *MazF* происходит деградация клеточных мРНК [62, 63]. Некоторые из этих РНК транслируются с образованием укороченных неправильно свернутых пептидов, которые включаются в клеточную мембрану и активируют расположен-

ную в оболочке регуляторную систему *Srx* [64–66]. Активация *Srx* индуцирует экспрессию белка *YihE* [67], кодирующего протеинкиназу, которая вовлечена в негативную регуляцию *MazF* [64]. Белок *Srx* индуцирует и другие системы, участвующие в ренатурации или деградации неправильно свернутых белков, т.е. выполняет защитную функцию в клетке [68]. Однако оказалось, что делеция гена *SrxR*, кодирующего регулятор системы *Srx*, приводит к защите клеток от летального действия хинолонов, бета-лактамов и аминогликозидов [64, 65]. Таким образом, система *Srx* дикого типа выполняет и деструктивные функции, обусловленные, возможно, активацией двухкомпонентной системы *Ags*, вовлеченной в контроль редокс-баланса клетки [65, 66]. Система *Ags* участвует в регуляции активности компонентов системы транспорта, в частности, цитохромоксидазы *bd-I* [66] и тем самым может регулировать внутриклеточное содержание АФК.

Таким образом, при умеренном и непродолжительном окислительном стрессе бактериальная клетка способна преобразовать образующиеся АФК и защититься от их токсичного и летального действия. Однако при возрастании количества АФК в клетке и увеличении времени экспозиции происходит *Srx*-зависимое изменение активности *Ags*-системы, приводящее к увеличению содержания АФК до уровня, превышающего его позитивное действие на клетку, что, в конечном счете, может привести к летальному эффекту. Таким образом, бактериальная клетка располагает несколькими регуляторными системами, с помощью которых АФК могут обеспечивать различные сценарии действия антибиотиков на бактерии.

Ярким примером, показывающим важную роль окислительного стресса в летальном действии антибиотиков, служит обнаруженный нами феномен протективной функции сероводорода в отношении широкого спектра антибиотиков.

ГЕНЕТИЧЕСКИЙ КОНТРОЛЬ ГЕНЕРАЦИИ СЕРОВОДОРОДА У БАКТЕРИЙ

На протяжении многих десятилетий сероводород (H_2S) был известен как высокотоксичный яд, подавляющий дыхание организмов благодаря способности эффективно восстанавливать и инактивировать терминальные цитохромоксидазы и другие металлсодержащие ферменты. Способность бактерий продуцировать H_2S как побочный продукт метаболизма серы была обнаружена почти век назад [69], однако изучение его функций в бактериальной клетке началось лишь недавно. Наряду с оксидом азота (NO) и монооксидом углерода (CO), H_2S относится к группе так называемых газов-трансммиттеров, выполняющих (в низ-

ких концентрациях) важную сигнальную роль в клеточном метаболизме эукариот [70]. Первым газом-трансммиттером, выявленным у бактерий, был оксид азота, синтез которого контролируется синтазой оксида азота (bNOS) [71, 72]. Компьютерный анализ нуклеотидных последовательностей бактериальных геномов выявил потенциальные аналоги bNOS у ограниченного количества видов грамположительных бактерий [73]. Эти данные послужили поводом к поиску бактериальных ортологов ферментов, генерирующих H_2S , у млекопитающих: цистатионин- β -синтазы (CBS, [КФ 4.2.1.22]), цистатионин- γ -лиазы (CSE, [КФ 4.4.1.1]), 3-меркаптопируват-сульфотрансферазы (3MST [КФ 2.8.1.2]). В отличие от bNOS, ферменты, катализирующие синтез H_2S (т.е. ферменты, участвующие в биосинтезе сероводорода), очень консервативны – у большинства проанализированных видов бактерий обнаружен хотя бы один из гомологов ферментов млекопитающих, что указывает на важную роль сероводорода в жизнедеятельности бактерий [31].

Задолго до того, как обнаружили ферменты, катализирующие эндогенный синтез H_2S , было известно, что у анаэробных сульфат-продуцирующих бактерий сероводород может генерироваться в метаболическом пути восстановления сульфата [74]. Некоторые кишечные бактерии могут сходным образом продуцировать H_2S путем восстановления тиосульфата [75].

Как уже отмечено выше, бактерии содержат три фермента, вовлеченных в генерацию H_2S : CBS, CSE и (3MST) (рис. 1).

Все три фермента используют цистеин в качестве субстрата для синтеза H_2S , причем система CBS/CSE может также метаболизировать гомоцистеин в серии реакций, приводящих к образованию H_2S и других соединений [74, 76]. CBS и CSE являются пиридоксальфосфатзависимыми ферментами. Для протекания 3MST-зависимой реакции необходим предварительный этап, контролируемый аспартат-аминотрансферазой, обладающей цистеин-аминотрансферазной активностью, с образованием сульфана, который затем образует H_2S в присутствии восстановителей [77, 78]. Эти ферменты найдены в клетках по крайней мере четырех разных бактериальных патогенов. Бактерии *Bacillus anthracis*, *P. aeruginosa* и *S. aureus* кодируют ферменты CBS/CSE, тогда как *E. coli* содержит 3MST [31]. Известны и другие белки, потенциально способные генерировать H_2S , например, цистеиндесульфуразы, однако их вклад в генерацию сероводорода не доказан. До недавнего времени был известен только один путь генерации H_2S в клетках *E. coli* с участием фермента 3MST [31], однако сравнительно недавно в геноме *E. coli* и *Salmonella enterica* идентифицирован оперон *cyuPA*, контролирующий анаэробную де-

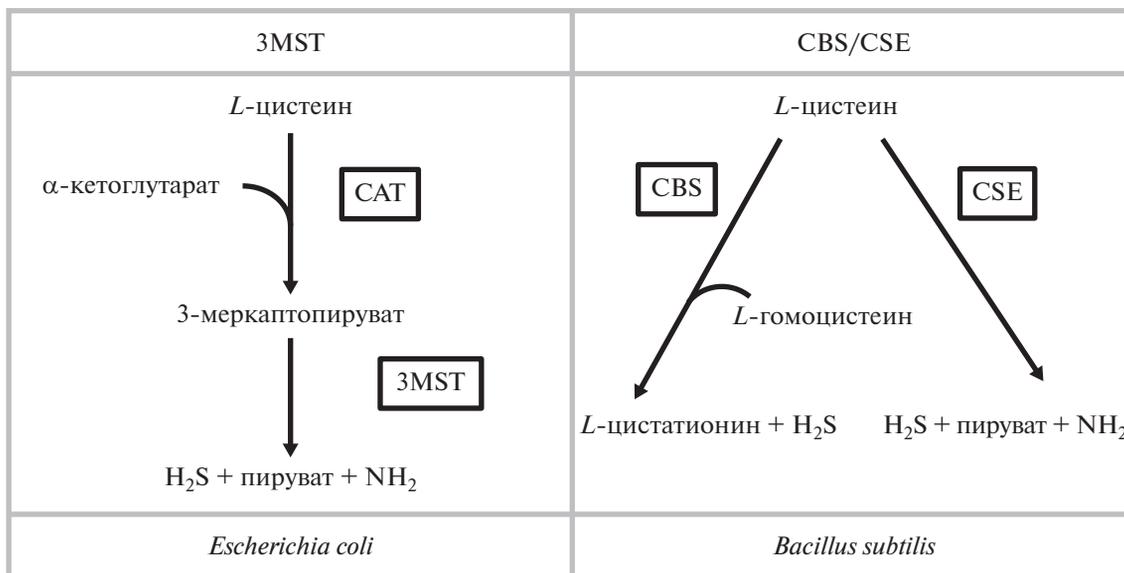


Рис. 1. Два пути генерации H_2S у модельных организмов. В клетках *E. coli* цистеин сначала превращается в 3-меркаптопируват с участием цистеин-аминотрансферазы (CAT) с последующим образованием H_2S , пирувата и аммония под контролем 3-меркаптопируват-сульфотрансферазы (3MST). В клетках *Bacillus subtilis* реализуются два пути генерации H_2S – с участием цистатинин- β -синтазы (CBS) и цистатинин- γ -лиазы (CSE).

градацию цистеина до сероводорода [79]. Физиологическая роль этих ферментов состоит в поддержании внутриклеточного содержания цистеина на уровне, который не позволяет реализоваться ингибирующему эффекту цистеина на экспрессию ряда аминокислотных оперонов.

СЕРОВОДОРОД ЗАЩИЩАЕТ БАКТЕРИИ ОТ ОКИСЛИТЕЛЬНОГО СТРЕССА И ДЕЙСТВИЯ БАКТЕРИЦИДНЫХ АНТИБИОТИКОВ

Показано, что в организмах млекопитающих H_2S выполняет функцию кардиопротектора, контролирует расслабление сосудов и гладкой мускулатуры, вовлечен в нейромодуляцию и защиту нейронов от окислительного стресса, а также оказывает противовоспалительное действие при инфекциях желудочно-кишечного тракта [80, 81]. Впервые защитная роль сероводорода в отношении действия бактерицидных антибиотиков была показана нами более 10 лет назад [31]. Оказалось, что инактивация генов, ответственных за генерацию H_2S у разных патогенных бактерий, приводит к увеличению чувствительности бактерий к широкому спектру антибиотиков. Согласно нашим ранним исследованиям, оксид азота (NO) проявляет сходную защитную активность в отношении антибиотиков у грамположительных бактерий, содержащих bNOS [82]. Поэтому первое предположение о возможной сигнальной функции H_2S у бактерий было основано на наших работах, посвященных изучению сигнальных функ-

ций NO. Хорошо известно, что NO участвует в различных жизненно важных процессах в бактериальной клетке, включая устойчивость к разнообразным стрессам, вирулентность, модуляцию хозяйского ответа на стресс и клеточную коммуникацию [72, 73, 82–87]. В 2009 г. впервые показали, что у тех видов бактерий, которые содержат bNOS, оксид азота защищает бактерии от широкого спектра антимикробных препаратов [82]. Интересно, что NO, выделяемый бактериями *B. subtilis* и *B. anthracis*, защищает также от токсина пиоцианина, секретируемого *P. aeruginosa* [82]. Весьма вероятно, что использование газов-трансммиттеров NO и H_2S является универсальной стратегией, которую бактерии применяют для защиты от генотоксичных агентов. Действительно, мы обнаружили, что нарушение способности бактерий продуцировать H_2S в результате инактивации генов *cbs*, *cse* или *mstA* приводит к резкому увеличению чувствительности таких мутантов к широкому спектру антибиотиков [31]. Добавление экзогенного источника H_2S в ростовую среду восстанавливало устойчивость таких мутантов к антибиотикам до уровня штамма дикого типа. Важно отметить, что из всех использованных нами мутантов, дефектных по продукции H_2S , только штамм *B. anthracis* содержал активную синтазу оксида азота bNOS, однако попытки объединить в одном геноме мутации *cbs/cse* и Δnos оказались безуспешными, т.е. комбинация мутаций, нарушающих генерацию обоих газов, приводит к летальному эффекту [31]. В то же время, химическое ингибирование активности bNOS в мутантах, дефектных по

cbs/cse, приводило к существенно большей чувствительности таких бактерий к антибиотикам по сравнению с одиночными мутантами *cbs/cse* и Δnos . На основании этих данных сделано заключение, что у бактерий, имеющих обе системы генерации NO и H₂S, наблюдается синергичное действие этих газов как протекторов от антибиотиков.

Важное наблюдение, указывающее на реализацию защитного действия H₂S на уровне супрессии окислительного стресса, сделано на основании определения частоты индуцированных пероксидом водорода (H₂O₂) двухцепочечных разрывов в хромосомной ДНК мутантов $\Delta mstA$ с нарушенной продукцией H₂S и мутантов со сверхэкспрессией гена *mstA*, находящегося под контролем промотора P_{tet}. Оказалось, что увеличение уровня генерации H₂S в мутанте P_{tet}-*mstA* или добавление экзогенного H₂S существенно снижает количество двухцепочечных разрывов в ДНК при обработке клеток H₂O₂ [88]. Эти данные позволяют предположить, что протективное действие H₂S осуществляется за счет снижения эффективности реакции Фентона, приводящей к генерации токсичного гидроксил-радикала [89, 90]. Для проверки этого предположения мы внесли в геном мутантов, содержащих делецию $\Delta mstA$, дополнительную мутацию в гене *fur*, продукт которого является регулятором ферментов, ответственных за усвоение железа в бактериальных клетках [91, 92]. Известно, что инактивация гена *fur* приводит к 8-кратному увеличению концентрации свободного железа в клетках *E. coli* и резко увеличивает чувствительность ДНК к окислительному стрессу [93–95]. Оказалось, что в клетках штамма дикого типа инактивация гена *fur* приводит к 40-кратному увеличению чувствительности к H₂O₂, тогда как выживаемость клеток штамма с делецией гена *mstA* снижается более чем в 300 раз. В клетках мутанта P_{tet}-*mstA* инактивация гена *fur* практически не сказывается на выживаемости бактерий, обработанных H₂O₂ [88]. Полученные результаты позволяют заключить, что H₂S, синтезируемый эндогенно под контролем гена *mstA*, защищает клетки от бактерицидного действия H₂O₂. Совокупность полученных данных показывает, что защитная функция H₂S, генерируемого под контролем гена *mstA*, наиболее ярко проявляется на фоне делеции гена Δfur , т.е. в условиях высокого внутриклеточного содержания свободного железа. Поэтому можно предположить, что, будучи мощным восстановителем, H₂S связывает свободное внутриклеточное железо, служащее субстратом реакции Фентона, ведущей к образованию гидроксил-радикала [88].

Это заключение подтвердилось последующими экспериментами с мутантами *E. coli*, содержа-

щими модификации в генах, ответственных за метаболизм и транспорт цистеина.

ВЗАИМОСВЯЗЬ МЕЖДУ ГЕНЕРАЦИЕЙ СЕРОВОДОРОДА, МЕТАБОЛИЗМОМ ЦИСТЕИНА И ОКИСЛИТЕЛЬНЫМ СТРЕССОМ

Высокий уровень устойчивости к окислительному стрессу, наблюдаемый у мутанта P_{tet}-*mstA*, может быть обусловлен не только связыванием свободного железа в реакции Фентона, но и усилением деградации L-цистеина. Показано, что L-цистеин может промотировать реакцию Фентона путем восстановления трехвалентного железа (Fe³⁺) в двухвалентное [96]. Можно предположить, что в условиях интенсивной деградации L-цистеина в H₂S через последовательное действие ферментов AspC и 3MST, наблюдаемой у мутанта P_{tet}-*mstA*, реакция Фентона должна подвергаться дополнительной репрессии. Мы предположили, что усиленная деградация L-цистеина в мутанте P_{tet}-*mstA* должна активировать экспрессию CysB-регулона. Белок CysB служит сенсором и регулятором внутриклеточного содержания L-цистеина и серы (рис. 2) [97].

Чтобы выявить взаимосвязь между генерацией H₂S и деградацией L-цистеина мы определили уровень транскрипции генов *cysK*, *cysP* и *tau*, регулируемых белком CysB в штаммах $\Delta mstA$ и P_{tet}-*mstA*, методом количественной ПЦР в реальном времени. Выяснилось, что уровень транскрипции генов *cysB*, *cysK*, *cysP* и *tau* у мутанта $\Delta mstA$ несколько ниже, чем в штамме дикого типа. Напротив, у мутанта P_{tet}-*mstA* транскрипция генов *cysK*, *cysP* и *tau* значительно увеличена — в 10.5, 8.2, и 4.8 раза соответственно. Повышенная экспрессия этих генов, скорее всего, обусловлена 2-кратным увеличением экспрессии гена *cysB*, так как инактивация этого гена снижает уровень их экспрессии до базального уровня. Из этого следует, что индукция генов CysB-регулона обусловлена усиленной деградацией L-цистеина в клетках мутанта P_{tet}-*mstA*. Известно, что L-цистеин участвует в аллостерическом ингибировании серин-ацетилтрансферазы (ген *cysE*), продуктом которой является O-ацетилсерин (OAS), который, в свою очередь, превращается в N-ацетилсерин, служащий автоиндуктором транскрипционного регулятора — белка CysB [98]. Поэтому именно увеличенный пул OAS, вероятнее всего, является главной причиной усиления экспрессии CysB-регулируемых генов у мутанта P_{tet}-*mstA*, в то время как сниженный уровень транскрипции этих генов у мутанта $\Delta mstA$ обусловлен нарушением *aspC-mstA*-зависимого пути деградации L-цистеина (рис. 2). В соответствии с этим предположением при добавлении экзогенного L-цистеина в среду при выращивании му-

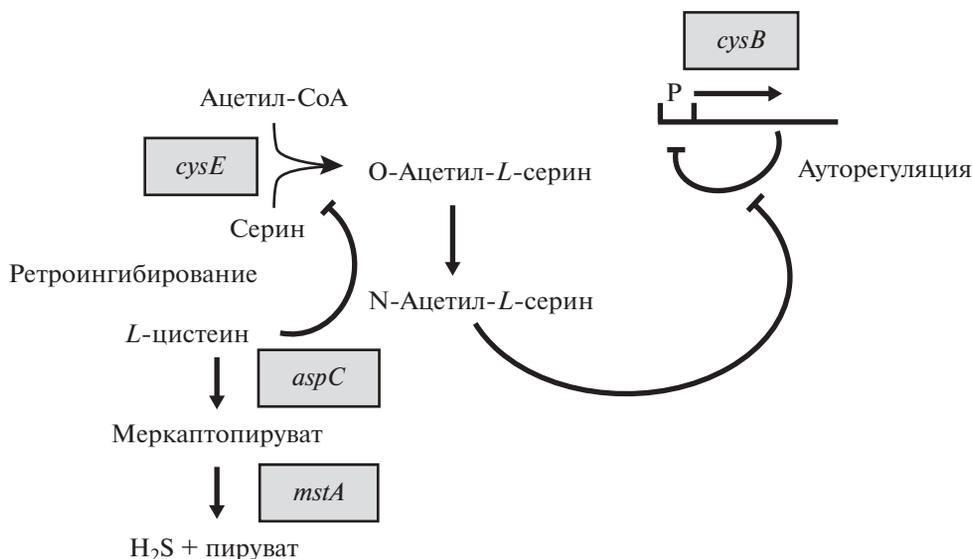


Рис. 2. Взаимосвязь между генерацией H_2S , активностью серин-ацетилтрансферазы и экспрессией гена *cysB*. Активность серин-ацетилтрансферазы, кодируемой геном *cysE*, подвержена ретроингибированию цистеином. Продуктом серин-ацетилтрансферазной реакции является О-ацетилсерин, который спонтанно превращается в N-ацетилсерин. N-ацетилсерин служит индуктором транскрипционного регулятора CysB. Белок CysB связывается перед -35 областью позитивно регулируемых промоторов и в присутствии индуктора облегчает формирование комплекса, инициирующего транскрипцию. Кроме того, ген *cysB* подвержен авторегуляции собственным продуктом, который связывается с собственным промотором в качестве белка-репрессора. N-ацетилсерин стимулирует связывание белка CysB с сайтами, вовлеченными в позитивную регуляцию, но ингибирует связывание с негативно регулируемым промотором гена *cysB* [88].

танта P_{tet} -*mstA* экспрессия CysB-регулируемых генов снижается до базального уровня. Кроме того, сравнили уровни транскрипции генов CysB-регулона в условиях окислительного стресса у штамма дикого типа, делеционного мутанта $\Delta mstA$ и мутанта P_{tet} -*mstA*, суперпродуцента H_2S . В штамме дикого типа мы обнаружили достаточно высокий уровень индукции CysB-регулируемых генов в ответ на обработку пероксидом водорода, что согласуется с опубликованными данными. Следует подчеркнуть, что молекулярный механизм, с помощью которого H_2O_2 может влиять на уровень транскрипции CysB-регулируемых генов, остается нераскрытым. Особый интерес представляют полученные нами результаты, показывающие практически полное отсутствие индукции CysB-зависимых генов под действием H_2O_2 в делеционном мутанте $\Delta mstA$.

Мы предложили модель, с помощью которой можно объяснить неожиданную роль H_2S в регуляторном ответе CysB-регулона на окислительный стресс (рис. 3) [88]. Согласно этой модели, экзогенный пероксид водорода, попадая в периплазму клетки, окисляет L-цистеин до L-цистина с образованием воды. Это должно приводить к снижению пула L-цистеина, в свою очередь, приводит к снятию авторегуляции транскрипции гена *cysB*, продукт которого служит активатором генов CysB-регулона и, в частности, гена *tcyP*, ответственного

за синтез транспортера L-цистина. Усиление потока L-цистина/L-цистеина в клетку обеспечивает усиленную *mstA*-зависимую генерацию H_2S , который, связываясь со свободным железом, снижает эффективность реакции Фентона, сопровождающую образование токсичного для клетки гидроксил-радикала ($\bullet OH$).

ФЕРМЕНТЫ, ГЕНЕРИРУЮЩИЕ СЕРОВОДОРОД, КАК МИШЕНИ ДЛЯ АНТИБАКТЕРИАЛЬНОЙ ТЕРАПИИ

Несмотря на потенциальную токсичность в больших дозах, в физиологических концентрациях H_2S действует как важная сигнальная молекула, которая защищает бактерии от окислительного стресса, иммунной атаки и многих антибиотиков. Эти результаты, поддерживающие концепцию бактерицидного действия антибиотиков через окислительные повреждения, позволили предложить ферменты, продуцирующие H_2S , в качестве новых многообещающих мишеней для противомикробной терапии. Была поставлена практическая задача синтеза низкомолекулярных соединений, способных служить ингибиторами конкретных ферментов, вовлеченных в генерацию сероводорода.

В качестве модели в этих исследованиях использовали патогенные бактерии: *S. aureus* (грам-

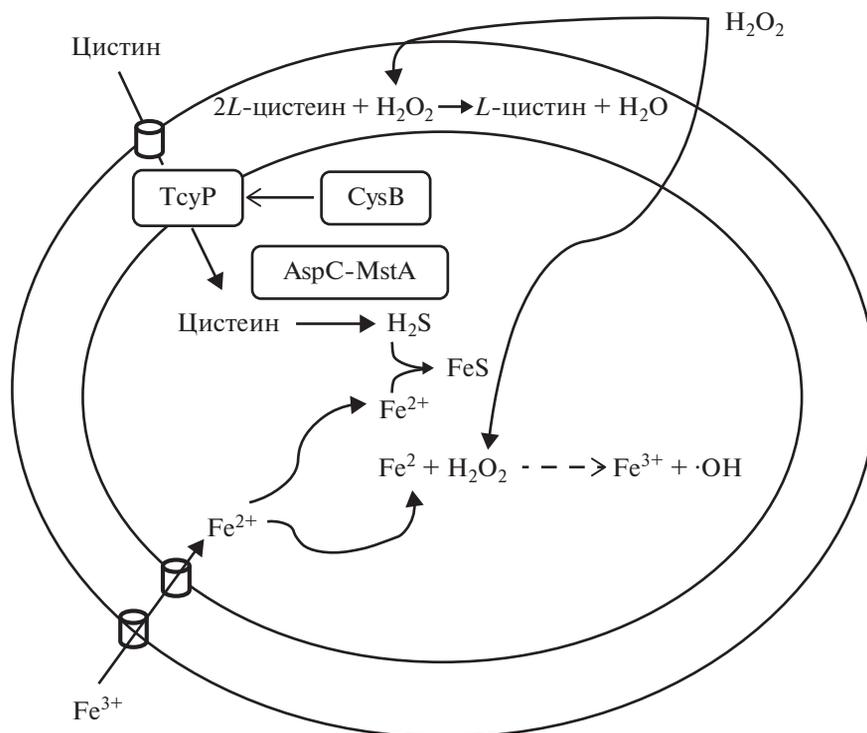


Рис. 3. Модель опосредованной H_2S защиты клеток *E. coli* от окислительного стресса. Фракция экзогенного H_2O_2 в периплазме клетки вступает в реакцию с цистеином с образованием цистина и воды. Это приводит к снижению внутриклеточного содержания цистеина с последующим снятием авторегуляции гена *cysB* и активацией *CysB*-регулируемых генов, включая *tcyP*, который контролирует транспорт цистина из периплазмы в цитоплазму. Усиление потока цистина/цистеина в клетку приводит к увеличению уровня *mstA*-зависимой генерации H_2S , который секвестрирует свободное железо, блокирует реакцию Фентона и предотвращает образование токсичного гидроксил-радикала [88].

положительная) и *P. aeruginosa* (грамотрицательная) — основные возбудители-внутрибольничных инфекций. С помощью транспозонного мутагенеза в геноме этих бактерий инактивировали гены *cbs* и *cse*, кодирующие ферменты, участвующие в продукции сероводорода, и определили их вклад в генерацию сероводорода [99]. Определили уровень генерации H_2S полученными мутантами и показали, что главную роль в продукции сероводорода у обоих видов бактерий играет фермент CSE. Кроме того, делеционные мутанты *cse* обнаруживали значительно более высокую чувствительность к антибиотикам гентамицину, ампициллину и норфлоксацину по сравнению со штаммами дикого типа.

В результате виртуального скрининга (SBVS) среди ~3 млн коммерчески доступных малых молекул отобрали три потенциальных ингибитора фермента CSE: NL1, NL2 и NL3. Эксперименты по сокристаллизации этих ингибиторов с мономерами CSE позволили определить сайты связывания всех трех ингибиторов с ферментом. Определена способность отображенных ингибиторов подавлять активность фермента CSE *in vitro*, а также в живых клетках. Важно подчеркнуть, что отображенные ингибиторы проявляли строгую специ-

фичность к бактериальным CSE, но не подавляли активность CSE млекопитающих, включая человека. Выяснилось, что ингибиторы NL1, NL2 и NL3 подавляют способность бактерий *S. aureus* и *P. aeruginosa* генерировать H_2S и существенным образом увеличивают чувствительность этих бактерий к действию антибиотика гентамицина [99].

На мышинных моделях сепсиса, индуцированного *S. aureus*, и легочной инфекции, вызванной *P. aeruginosa*, проверена способность ингибиторов NL1, NL2 и NL3 усиливать действие гентамицина против этих инфекций. Показано, что комбинация антибиотика гентамицина с ингибитором NL1 увеличивает выживаемость зараженных сепсисом мышей и снижает титр бактерий *P. aeruginosa* при легочной инфекции. Исследована способность отображенных ингибиторов снижать долю персистеров, устойчивых к действию ципрофлоксацина и гентамицина, в популяции бактерий *S. aureus* и *P. aeruginosa*, а также их влияние на формирование биопленок. Показано, что обработка бактерий ингибитором NL1 существенно снижает долю персистеров в популяции бактерий *S. aureus* и *P. aeruginosa*, а все три ингибитора подавляют формирование биопленок у бактерий *P. aeruginosa*. Таким образом, можно заключить, что ингибиторы NL1, NL2

и NL3 действуют как высокоактивные антибактериальные препараты, усиливающие токсический эффект традиционных антибиотиков [99].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Инфекционное заболевание часто может быть неизлечимым, даже если оно вызвано патогеном, чувствительным к антибиотикам. Это главный парадокс хронических инфекций. В большинстве случаев хронические инфекции сопровождаются образованием персистеров и биопленок. Персистеры – это метаболически неактивные, неделимые варианты обычных клеток, которые случайным образом или под влиянием стресса образуются в микробных популяциях и обладают высокой толерантностью к антибиотикам (не приобретая при этом резистентности к ним). Персистеры могут быть основной причиной неэффективности терапии хронических инфекционных заболеваний. Периодическое применение высоких доз бактерицидных антибиотиков может приводить к отбору штаммов с повышенным уровнем образования персистеров. Именно это и происходит в процессе лечения хронических инфекций, когда пациент периодически подвергается воздействию высоких доз антибиотиков. Скрининговые нокаутные библиотеки не выявили мутантов, полностью лишенных персистеров, что указывает на “избыточность” механизмов образования “дремлющих” клеток. Такая избыточность затрудняет поиск мишеней для предотвращения образования персистеров. Мы показали, что продукция сероводорода в клетке имеет решающее значение для формирования популяции персистеров. Клетки *S. aureus* и *P. aeruginosa* с генетическим нарушением основного пути образования сероводорода образуют в 100 раз меньше персистеров после обработки ципрофлоксацином в концентрации, в 10 раз превышающей минимальную ингибирующую концентрацию (МИС). Ингибитор CSE NL1, впервые предложенный нами для усиления действия бактерицидных антибиотиков, в такой же степени снижал количество персистеров, как и генетическая инактивация *cse*-оперона. Персистеры генерируют значительно больше H_2S , чем обычные клетки, что, вероятно, приводит к контролируемому “самоотравлению” и снижению синтеза АТФ. В результате происходит замедление метаболизма и, как следствие, возникает высокая толерантность к антибиотикам. Еще одно удивительное наблюдение связано с пиоцианином, вторичным метаболитом, функционирующим как сигнальная молекула и фактор вирулентности в стационарной культуре *P. aeruginosa*. При инактивации CSE цвет культуры *P. aeruginosa* изменяется от светло-желтого, характерного для восстановленного пиоцианина, до зелено-синего, соответствующего окисленному пиоцианину. Поскольку доля клеток-персистеров у

P. aeruginosa дикого типа может увеличиться в 90 раз в ответ на пиоцианин, отсутствием окислительно-восстановительной активности пиоцианина можно объяснить антиперсистерный эффект ингибирования CSE. Пиоцианин связан с образованием биопленок *P. aeruginosa*. Инактивация CSE приводит к резкому изменению морфологии колоний *P. aeruginosa* на чашках с агаром, а также к значительному снижению образования статической биопленки у *P. aeruginosa* и *S. aureus*. Сравнительный транскриптомный анализ *P. aeruginosa* показал, что гены, участвующие в формировании биопленок (включая гены биосинтеза альгината и других экзополисахаридов), наиболее сильно подавлены в клетках с дефицитом H_2S . Обнаружение того, что ингибиторы H_2S подавляют образование персистеров и биопленок – двух основных адаптаций бактерий к действию антибиотиков, открывает новые возможности для дальнейших испытаний нашего терапевтического подхода с использованием комбинации ингибиторов H_2S и антибиотиков, в том числе с применением усовершенствованных новых вариантов ингибиторов H_2S .

Авторы выражают благодарность Е.А. Нудлеру и А.А. Макарову за ценные замечания при написании и обсуждении настоящего обзора.

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

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

Авторы сообщают об отсутствии конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Payne D.J., Gwynn M.N., Holmes D.J., Pompliano D.L. (2007) Drugs for bad bugs: confronting the challenges of antibacterial discovery. *Nat. Rev. Drug Discov.* **6**, 29–40.
2. Ribeiro da Cunha B., Fonseca L.P., Calado C.R.C. (2019) Antibiotic discovery: where have we come from, where do we go? *Antibiotics* (Basel). **8**, 45.
3. Schrader S.M., Vaubourgeix J., Nathan C. (2020) Biology of antimicrobial resistance and approaches to combat it. *Sci. Transl. Med.* **12**, eaaz6992.
4. O’Neill J. “Tackling drug-resistant infections globally: final report and recommendations” (Wellcome Trust, 2016); <https://wellcomecollection.org/works/thvwsuba>
5. Brauner A., Fridman O., Gefen O., Balaban N.Q. (2016) Distinguishing between resistance, tolerance and persistence to antibiotic treatment. *Nat. Rev. Microbiol.* **14**, 320–330.
6. Wright G.D. (2011) Molecular mechanisms of antibiotic resistance. *Chem. Commun.* **47**, 4055.

7. Lin J., Nishino K., Roberts M.C., Tolmasky M., Aminov R.I., Zhang L. (2015) Mechanisms of antibiotic resistance. *Front. Microbiol.* **6**, 34.
8. Webber M., Piddock L. (2003) The importance of efflux pumps in bacterial antibiotic resistance. *J. Antimicrob. Chemother.* **51**, 9.
9. Cox G., Wright G.D. (2013) Intrinsic antibiotic resistance: mechanisms, origins, challenges and solutions. *Int. J. Med. Microbiol.* **303**, 287.
10. Piddock L.J. (2006) Multidrug-resistance efflux pumps? Not just for resistance. *Nat. Rev. Microbiol.* **4**, 629.
11. Wright G.D. (2007) The antibiotic resistome: the nexus of chemical and genetic diversity. *Nat. Rev. Microbiol.* **5**, 175.
12. Walsh C. (2000) Molecular mechanisms that confer antibacterial drug resistance. *Nature.* **406**, 775–778.
13. Balaban N.Q., Helaine S., Lewis K., Ackermann M., Aldridge B., Andersson D., Brynildsen M.P., Bumann D., Camilli A., Collins J., Dehio C., Fortune S., Ghigo J.M., Hardt W.D., Harms A., Heinemann M., Hung D.T., Jenal U., Levin B.R., Michiels J., Storz G., Tan M.W., Nenson T., Van Melderen L., Zinkernagel A. (2019) Definitions and guidelines for research on antibiotic persistence. *Nat. Rev. Microbiol.* **17**, 441–448.
14. Michiels J.F., Van den Bergh B., Verstraeten N., Michiels J. (2016) Molecular mechanisms and clinical implications of bacterial persistence. *Drug Resist. Updat.* **29**, 76–89.
15. Costerton J.W., Stewart P.S., Greenberg E.P. (1999) Bacterial biofilms: a common cause of persistent infections. *Science.* **284**, 1318–1322.
16. Kirby A.E., Garner K., Levin B.R. (2012) The relative contributions of physical structure and cell density to the antibiotic susceptibility of bacteria in biofilms. *Antimicrob. Agents Chemother.* **56**, 2967–2975.
17. Meredith H.R., Srimani J.K., Lee A.J., Lopatkin A.J., You L. (2015) Collective antibiotic tolerance: mechanisms, dynamics and intervention. *Nat. Chem. Biol.* **11**, 182–188.
18. Dewachter L., Fauvart M., Michiels J. (2019) Bacterial heterogeneity and antibiotic survival: understanding and combatting persistence and heteroresistance. *Mol. Cell.* **76**, 255–267.
19. Schulze A., Mitterer F., Pombo J.P., Schild S. (2021) Biofilms by bacterial human pathogens: clinical relevance – development, composition and regulation – therapeutic strategies. *Microb. Cell.* **8**, 28–56.
20. Conlon B.P. (2014) *Staphylococcus aureus* chronic and relapsing infections: evidence of a role for persister cells: an investigation of persister cells, their formation and their role in *S. aureus* disease. *BioEssays.* **36**, 991–996.
21. Donlan R.M., Costerton J.W. (2002) Biofilms: survival mechanisms of clinically relevant microorganisms. *Clin. Microbiol. Rev.* **15**, 167–193.
22. Mulcahy L.R., Burns J.L., Lory S., Lewis K. (2010) Emergence of *Pseudomonas aeruginosa* strains producing high levels of persister cells in patients with cystic fibrosis. *J. Bacteriol.* **192**, 6191–6199.
23. Percival S.L., Hill K.E., Malic S., Thomas D.W., Williams D.W. (2011) Antimicrobial tolerance and the significance of persister cells in recalcitrant chronic wound biofilms. *Wound Repair Regen.* **19**, 1–9.
24. Huemer M., Shambata S.M., Bergada-Pijuana J., Söderholmb S., Boumasmouda M., Vulin C., Gómez-Mejiaa A., Varela M.A., Tripathi V., Götschia S., Maggio E.M., Hasse B., Bruggera S.D., Bumann D., Schuepbach R.F., Zinkernagel A.S. (2021) Molecular reprogramming and phenotype switching in *Staphylococcus aureus* lead to high antibiotic persistence and affect therapy success. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **118**, e2014920118.
25. Davies J., Davies D. (2010) Origins and evolution of antibiotic resistance. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **74**, 417–433.
26. Levin B.R., Rozen D.E. (2006) Non-inherited antibiotic resistance. *Nat. Rev. Microbiol.* **4**, 556–562.
27. Sebastian J., Swaminath S., Nair R.R., Jakkala K., Pradhan A., Ajitkumar P. (2017) *De novo* emergence of genetically resistant mutants of *Mycobacterium tuberculosis* from the persistence phase cells formed against antituberculosis drugs *in vitro*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **61**, e01343-16.
28. Van Acker H., Coenye T. (2017) The role of reactive oxygen species in antibiotic-mediated killing of bacteria. *Trends Microbiol.* **25**, 456–466.
29. Dwyer D.J., Collins J.J., Walker G.C. (2015) Unraveling the physiological complexities of antibiotic lethality. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* **55**, 313–332.
30. Kohanski M.A., Dwyer D.J., Hayete B., Lawrence C.A., Collins J.J. (2007) A common mechanism of cellular death induced by bactericidal antibiotics. *Cell.* **130**, 797–810.
31. Shatalin K., Shatalina E., Mironov A., Nudler E. (2011) H₂S: a universal defense against antibiotics in bacteria. *Science.* **334**, 986–990.
32. Luhachack L., Nudler E. (2014). Bacterial gasotransmitters: an innate defense against antibiotics. *Curr. Opin. Microbiol.* **21C**, 13–17.
33. Kimura H. (2015) Signaling of hydrogen sulfide and polysulfides. *Antioxid. Redox Signal.* **22**, 347–349.
34. Szabo C. (2018) A timeline of hydrogen sulfide (H₂S) research: from environmental toxin to biological mediator. *Biochem. Pharmacol.* **149**, 5–19.
35. Nzungize L., Kaiser M., Wang X., Huang X., Yang W., Duan X., Yan S., Li C., Abdalla A.E., Jeyakkumar P., Xie J. (2019) *Mycobacterium tuberculosis metC* (Rv3340) derived hydrogen sulphide conferring bacteria stress survival. *J. Drug Target.* **27**, 1004–1016.
36. Toliver-Kinsky T., Cui W., Törö G., Lee S.J., Shatalin K., Nudler E., Szabo C. (2018) H₂S: a bacterial defense mechanism against the host immune response *Infect. Immun.* **87**, e00272-18.
37. Walsh C. (2003) *Antibiotics: Actions, Origins, Resistance*. Washington, DC: ASM.
38. Kohanski M.A., Dwyer D.J., Collins J.J. (2010) How antibiotics kill bacteria: from targets to networks. *Nat. Rev. Microbiol.* **8**, 423–435.

39. Imlay J.A. (2003) Pathways of oxidative damage. *Annu. Rev. Microbiol.* **57**, 395–418.
40. Zhao X., Drlica K. (2014) Reactive oxygen species and the bacterial response to lethal stress. *Curr. Opin. Microbiol.* **21**, 1–6.
41. Imlay J.A., Chin S.M., Linn S. (1988) Toxic DNA damage by hydrogen peroxide through the Fenton reaction *in vivo* and *in vitro*. *Science*. **240**, 640–642.
42. Park S., You X., Imlay J.A. (2005) Substantial DNA damage from submicromolar intracellular hydrogen peroxide detected in Hpx7 mutants of *Escherichia coli*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **102**, 9317–9322.
43. Wang X., Zhao X. (2009) Contribution of oxidative damage to antimicrobial lethality. *Antimicrob. Agents Chemother.* **53**, 1395–1402.
44. Greenberg J.T., Monach P., Chou J.H., Josephy P.D., Demple B. (1990) Positive control of a global antioxidant defense regulon activated by superoxide-generating agents in *Escherichia coli*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **87**, 6181–6185.
45. Oethinger M., Podglajen I., Kern W.V., Levy S.B. (1998) Overexpression of the *marA* or *soxS* regulatory gene in clinical topoisomerase mutants of *Escherichia coli*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **42**, 2089–2094.
46. Koutsolioutsou A., Martins E.A., White D.G., Levy S.B., Demple B. (2001) A *soxRS*-constitutive mutation contributing to antibiotic resistance in a clinical isolate of *Salmonella enterica* (serovar *typhimurium*). *Antimicrob. Agents Chemother.* **45**, 38–43.
47. Goswami M., Mangoli S.H., Jawali N. (2006) Involvement of reactive oxygen species in the action of ciprofloxacin against *Escherichia coli*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **50**, 949–954.
48. Goswami M., Mangoli S.H., Jawali N. (2007) Effects of glutathione and ascorbic acid on streptomycin sensitivity of *Escherichia coli*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **51**, 1119–1122.
49. Albesa I., Becerra M.C., Battan P.C., Paez P.L. (2004) Oxidative stress involved in the antibacterial action of different antibiotics. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **317**, 605–609.
50. Becerra M.C., Albesa I. (2002) Oxidative stress induced by ciprofloxacin in *Staphylococcus aureus*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **297**, 1003–1007.
51. Lewin C.S., Morrissey I., Smith J.T. (1991) The mode of action of quinolones: the paradox in activity of low and high concentrations and activity in the anaerobic environment. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* **10**, 240–248.
52. Malik M., Hussain S., Drlica K. (2007) Effect of anaerobic growth on quinolone lethality with *Escherichia coli*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **51**, 28–34.
53. Liu Y., Liu X., Qu Y., Wang X., Li L., Zhao X. (2012) Inhibitors of reactive oxygen species accumulation delay and/or reduce the lethality of several antistaphylococcal agents. *Antimicrob. Agents Chemother.* **56**, 6048–6050.
54. Burger R.M., Drlica K. (2009) Superoxide protects *Escherichia coli* from bleomycin mediated lethality. *J. Inorg. Biochem.* **103**, 1273–1277.
55. Mosel M., Li L., Drlica K., Zhao X. (2013) Superoxide-mediated protection of *Escherichia coli* from antimicrobials. *Antimicrob. Agents Chemother.* **57**, 5755–5759.
56. Girgis H.S., Hottes A.K., Tavazoie S. (2009) Genetic architecture of intrinsic antibiotic susceptibility. *PLoS One* **4**, e5629.
57. Baba T., Ara T., Hasegawa M., Takai Y., Okumura Y., Baba M., Datsenko K.A., Tomita M., Wanner B.L., Mori H. (2006) Construction of *Escherichia coli* K-12 in-frame, single-gene knockout mutants: the Keio collection. *Mol. Syst. Biol.* **2**, 2006 0008.
58. Liu A., Tran L., Becket E., Lee K., Chinn L., Park E., Tran K., Miller J.H. (2010) Antibiotic sensitivity profiles determined with an *Escherichia coli* gene knockout collection: generating an antibiotic bar code. *Antimicrob. Agents Chemother.* **54**, 1393–1403.
59. Foti J.J., Devadoss B., Winkler J.A., Collins J.J., Walker G.C. (2012) Oxidation of the guanine nucleotide pool underlies cell death by bactericidal antibiotics. *Science*. **336**, 315–319.
60. Becerra M.C., Paez P.L., Larovere L.E., Albesa I. (2006) Lipids and DNA oxidation in *Staphylococcus aureus* as a consequence of oxidative stress generated by ciprofloxacin. *Mol. Cell Biochem.* **285**, 29–34.
61. Ling J., Cho C., Guo L.T., Aerni H.R., Rinehart J., Soll D. (2012) Protein aggregation caused by aminoglycoside action is prevented by a hydrogen peroxide scavenger. *Mol. Cell.* **48**, 713–722.
62. Zhang Y., Zhang J., Hoeflich K.P., Ikura M., Qing G., Inouye M. (2003) MazF cleaves cellular mRNAs specifically at ACA to block protein synthesis in *Escherichia coli*. *Mol. Cell.* **12**, 913–923.
63. Gerdes K., Christensen S.K., Lobner-Olesen A. (2005) Prokaryotic toxin–antitoxin stress response loci. *Nat. Rev. Microbiol.* **3**, 371–382.
64. Dorsey-Oresto A., Lu T., Mosel M., Wang X., Salz T., Drlica K., Zhao X. (2013) YihE kinase is a central regulator of programmed cell death in bacteria. *Cell Rep.* **3**, 528–537.
65. Kohanski M.A., Dwyer D.J., Wierzbowski J., Cottarel G., Collins J.J. (2008) Mistranslation of membrane proteins and two-component system activation trigger antibiotic-mediated cell death. *Cell*. **135**, 679–690.
66. Davies B.W., Kohanski M.A., Simmons L.A., Winkler J.A., Collins J.J., Walker G.C. (2009) Hydroxyurea induces hydroxyl radical-mediated cell death in *Escherichia coli*. *Mol. Cell.* **36**, 845–860.
67. Pogliano J., Lynch A.S., Belin D., Lin E.C., Beckwith J. (1997) Regulation of *Escherichia coli* cell envelope proteins involved in protein folding and degradation by the Cpx two-component system. *Genes Dev.* **11**, 1169–1182.
68. Raivio T.L., Silhavy T.J. (2001) Periplasmic stress and ECF sigma factors. *Annu. Rev. Microbiol.* **255**, 591–624.
69. Clarke P.H. (1953) Hydrogen sulphide production by bacteria. *J. Gen. Microbiol.* **8**, 397–407.

70. Wang R. (2002) Wo's company, three's a crowd: can H₂S be the third endogenous gaseous transmitter? *FASEB J.* **16**, 1792–1798.
71. Adak S., Aulak K.S., Stuehr D.J. (2002) Direct evidence for nitric oxide production by a nitric-oxide synthase-like protein from *Bacillus subtilis*. *J. Biol. Chem.* **277**, 16167–16171.
72. Gusarov I., Nudler E. (2005) NO-mediated cytoprotection: instant adaptation to oxidative stress in bacteria. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **102**, 13855–13860.
73. Gusarov I., Starodubtseva M., Wang Z.Q., McQuade L., Lippard S.J., Stuehr D.J., Nudler E. (2008) Bacterial nitric-oxide synthases operate without a dedicated redox partner. *J. Biol. Chem.* **283**, 13140–13147.
74. Wang R. (2012) Physiological implications of hydrogen sulfide: a whiff exploration that blossomed. *Physiol. Rev.* **92**, 791–896.
75. Stoffels L., Krehenbrink M., Berks B.C., Unden G. (2012) Thiosulfate reduction in *Salmonella enterica* is driven by the proton motive force. *J. Bacteriol.* **194**, 475–485.
76. Mondovi B., Scioscia-Santoro A., Cavallinid D. (1963) Further evidence on the identity of cystathionase and cysteine desulfhydrase. *Arch. Biochem. Biophys.* **101**, 363–364.
77. Mikami Y., Shibuya N., Kimura Y., Nagahara N., Ogasawara Y., Kimura H. (2011) Thioredoxin and dihydro-lipoic acid are required for 3-mercaptopyruvate sulfuryltransferase to produce hydrogen sulfide. *Biochem. J.* **439**, 479–485.
78. Singh S., Banerjee R. (2011) PLP-dependent H₂S biogenesis. *Biochim. Biophys. Acta.* **1814**, 1518–1527.
79. Loddeke M., Schneider B., Oguri T., Mehta I., Xuan Z., Reitzera L. (2017) Anaerobic cysteine degradation and potential metabolic coordination in *Salmonella enterica* and *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **199**, e00117–17.
80. Kimura Y., Goto Y.-I., Kimura H. (2010) Hydrogen sulfide increases glutathione production and suppresses oxidative stress in mitochondria. *Antioxid. Redox Signal* **12**, 1–13.
81. Kimura H. (2014) Production and physiological effects of hydrogen sulfide. *Antioxid. Redox Signal.* **20**, 783–793.
82. Gusarov I., Shatalin K., Starodubtseva M., Nudler E. (2009) Endogenous nitric oxide protects bacteria against a wide spectrum of antibiotics. *Science.* **325**, 380–384.
83. Kers J.A., Wach M.J., Krasnoff S.B., Widom J., Cameron K.D., Bukhalid R.A., Gibson D.M., Crane B.R., Loria R. (2004) Nitration of a peptide phytotoxin by bacterial nitric oxide synthase. *Nature.* **429**, 79–82.
84. Shatalin K., Gusarov I., Avetisova E., Shatalina Y., McQuade L.E., Lippard S.J., Nudler E. (2008) *Bacillus anthracis*-derived nitric oxide is essential for pathogen virulence and survival in macrophages. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **105**, 1009–1013.
85. Carlson H.K., Vance R.E., Marletta M.A. (2010) H-NOX regulation of c-di-GMP metabolism and biofilm formation in *Legionella pneumophila*. *Mol. Microbiol.* **77**, 930–942.
86. Bowman L.A., McLean S., Poole R.K., Fukuto J.M. (2011) The diversity of microbial responses to nitric oxide and agents of nitrosative stress close cousins but not identical twins. *Adv. Microb. Physiol.* **59**, 135–219.
87. Gusarov I., Gautier L., Smolentseva O., Shamovsky I., Eremina S., Mironov A., Nudler E. (2013) Bacterial nitric oxide extends the lifespan of *C. elegans*. *Cell.* **152**, 818–830.
88. Mironov A., Seregina T., Nagornykh M., Luhachack L., Korolkova L., Errais Lopes L., Kotova V., Zavigelsky G., Shakulov R., Shatalin R., Nudler E. (2017) A mechanism of H₂S-mediated protection against oxidative stress in *E. coli*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **114**, 6022–6027.
89. Aruoma O.I., Halliwell B., Gajewski E., Dizdaroglu M. (1989) Damage to the bases in DNA induced by hydrogen peroxide and ferric ion chelates. *J. Biol. Chem.* **264**, 20509–20512.
90. Imlay J.A., Chin S.M., Linn S. (1988) Toxic DNA damage by hydrogen peroxide through the Fenton reaction *in vivo* and *in vitro*. *Science.* **240**, 640–642.
91. Hantke K. (2001) Iron and metal regulation in bacteria. *Curr. Opin. Microbiol.* **4**, 172–177.
92. Hantke K., Braun V. (2000) The art of keeping low and high iron concentrations in balance. In: *Bacterial stress responses*. Eds Storz G., Hengge-Aronis R. Washington DC: ASM, 275–288.
93. Touati D., Jacques M., Tardat B., Bouchard L., Despied S. (1995) Lethal oxidative damage and mutagenesis are generated by iron in delta fur mutants of *Escherichia coli*: protective role of superoxide dismutase. *J. Bacteriol.* **177**, 2305–2314.
94. Keyer K., Imlay J.A. (1996) Superoxide accelerates DNA damage by elevating free-iron levels. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **93**, 13635–13640.
95. Keyer K., Gort A.S., Imlay J.A. (1995) Superoxide and the production of oxidative DNA damage. *J. Bacteriol.* **177**, 6782–6790.
96. Park S., Imlay J.A. (2003) High levels of intracellular cysteine promote oxidative DNA damage by driving the Fenton reaction. *J. Bacteriol.* **185**, 1942–1950.
97. Kredich N.M. (1983) Amino acids: biosynthesis and genetic regulation. In: *Regulation of cysteine biosynthesis in Escherichia coli and Salmonella typhimurium*. Ed. Herrmann K.M. Sommerville edition. United Kingdom London: Addison-Wesley Publ. Comp. 115–132.
98. Kredich N.M. (1992) The molecular basis for positive regulation of *cys* promoters in *Salmonella typhimurium* and *Escherichia coli*. *Mol. Microbiol.* **6**, 2747–2753.
99. Shatalin K., Nuthanakanti A., Kaushik A., Shishov D., Peselis A., Shamovsky I., Pani B., Lechpammer M., Vasilyev N., Shatalina E., Rebatchouk D., Mironov A., Fedichev P., Serganov A., Nudler E. (2021) Inhibitors of bacterial H₂S biogenesis targeting antibiotic resistance and tolerance. *Science.* **372**, 1169–1175.

THE ENHANCEMENT OF BACTERICIDAL EFFECT OF ANTIBIOTICS AS A RESULT OF INHIBITION OF ENZYMES INVOLVED IN PRODUCTION OF HYDROGEN SULFIDE IN BACTERIA

T. A. Seregina¹, *, K. V. Lobanov¹, R. S. Shakulov¹, and A. S. Mironov¹

¹ Engelhardt Institute of Molecular Biology, Russian Academy of Science, Moscow, 119991 Russia

*e-mail: tatyana.s82@gmail.com

It is still the actual problem for medical society all over the world to counteract the origin and distribution of multidrug resistant pathogens responsible for intra-hospital infections. In this brief review we discuss results of our recent investigations which argue that many antibiotics along with inactivation of their traditional biochemical targets can induce oxidative stress (ROS production) which results in increased bactericidal efficiency of the applied antibiotics. As we have estimated previously, hydrogen sulfide produced in the cells of different pathogens protects them not only of oxidative stress but also of bactericidal antibiotics. Next, we have cleared out the interplay of oxidative stress, cysteine metabolism and hydrogen sulfide production. Finally, we have demonstrated that small molecules that inhibit bacterial enzyme involved in hydrogen sulfide production potentiate bactericidal antibiotics including quinolones, beta-lactams and aminoglycosides against bacterial pathogens *in vitro* and in mouse models of infection. These inhibitors also suppress bacterial tolerance, disrupting biofilm formation and substantially reducing the number of persister bacteria that survive antibiotic treatment. We suppose the agents limiting the hydrogen sulfide biosynthesis to be the effective tools to counteract the origin and distribution of multidrug resistant pathogens.

Keywords: bacteria, antibiotics, oxidative stress, hydrogen sulfide generation, inhibitors of hydrogen sulfide generation ferments, new class of antimicrobial drugs

**ВИРУСНЫЕ ИНФЕКЦИИ: ОТ МЕХАНИЗМОВ РЕПЛИКАЦИИ
И ПАТОГЕНЕЗА К ПОДХОДАМ ТЕРАПИИ**

УДК 578.76

**МЫШИНЫЕ МОДЕЛИ ХРОНИЧЕСКИХ ВИРУСНЫХ ИНФЕКЦИЙ
И АССОЦИИРОВАННЫХ С НИМИ ОПУХОЛЕЙ**© 2022 г. Д. В. Авдошина^а, А. С. Кондрашова^а, М. Г. Беликова^{а, б, с}, Е. О. Баюрова^{а, б, *}^аФедеральный научный центр исследований и разработки иммунобиологических препаратов им. М.П. Чумакова Российской академии наук (Институт полиомиелита), Москва, 108819 Россия^бНациональный исследовательский центр эпидемиологии и микробиологии им. почетного академика Н.Ф. Гамалеи Минздрава России, Москва, 123098 Россия^сРоссийский университет дружбы народов, Москва, 117198 Россия

*e-mail: bayurova_eo@chumakovs.ru

Поступила в редакцию 18.03.2022 г.

После доработки 12.04.2022 г.

Принята к публикации 13.04.2022 г.

В настоящее время вирусы признаны одними из этиологических факторов развития опухолей человека. К онкогенным вирусам относятся вирус Эпштейна–Барр, папилломавирусы человека высокого канцерогенного риска, вирусы гепатита В и С, вирус Т-клеточного лейкоза человека типа I, вирус иммунодефицита человека типа 1 (опосредованно) и еще несколько предположительно онкогенных вирусов. Показано, что в патогенезе примерно 15% диагностируемых во всем мире опухолей человека участвуют вирусы. Онкогенные вирусы вызывают длительные персистирующие инфекции, при этом опухоль является случайным побочным продуктом стратегии вирусной репликации. Вирусы, как правило, не способны к индукции быстрого канцерогенеза, что подтверждает концепцию о развитии опухолей в результате совокупности множества накладывающихся друг на друга событий, в которых онкогенные вирусы человека играют разные, часто противоположные, роли. Одной из лучших экспериментальных *in vivo* систем для моделирования патологии человека, включая вирусные инфекции и образование опухолей, считается мышь. Однако мыши невосприимчивы к инфицированию известными онкогенными вирусами. Для преодоления этого ограничения и изучения различных аспектов вирус-ассоциированного канцерогенеза разработано множество мышинных моделей, начиная с ксенотрансплантатов тканей и клеток человека, включая вирус-инфицированные и опухолевые, и заканчивая генетически модифицированными мышами, восприимчивыми к вирусным инфекциям и вирус-ассоциированному канцерогенезу. В представленном обзоре рассмотрены основные известные на данные момент модели, проанализированы их преимущества и недостатки, описаны области их применения и намечены перспективы дальнейшего развития таких моделей.

Ключевые слова: мышинные модели, хроническая вирусная инфекция, вирусный онкогенез, вирусные онкогены, ксенотрансплантат, вирус гепатита В, вирус гепатита С, вирус иммунодефицита человека типа 1 (ВИЧ-1), вирус Эпштейна–Барр, вирус Т-клеточного лейкоза человека типа 1

DOI: 10.31857/S0026898422050020

ВВЕДЕНИЕ

Домовая мышь (*Mus musculus*) — одна из лучших экспериментальных *in vivo* систем для моделирования патологии человека, включая вирусные инфекции и образование опухолей. К преимуществам мышей в качестве моделей относятся небольшой размер, короткая продолжительность жизни, простота разведения, хорошо охарактеризованная иммунная система, большое молекулярное и физиологическое сходство с человеком и полностью расшифрованный геном, что подразумевает возможность обширных генетических модификаций. Мышиные модели оказались полезными для

понимания биологических процессов, происходящих во время роста опухоли, и для проведения доклинических испытаний противоопухолевой терапии [1]. Однако мыши не могут быть инфицированы ни одним из вирусов, вызывающих хронические инфекции человека, связанные с развитием опухолей, включая вирусы гепатита В (ВГВ) и С (ВГС), вирус иммунодефицита человека типа 1 (ВИЧ-1), вирус Эпштейна–Барр (ВЭБ), вирус Т-клеточного лейкоза человека типа 1 (ВТЛЧ-1), папилломавирусы человека высокого канцерогенного риска (ВПЧ ВКР) и другие. Для изучения различных аспектов вирус-ассоцииро-

ванного канцерогенеза разработано большое количество мышинных моделей вирус-ассоциированных опухолей, начиная с ксенотрансплантатов, полученных из эксплантов тканей человека, включая опухоли, и заканчивая генетически модифицированными мышами, восприимчивыми к вирусным инфекциям и вирус-ассоциированным опухолям. В настоящем обзоре рассмотрены принципы конструирования моделей, приведены примеры их использования для изучения хронических вирусных инфекций, вирус-ассоциированного онкогенеза и разработки методов их терапии.

МЫШИ С КСЕНОТРАНСПЛАНТАЦИЕЙ КЛЕТОК ЧЕЛОВЕКА – МОДЕЛИ КСЕНОГРАФТОВ

*Ксенотрансплантаты, полученные от пациентов,
в иммуносупрессированных мышах*

В мышинных моделях трансплантированные клетки и ткани человека выполняют те же функции, что и в организме человека. Такие модели чрезвычайно полезны для прямого изучения патогенов человека и механизмов заражения.

В моделях опухолей, ассоциированных с вирусной инфекцией, опухолевые клетки человека или биоптаты опухолей (ксенотрансплантаты, полученные от пациентов, *patient derived xenografts* – PDX) трансплантируют мышам с иммунодефицитом. В течение последних двух десятилетий PDX-модели были основным инструментом для доклинического скрининга при разработке новых методов лечения опухолей. Эти модели помогли выявить клинически эффективные химиотерапевтические агенты, на настоящий момент они остаются основными моделями для фармацевтической промышленности [2], главным образом потому, что позволяют быстро и легко оценить эффекты, вызываемые различными агентами в опухолевых тканях и клетках *in vivo* [1]. Получение аналогичных моделей для отдельных пациентов стало шагом вперед в персонализации схем лечения [3].

Линии мышей, используемые для создания PDX-моделей. Клетки и ткани человека можно трансплантировать только иммунодефицитным/иммунокомпрометированным мышам. С этой целью разработана целая панель линий мышей с ослабленным иммунитетом. Наиболее широко используемые линии перечислены ниже в соответствии с уровнем иммунодефицита. Бестимусные голые мыши (*nude*) несут спонтанную делецию в гене *Foxn1*, которая нарушает развитие и/или вызывает отсутствие тимуса, что приводит к угнетению иммунной системы с уменьшением количества Т-клеток. Это тяжелый, но не абсолютный иммунодефицит, так как у мышей остается небольшое количество Т-клеток на периферии и интактный

врожденный иммунитет с повышенной активностью NK-клеток. Это может ограничивать приживаемость ксенографтов (т.е. процент успешно приживленных опухолей), рост и способность к метастазированию большинства первичных солидных опухолей и делает невозможным приживание злокачественных гемопоэтических клеток [4]. У мышей с тяжелым комбинированным иммунодефицитом (SCID) в результате редкого врожденного заболевания практически отсутствует В- и Т-клеточный иммунитет. У этих мышей наблюдается нормальная дифференцировка и функции нелимфоидных клеток крови, включая моноциты, гранулоциты, мегакарициты, эритроциты и NK-клетки [5]. Хорошими реципиентами клеток человека оказались мыши NOD/LtSz-SCID, полученные Grenier и соавт. [6]. Высокие показатели приживаемости клеток человека у мышей NOD/LtSz-SCID объясняются множественной иммунной дисфункцией, которая включает снижение функции макрофагов, комплементзависимой гемолитической активности и активности NK-клеток [6], однако у этих мышей сохраняется остаточная активность NK-клеток [7]. Чтобы обойти эту проблему, были разработаны линии мышей NOD/SCID/ $\beta 2m^{null}$ и NOD/SCID/ γc^{null} с выраженным снижением продукции интерферона- γ (ИФН- γ) дендритными клетками. Обе линии лишены активности NK-клеток, что обеспечивает высокую приживаемость клеток человека [7, 8] Получены также варианты NOD.Cg-Prkdc^{scid}Il2rg^{tm1Sug} (NOG), NOD.Cg-Prkdc^{scid}Il2rg^{tm1Wjl} (NSG) и NOD.Cg-Rag1^{tm1Mom}Il2rg^{tm1Wjl}/SzJ (NRG) – линии иммунодефицитных мышей Il2rg^{null} на основе линии NOD. Мыши NOG и NSG имеют мутированный ген *Prkdc*. У мышей NOG укорочен цитоплазматический домен общей гамма-цепи рецептора интерлейкина 2 (Il2rg), у NSG гамма-цепь делетирована; мыши NRG имеют таргетные мутации в гене *Rag1*, вызывающие нарушение функций кодируемого белка [9]. В результате этих модификаций у мышей NOG критически нарушен врожденный и адаптивный иммунитет. У мышей NSG отсутствуют Т-, В- и NK-клетки, и они поддерживают высокие уровни приживания гемопоэтических стволовых клеток из пуповинной крови человека [10]. Более подробное обсуждение особенностей этих моделей выходит за пределы данного обзора.

PDX-модели инфекции вирусом Эпштейна–Барр (ВЭБ). К настоящему времени разработаны PDX-модели опухолей, связанных с рядом вирусных инфекций, начиная с ВЭБ. В 1999 г. Murakami и соавт. [11] впервые показали, что эпителиальные клеточные линии, инфицированные ВЭБ, принадлежащему к семейству герпесвирусов, при подсадке мышам SCID продуцируют опухоли. В этих экс-

периментах ВЭБ-положительные эпителиальные клеточные линии GT38 и GT39, полученные из незлокачественных участков карциномы желудка человека, имплантировали под кожу мышам SCID. У всех мышей примерно через 2 мес. после подсадки развились опухоли, которые представляли собой недифференцированную карциному с детектируемой кольцевой, но не линейной ДНК ВЭБ, экспрессирующую малую РНК-1, кодируемую ВЭБ [11]. В аналогичном эксперименте условно иммортализованные эндотелиальные клетки человека (HuARLT), перmissive к заражению другим герпесвирусом – вирусом герпеса, ассоциированным с саркомой Капоши (KSHV), инфицированные либо *in vitro* до приживления, либо *in vivo* после приживления, образовывали опухоли у мышей с иммунодефицитом (Rag2^{-/-}γс^{-/-}) [12]. В более поздних исследованиях обнаружено развитие ВЭБ-ассоциированных лимфоцитарных опухолей из образцов опухолей толстой кишки, желудка, молочной железы и легких, трансплантированных подкожно мышам NOG [13]. Опухоли, состоящие из CD45+/CD20+ ВЭБ+ В-клеток, быстро росли и образовывали большие метастатические поражения в лимфатических узлах, печени, легких и селезенке мышей, тогда как первично привитые карциномы росли медленно и не метастазировали [14]. Суммируя эти данные, можно сказать, что ВЭБ+ лимфоцитарные ксенографты представляют собой удобную модель для изучения ВЭБ-ассоциированных опухолей.

PDX-модели ВПЧ-инфекции и рака шейки матки. Разработана панель моделей рака шейки матки (cervical cancer, CC), основанная на ксенотрансплантатах образцов CC (CC-PDX), полученных от пациентов. В общей сложности от 98 пациентов-доноров получена 61 CC-PDX с приживаемостью до 75% [15]. В CC-PDX сохранились многие характеристики первичной опухоли, такие как геномные и гистологические особенности, чувствительность к противоопухолевым препаратам и даже морфологические признаки (при окрашивании гематоксилином и эозином), такие как центры митотически активных клеток, сходные структурные отложения коллагена, паттерны цитоплазматического иммунного окрашивания на ВПЧ и распространенное ядерное окрашивание на p16INK4a, которые наблюдали в первичных биопсиях и в серийно трансплантированных ксенотрансплантатах [15, 16]. Показано, что частота успешных имплантаций в CC-PDX-моделях была выше при использовании мышей с тяжелым иммунодефицитом, таких как SCID, NOD или NSG [15].

PDX-модели ВГВ- и ВГС-инфекций. PDX-модели позволяют изучать клинико-патологическую картину инфицирования ВГВ. Первой появилась

модель Trimera, представляющая собой мышей SCID, которым трансплантировали *ex vivo* инфицированные ВГВ фрагменты печени человека [17]. Приживление фрагментов печени человека, оцениваемое по окрашиванию гематоксилином и эозином и по экспрессии мРНК сывороточного альбумина человека, отмечено у 85% трансплантированных животных через 1 мес. после имплантации. ДНК ВГВ впервые обнаруживали через неделю после трансплантации печени, а пик виремии приходился на 2–3 нед. после трансплантации. Модель ВГВ-Trimera использовали для оценки терапевтических эффектов поликлональных анти-НВs-антител человека и ингибиторов обратной транскриптазы, которые снижали как число инфицированных животных, так и вирусную нагрузку в их сыворотках [17]. В более позднем исследовании мышам NOD/SCID трансплантировали уникальную панель образцов гепатоцеллюлярной карциномы (ГЦК) и соответствующих тканей стромы, уже положительных по ВГВ [18]. Обнаружено, что все клетки ГЦК продуцировали НВsAg и обладали высокой пролиферативной активностью, тогда как положительную реакцию на НВsAg наблюдали только у доброкачественных гепатоцитов. Используя PDX-модели ВГВ/ГЦК в мышах, удалось фенотипировать вирусологические и клеточные особенности тканей пациентов. Это исследование показало применимость PDX-моделей для изучения как ВГВ, так и вызываемого ВГВ канцерогенеза [18].

С использованием мышей с тяжелым иммунодефицитом на основе PDX разработана также модель ГЦК, связанной с ВГС [19]. NSG-мышам имплантировали первичную опухоль из печени пациента с хроническим гепатитом С и после нескольких циклов *in vivo* пассирования получили культуру ксенотрансплантатной опухоли мышши. Первичная опухоль пациента и ксенотрансплантаты мышши были гистологически сходными. Генетическое профилирование подтвердило идентичность ВГС-ГЦК-PDX клиническому образцу; в исходных опухолевых тканях человека и в ксенотрансплантированных опухолях детектировали альбумин человека, α1-антитрипсин, глипикан 3, α-SMA и маркеры коллагена типа 1A2. Модель ВГС-ГЦК-PDX успешно использовали при тестировании химиотерапевтических агентов для эффективной схемы лечения ГЦК. Эта модель остается перспективной для оценки новых или дополнительных таргетных химиотерапевтических агентов против ГЦК. Однако примечательно, что в отличие от ВГВ-ГЦК-PDX, пассирование приводило к исчезновению РНК ВГС [19], что делает модель не пригодной ни для изучения ВГС, ни для изучения механизмов ВГС-ассоции-

рованного канцерогенеза, ни для иммунотерапии ВГС-ассоциированных ГЦК.

Преимущества и недостатки PDX-моделей. В целом, PDX-модели имеют сходные с первичной опухолью гистопатологические особенности, включая характеристики генома клеток, статус микроокружения, меж- и внутриопухолевую гетерогенность [20]. Их чувствительность к химиотерапевтическим агентам сходна с чувствительностью, наблюдаемой при клиническом применении противоопухолевых препаратов. В настоящий момент ведется интенсивная разработка мышинных “аватаров” на основе PDX для оптимизации лечения хронических вирусных и онкологических заболеваний человека и персонализированной терапии [21]. Приживаемость может быть сравнительно низкой (см., например, [15]), однако ее можно увеличить за счет использования иммортализованных или опухолевых клеточных линий, полученных из тканей пациентов [16]. Это позволяет применять PDX-модели на различных этапах развития диагностики и терапии опухолей, в совмещенных доклинических/клинических испытаниях для оценки эффективности терапии и преодоления лекарственной устойчивости, идентификации биомаркеров и прецизионной медицины [20].

В то же время PDX-модели имеют ряд недостатков и ограничений по сравнению с аутохтонными моделями опухолей мышей. Во-первых, подавление иммунной системы мыши не позволяет использовать эти модели для проверки эффективности вакцин и чувствительности к иммунотерапии. Кроме того, из-за иммунокомпрометированности хозяина PDX-модели могут неадекватно отражать процесс роста опухоли, особенно метастазирования, в котором существенную роль играет воспаление, определяемое клетками иммунной системы [16]. Специфическим ограничением ксенотрансплантатов иммортализованных или трансформированных клеточных линий человека является тот факт, что они представляют собой экспансию определенного клонального компонента поликлональных опухолей вследствие селективного давления процессов культивирования клеток или эксплантации тканей [22]. В результате этих процессов ксенотрансплантаты могут изменить или полностью утратить признаки аутохтонных опухолей, такие как окружающие их нормальные ткани, стромальные клетки, сосудистая и лимфатическая циркуляция и инфильтрация иммунных клеток (детально описано в обзорах [1, 23]). В силу этих особенностей и ограничений предикативное значение моделей ксенотрансплантатов неоднозначно и оценивается как достаточно высоко [24], так и критически низко [25].

Кроме того, эти модели имеют ряд практических недостатков. Так, обнаружено, что значи-

тельная часть PDX, полученных из гетерогенных образцов опухолей пациентов, включая опухоли молочной железы, толстой кишки, поджелудочной железы, мочевого пузыря и почки, прогрессирует в ВЭБ+ и высокометастатические лимфоцитарные опухоли, что ставит под угрозу результаты экспериментов [14] и указывает на необходимость систематического анализа опухолевых тканей и/или клеток человека перед имплантацией для исключения контаминации “посторонними” вирусами (в данном случае ВЭБ). Эксперименты с ВГВ-ГЦК-PDX показали также, что интенсивность пролиферации клеток в ксенотрансплантатах значительно выше, чем в исходных тканях человека (оценивали по окрашиванию ki67) [18], что может означать отбор во время приживления субпопуляции опухолевых клеток с повышенной склонностью к размножению в мышах [26], что в конечном итоге приводит к отличиям PDX от исходных опухолевых тканей. И последний, но не менее важный фактор: эксперименты с ВГС-ГЦК-PDX выявили временный характер экспрессии вируса в ксенотрансплантатах, что ограничивает использование PDX-моделей для изучения вирусных инфекций и вирус-ассоциированного онкогенеза, по крайней мере, в применении к ВГС.

*Ксенотрансплантаты тканей человека,
искусственно зараженные вирусом
или продуцирующие отдельные вирусные белки*

Создание моделей ксенотрансплантатов опухолей пациентов проходило параллельно с созданием моделей, в которых мышам имплантировали иммортализованные или трансформированные клетки человека, искусственно инфицированные вирусом, или сначала имплантировали клетки человека, а затем инфицировали их тем или иным вирусом. Эксперименты по созданию подобных моделей проведены для ВПЧ ВКР-, ВГС-, ВГВ-ассоциированных опухолей.

Для моделирования патологий, связанных с ВПЧ ВКР, мышам nude прививали искусственную кожу человека, полученную с использованием первичных кератиноцитов, продуцирующих онкобелок E7 ВПЧ 16. Трансплантаты стабильно продуцировали E7 в течение 6 мес. после подсадки. У трансплантированных мышей образовались поражения, гистологически напоминающие аногенитальные поражения человека, вызванные онкогенными ВПЧ. Иммунодетекция или количественная ПЦР мРНК ВПЧ и микроРНК основных биомаркеров показали, что привитая кожа, модифицированная E7 ВПЧ 16, имеет общие молекулярные характеристики с предопухолевыми и опухолевыми поражениями, связанными с инфекциями ВПЧ ВКР у человека [27]. Эта модель

стала ценной платформой для фундаментальных исследований ВПЧ-ассоциированного онкогенеза.

Первые успехи достигнуты и в отношении ВГС. Разработана панель моделей ксенотрансплантатных опухолей для ВГС-инфекции в SCID мышах. В этой панели использовали адаптированные к мышам гепатоциты человека, несущие геномные или субгеномные репликоны ВГС и репортерные гены люциферазы или зеленого флуоресцентного белка (GFP) [28, 29]. Имплантированные мышам SCID клеточные линии образовывали подкожные опухоли и метастазы в печени, реплицирующие ВГС. Сходным образом у мышей с иммунодефицитом вызывали образование опухолей, вводя клетки линии Nuh7, полученной из гепатокарциномы человека, а затем инфицировали ВГС [30]. Оба варианта позволяют изучать репликацию ВГС и тестировать противовирусные препараты против ВГС, но не тестировать вакцины или изучать иммунопатогенез хронической ВГС-инфекции, включая развитие ГЦК (поскольку у мышей SCID отсутствует В- и Т-клеточный иммунный ответ). Аналогичные модели для ВГВ, созданные на основе трансгенных мышей SCID с активатором плазминогена урокиназного типа (мышь uPA/SCID), рассмотрены в разделе “Трансгенные мыши, которым имплантировали ксенотрансплантаты, полученные от пациентов”.

Подход с использованием клеточных линий помог устранить перечисленные выше практические ограничения PDX-моделей, такие как контаминация гетерогенными вирусами и/или опухолями, селекция отдельных клонов, отличающихся по свойствам от остальных клеток, а также спонтанный клиренс вирусной инфекции. Однако, как и в случае с PDX-моделями, этот подход не позволял и не позволяет проводить испытания вакцин и методов иммунотерапии.

Приживление элементов иммунной системы человека

Описанные модели можно дополнительно усовершенствовать путем прививки иммунных клеток человека, что позволяет хотя бы частично разрешить проблему иммунодефицита.

На основе иммунокопрометированных мышей создано несколько гуманизированных мышинных моделей с привитыми иммунными клетками человека:

hu-PBL-SCID (*human peripheral blood lymphocyte*) с привитыми зрелыми периферическими мононуклеарными клетками человека, полученными из крови, селезенки или лимфатических уз-

лов (преимущественно привитые CD3+ Т-клетки человека);

hu-SRC-SCID (*human SCID repopulating cell*) с подсаженными гемопоэтическими стволовыми клетками, что приводит к развитию гемопоэтической и наивной иммунной системы человека;

SCID-hu с трансплантированной печенью и тимусом плода человека. У этих мышей развивается новый очаг кроветворения и дополнительный органоид, выполняющий функции тимуса человека;

мышь hu-Tg с трансгенной экспрессией генов человека. Таким образом, модели hu-mouse нового поколения воспроизводят созревание широкого спектра гемопоэтических клеток человека, включая Т-клетки, В-клетки, макрофаги и дендритные клетки, необходимые для выработки специфического иммунного ответа. Модели этого типа позволяют воспроизвести как инфекцию, так и выработку иммунного ответа на эту инфекцию [31]. Эти модели можно использовать для исследования опухолей [2, 32, 33], аутоиммунитета [34] и вирусных инфекций, специфичных для человека, что осуществлено в применении к ВИЧ-1 [35], вирусу денге, ВЭБ, вирусу саркомы Капоши [36–38] и ряду других вирусных инфекций [34].

ВЭБ инфицирует исключительно В-лимфоциты человека и имеет двухфазный латентный цикл и литический цикл. Эти особенности в комплексе с необходимостью как врожденного, так и адаптивного иммунного ответа для борьбы с инфекцией, сделали разработку подходящей мышинной модели сложной задачей. Для ВЭБ широко используются гуманизированные мыши с Т-клеточным иммунодефицитом. В этих моделях ВЭБ индуцирует летальную лимфому с паттерном экспрессии генов латентного типа III, сходным с посттрансплантационными лимфопролиферативными заболеваниями. Эти модели применяют для тестирования вакцин, адаптивных клеточных подходов и разработки новых терапевтических стратегий. Модели hu-PBL-SCID широко использовались в доклинических испытаниях терапии ВЭБ (обзор таких моделей см. в [39]). Получение нового поколения гуманизированных мышей, таких как NOG, NSG, с реконструированной иммунной системой человека, привело к созданию уникальных иммунокомпетентных моделей ВЭБ-инфекции, которые позволяют исследовать ВЭБ-индуцированные злокачественные новообразования и механизмы предотвращения их образования (см. обзор [39]).

Аналогичные модели на основе мышей hu-PBL-SCID использовали для изучения пассивной иммунизации против ВИЧ-1. Репопуляция мышей с иммунодефицитом иммунными клетка-

ми человека делает их восприимчивыми к заражению лимфотропным вирусом ВИЧ-1 [40, 41].

Тем не менее, эти модели не полностью соответствуют иммунокомпетентным животным, а довольно высокая стоимость этих моделей ограничивает их широкое использование.

ТРАНСГЕННЫЕ МЫШИ, ЭКСПРЕССИРУЮЩИЕ ГЕНЫ ЧЕЛОВЕКА

Преодолеть ограничения, налагаемые иммунодефицитом, позволяет подход, направленный на использование трансгенных гуманизированных мышей, экспрессирующих гены человека, что позволяет получить представление о контексте вирус-индуцированного канцерогенеза *in vivo* на фоне функциональной иммунной системы. Мышей часто используют из-за их геномного и физиологического сходства с человеком и простоты генетической модификации. В частности, трансгенных мышей применяют для моделирования прогрессирования вирусной инфекции и связанных с ней патологий. Поскольку у трансгенных мышей сохранена иммунная система, на них можно успешно изучать как химиотерапевтические, так и иммунотерапевтические препараты [42].

Трансгенные мыши могут быть созданы с использованием ряда методов, таких как рекомбинантные системы Cre и Tat, обычные и условные нокауты, RCAS (компетентный к репликации ALV LTR с акцептором сплайсинга) и других [43].

Для конструирования трансгенных мышей чрезвычайно важен выбор базовой линии, поскольку генетический фон может играть как положительную, так и отрицательную роль. Например, линия C3H/HeN(C3H) имеет более высокую частоту спонтанной и химически индуцированной гепатоцеллюлярной карциномы, чем линия C57BL/6, хотя это затрудняет интерпретацию данных о влиянии гена, связанного с канцерогенезом, в то время как линия мышей C57BL/6 имеет относительно более низкую частоту формирования спонтанных опухолей [44]. В моделях на основе мышей линии C57BL/6, BALB/c и SSIN/SENCA у 100% трансгенных животных, экспрессирующих ранние гены ВПЧ 16 под контролем промотора гена кератиноцитов K14, развиваются гиперпластические и/или диспластические поражения. При этом только у мышей, полученных в результате обратного скрещивания с линией FVB/p, развиваются злокачественные плоскоклеточные карциномы двух патологических степеней – высокодифференцированной и умеренно/низкодифференцированной, каждая из которых имеет характерные паттерны злокачественного поведения [45].

Мыши, трансгенные по факторам, позволяющим заражение вирусами человека

Вирусы, патогенные для человека, не всегда способны заражать мышей. Решить эту проблему можно, создавая линии мышей, трансгенных по человеческому рецептору вируса, что делает клетки мыши восприимчивыми к вирусной инфекции. На этой основе созданы *in vitro* и *in vivo* модели для исследования процесса вирусной инфекции и вирус-ассоциированного патогенеза.

Трансгенные мыши, экспрессирующие ген рецептора ангиотензин I-превращающего фермента 2 человека (ACE2) под контролем промотора гена цитокератина-18 (K18) (K18-hACE2), служат моделью для изучения инфекции SARS-CoV-2. Интраназальная инокуляция SARS-CoV-2 мышам K18-hACE2 приводит к высокому уровню репликации вируса в легких с распространением инфекции на другие органы [46]. Ген рецептора полиовируса человека (PVR) использовали для создания трансгенных мышей, которые экспрессируют транскрипты PVR и сайты связывания полиовируса в широком диапазоне тканей: внутримозговая инъекция полиовируса типа 1 (штамм Mahoney) мышам, трансгенным по PVR, приводит к репликации вируса в головном и спинном мозге и развитию паралитического полиомиелита [47].

Однако восприимчивость мышей к вирусам человека определяется не только присутствием вирусных рецепторов на поверхности клетки. Имеющиеся у мыши и человека генетические различия определяют различия в репликации вирусов, восприимчивости организма к определенным вирусам, а также в патологических особенностях вирусной инфекции у мыши и человека. Сравнительное секвенирование геномов человека и мыши определило уникальность 300 генов, но на нуклеотидном уровне только 40% генома мыши выравнивается с геномом человека [48]. Репликация вирусов – облигатных внутриклеточных паразитов – зависит от функционирования аппарата клетки-хозяина и ее метаболизма, во многом различающихся у человека и мыши. Множество факторов-клетки хозяина, участвующих в репликации вирусов, делает этот путь чрезвычайно сложным для большинства вирусов. Так, например, заражение гепатоцитов человека ВГС зависит от поверхностных белков-рецепторов вируса – CD81, окклюдина (OCLN), белка плотных контактов клаудина-1 (CLDN1) и белка суперсемейства сквенджер-рецепторов клеточной поверхности класса В типа 1 (scavenger receptor class B type 1, SR-BI). Для заражения клеток мыши абсолютно необходимы CD81 и OCLN [49]. Однако при этом зараженные клетки мыши не поддерживают репликацию ВГС и хрониче-

скую ВГС-инфекцию, что обусловлено различиями в целом ряде факторов, определяющих репликацию вируса в клетках человека. В число этих факторов входят рецептор липопротеинов низкой плотности, гликозаминогликаны, рецептор эфрина А2, рецепторные тирозинкиназы, рецептор эпидермального фактора роста, кадгерин Е, индуцирующий клеточную смерть DFFA-подобный эфektor В (cell death-inducing DFFA-like effector b), С1-подобный белок 1 синдрома Ниманна–Пика, рецептор трансферрина 1 (см. обзор [50]). В качестве еще одного примера можно привести экзогенную экспрессию *NTCP* человека, которая может сделать исходно нечувствительные клеточные линии HepG2 (человек), Huh7 (человек), Heral-6 (мышь), AML-12 (мышь) и первичные клетки гепатоцитов мыши (PMH), восприимчивыми к вирусу гепатита D (ВГD), который использует белки оболочки ВГВ. *NTCP* человека может вызвать чувствительность к ВГВ только в линиях клеток HepG2 и Huh7 человека, но не в линиях клеток Heral-6, AML-12 или PMH мыши. Эти данные свидетельствуют о том, что, хотя *NTCP* человека и является функциональным рецептором, который опосредует инфекцию ВГВ в клетках человека, он не позволяет поддерживать инфекцию ВГВ в гепатоцитах мыши, для этого требуются другие внутриклеточные факторы [51]. Репликация ВИЧ-1 в клетках человека зависит от целого ряда факторов, включая циклин Т1, ингибитор сплайсинга р32, АРОВЕС (цитозиндезаминаза, редактирующая мРНК апо-липопротеина В), Fut-2, TRIM5 α , Lv-1, Ref-1 и циклофилин А. Отсутствие этих факторов делает невозможной репликацию ВИЧ-1 в клетках мыши [52].

Кроме того, существует множество различий в структуре и функциях врожденной иммунной системы у человека и мыши, влияющих на процесс вирусной инфекции. В первую очередь это касается – баланса лейкоцитарных популяций, структуры и функций дефензинов, Toll-подобных рецепторов, индуцируемых NO-синтаз, рецепторов подавления цитотоксичности Ly49 и KIR, Fc-рецептора, подмножества иммуноглобулинов, компонентов В-клеточного (BLNK, Vtk, и λ 5) и Т-клеточного (ZAP70 и общая γ -цепь) сигнальных каскадов, Thy-1, γ Т-клеток, цитокинов, хемокинов и их рецепторов, поляризации Th1/Th2, продукции и функций костимуляторных молекул и антигенпредставляющих функций эндотелиальных клеток [53]. Совокупность этих факторов определяет противовирусный иммунный ответ и, соответственно, возможность и особенности репликации вируса в мышечных клетках в сравнении с человеческими. Кроме того, различия могут наблюдаться и между различными линиями лабора-

торных мышей. Так, например, линии лабораторных мышей, восприимчивых или устойчивых к вирусу гриппа А, различаются по гену *Mx* [54]. Ген *Mx*, регулируемый интерфероном, играет важную роль во врожденной иммунной реакции организма на вирус гриппа А.

Мыши, трансгенные по экспрессии вирусов или отдельных вирусных генов

Если мышью невозможно инфицировать вирусом человека даже при экспрессии необходимого рецептора, то ее можно сделать трансгенной по экспрессии отдельных вирусных генов или даже всего вирусного генома. Большинство из описанных к настоящему моменту трансгенных мышей этого типа созданы для изучения механизмов развития патологий печени, индуцированных инфекцией гепатотропными вирусами.

Полный геном ВГВ или его специфические субгеномные фрагменты ввели в пронуклеусы оплодотворенного одноклеточного эмбриона мыши с помощью микроинъекции. Эти мыши не могут элиминировать вирус, но их можно использовать для изучения иммунного ответа, вызванного ВГВ, и ВГВ-ассоциированного канцерогенеза. Показано развитие ГЦК у трансгенных мышей со стабильной продукцией НВх, полноразмерного НВsAg и мутантов pre-S [55, 56]. На этих моделях показана важность вирусных онкогенных белков, которые как сами, так в сочетании с онкогенами человека способствуют развитию ГЦК, индуцируя окислительный стресс, нарушая регуляцию экспрессии генов хозяина и активируя пути передачи онкогенного сигнала [56]. Трансгенных по ВГВ мышей использовали также для изучения эффектов лекарственных средств, включая цитонины, способных предотвратить прогрессирование ВГВ, а также для разработки стратегий преодоления иммунной толерантности к ВГВ [55].

Для изучения влияния ВГС на патологию печени, стеатоз и индукцию ГЦК также созданы трансгенные мыши, продуцирующие полноразмерный полипротеин ВГС или его отдельные белки [54]. Трансгенных мышей, продуцирующих белок нуклеокапсида (кора) ВГС, использовали для анализа механизма индуцированного ВГС канцерогенеза. Показано, что длительная продукция корового белка ВГС приводит к развитию ГЦК у трансгенных мышей. Развитие ГЦК предположительно обусловлено нарушением белком нуклеокапсида ВГС баланса оксидантов/антиоксидантов в печени без индукции воспаления [57]. Не ясно, однако, применимы ли данные, полученные на этих моделях, для объяснения патологии, наблюдаемой у человека. Необходимо отметить, что трансгенные мыши характеризуются

сверхпродукцией белков ВГС, что разительно отличается от низкого уровня белков ВГС при естественной инфекции. Кроме того, в отличие от моделей, трансгенных по ВГВ, экспрессия генома ВГС в мышинных клетках не приводит к продукции вирусных частиц или репликации вирусного генома. Таким образом, на этих моделях нельзя изучать вирусную инфекцию и моделировать весь естественный процесс заражения клеток/организма и распространения вируса, наблюдаемый в тканях человека [54].

Еще одно ограничение этих моделей инфекции ВГВ и ВГС – экспрессия вируса во всех тканях организма, в отличие от естественного процесса инфекции, происходящего преимущественно (ВГС) или исключительно (ВГВ) в печени. По совокупности этих свойств трансгенные по ВГВ и ВГС мыши не подходят для оценки противовирусных препаратов или методов терапии/иммунотерапии, а также для отработки методов контроля инфекционного процесса, в частности, гистологического наблюдения процесса клиренса в тканях печени [58]. Эти ограничения можно отчасти преодолеть, задавая экспрессию вируса (вирусных генов) под контролем экзогенных промоторов, специфичных для органа (ткани), например, конститутивного промотора гена альбумина или индуцибельного промотора металлотионеина, определяющих экспрессию в печени [56].

Предпринято также несколько попыток создать трансгенных мышей, экспрессирующих весь геном ВИЧ-1 [52, 59, 60]. Например, сконструированы трансгенные мыши, содержащие интактные копии провириона ВИЧ-1. Эти мыши не имели признаков инфекции в течение 9 мес. наблюдения, но одна из них дала потомство (F1), у которого развилась болезнь, сходная с синдромом приобретенного иммунодефицита, и оно погибло на 25-й день жизни. Из селезенки, лимфатических узлов и кожи пораженных животных (пять из пяти) был выделен вирус ВИЧ-1, неотличимый от родительского вируса [59]. Созданы также мыши, трансгенные по отдельным генам ВИЧ-1, таким как *Tat* [61, 62]. Как и в других моделях мыши, трансгенные по отдельным вирусным генам, не имели ни рецепторов, необходимых для вирусной инфекции, ни кофакторов, необходимых для эффективной репликации вируса, и были толерантными к продукции вирусных белков. Таким образом, ни одна из этих моделей не годилась для изучения репликации ВИЧ-1, разработки стратегий противовирусной терапии или новых подходов к вакцинации [54].

Для изучения онкогенных свойств белков KSHV, разработана панель трансгенных мышей, продуцирующих белки этого вируса. Эти генетически модифицированные мыши продуцировали один

или несколько белков KSHV, обладавших онкогенными свойствами в культуре клеток, они предоставили новые возможности изучения патогенеза KSHV не только для понимания механизмов онкогенеза, связанного с KSHV, но и для оценки эффективности терапии инфекций, связанных с KSHV, путем направленного воздействия на эти вирусные белки [63].

Разработаны трансгенные мыши K14E7, в кератиноцитах которых экспрессируется ген *E7* ВПЧ 16 под промотором K14. В этой модели экспрессия *E7* приводила к гиперплазии эпителия, инфильтрации иммунных клеток и иммуномодуляции, сходной с ВПЧ-ассоциированной неоплазией у человека. Сигнатура экспрессии мРНК генов в коже была сходной с сигнатурой цервикальной интраэпителиальной неоплазии 3-й стадии у человека. Интересно, что при трансплантации кожи мышей K14E7 мышам дикого типа и мышам, трансгенным по T-клеточному рецептору с увеличенным количеством E7-специфических цитотоксических T-клеток E7TCR269, кожа мышей K14E7 приживалась, в то время как аналогичная кожа, экспрессирующая овальбумин, отторгалась. Хорошую приживаемость кожных трансплантатов K14E7 объяснили экспрессией *E7* ВПЧ 16, приводящей к иммуносупрессии, в частности, к подавлению экспрессии интерферона- γ и понижению активности NK-клеток и тучных клеток [64], участвующих в процессе отторжения.

МНС-гуманизированные мыши

Классические антигены главного комплекса гистосовместимости класса I (МНС I) представляют собой тримерные молекулы, обнаруживаемые на поверхности ядерных клеток у всех челюстных позвоночных. Молекулы МНС I распознаются двумя семействами рецепторов: клонотипическими T-клеточными рецепторами, которые экспрессируются на поверхности CD8⁺ цитотоксических T-лимфоцитов (ЦТЛ), и мономорфными рецепторами, экспрессируемыми как NK-клетками, так и ЦТЛ. Продукция молекул МНС I в клетках представляет собой последовательный процесс, осуществляемый с помощью белков: протеаз, шаперонов, транспортеров и ряда других.

Несмотря на то, что МНС I человека и мыши в значительной степени гомологичны по своей структуре, организации и функциям, в механизме процессинга и представления антигена в контексте МНС I человека и мыши имеются различия. Технологии трансгенеза и нокаута или нокина позволяют добавлять соответствующие гены человека или заменять гены мыши ортологичными генами человека для получения иммунологиче-

ски гуманизированных мышей [65]. Такие экспериментальные животные особенно важны в качестве доклинических инструментов для идентификации эпитопов пептидов, представляемых в контексте HLA I при инфекционных заболеваниях и опухолях, а также для сравнительной оценки эффективности иммунотерапии. В моделях, в которых сохранялись интактные молекулы MHC I мыши, цитолитические ответы не ограничивались ответами, рестриктированными HLA I человека. Чтобы лучше использовать трансгенные молекулы HLA I и генерировать более функциональные HLA-рестриктированные ответы CD8⁺ Т-клеток, Pascolo S. и соавт. создали мышью с двойным нокаутом H-2 Db и β 2-m, экспрессирующих химерную α 3-H-цепь HLA-A*02:01, ковалентно связанную с β 2-m человека с помощью пептидного плеча (мышь HND II) [66]. Цитолитические ответы этих мышей опосредовались исключительно моноцепью HLA-A*02:01. Для дальнейшей оптимизации моделей с трансгенными молекулами HLA I, Boucherra R. и соавт. создали семь новых линий трансгенных мышей с моноцепью HLA I в контексте тройного нокаута H-2 Kb, Db и β 2-m мыши (H-2 I null) [67]. В этих мышях соответствующие домены H-цепи α 1 α 2, наиболее часто встречающиеся во всех популяциях человека молекул HLA: HLA-A*01:03, -A*24:02, -B*08:01, -B*27:05, -B*35:01, -B*44:02 или -C*07:01, были слиты с доменом α 3 мыши и ковалентно связаны с β 2-микроглобулином человека [67].

Позднее были разработаны и другие полностью MHC-гуманизированные мыши, позволяющие изучать HLA-рестриктированное распознавание пептидов без вмешательства представления эпитопов в контексте молекул MHC мыши [68]. В гуманизированной модели A2.DR1 молекулы HLA, наиболее часто встречающиеся у представителей европеоидной расы – HLA-A*0201, представляющие эпитоп-связывающие домены α 1 и α 2 HLA-A0201 с доменом α 3 H-2D*b, ковалентно связанным с β 2m человека (HDD), а также HLA-DR1 экспрессируются при нокауте всех генов MHC мыши. Эту модель использовали для тестирования вакцин против ВПЧ 16, моделируя ВПЧ-инфекцию присадкой сингенных клеточных линий, экспрессирующих белки E6 и E7 [68]. Так, путем трансфекции фибробластов сердца и легких мышью, трансгенных по HLA-A*0201, онкогеном *H-Ras* V12 и генами *E6* и *E7* ВПЧ 16 получена трансгенная клеточная линия, онкогенная для мышью HLA-A*0201. При этом из белка E7 ВПЧ 16 был удален доминантный эпитоп, распознаваемый иммунной системой мышью H-2D(b), чтобы гарантировать, что противоопухолевый иммунный ответ будет направлен исключительно на HLA-A*0201-рестриктированные эпитопы [69].

Эту модель использовали для тестирования эффективности двух кандидатных вакцин против ВПЧ 16, основанных на плазмидной ДНК и рекомбинантном вирусе венесуэльского энцефалита лошадей [69].

Трансгенные мыши, которым имплантировали ксенотрансплантаты, полученные от пациентов

Этот подход применяли преимущественно для создания моделей заражения гепатотропными вирусами ВГВ и ВГС (подробности см. в [70]). При этом наиболее широко использовалась и используется модель, основанная на мышях SCID, трансгенных по активатору плазминогена урокиназного типа (Alb-uPA)/SCID), или мышью, uPA/трансгенных по белку, активирующему рекомбинацию гена 2 (RAG-2), с острой или подострой печеночной недостаточностью у новорожденных мышат. Печень этих мышью можно “воссоздать” путем постепенного заселения гепатоцитами человека [71, 72]. Тяжелая печеночная недостаточность необходима для того, чтобы клетки человека имели свободное пространство и условия для пролиферации и достижения высокой степени химеризма. В таких системах гепатоциты человека остаются функциональными в течение как минимум 2 мес. после трансплантации и после прохождения множественных клеточных делений (подтверждено продукцией альбумина человека). Инфицирование мышью с трансплантированными гепатоцитами человека ВГВ из сыворотки крови человека или выделенным из *in vitro* культуры приводило к продуктивной инфекции с вирусемией до $\approx 10^{10}$ копий/мл, образованию функциональной кольцевой ковалентно замкнутой ДНК (ккзДНК) ВГВ и распространению вируса [72]. Вирусная нагрузка возрастала с увеличением доли клеток печени мышью, замещенных клетками человека, сохраняя возможность контролировать как степень печеночной недостаточности, так и степень ее восстановления. Вирусемия наблюдалась до 22 нед. с момента инфицирования (до наступления смерти или планового окончания эксперимента). Пассирование вируса показало, что сыворотки крови мышью содержат инфекционный ВГВ. Экспериментально установлено, что HBeAg незаменим как для активной продукции вируса, так и для его передачи [73]. Таким образом, химерные мыши могут быть напрямую инфицированы вирионами ВГВ с образованием функциональной ккзДНК ВГВ и с последующим распространением вируса. В аналогичном эксперименте линии клеток человека инъецировали в селезенку мышью FAN^{-/-}RAG2^{-/-}IL2R γ (FRG) или трансгенным по тимидинкиназе (ТК) мышам NOG (ТК-NOG) с последующим инфицированием ВГВ (подробности см. в [70]). ВГВ

можно вводить также после инъекции CD34+ гемопоэтических стволовых клеток и гепатоцитов человека в печень новорожденных мышей NOD/SCID/IL2R $\gamma^{-/-}$, трансгенных по HLA-A2 (мышей A2/NSG) [70]. Ни одна из этих моделей не может применяться ни для изучения иммуноопосредованного воспаления, врожденного или адаптивного противовирусного иммунного ответа, ни для тестирования иммунотерапии ВГВ-инфекции или ВГВ-ассоциированных опухолей, ввиду иммунодефицитного статуса мышей-реципиентов.

Чтобы устранить это ограничение, разработаны модели двойных гуманизированных химерных мышей, которые предусматривают пересадку иммунных клеток человека. С этой целью мезенхимальные стволовые клетки костного мозга человека (hBMSCs) трансплантировали мышам Fah $^{-/-}$ Rag2 $^{-/-}$ IL-2R $\gamma^{-/-}$ SCID (FRGS) с фульминантной печеночной недостаточностью, в результате чего получили модель hBMSC-FRGS, гуманизированную по клеткам печени и иммунной системы [74]. Мыши hBMSC-FRGS характеризовались активной пролиферацией и трансдифференцировкой функциональных гепатоцитов человека и широкого спектра иммунных клеток, включая В-клетки, Т-клетки, НК-клетки, дендритные клетки и макрофаги. После инфицирования ВГВ у этих мышей развивалась устойчивая вирусемия и специфические иммунные и воспалительные реакции. Через 54 нед. у 55% мышей наблюдалось прогрессирование заболевания до хронического гепатита и цирроза печени [74]. В целом, мыши hBMSC-FRGS оказались уникальной системой для выявления взаимодействий вируса с организмом хозяина, включая патофизиологические повреждения печени при хроническом гепатите с прогрессированием в цирроз, и специфические иммунные и воспалительные реакции организма человека на инфекцию ВГВ и повреждение печени. При этом сохранялся профиль экспрессии генов, ассоциированных с течением болезни, клеточный иммунный ответ, продукция цитокинов и характерные для гепатита В биохимические и патологические изменения [74]. В аналогичном исследовании созданы мышинные модели AFC8-hu HSC/Нер и A2/NSG-hu-HSC/Нер, в которых трансгенным мышам A2 трансплантировали гемопоэтические стволовые клетки человека CD34+ и клетки-предшественники гепатоцитов человека (или клетки печени плода). В обеих моделях ВГВ был способен инфицировать мышей, персистируя при этом в организме мыши не менее 4 мес. [70, 75] и вызывая фиброз печени. Описанные модели оказались очень полезными для изучения механизмов поражения печени при ВГВ-инфекции [75]. Модели типа Trimer и модели на основе

uPA/SCID и Fah $^{-/-}$ Rag $^{-/-}$ IL-2 $^{-/-}$ мышей успешно использовали для изучения инфекции ВГС, а также при разработке противовирусных препаратов, эффективных при ВГС-инфекции [76–79].

Ограничения трансгенных мышинных моделей

Использование химерных трансгенных моделей имеет ряд ограничений, включая генетическую изменчивость, отсутствие инструментов для изучения иммунного ответа, длительность исследования, сложные лабораторные методы и этические аспекты. Важно также отметить, что трансгенные мыши обладают низким потенциалом к формированию опухолей и метастазированию и низким уровнем мутаций в опухолях [80]. Помимо этого, экспрессия введенного гена в трансгенных мышцах чаще всего контролируется конститутивным синтетическим промотором, который не позволяет варьировать экспрессию генов в зависимости от генетического фона модели, что приводит к низкой клеточной гетерогенности и влияет на характер прогрессирования опухоли и метастазирования [81].

Получение мышинных моделей для анализа вирусных инфекций человека хорошо налажено для вирусов, использующих ограниченную панель факторов клетки-хозяина. Однако уровень репликации даже таких вирусов в клетках мыши ниже, чем в клетках человека, что во многом связано с активацией системы врожденного иммунитета и продукцией интерферонов первого типа [82]. В большинстве моделей молекулярные сенсоры нуклеиновых кислот и ИФН I подавляют размножение вирусов и блокируют появление симптомов инфекции, что затрудняет изучение вирусиндуцированных патологий.

Как уже упомянуто, человек и мышь имеют по существу разные иммунные системы. Поэтому мышинные модели не позволяют точно воспроизвести иммунный ответ человека на вирусы или отдельные вирусные антигены, что затрудняет экстраполяцию результатов, полученных на мышинных моделях, на человека [82]. В силу этого для моделирования хронических инфекций, вызванных гепатотропными вирусами, такими как ВГВ и ВГС, весьма актуальны модели, основанные на гуманизированных химерных мышцах. Однако эти модели, как и PDX-модели, не годятся для изучения воспаления, врожденного или адаптивного противовирусного иммунного ответа, тестирования иммунотерапии или вакцин. Сохранение в мышинных моделях интактной иммунной системы важно не только для решения задач иммунотерапии, но и при исследовании эффектов химиопрепаратов, так как ранее было показано, что часть химиотерапевтических препаратов ин-

дуцирует развитие противоопухолевого иммунного ответа [83].

Двойные гуманизированные химерные модели казалось бы обходят эту проблему, однако врожденные и адаптивные противовирусные иммунные ответы в этих моделях ограничены, а характер опосредованного Т- и В-клетками иммунного ответа на вирусную инфекцию отличается от иммунного ответа человека, в основном из-за клеточного состава микроокружения печени [70, 75]. Кроме того, печень мышей в двойных химерных моделях содержит меньше гепатоцитов, и поддерживает более низкий уровень репликации вируса, чем печень человека. И последнее, но не менее важное: эти модели основаны на узкоспециализированных линиях мышей, технически они очень сложные и дороги. Их создание и поддержание требует много времени, средств, развитой инфраструктуры и высококвалифицированного персонала, что ограничивает их широкое применение. Нужны более простые системы, подходящие для моделирования отдаленных последствий хронической вирусной инфекции, вызванной длительной продукцией вирусных белков, с оценкой их влияния на регуляцию генов, метаболизм экспрессирующих клеток и “невинных” клеток окружения, а также на состояние (функционирование) врожденного и адаптивного иммунного ответа.

МОДЕЛИРОВАНИЕ ВИРУС-АССОЦИИРОВАННОГО ОНКОГЕНЕЗА

Имплантация иммунокомпетентным мышам сингенных линий опухолевых клеток, несущих целые вирусные геномы или отдельные вирусные гены

Простейшие модели вирус-ассоциированного канцерогенеза основаны на использовании мышинных опухолевых (опухолеродных) клеток, экспрессирующих вирусные гены. Клетки имплантируют сингенным мышам, т.е. мышам, имеющим тот же генетический фон, что и имплантируемые клетки. Модели вирус-ассоциированных опухолей, созданные на основе таких клеток, называют аллогraftными, или сингенными моделями. Сингенные мышинные модели (СММ) сохраняют интактной иммунную систему мыши, поэтому они хорошо подходят для разработки противоопухолевых и противовирусных препаратов, воздействующих на иммунную систему, таких как ингибиторы контрольных точек, профилактические и иммуноотерапевтические противовирусные и противопухолевые вакцины. Сингенные клеточные линии могут быть получены из спонтанно возникающих опухолей мышей или с использованием мутагенных соединений и транспозонов и модифицированы для экспрессии одного или нескольких вирусных онкогенов в сочетании с известными

ми клеточными онкогенами путем стабильной трансфекции или трансдукции ретро- или лентивирусами, а также путем введения гена с помощью системы CRISPR-Cas. Например, получена панель клеточных линий рака легкого, сингенных мышам линии C57BL/6 [80]. Описаны модификации этого протокола для других видов клеток, например, клеток опухоли мочевого пузыря [84] и прямой кишки [85]. В другом подходе в уже злокачественные клетки путем стабильной трансфекции или трансдукции с использованием ретро- или лентивирусов вводят гены одного или нескольких вирусных белков. В ряде случаев экспрессия вирусных генов может приводить к увеличению онкогенного потенциала уже существующих опухолевых линий [86, 87].

Сингенные модели имеют множество преимуществ, в том числе и то, что опухолевые клетки можно легко поддерживать и размножать *in vitro* перед имплантацией мышам. Это приводит к образованию воспроизводимых по размеру и темпам роста опухолей со сходной выживаемостью животных. Основные ограничения использования сингенных клеточных линий связаны с их генетической однородностью [83] и ограниченными размерами, проще говоря, “бедностью” панели опухолевых линий, способных стабильно формировать опухоли в иммунокомпетентных мышах. Необходимо также учитывать, что прогрессирование опухоли сложный процесс – эффекты от воздействия отдельного вирусного белка или даже целого вируса у человека и мыши могут различаться. Это ограничивает применимость результатов, полученных в СММ, для трактовки феномена вирус-ассоциированного канцерогенеза человека.

Сингенные модели описаны как в научной литературе, так и на сайтах компаний-производителей (например, <https://www.criver.com/products-services/discovery-services/pharmacology-studies/oncology-immuno-oncology-studies/oncology-models/syngeneic-mouse-models> или <https://www.taconic.com/resources/syngeneic-cell-line-reference-database/>), поэтому мы не будем рассматривать их подробно.

Инфекции, вызываемые вирусами грызунов, родственными онкогенным вирусам человека

В первую очередь следует упомянуть вирус опухоли молочной железы мышей (MMTV), относящийся к ретровирусам [88]. Однако MMTV не является моделью родственного вируса, это скорее реальный этиологический агент опухолей молочной железы. Об этом свидетельствует анализ накопленных к настоящему моменту данных, включая идентификацию провируса, LTR, белков Gag

и нуклеокапсида, обратную транскриптазу и белок оболочки в 13% образцов опухолей молочной железы человека [88].

Наиболее хорошо изучен вирус папилломы мыши (MtuPV1), используемый для моделирования, вирус-ассоциированного канцерогенеза. С помощью MtuPV1 на мышцах моделировали ВПЧ-ассоциированный плоскоклеточный рак головы и шеи. Инфицирование вирусом MtuPV1 эпителия языка мышей с иммунодефицитом приводило к развитию плоскоклеточной дисплазии высокой степени с ранними признаками инвазивной карциномы в течение 4 мес. [89]. В сочетании с пероральным канцерогеном 4-нитрохиолин-1-оксидом (4NQO) MtuPV1 вызывал развитие инвазивного плоскоклеточного рака языка у мышей как с иммунодефицитом, так и иммунокомпетентных. Эти опухоли экспрессировали маркеры папилломавирусной инфекции и ВПЧ-ассоциированного канцерогенеза [89]. У иммунокомпетентных мышей MtuPV1, как и ВПЧ, передается половым путем [90], что позволяет изучать механизм заражения, а также использовать его в качестве модели для оценки эффективности профилактических препаратов. Кроме того, установлено, что механизм онкогенеза MtuPV1, по крайней мере отчасти, связан с его интеграцией в геном инфицированных клеток [91].

Наиболее близким к ВЭБ оказался γ -герпесвирус 68 мыши (MHV-68). К сожалению, MHV-68 значительно отличается от ВЭБ, различается также иммунный ответ хозяина на эти два вируса [39]. MHV-68 способен иммортализовать фетальные клетки печени мыши *in vitro*, что приводит к их дифференцировке в плазмобласты, которые, в свою очередь, могут образовывать опухоли в мышцах nude и Rag2^{-/-}, но не при подсадке иммунокомпетентным мышам линии C57Bl/6 или мышам с дефицитом В-клеток [92].

Для моделирования ВИЧ-1-инфекции разработаны химерные псевдовирсоны ВИЧ-1—вирус лейкоза мышей (MuLV). Эти химеры могут быть получены путем инфицирования ВИЧ-1 Т-клеточной линии, несущей MuLV, или путем замены кодирующей области *gp120* ВИЧ-1 на *gp80* MuLV [52]. С целью оценки протективных свойств вакцин против ВИЧ-1 проведены эксперименты по иммунизации мышей кандидатными ВИЧ-1 вакцинами с последующим их инфицированием химерным псевдовирсом [52].

В целом, этот подход используется относительно редко в силу узкого спектра вирусов грызунов, аналогичных онкогенным вирусам человека.

In vitro и *in vivo* моделирование молекулярного фона, способствующего злокачественной трансформации

Более сложным представляется моделирование процесса вирус-ассоциированного онкогенеза в части кооперации онкогенов/онкобелков вирусов и человека. Известно, что злокачественная трансформация клетки и развитие опухоли (опухолей) зависят от сложного взаимодействия между вирусными онкогенами и онкогенами/онкобелками хозяина. Ранние доказательства такого сотрудничества получены с использованием *in vitro* трансформации клеток с участием онкобелков вируса полиомы. Для трансформации первичных фибробластов эмбриона крысы требовалась экспрессия как большого, так и среднего Т-антигена вируса [93]. Подобная “кооперация” генов широко используется при моделировании опухолей, связанных с вирусными инфекциями.

Чтобы обеспечить созревание и выход потомства, вирусы должны в течение достаточно долгого времени подавлять или задерживать процесс апоптоза. Онкогенные вирусы особенно активно манипулируют как внешними, так и внутренними путями индукции апоптоза, подавляя активность проапоптотических белков и сигнальных путей, способствуя тем самым онкогенезу [94]. Чаще всего затрагивается p53-индуцированный апоптоз, опосредованный линейным каскадом, включающим трансактивацию *bax*, транслокацию белка *Bax* из цитозоля в мембранный компартмент, высвобождение цитохрома *c* из митохондрий и последовательную активацию каспаз-9, -3, -6 и -7 [95]. Выявление ускоренного образования опухолей у мышей с нуль-мутациями по p53 и с дефицитом p53 [96] способствовало созданию широкой панели моделей опухолей на основе мутированного p53 [97]. Вирусы достигают того же эффекта за счет функциональной инактивации p53. Т-антигены адено- и полиомавирусов связывают и инактивируют p53, что позволяет клетке избежать остановки клеточного цикла и способствует ее переходу в S-фазу. Кроме того, вирусные Т-антигены имитируют структуру ДНК (DNA mimicry), конкурируют с p53 за связывание ДНК, изменяя заряд и конфигурацию ДНК-дуплекса [98]. Это свойство Т-антигенов позволяет им нарушать регуляцию транскрипции генов-мишеней p53 и вызывать злокачественную трансформацию, в том числе клеток, непермиссивных для продуктивной вирусной инфекции [99]. Этот механизм сделал экспрессию Т-антигена вируса SV40 надежным способом создания трансгенных мышинных моделей опухолей [100].

Другой пример – вирусы ВПЧ ВКР, ингибирующие p53 за счет специфической активности онкобелков E6 и E7. E6 рекрутирует E6AP и промотирует убиквитинлигазную активность E6AP E3,

вызывая деградацию p53, приводящую к снижению его уровня в инфицированных клетках. Онкобелок E7 связывается с транскрипционным репрессорным комплексом DREAM, что повышает уровни экспрессии большинства генов клеточного цикла и ингибирует p53 [101]. Кроме того, белок E7 ВПЧ ВКР связывает другой опухолевый супрессор – белок ретинобластомы (Rb). Rb связывается с факторами транскрипции семейства E2F и подавляет экспрессию генов ферментов репликации [102]. E7 нарушает взаимодействие между Rb и E2F, что приводит к высвобождению факторов E2F в их транскрипционно-активных формах, стимулируя репликацию и деление клеток [103]. Однако этих событий недостаточно, чтобы вызвать трансформацию клеток. Чтобы трансформировать первичные клетки человека, ВПЧ ВКР должны взаимодействовать с такими активированными онкогенами человека, как RAS – центральный медиатор клеточной пролиферации и дифференцировки, индуцированной факторами роста [104]. RAS действует через белок RAF и ERK-киназы сигнального пути MAP-киназы. RAS, обладающий митогенной активностью, необходим на протяжении G1-фазы клеточного цикла и для прохождения через S-фазу [105]. Продукция активированного RAS в отсутствие таких негативных регуляторов, как p53 или Rb, приводит к трансформации клеток [106]. Это свойство превратило коэкспрессию E6/E7 ВПЧ ВКР в сочетании с активированным RAS в еще один инструмент злокачественной трансформации клеток, что привело к созданию множества мышинных моделей опухолей человека, продуцирующих белки E6 и E7 ВПЧ ВКР [107–109]. Сходный сценарий трансформации может быть реализован и с использованием других кооперативных онкобелков, например, MYC [110].

Клетки (клеточные линии), трансформированные совместным действием онкогенов вирусов и человека, имплантируют сингенным иммунокомпетентным мышам. Аналогичные сингенные мышинные модели описаны в разделе “Имплантация иммунокомпетентным мышам сингенных линий опухолевых клеток, несущих целые вирусные геномы или отдельные вирусные гены”. В последнее время появились работы, описывающие индукцию такого сочетанного онкогенеза *in vivo*. Ярким примером этого может быть внутривагинальная электропорация мышей плазмидами, кодирующими E6/E7 ВПЧ-16, с-MYC, AKT и транспозазу Sleeping Beauty. Кооперативное действие онкогенов (онкобелков) вируса и человека привело к формированию опухолей, которые спонтанно прогрессировали от плоскоклеточного интраэпителиального поражения высокой степени до рака и продуцировали белки E6 и E7 ВПЧ. Клеточные линии, полу-

ченные из этих опухолей, способны образовывать карциномы у иммунокомпетентных мышей [110]. Совместное воздействие клеточных факторов MYC, RAS и вирусных онкобелков на клеточную трансформацию опосредуется регуляцией активности циклинкиназ [106].

Модели спровоцированного канцерогенеза

В этом подходе для индукции опухоли используют различные канцерогены на фоне вирусной инфекции или экспрессии вирусных антигенов, т.е. совместное действие вирусных антигенов и химических/физических факторов, способствующих образованию опухолей. Naverkos H. опубликован исчерпывающий обзор [111] взаимодействия вирусов с канцерогенами человека. Сделанные в этом обзоре выводы применимы и к мышинным моделям. Мы сосредоточимся на наиболее важных факторах, связанных с канцерогенезом, таких как прием алкоголя, диета и воздействие канцерогенов.

Синергизм между канцерогенезом печени, вызванным ВГВ и ВГС, и потреблением алкоголя описан давно [57]. Механизм канцерогенеза, связанного с ВГС, заключается в индукции окислительного стресса [112]. Как можно было ожидать, у мышей, трансгенных по белку нуклеокапсида ВГС, употребление алкоголя вызывало заметное повышение уровня гидропероксидов фосфатидилхолина, а длительное употребление алкоголя (алкогольная диета) индуцировало развитие фиброза печени, подтверждая как синергический эффект вирусной инфекции и алкоголя в индукции заболевания печени [113], так и возможность моделирования этого процесса путем сочетания экспрессии вирусных антигенов с длительным воздействием этанола.

На примере мышей, несущих T-антиген SV40 под промотором эластазы-1, показано, что ассоциированный с вирусом онкогенез можно стимулировать с помощью определенных диет. Оказалось, что пища с низким содержанием клетчатки увеличивает частоту образования опухолей [114]. Интересно, что низкое содержание клетчатки в пищевом рационе вызывает изменения в составе кишечного микробиома, что, в свою очередь, приводит к распространению кишечных патобионтов, таких как адгезивно-инвазивная кишечная палочка (AIEC, связанная с болезнью Крона), с последующим изменением микробного метаболома с усилением воспаления кишечника [115], а также с системной метаболической и иммунной дисрегуляцией [116].

Рассмотренные примеры воздействия, приводящие к усилению роста опухоли, имеют один и тот же механизм, заключающийся в индукции и



Рис. 1. Основные подходы к созданию моделей вирусной инфекции и вирус-ассоциированного канцерогенеза.

поддержании воспаления. Индукция воспаления лежит в основе хорошо зарекомендовавших себя моделей канцерогенеза кожи, индуцированного химическими канцерогенами. Показано, что предсуществующее воспаление кожи увеличивает восприимчивость к росту опухоли. Это явление связано с увеличением популяции опухолеспецифических Т-клеток, продуцирующих интерлейкин-17 (IL-17) [117]. В то же время дефицит рецептора IL-17 (IL-17R) усиливал инфильтрацию CD8+ Т-клеток, ингибируя при этом инфильтрацию миелоидных клеток CD11b+ и развитие клеток-супрессоров миелоидного происхождения [118], что препятствовало росту опухоли.

Состояние воспаления тканей может быть достигнуто механическим путем. Isagulians M. и соавт. опубликовали данные, согласно которым воспаление, вызванное электропорацией, приводит к усиленному росту опухоли в участках, проксимальных к месту электропорации [119].

Описанные методы моделирования онкогенеза, ассоциированного с хроническими вирусными инфекциями, нашли свое применение для объяснения механизма индукции и развития опухолей, но не для создания самих моделей, прежде всего, в силу отсутствия воспроизводимости эффектов и их неоднородности, из-за невозможности ограничить их одним органом или типом ткани, а также длительности экспериментов.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

На сегодняшний день разработан ряд стандартных подходов к созданию моделей вирусной инфекции и вирус-ассоциированного канцерогенеза, нашедших широкое применение в лабораторной практике (рис. 1). Каждый из этих подходов имеет свои особенности, преимущества, недостатки и ограничения (табл. 1). Выбор той или иной модели должен осуществляться с учетом этих характеристик. Наиболее распространено использование ксенотрансплантатов тканей и клеток человека (как опухолевых и/или инфицированных, так и здоровых) с последующей инфекцией и трансформацией. Этот метод позволяет в довольно короткие сроки получить панель инструментов для оценки эффективности противоопухолевых препаратов, однако его применение сильно ограничивается супрессией иммунной системы мыши.

В случае лимфотропных вирусов, таких как ВИЧ-1 и ВЭБ, наиболее удачными моделями считаются мыши с иммунодефицитом с имплантированными элементами иммунной системы человека, так как эти модели позволяют изучать естественные механизмы реинфекции и патогенеза вирусов этой группы. Однако возможность применения этих моделей для оценки эффективности вакцинных препаратов ограничена, поскольку иммунная система этих мышей не может в полной мере моделировать иммунную систему иммунокомпетентных животных.

Таблица 1. Основные преимущества, недостатки и направления использования различных подходов к созданию моделей вирусной инфекции и вирус-ассоциированного канцерогенеза

Подход	Преимущества	Недостатки	Использование
Гуманизированные мыши с привитыми иммунными клетками человека с последующей ксенотрансплантацией тканей или клеток человека	<ul style="list-style-type: none"> — Позволяют воспроизвести как инфекцию, так и выработку иммунного ответа на эту инфекцию 	<ul style="list-style-type: none"> — Модели не полностью соответствуют иммуннокомпетентным животным. — Высокая стоимость 	<ul style="list-style-type: none"> — Исследование развития злокачественных новообразований. — Исследование аутоиммунитета. — Исследование вирусных инфекций, специфичных для человека. — Тестирование вакцин
Опухолевые клетки человека или биоптаты опухолей	<ul style="list-style-type: none"> — Подходят для прямых исследований патогенов человека и механизмов заражения. — Позволяют быстро и легко оценить эффекты различных агентов на опухолевые ткани и клетки <i>in vivo</i>. — Имеют сходные с первичной опухолью гистопатологические особенности. — Сходная с человеком чувствительность к химиотерапевтическим агентам. — Управляемая приживаемость 	<ul style="list-style-type: none"> — Не подходят для тестирования вакцин. — Могут неадекватно отражать процесс роста опухоли, особенно в отношении метастазирования из-за иммунокомпрометированности хозяина. — Могут изменить или полностью утратить признаки аутохтонных опухолей. — Возможна контаминация “посторонними” вирусами. — Временный характер вирусной экспрессии в ксенотрансплантатах. — Склонность к интенсивной пролиферации клеток в ксенотрафтах 	<ul style="list-style-type: none"> — Доклинический скрининг новых методов лечения (в том числе персоналифицированных) опухолей. — Моделирование развития опухолей и метастазов, связанных с вирусными инфекциями
Ксенографты клеток или тканей человека	<ul style="list-style-type: none"> — Управляемая приживаемость 	<ul style="list-style-type: none"> — Возможна контаминация “посторонними” вирусами. — Временный характер вирусной экспрессии в ксенотрансплантатах. — Склонность к интенсивной пролиферации клеток в ксенотрафтах 	<ul style="list-style-type: none"> — Прямые исследования патогенов человека и механизмов заражения. — Моделирование патологий, связанных с вирусными заболеваниями
МНС-гуманизированные мыши	<ul style="list-style-type: none"> — Возможность исследования HLA-рестриктированного распознавания пептидов без вмешательства презентации эпитопов в контексте молекул MHC мыши 	<ul style="list-style-type: none"> — Высокая стоимость. — Возможность использования HLA типа I в каждой линии мышей 	<ul style="list-style-type: none"> — Моделирование иммунного ответа на вирусную инфекцию или на вакцинацию/иммунотерапию. — Исследования, направленные на изучение онкологических и аутоиммунных заболеваний
Трансгенные мыши с имплантированными PDX (трансгенные химерные мыши)	<ul style="list-style-type: none"> — Возможность моделирования процесса вирусной инфекции. — При использовании двойных гуманизированных химерных мышей возможность изучать вирусную инфекцию на фоне гуманизированной иммунной системы 	<ul style="list-style-type: none"> — Генетическая изменчивость. — Отсутствие инструментов для изучения иммунного ответа. — Пролонгированные периоды исследования. — Сложные лабораторные методы и этические аспекты. — Низкий потенциал к формированию опухолей и метастазированию и низкий уровень мутаций в опухолях. — Модели основаны на узкоспециализированных линиях мышей, технически очень сложны и дороги 	<ul style="list-style-type: none"> — Моделирование хронических заболеваний печени, изучение гепатотропных вирусов, изучение противовирусных препаратов

Таблица 1. Продолжение

Подход	Преимущества	Недостатки	Использование
Трансгенные по экспрессии вирусов или отдельных вирусных белков	— Позволяют изучить патогенез хронической вирусной инфекции на фоне компетентной иммунной системы	— Не позволяют анализировать репликацию вируса, противовирусные стратегии или подходы к вакцинации	— Анализ механизмов вирус-индуцированной патологии. — Изучение онкогенных свойств белков <i>in vivo</i>
Трансгенные по факторам, приводящим к заражению вирусами человека	— Изучение вирусной инфекции на фоне компетентной иммунной системы	— Ограниченная панель факторов клетки-хозяина. — Не позволяют в точности воспроизвести иммунный ответ человека на вирусы или отдельные вирусные антигены	— Моделирование всех этапов инфекции вирусами человека
Имплантиция иммунокомпетентным мышам сингенных линий опухолевых клеток, несущих целые вирусные геномы или отдельные вирусные гены	— Иммунная система мышей интактна. — Легкость поддержания и размножения опухолевых клеток <i>in vitro</i> перед их имплантацией мышам. — Хорошая воспроизводимость опухолей со сходными темпами роста и выживаемостью мышей	— Генетическая однородность. — Ограниченная панель опухолевых линий, стабильно формирующих опухоли в иммунокомпетентных мышах	— Моделирование опухолевого роста. — Доклинический скрининг методов лечения, затрагивающих иммунную систему, в том числе. ингибиторов контрольных точек иммунитета
Использование комбинации вирусных и человеческих онкобелков для моделирования молекулярного фона <i>in vivo</i> и <i>in vitro</i> , способствующего злокачественной трансформации			— Моделирование и исследование опухолей, связанных с вирусными инфекциями
Канцерогенез, спровоцированный химическими или физическими факторами на фоне вирусной инфекции или с привлечением вирусных антигенов	— Изучение вирусного канцерогенеза на фоне компетентной иммунной системы	— Отсутствие воспроизводимости эффектов. — Неоднородность эффектов. — Невозможности ограничить воздействие одним органом или типом ткани. — Длительность эксперимента	— Изучение канцерогенеза, индуцируемого химическими или физическими факторами на фоне вирусной инфекции или кооперацией вирусных антигенов и химических/физических факторов. — Исследование влияния диет и воспаления на развитие опухолей
Инфицирование вирусами грызунов, родственными онкогенным вирусам человека	— Изучение вирусной инфекции на фоне компетентной иммунной системы	— Узкий спектр вирусов грызунов, аналогичных онкогенным вирусам человека	— Моделирование вирус-индуцированной патологии, в том числе опухолей, вызываемых вирусами человека, у лабораторных мышей. — Изучение механизмов заражения. — Оценка эффективности профилактического препаратов

Патогенез гепатотропных вирусов изучают на животных, трансгенных по целому вирусному геному или отдельным вирусным генам. Эти модели позволяют изучать механизмы вирусного патогенеза, но они не могут использоваться для тестирования противовирусных препаратов и вакцин, так как не предусматривают возможность элиминации вируса.

Ограниченно в качестве моделей применяют мышей, трансгенных по факторам, необходимым для вирусной инфекции (рецепторы, внутриклеточные кофакторы), так как для успешного инфицирования вирусами человека зачастую необходимо вводить в мышь целую панель клеточных факторов (например, для ВИЧ-1), при том что ряд факторов до сих пор не охарактеризован (например, для ВГС). Редко используется и моделирование процесса вирус-ассоциированного канцерогенеза с помощью вирусов грызунов, родственных онкогенным вирусам человека, прежде всего в силу узости спектра этих вирусов.

Таким образом, несмотря на разнообразие мышинных моделей вирусной инфекции и вирус-ассоциированного патогенеза, до сих пор не создана “идеальная” модель, полностью воссоздающая процесс инфекции, патогенеза и иммунного ответа человека. Исследователям необходимо выбирать модель, наиболее подходящую для решения конкретных задач.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (грант № 19-04-01034).

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

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Frese K.K., Tuveson D.A. (2007) Maximizing mouse cancer models. *Nat. Rev. Cancer*. **7**, 645–658.
2. Morton C.L., Houghton P.J. (2007) Establishment of human tumor xenografts in immunodeficient mice. *Nat. Protocols*. **2**, 247–250.
3. Rubio-Viqueira B., Jimeno A., Cusatis G., Zhang X., Iacobuzio-Donahue C., Karikari C., Shi C., Danenberg K., Danenberg P.V., Kuramochi H., Tanaka K., Singh S., Salimi-Moosavi H., Bouraoud N., Amador M.L., Altiock S., Kulesza P., Yeo C., Messersmith W., Eshleman J., Hruban R.H., Maitra A., Hidalgo M. (2006) An *in vivo* platform for translational drug development in pancreatic cancer. *Clin. Cancer Res.: An Official J. Am. Ass. Cancer Res.* **12**, 4652–4661.
4. Szadvari I., Krizanova O., Babula P. (2016) Athymic nude mice as an experimental model for cancer treatment. *Physiol. Res.* **65**, S441–S453.
5. Bosma M.J., Carroll A.M. (1991) The SCID mouse mutant: definition, characterization, and potential uses. *Annu. Rev. Immunol.* **9**, 323–350.
6. Shultz L.D., Schweitzer P.A., Christianson S.W., Gott B., Schweitzer I.B., Tennent B., McKenna S., Mombaaten L., Rajan T.V., Greiner D.L. (1995) Multiple defects in innate and adaptive immunologic function in NOD/LtSz-SCID mice. *J. Immunol.* **154**, 180–191.
7. Ito M., Hiramatsu H., Kobayashi K., Suzue K., Kawahata M., Hioki K., Ueyama Y., Koyanagi Y., Sugamura K., Tsuji K., Heike T., Nakahata T. (2002) NOD/SCID/gamma(c)(null) mouse: an excellent recipient mouse model for engraftment of human cells. *Blood*. **100**, 3175–3182.
8. Christianson S.W., Greiner D.L., Hesselton R.A., Leif J.H., Wagar E.J., Schweitzer I.B., Rajan T.V., Gott B., Roopenian D.C., Shultz L.D. (1997) Enhanced human CD4+ T cell engraftment in beta2-microglobulin-deficient NOD-scid mice. *J. Immunol.* **158**, 3578–3586.
9. Audige A., Rochat M.A., Li D., Ivic S., Fahrny A., Muller C.K.S., Gers-Huber G., Myburgh R., Redl S., Schlaepfer E., Scherrer A.U., Kuster S.P., Speck R.F. (2017) Long-term leukocyte reconstitution in NSG mice transplanted with human cord blood hematopoietic stem and progenitor cells. *BMC Immunol.* **18**, 28.
10. Ishikawa F. (2013) Modeling normal and malignant human hematopoiesis *in vivo* through newborn NSG xenotransplantation. *Internat. J. Hematol.* **98**, 634–640.
11. Murakami M., Hoshikawa Y., Satoh Y., Ito H., Tajima M., Okinaga K., Miyazawa Y., Kurata T., Sairenji T. (2000) Tumorigenesis of Epstein–Barr virus-positive epithelial cell lines derived from gastric tissues in the SCID mouse. *Virology*. **277**, 20–26.
12. Dubich T., Lieske A., Santag S., Beauclair G., Ruckert J., Herrmann J., Gorges J., Busche G., Kazmaier U., Hauser H., Stadler M., Schulz T.F., Wirth D. (2019) An endothelial cell line infected by Kaposi’s sarcoma-associated herpes virus (KSHV) allows the investigation of Kaposi’s sarcoma and the validation of novel viral inhibitors *in vitro* and *in vivo*. *J. Mol. Med.* **97**, 311–324.
13. Fujii E., Kato A., Chen Y.J., Matsubara K., Ohnishi Y., Suzuki M. (2014) Characterization of EBV-related lymphoproliferative lesions arising in donor lymphocytes of transplanted human tumor tissues in the NOG mouse. *Exp. Animals*. **63**, 289–296.
14. Bondarenko G., Ugolkov A., Rohan S., Kulesza P., Dubrovskiy O., Gursel D., Mathews J., O’Halloran T.V., Wei J.J., Mazar A.P. (2015) Patient-derived tumor xenografts are susceptible to formation of human lymphocytic tumors. *Neoplasia*. **17**, 735–741.
15. Tanaka T., Nishie R., Ueda S., Miyamoto S., Hashida S., Konishi H., Terada S., Kogata Y., Sasaki H., Tsunetoh S., Taniguchi K., Komura K., Ohmichi M. (2021) Patient-derived xenograft models in cervical cancer: a systematic review. *Internat. J. Mol. Sci.* **22**(17), 9369.
16. Larmour L.I., Cousins F.L., Teague J.A., Deane J.A., Jobling T.W., Gargett C.E. (2018) A patient derived xenograft model of cervical cancer and cervical dysplasia. *PLoS One*. **13**, e0206539.

17. Ilan E., Burakova T., Dagan S., Nussbaum O., Lubin I., Eren R., Ben-Moshe O., Arazi J., Berr S., Neville L., Yuen L., Mansour T.S., Gillard J., Eid A., Jurim O., Shouval D., Reisner Y., Galun E. (1999) The hepatitis B virus-trimera mouse: a model for human HBV infection and evaluation of anti-HBV therapeutic agents. *Hepatology*. **29**, 553–562.
18. Liu J., Chen S., Zou Z., Tan D., Liu X., Wang X. (2019) Pathological pattern of intrahepatic HBV in HCC is phenocopied by PDX-derived mice: a novel model for antiviral treatment. *Translat. Oncol.* **12**, 1138–1146.
19. Nazzal M., Sur S., Steele R., Khatun M., Patra T., Phillips N., Long J., Ray R., Ray R.B. (2020) Establishment of a patient-derived xenograft tumor from hepatitis C-associated liver cancer and evaluation of imatinib treatment efficacy. *Hepatology*. **72**, 379–388.
20. Cho S.Y. (2020) Patient-derived xenografts as compatible models for precision oncology. *Lab. Animal Res.* **36**, 14.
21. Malaney P., Nicosia S.V., Dave V. (2014) One mouse, one patient paradigm: new avatars of personalized cancer therapy. *Cancer Lett.* **344**, 1–12.
22. De Both N.J., Vermey M., Groen N., Dinjens W.N., Bosman F.T. (1997) Clonal growth of colorectal-carcinoma cell lines transplanted to nude mice. *Internat. J. Cancer*. **72**, 1137–1141.
23. Becher O.J., Holland E.C. (2006) Genetically engineered models have advantages over xenografts for preclinical studies. *Cancer Res.* **66**, 3355–3358, discussion 3358–3359.
24. Fiebig H.H., Berger D.P., Winterhalter B.R., Plowman J. (1990) *In vitro* and *in vivo* evaluation of US-NCI compounds in human tumor xenografts. *Cancer Treat. Rev.* **17**, 109–117.
25. Johnson J.I., Decker S., Zaharevitz D., Rubinstein L.V., Venditti J.M., Schepartz S., Kalyandrug S., Christian M., Arbuck S., Hollingshead M., Sausville E.A. (2001) Relationships between drug activity in NCI preclinical *in vitro* and *in vivo* models and early clinical trials. *Br. J. Cancer*. **84**, 1424–1431.
26. Byrne A.T., Alferez D.G., Amant F., Annibaldi D., Arribas J., Biankin A.V., Bruna A., Budinska E., Caldas C., Chang D.K., Clarke R.B., Clevers H., Coukos G., Dangles-Marie V., Eckhardt S.G., Gonzalez-Suarez E., Hermans E., Hidalgo M., Jarzabek M.A., de Jong S., Jonkers J., Kemper K., Lanfrancone L., Maelandsmo G.M., Marangoni E., Marine J.C., Medico E., Norum J.H., Palmer H.G., Peeper D.S., Pelicci P.G., Piris-Gimenez A., Roman-Roman S., Rueda O.M., Seoane J., Serra V., Soucek L., Vanhecke D., Villanueva A., Vinolo E., Bertotti A., Trusolino L. (2017) Interrogating open issues in cancer precision medicine with patient-derived xenografts. *Nat. Rev. Cancer*. **17**, 254–268.
27. Buitrago-Perez A., Hachimi M., Duenas M., Lloveras B., Santos A., Holguin A., Duarte B., Santiago J.L., Akgul B., Rodriguez-Peralto J.L., Storey A., Ribas C., Larcher F., del Rio M., Paramio J.M., Garcia-Escudero R. (2012) A humanized mouse model of HPV-associated pathology driven by E7 expression. *PLoS One*. **7**, e41743.
28. Hazari S., Hefler H.J., Chandra P.K., Poat B., Gunduz F., Ooms T., Wu T., Balart L.A., Dash S. (2011) Hepatocellular carcinoma xenograft supports HCV replication: a mouse model for evaluating antivirals. *World J. Gastroenterol.* **17**, 300–312.
29. Meuleman P., Leroux-Roels G. (2008) The human liver-uPA-SCID mouse: a model for the evaluation of antiviral compounds against HBV and HCV. *Antiviral Res.* **80**, 231–238.
30. Guevin C., Lamarre A., Labonte P. (2009) Novel HCV replication mouse model using human hepatocellular carcinoma xenografts. *Antiviral Res.* **84**, 14–22.
31. Akkina R. (2013) New generation humanized mice for virus research: comparative aspects and future prospects. *Virology*. **435**, 14–28.
32. Richmond A., Su Y. (2008) Mouse xenograft models vs GEM models for human cancer therapeutics. *Disease Models Mech.* **1**, 78–82.
33. Jin K., Teng L., Shen Y., He K., Xu Z., Li G. (2010) Patient-derived human tumour tissue xenografts in immunodeficient mice: a systematic review. *Clin. Translat. Oncol.: Official Publ. Fed. Spanish Oncol. Soc. Nat. Canc. Inst. Mexico*. **12**, 473–480.
34. Walsh N.C., Kenney L.L., Jangalwe S., Aryee K.E., Greiner D.L., Brehm M.A., Shultz L.D. (2017) Humanized mouse models of clinical disease. *Annu. Rev. Pathol.* **12**, 187–215.
35. Hatzioannou T., Evans D.T. (2012) Animal models for HIV/AIDS research. *Nat. Rev. Microbiol.* **10**, 852–867.
36. Brehm M.A., Shultz L.D., Greiner D.L. (2010) Humanized mouse models to study human diseases. *Curr. Opin. Endocrinol. Diabetes Obesity*. **17**, 120–125.
37. Wang L.X., Kang G., Kumar P., Lu W., Li Y., Zhou Y., Li Q., Wood C. (2014) Humanized-BLT mouse model of Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus infection. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **111**, 3146–3151.
38. Ma S.D., Xu X., Plowshay J., Ranheim E.A., Burlingham W.J., Jensen J.L., Asimakopoulou F., Tang W., Gulley M.L., Cesarman E., Gumperz J.E., Kenney S.C. (2015) LMP1-deficient Epstein–Barr virus mutant requires T cells for lymphomagenesis. *J. Clin. Invest.* **125**, 304–315.
39. Ahmed E.H., Baiocchi R.A. (2016) Murine models of Epstein–Barr virus-associated lymphomagenesis. *ILAR JI.* **57**, 55–62.
40. Gauduin M.C., Parren P.W., Weir R., Barbas C.F., Burton D.R., Koup R.A. (1997) Passive immunization with a human monoclonal antibody protects hu-PBL-SCID mice against challenge by primary isolates of HIV-1. *Nat. Med.* **3**, 1389–1393.
41. Parren P.W., Ditzel H.J., Gulizia R.J., Binley J.M., Barbas C.F., 3rd, Burton D.R., Mosier D.E. (1995) Protection against HIV-1 infection in hu-PBL-SCID mice by passive immunization with a neutralizing human monoclonal antibody against the gp120 CD4-binding site. *AIDS*. **9**, F1–F6.
42. Dexter D.L., Diamond M., Creveling J., Chen S.F. (1993) Chemotherapy of mammary carcinomas arising in ras transgenic mice. *Invest. New Drugs*. **11**, 161–168.

43. Haddad A.F., Young J.S., Amara D., Berger M.S., Raleigh D.R., Aghi M.K., Butowski N.A. (2021) Mouse models of glioblastoma for the evaluation of novel therapeutic strategies. *Neuro-Oncol. Adv.* **3**, vdab100.
44. Nomura T., Tamaoki N., Takakura A., Suemizu H. (2008) Basic concept of development and practical application of animal models for human diseases. *Curr. Topics Microbiol. Immunol.* **324**, 1–24.
45. Coussens L.M., Hanahan D., Arbeit J.M. (1996) Genetic predisposition and parameters of malignant progression in K14-HPV16 transgenic mice. *Am. J. Pathol.* **149**, 1899–1917.
46. Winkler E.S., Bailey A.L., Kafai N.M., Nair S., McCune B.T., Yu J., Fox J.M., Chen R.E., Earnest J.T., Keeler S.P., Ritter J.H., Kang L.I., Dort S., Robichaud A., Head R., Holtzman M.J., Diamond M.S. (2020) SARS-CoV-2 infection of human ACE2-transgenic mice causes severe lung inflammation and impaired function. *Nat. Immunol.* **21**, 1327–1335.
47. Ren R.B., Costantini F., Gorgacz E.J., Lee J.J., Racaniello V.R. (1990) Transgenic mice expressing a human poliovirus receptor: a new model for poliomyelitis. *Cell.* **63**, 353–362.
48. Mouse Genome Sequencing C., Waterston R.H., Lindblad-Toh K., Birney E., Rogers J., Abril J.F., Agarwal P., Agarwala R., Ainscough R., Alexandersson M., An P., Antonarakis S.E., Attwood J., Baertsch R., Bailey J., Barlow K., Beck S., Berry E., Birren B., Bloom T., Bork P., Botcherby M., Bray N., Brent M.R., Brown D.G., Brown S.D., Bult C., Burton J., Butler J., Campbell R.D., Carninci P., Cawley S., Chiaromonte F., Chinwalla A.T., Church D.M., Clamp M., Clee C., Collins F.S., Cook L.L., Copley R.R., Coulson A., Couronne O., Cuff J., Curwen V., Cutts T., Daly M., David R., Davies J., Delehaunty K.D., Deri J., Dermitzakis E.T., Dewey C., Dickens N.J., Diekhans M., Dodge S., Dubchak I., Dunn D.M., Eddy S.R., Elnitski L., Emes R.D., Eswar P., Eyas E., Felsenfeld A., Fewell G.A., Flicek P., Foley K., Frankel W.N., Fulton L.A., Fulton R.S., Furey T.S., Gage D., Gibbs R.A., Glusman G., Gnerner S., Goldman N., Goodstadt L., Grafham D., Graves T.A., Green E.D., Gregory S., Guigo R., Guyer M., Hardison R.C., Haussler D., Hayashizaki Y., Hillier L.W., Hinrichs A., Hlavina W., Holzer T., Hsu F., Hua A., Hubbard T., Hunt A., Jackson I., Jaffe D.B., Johnson L.S., Jones M., Jones T.A., Joy A., Kamal M., Karlsson E.K., Karolchik D., Kasprzyk A., Kawai J., Keibler E., Kells C., Kent W.J., Kirby A., Kolbe D.L., Korf I., Kucherlapati R.S., Kulbokas E.J., Kulp D., Landers T., Leger J.P., Leonard S., Letunic I., Levine R., Li J., Li M., Lloyd C., Lucas S., Ma B., Maglott D.R., Mardis E.R., Matthews L., Mauceli E., Mayer J.H., McCarthy J.D., McCombie W.R., McLaren S., McLay K., McPherson J.D., Meldrim J., Meredith B., Mesirov J.P., Miller W., Miner T.L., Mongin E., Montgomery K.T., Morgan M., Mott R., Mullikin J.C., Muzny D.M., Nash W.E., Nelson J.O., Nhan M.N., Nicol R., Ning Z., Nusbaum C., O'Connor M.J., Okazaki Y., Oliver K., Overton-Larty E., Pachter L., Parra G., Pepin K.H., Peterson J., Pevzner P., Plumb R., Pohl C.S., Poliakov A., Ponce T.C., Ponting C.P., Potter S., Quail M., Raymond A., Roe B.A., Roskin K.M., Rubin E.M., Rust A.G., Santos R., Sapojnikov V., Schultz B., Schultz J., Schwartz M.S., Schwartz S., Scott C., Seaman S., Searle S., Sharpe T., Sheridan A., Shownkeen R., Sims S., Singer J.B., Slater G., Smit A., Smith D.R., Spencer B., Stabenau A., Stange-Thomann N., Sugnet C., Suyama M., Tesler G., Thompson J., Torrents D., Trevaskis E., Tromp J., Ucla C., Ureta-Vidal A., Vinson J.P., Von Niederhausern A.C., Wade C.M., Wall M., Weber R.J., Weiss R.B., Wendl M.C., West A.P., Wetterstrand K., Wheeler R., Whelan S., Wierzbowski J., Willey D., Williams S., Wilson R.K., Winter E., Worley K.C., Wyman D., Yang S., Yang S.P., Zdobnov E.M., Zody M.C., Lander E.S. (2002) Initial sequencing and comparative analysis of the mouse genome. *Nature.* **420**, 520–562.
49. Dorner M., Horwitz J.A., Robbins J.B., Barry W.T., Feng Q., Mu K., Jones C.T., Schoggins J.W., Catanese M.T., Burton D.R., Law M., Rice C.M., Ploss A. (2011) A genetically humanized mouse model for hepatitis C virus infection. *Nature.* **474**, 208–211.
50. Burm R., Collignon L., Mesalam A.A., Meuleman P. (2018) Animal models to study hepatitis C virus infection. *Front. Immunol.* **9**, 1032.
51. Li H., Zhuang Q., Wang Y., Zhang T., Zhao J., Zhang Y., Zhang J., Lin Y., Yuan Q., Xia N., Han J. (2014) HBV life cycle is restricted in mouse hepatocytes expressing human NTCP. *Cell Mol. Immunol.* **11**, 175–183.
52. Boberg A., Brave A., Johansson S., Wahren B., Hinkula J., Rollman E. (2008) Murine models for HIV vaccination and challenge. *Expert Rev. Vaccines.* **7**, 117–130.
53. Mestas J., Hughes C.C. (2004) Of mice and not men: differences between mouse and human immunology. *J. Immunol.* **172**, 2731–2738.
54. Masemann D., Ludwig S., Boergeling Y. (2020) Advances in transgenic mouse models to study infections by human pathogenic viruses. *Internat. J. Mol. Sci.* **21**(23), 9289.
55. Inuzuka T., Takahashi K., Chiba T., Marusawa H. (2014) Mouse models of hepatitis B virus infection comprising host–virus immunologic interactions. *Pathogens.* **3**, 377–389.
56. Li Y.T., Wu H.L., Liu C.J. (2021) Molecular mechanisms and animal models of HBV-related hepatocellular carcinoma: with emphasis on metastatic tumor antigen 1. *Internat. J. Mol. Sci.* **22**(17), 9380.
57. Moriya K., Nakagawa K., Santa T., Shintani Y., Fujie H., Miyoshi H., Tsutsumi T., Miyazawa T., Ishibashi K., Horie T., Imai K., Todoroki T., Kimura S., Koike K. (2001) Oxidative stress in the absence of inflammation in a mouse model for hepatitis C virus-associated hepatocarcinogenesis. *Cancer Res.* **61**, 4365–4370.
58. Liu Y., Maya S., Ploss A. (2021) Animal models of hepatitis B virus infection—success, challenges, and future directions. *Viruses.* **13**(5), 777
59. Leonard J.M., Abramczuk J.W., Pezen D.S., Rutledge R., Belcher J.H., Hakim F., Shearer G., Lamperth L., Travis W., Fredrickson T., Notkinsand A.L., Martin M.A. (1988) Development of disease and virus recovery in transgenic mice containing HIV proviral DNA. *Science.* **242**, 1665–1670.

60. Goudreau G., Carpenter S., Beaulieu N., Jolicœur P. (1996) Vacuolar myelopathy in transgenic mice expressing human immunodeficiency virus type 1 proteins under the regulation of the myelin basic protein gene promoter. *Nat. Med.* **2**, 655–661.
61. Vogel J., Hinrichs S.H., Reynolds R.K., Luciw P.A., Jay G. (1988) The HIV *tat* gene induces dermal lesions resembling Kaposi's sarcoma in transgenic mice. *Nature*. **335**, 606–611.
62. Brady H.J., Abraham D.J., Pennington D.J., Miles C.G., Jenkins S., Dzierzak E.A. (1995) Altered cytokine expression in T lymphocytes from human immunodeficiency virus Tat transgenic mice. *J. Virol.* **69**, 7622–7629.
63. Bravo Cruz A.G., Damania B. (2019) *In vivo* models of oncoproteins encoded by Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus. *J. Virol.* **93**(11), e01053-18.
64. Yu M., Chandra J. (2021) Therapeutic DNA vaccine against HPV16-associated cancer. *Meth. Mol. Biol.* **2197**, 241–252.
65. Pascolo S. (2005) HLA class I transgenic mice: development, utilisation and improvement. *Expert Opin. Biol. Therapy*. **5**, 919–938.
66. Pascolo S., Bervan N., Ure J.M., Smith A.G., Lemonnier F.A., Perarnau B. (1997) HLA-A2.1-restricted education and cytolytic activity of CD8(+) T lymphocytes from beta2 microglobulin (beta2m) HLA-A2.1 monochain transgenic H-2Db beta2m double knock-out mice. *J. Exp. Med.* **185**, 2043–2051.
67. Boucherma R., Kridane-Miledi H., Bouziat R., Rasmussen M., Gatard T., Langa-Vives F., Lemercier B., Lim A., Berard M., Benmohamed L., Buus S., Rooke R., Lemonnier F.A. (2013) HLA-A*01:03, HLA-A*24:02, HLA-B*08:01, HLA-B*27:05, HLA-B*35:01, HLA-B*44:02, and HLA-C*07:01 monochain transgenic/H-2 class I null mice: novel versatile preclinical models of human T cell responses. *J. Immunol.* **191**, 583–593.
68. Zottnick S., Voss A.L., Riemer A.B. (2020) Inducing immunity where it matters: orthotopic HPV tumor models and therapeutic vaccinations. *Front. Immunol.* **11**, 1750.
69. Eiben G.L., Velders M.P., Schreiber H., Cassetti M.C., Pullen J.K., Smith L.R., Kast W.M. (2002) Establishment of an HLA-A*0201 human papillomavirus type 16 tumor model to determine the efficacy of vaccination strategies in HLA-A*0201 transgenic mice. *Cancer Res.* **62**, 5792–5799.
70. Sun S., Li J. (2017) Humanized chimeric mouse models of hepatitis B virus infection. *Internat. J. Infect. Dis.: IJID: Official Publ. Internat. Soc. Infect. Dis.* **59**, 131–136.
71. Tateno C., Yoshizane Y., Saito N., Kataoka M., Utoh R., Yamasaki C., Tachibana A., Soeno Y., Asahina K., Hino H., Asahara T., Yokoi T., Furukawa T., Yoshizato K. (2004) Near completely humanized liver in mice shows human-type metabolic responses to drugs. *Am. J. Pathol.* **165**, 901–912.
72. Dandri M., Burda M.R., Torok E., Pollok J.M., Iwanska A., Sommer G., Rogiers X., Rogler C.E., Gupta S., Will H., Greten H., Petersen J. (2001) Repopulation of mouse liver with human hepatocytes and *in vivo* infection with hepatitis B virus. *Hepatology*. **33**, 981–988.
73. Tsuge M., Hiraga N., Takaishi H., Noguchi C., Oga H., Imamura M., Takahashi S., Iwao E., Fujimoto Y., Ochi H., Chayama K., Tateno C., Yoshizato K. (2005) Infection of human hepatocyte chimeric mouse with genetically engineered hepatitis B virus. *Hepatology*. **42**, 1046–1054.
74. Yuan L., Jiang J., Liu X., Zhang Y., Zhang L., Xin J., Wu K., Li X., Cao J., Guo X., Shi D., Li J., Jiang L., Sun S., Wang T., Hou W., Zhang T., Zhu H., Zhang J., Yuan Q., Cheng T., Li J., Xia N. (2019) HBV infection-induced liver cirrhosis development in dual-humanised mice with human bone mesenchymal stem cell transplantation. *Gut*. **68**, 2044–2056.
75. Hu J., Lin Y.Y., Chen P.J., Watashi K., Wakita T. (2019) Cell and animal models for studying hepatitis B virus infection and drug development. *Gastroenterology*. **156**, 338–354.
76. Ilan E., Arazi J., Nussbaum O., Zauberman A., Eren R., Lubin I., Neville L., Ben-Moshe O., Kischitzky A., Litchi A., Margalit I., Gopher J., Mounir S., Cai W., Daudi N., Eid A., Jurim O., Czerniak A., Galun E., Dagan S. (2002) The hepatitis C virus (HCV)-Trimera mouse: a model for evaluation of agents against HCV. *J. Infect. Dis.* **185**, 153–161.
77. Mercer D.F., Schiller D.E., Elliott J.F., Douglas D.N., Hao C., Rinfret A., Addison W.R., Fischer K.P., Churchill T.A., Lakey J.R., Tyrrell D.L., Kneteman N.M. (2001) Hepatitis C virus replication in mice with chimeric human livers. *Nat. Medicine*. **7**, 927–933.
78. Kneteman N.M., Weiner A.J., O'Connell J., Collett M., Gao T., Aukerman L., Kovelsky R., Ni Z.J., Zhu Q., Hashash A., Kline J., Hsi B., Schiller D., Douglas D., Tyrrell D.L., Mercer D.F. (2006) Anti-HCV therapies in chimeric scid-Alb/uPA mice parallel outcomes in human clinical application. *Hepatology*. **43**, 1346–1353.
79. Turrini P., Sasso R., Germoni S., Marcucci I., Celluci A., Di Marco A., Marra E., Paonessa G., Eutropi A., Laufer R., Migliaccio G., Padron J. (2006) Development of humanized mice for the study of hepatitis C virus infection. *Transplant. Proc.* **38**, 1181–1184.
80. Nolan K., Verzosa G., Cleaver T., Tippimanchai D., DePledge L.N., Wang X.J., Young C., Le A., Doebele R., Li H., Malkoski S.P. (2020) Development of syngeneic murine cell lines for use in immunocompetent orthotopic lung cancer models. *Cancer Cell Internat.* **20**, 417.
81. Talmadge J.E., Singh R.K., Fidler I.J., Raz A. (2007) Murine models to evaluate novel and conventional therapeutic strategies for cancer. *Am. J. Pathol.* **170**, 793–804.
82. Takaki H., Oshiumi H., Shingai M., Matsumoto M., Seya T. (2017) Development of mouse models for analysis of human virus infections. *Microbiol. Immunol.* **61**, 107–113.
83. Zitvogel L., Pitt J.M., Daillere R., Smyth M.J., Kroemer G. (2016) Mouse models in oncoimmunology. *Nat. Rev. Cancer*. **16**, 759–773.
84. Gunther J.H., Jurczok A., Wulf T., Brandau S., Deiner I., Jocham D., Bohle A. (1999) Optimizing syngeneic

- neic orthotopic murine bladder cancer (MB49). *Cancer Res.* **59**, 2834–2837.
85. Mittal V.K., Bhullar J.S., Jayant K. (2015) Animal models of human colorectal cancer: current status, uses and limitations. *W. J. Gastroenterol.* **21**, 11854–11861.
 86. Tsukiyama-Kohara K. (2012) Role of oxidative stress in hepatocarcinogenesis induced by hepatitis C virus. *Internat. J. Mol. Sci.* **13**, 15271–15278.
 87. Bayurova E., Jansons J., Skrastina D., Smirnova O., Mezale D., Kostyusheva A., Kostyushev D., Petkov S., Podschwadt P., Valuev-Elliston V. (2019) HIV-1 reverse transcriptase promotes tumor growth and metastasis formation via ROS-dependent upregulation of twist. *Oxidative Med. Cell. Longevity.* **2019**, 6016278. <https://doi.org/10.1155/2019/601627>
 88. Lawson J.S., Salmons B., Glenn W.K. (2018) Oncogenic viruses and breast cancer: mouse mammary tumor virus (MMTV), bovine leukemia virus (BLV), human papilloma virus (HPV), and Epstein–Barr virus (EBV). *Fron. Oncol.* **8**, 1.
 89. Wei T., Buehler D., Ward-Shaw E., Lambert P.F. (2020) An infection-based murine model for papillomavirus-associated head and neck cancer. *mBio.* **11**(3), e00908-20.
 90. Spurgeon M.E., Lambert P.F. (2019) Sexual transmission of murine papillomavirus (MmuPV1) in *Mus musculus*. *eLife.* **8**, e50056.
 91. Yu L., Majerciak V., Xue X.Y., Uberoi A., Lobanov A., Chen X., Cam M., Hughes S.H., Lambert P.F., Zheng Z.M. (2021) Mouse papillomavirus type 1 (MmuPV1) DNA is frequently integrated in benign tumors by microhomology-mediated end-joining. *PLoS Pathog.* **17**, e1009812.
 92. Liang X., Paden C.R., Morales F.M., Powers R.P., Jacob J., Speck S.H. (2011) Murine gamma-herpesvirus immortalization of fetal liver-derived B cells requires both the viral cyclin D homolog and latency-associated nuclear antigen. *PLoS Pathog.* **7**, e1002220.
 93. Butel J.S. (2000) Viral carcinogenesis: revelation of molecular mechanisms and etiology of human disease. *Carcinogenesis.* **21**, 405–426.
 94. Замараев А.В., Животовский Б., Копейна Г.С. (2020) Вирусные инфекции: негативный регулятор апоптоза и фактор онкогенности. *Биохимия.* **85**(10), 1398–1410.
 95. Sun W., Yang J. (2010) Functional mechanisms for human tumor suppressors. *J. Cancer.* **1**, 136–140.
 96. Attardi L.D., Jacks T. (1999) The role of p53 in tumour suppression: lessons from mouse models. *Cell. Mol. Life Sci: CMLS.* **55**, 48–63.
 97. Clarke A.R., Hollstein M. (2003) Mouse models with modified p53 sequences to study cancer and ageing. *Cell Death Differ.* **10**, 443–450.
 98. Levine A.J., Oren M. (2009) The first 30 years of p53: growing ever more complex. *Nat. Rev. Cancer.* **9**, 749–758.
 99. Ahuja D., Saenz-Robles M.T., Pipas J.M. (2005) SV40 large T antigen targets multiple cellular pathways to elicit cellular transformation. *Oncogene.* **24**, 7729–7745.
 100. Hudson A.L., Colvin E.K. (2016) Transgenic mouse models of SV40-induced cancer. *ILAR J.* **57**, 44–54.
 101. Engeland K. (2018) Cell cycle arrest through indirect transcriptional repression by p53: I have a DREAM. *Cell Death Differ.* **25**, 114–132.
 102. Lipinski M.M., Jacks T. (1999) The retinoblastoma gene family in differentiation and development. *Oncogene.* **18**, 7873–7882.
 103. Gupta S., Kumar P., Das B.C. (2018) HPV: molecular pathways and targets. *Curr. Problems Cancer.* **42**, 161–174.
 104. Matlashewski G., Schneider J., Banks L., Jones N., Murray A., Crawford L. (1987) Human papillomavirus type 16 DNA cooperates with activated ras in transforming primary cells. *EMBO J.* **6**, 1741–1746.
 105. Pylayeva-Gupta Y., Grabocka E., Bar-Sagi D. (2011) RAS oncogenes: weaving a tumorigenic web. *Nat. Rev. Cancer.* **11**, 761–774.
 106. Kivinen L., Tsubari M., Haapajarvi T., Datto M.B., Wang X.F., Laiho M. (1999) Ras induces p21Cip1/Waf1 cyclin kinase inhibitor transcriptionally through Sp1-binding sites. *Oncogene.* **18**, 6252–6261.
 107. Feltkamp M.C., Smits H.L., Vierboom M.P., Minnaar R.P., de Jongh B.M., Drijfhout J.W., ter Schegget J., Melief C.J., Kast W.M. (1993) Vaccination with cytotoxic T lymphocyte epitope-containing peptide protects against a tumor induced by human papillomavirus type 16-transformed cells. *Eur. J. Immunol.* **23**, 2242–2249.
 108. Mermod M., Hiou-Feige A., Bovay E., Roh V., Sponarova J., Bongiovanni M., Vermeer D.W., Lee J.H., Petrova T.V., Rivals J.P., Monnier Y., Tolstonog G.V., Simon C. (2018) Mouse model of postsurgical primary tumor recurrence and regional lymph node metastasis progression in HPV-related head and neck cancer. *Intern. J. Cancer.* **142**, 2518–2528.
 109. Paolini F., Massa S., Manni I., Franconi R., Venuti A. (2013) Immunotherapy in new pre-clinical models of HPV-associated oral cancers. *Hum. Vaccin. Immunother.* **9**, 534–543.
 110. Henkle T.R., Lam B., Kung Y.J., Lin J., Tseng S.H., Ferrall L., Xing D., Hung C.F., Wu T.C. (2021) Development of a novel mouse model of spontaneous high-risk HPV E6/E7-expressing carcinoma in the cervicovaginal tract. *Cancer Res.* **81**, 4560–4569.
 111. Haverkos H.W. (2004) Viruses, chemicals and co-carcinogenesis. *Oncogene.* **23**, 6492–6499.
 112. Isaguliant M., Bayurova E., Avdoshina D., Kondrashova A., Chiodi F., Palefsky J.M. (2021) Oncogenic effects of HIV-1 proteins, mechanisms behind. *Cancers.* **13**(2), 305.
 113. Kornek M., Raskopf E., Guetgemann I., Ocker M., Gerceker S., Gonzalez-Carmona M.A., Rabe C., Sauerbruch T., Schmitz V. (2006) Combination of systemic thioacetamide (TAA) injections and ethanol feeding accelerates hepatic fibrosis in C3H/He mice and is associated with intrahepatic up regulation of MMP-2, VEGF and ICAM-1. *J. Hepatol.* **45**, 370–376.
 114. Longnecker D.S., Kuhlmann E.T., Freeman D.H., Jr. (1990) Characterization of the elastase 1-simian virus

- 40 T-antigen mouse model of pancreatic carcinoma: effects of sex and diet. *Cancer Res.* **50**, 7552–7554.
115. Lau T.C., Fiebig-Comyn A.A., Shaler C.R., McPhee J.B., Coombes B.K., Schertzer J.D. (2021) Low dietary fiber promotes enteric expansion of a Crohn’s disease-associated pathobiont independent of obesity. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metabolism.* **321**, E338–E350.
116. Morrison K.E., Jasarevic E., Howard C.D., Bale T.L. (2020) It’s the fiber, not the fat: significant effects of dietary challenge on the gut microbiome. *Microbiome.* **8**, 15.
117. Wang L., Yi T., Zhang W., Pardoll D.M., Yu H. (2010) IL-17 enhances tumor development in carcinogen-induced skin cancer. *Cancer Res.* **70**, 10112–10120.
118. He D., Li H., Yusuf N., Elmets C.A., Athar M., Katiyar S.K., Xu H. (2012) IL-17 mediated inflammation promotes tumor growth and progression in the skin. *PLoS One.* **7**, e32126.
119. Isaguliantz M., Krotova O., Petkov S., Jansons J., Bayurova E., Mezale D., Fridrihsone I., Kilpelainen A., Podschwadt P., Agapkina Y., Smirnova O., Kostic L., Saleem M., Latyshev O., Eliseeva O., Malkova A., Gorodnicheva T., Wahren B., Gordeychuk I., Starodubova E., Latanova A. (2021) Cellular immune response induced by DNA immunization of mice with drug resistant integrases of HIV-1 clade A offers partial protection against growth and metastatic activity of integrase-expressing adenocarcinoma cells. *Microorganisms.* **9**(6), 1219.
<https://doi.org/10.3390/microorganisms9061219>

MURINE MODELS OF CHRONIC VIRAL INFECTIONS AND ASSOCIATED CANCER

D. V. Avdoshina¹, A. S. Kondrashova¹, M. G. Belikova^{1, 2, 3}, and E. O. Bayurova^{1, 2, *}

¹ Chumakov Federal Scientific Center for Research and Development of Immunobiological Products (Polio Institute), Russian Academy of Sciences, Moscow, 108819 Russia

² Gamaleya National Research Center for Epidemiology and Microbiology, Ministry of Health of the Russian Federation, Moscow, 123098 Russia

³ Peoples’ Friendship University of Russia (RUDN University), Moscow, 117198 Russia

*e-mail: bayurova_eo@chumakovs.ru

Viruses are now accepted as bona fide etiologic factors of human cancer; these include Epstein–Barr virus, high risk human papillomaviruses, hepatitis B and C viruses, human T-cell leukemia virus type I and human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1), plus several candidate human cancer viruses. It is estimated that 15% of all human tumors worldwide are caused by viruses. The infectious nature of viruses distinguishes them from all other cancer-causing factors; tumor viruses establish long-term persistent infections in humans, with cancer as an accidental side effect of viral replication strategies. Viruses are usually not complete carcinogens, supporting the concept that cancer development occurs by the accumulation of multiple cooperating events, in which human cancer viruses display different, often opposing roles. The laboratory mouse (*Mus musculus*) is one of the best in vivo experimental systems for modeling human pathology, including viral infections and cancer. However, mice cannot be infected with any of the viruses known to cause chronic human infections associated with the development of cancer. A variety of murine models of virus-associated cancer have been developed to address different aspects of virus-associated carcinogenesis starting from tumors resulting from xenografts of human tissues and cells, including cancerous and virus infected, to genetically engineered mice susceptible to viral infections and associated cancer. Here we presented an overview of the existing models, described their applications, analyzed advantages and disadvantages, and drew perspectives for their further development.

Keywords: murine models, chronic viral infection, viral oncogenesis, viral oncogens, xenograft, HCV, HBV, HIV-1, EBV, HTLV-I

**ВИРУСНЫЕ ИНФЕКЦИИ: ОТ МЕХАНИЗМОВ РЕПЛИКАЦИИ
И ПАТОГЕНЕЗА К ПОДХОДАМ ТЕРАПИИ**

УДК 616-006-022

**МЕХАНИЗМЫ ВЫЖИВАНИЯ ОПУХОЛЕВЫХ КЛЕТОК,
ИНФИЦИРОВАННЫХ ЦИТОМЕГАЛОВИРУСОМ**© 2022 г. Г. Р. Виноградская^а, *, А. В. Иванов^б, А. А. Куш^с^аПетербургский институт ядерной физики им. Б.П. Константинова, Национальный исследовательский центр “Курчатовский институт”, Гатчина, Ленинградская обл., 188300 Россия^бИнститут молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта Российской академии наук, Москва, 119991 Россия^сНациональный исследовательский центр эпидемиологии и микробиологии им. Н.Ф. Гамалеи Министерства здравоохранения Российской Федерации, Москва, 123098 Россия

*e-mail: gvinogradskaya@mail.ru

Поступила в редакцию 28.03.2022 г.

После доработки 19.04.2022 г.

Принята к публикации 19.04.2022 г.

Частое обнаружение ДНК и белков цитомегаловируса (ЦМВ) в злокачественных опухолях ставит вопрос об участии вируса в развитии онкологических заболеваний. Показано, что продукты генов ЦМВ могут регулировать процессы, связанные с ключевыми признаками рака. Роль ЦМВ как онкогенного фактора, способствующего злокачественной трансформации клеток, только начинает проясняться, однако его способность усиливать опухолевую прогрессию уже признается многими исследователями. В обзоре рассмотрена роль вирусных факторов, а также клеточных молекулярных путей, в устойчивости инфицированных ЦМВ опухолевых клеток к терапии. ЦМВ ингибирует апоптоз опухолевых клеток, что не только способствует опухолевой прогрессии, но и снижает чувствительность клеток к противоопухолевой терапии. Показано, что аутофагия может способствовать либо выживанию опухолевых клеток разного типа, либо их гибели. ЦМВ-инфекция при лейкозе индуцирует “защитную” аутофагию, которая подавляет апоптоз. Изучение роли вирусных факторов в формировании устойчивости опухолевых клеток к терапии и их взаимодействия с ключевыми путями гибели клеток необходимо для разработки средств, способных восстановить чувствительность опухолей к противоопухолевым препаратам.

Ключевые слова: цитомегаловирус, онкомодуляция, апоптоз, аутофагия, противоопухолевая терапия, резистентность к противоопухолевой терапии

DOI: 10.31857/S0026898422050135

ВВЕДЕНИЕ

Цитомегаловирус (ЦМВ) человека, как и другие представители семейства *Herpesviridae*, переходит после первичной инфекции в латентное состояние и пожизненно сохраняется в организме ~90% взрослого населения. Рак развивается лишь у небольшой части носителей такой инфекции, что затрудняет эпидемиологическую оценку роли вируса в развитии онкозаболевания. Однако за последние 20 лет выявлена высокая частота присутствия ДНК и белков ЦМВ в таких опухолях, как злокачественная глиома, рак предстательной и молочной железы, колоректальный рак и другие [1–7]. Так, например, неструктурные белки IE1/IE2 ЦМВ и структурный белок pp65 обнаружены приблизительно в 75% образцов рака молочной железы и/или метастазов в лимфатические узлы [8]. В связи с расхождениями представлений о присутствии ЦМВ в глиобластомах, недавно были проанализированы результаты 645

статей, в которых изучены 9444 клинических образца [9]. Сообщается, что иммуногистохимические методы обеспечивают надежное обнаружение белков ЦМВ в опухолях (84.2%), тогда как вирусные нуклеиновые кислоты методами ПЦР часто не выявлялись.

Наиболее важно понять роль цитомегаловирусной инфекции (ЦМВИ) в онкозаболеваниях. Является ли вирус только “пассажиrom” в опухолевых клетках или играет определенную роль и, если да, то какую? Рассмотрены механизмы, с помощью которых вирусы приводят к развитию опухоли, такие как экспрессия онкогенов, мутации, эпигенетические процессы, хроническое воспаление, нарушение метаболизма зараженной клетки [10]. ЦМВ производит более 200 белков, и только малое их количество необходимо для репликации вируса. Большинство вирусных белков вовлечено в изменение поведения клетки [11]. В многочисленных вирусологических исследованиях показа-

но, что продукты генов ЦМВ, особенно экспрессируемые в начале его жизненного цикла, могут регулировать процессы, связанные с ключевыми признаками рака [12]. Если роль ЦМВ как онкогенного фактора, способствующего злокачественной трансформации, только начинает проявляться [10, 13, 14], то его онкомодулирующие свойства, т.е. способность усиливать опухолевую прогрессию, уже признаются многими исследователями [15–17].

Ключевые признаки рака, проявляемые на разных стадиях развития опухоли, сформулированы в обзорах Hanahan и Weinberg [18, 19]: поддержание пролиферативного потенциала клеток и отсутствие контактного торможения их роста, спонтанное деление, активация ангиогенеза и метастазирования, резистентность или ингибирование иммунной системы организма. В последнее время воспалительный процесс в тканях, создающих микроокружение опухоли, стали рассматривать как еще один ключевой элемент прогрессии опухоли и метастазирования [20]. В основе этих изменений, кроме генетических мутаций, могут лежать регрессия — утрата клетками специализированной функции, эпигенетические изменения, влияющие на экспрессию генов, участие микробиоты и нейрональной сигнализации [21, 22].

Мутации, возникающие в результате определенных процессов повреждения и восстановления ДНК, длительное время считались одной из основных причин рака, так как они могут запускать активацию клеточных онкогенов, приводя, в конце концов, к злокачественной трансформации клетки. Однако в настоящий момент эта концепция существенно видоизменяется. Основная идея нового взгляда заключается в том, что рак — это не только генетическое, но и метаболическое заболевание. В активно обсуждаемых работах Seyfried и соавт. [23, 24] показано, что в начале клеточной трансформации происходит радикальное изменение метаболизма, благоприятствующее повышенному энергетическому снабжению и изменению способа генерации энергии, а также переключению метаболизма на биосинтез макромолекул, необходимых для роста и деления клеток. Otto Warburg в 20-х годах прошлого столетия выдвинул гипотезу, согласно которой причиной большинства видов рака является митохондриальная дисфункция, и в ходе злокачественной трансформации клетки переключаются с окислительного фосфорилирования на аэробный гликолиз. В настоящее время эта концепция развивается [25–27]. Показано, что ЦМВ репрограммирует инфицированные клетки в направлении Варбург-подобного метаболизма [28–30]. Однако стоит отметить, что эффект Варбурга в настоящее время рассматривается не как нарушение дыхатель-

ной активности митохондрий, а как разобщение этой активности и гликолиза [31].

В большинстве опухолей наблюдается массивное мутирование многих генов, а не активация отдельных критических онкогенов. Случайные мутации, вызванные активными формами кислорода (АФК) и азотными радикалами, должны активировать не только гены, благоприятствующие, но и препятствующие росту опухоли. Конверсия предраковой клетки в раковую должна вовлекать целую серию точно направленных этапов [32], чтобы включить механизмы выживания и подавить механизмы клеточной гибели. Вероятность того, что это может быть достигнуто случайными мутациями, представляется нелогичной. В то же время вирусы запрограммированы на проведение подобных процессов в инфицированных клетках, чтобы обеспечить не только репликацию, но и продолжительное выживание вируса в латентном состоянии [10]. Латентный вирус неактивен только в отношении воспроизведения вирусных частиц, но не продукции онкомодулирующих белков. Кроме того, в опухолях обнаруживаются преимущественно мутантные штаммы ЦМВ, которые не могут эффективно реплицироваться в трансформированных клетках. Это может объяснить, почему вирусная ДНК не всегда выявляется с помощью ПЦР. Однако вирусные белки могут участвовать в онкомодулирующих и онкогенных процессах.

В настоящее время признается, что поведение опухоли во многом зависит от стволовых опухолевых клеток и микроокружения опухоли [33, 34]. Показано, что стволовые клетки особенно чувствительны к ЦМВ, они служат резервуаром для персистенции и реактивации вируса. Экспрессия вирусных генов в стволовых клетках увеличивает вероятность возникновения мутаций [35], активировать фактически все существенные для онкогенеза сигнальные пути и вызывает критические метаболические изменения [36, 37], превращая стволовые клетки в опухоль-иницирующие [38]. Несмотря на то, что только небольшое число клеток в опухоли действительно инфицированы вирусом, освобождение вирусных белков в стволовых и стромальных клетках микроокружения изменяет поведение и агрессивность опухоли, объясняет, почему инфицирование всех клеток опухоли не является необходимым для онкомодуляции. В настоящее время считается, что важную роль в межклеточной коммуникации играют экзосомы. Одним из механизмов системного воздействия ЦМВ на неинфицированные клетки может быть секреция вирусных белков и генетического материала инфицированными клетками в составе экзосом [39].

Таким образом, онкомодуляция клеток вытекает из способности ЦМВ нарушать разнообраз-

ные пути трансдукции сигнала, что ведет к ускорению клеточной пролиферации, блокированию гибели клеток, ангиогенезу, повышению клеточной подвижности и адгезивности, а также к созданию провоспалительного микроокружения. Сочетание этих свойств приводит к увеличению злокачественности опухоли. Связывание ЦМВ с клеточными рецепторами инициирует первую волну модуляции сигнальной трансдукции, затем следуют эффекты, вызываемые компонентами вириона, и, наконец, эффекты продуктов вирусных генов [14].

Выживание инфицированных клеток и преодоление программ гибели зараженных клеток под действием противоопухолевых средств — одна из важнейших проблем, не решенных в настоящее время. Эти проблемы будут рассмотрены нами на примере наиболее изученной программы гибели клеток — апоптоза. Ингибирующее воздействие ЦМВ на апоптоз опухолевых клеток не только способствует дальнейшей прогрессии опухоли, но и снижает чувствительность к противоопухолевой терапии. Устойчивость к апоптотическим стимулам способствует неконтролируемому выживанию и экспансии опухолевых клеток, накоплению мутаций и дальнейшему озлокачествлению. Потеря чувствительности к противоопухолевой терапии и иммуноопосредованной деструкции опухолевых клеток считается основной причиной неблагоприятного исхода у онкобольных.

ЦИТОМЕГАЛОВИРУС ПОДАВЛЯЕТ АПОПТОЗ В ОПУХОЛЕВЫХ КЛЕТКАХ

Выделяют внешний и внутренний пути активации апоптоза. Внешний путь осуществляется через взаимодействие внешних сигнальных молекул с клеточными рецепторами, которое либо запускает, либо блокирует апоптоз. Внутренний апоптотический путь опосредуется внутриклеточными сигналами стресса, в том числе обусловленными противоопухолевой терапией. Конечным этапом обоих путей является активация специфических эффекторных протеаз — каспаз 3, 6 и 7. Именно они узнают критические клеточные субстраты, разрушение которых приводит к морфологическим и функциональным изменениям, ассоциированным с апоптозом. Фактически каждый из этих механизмов ЦМВ может использовать не только для супрессии апоптоза, но и для ингибирования других механизмов гибели клеток. ЦМВ применяет стратегию мимикрии — кодирует “фальш-лиганды” и “фальш-рецепторы” для препятствия иммунным механизмам [40], способен активировать ингибиторы каспаз, разнонаправленно влиять на активность клеточных белков семейства BCL-2, синтезировать собственные гомологи этих белков, влиять на репертуар клеточных микроРНК и синтезировать собственные микроРНК,

которые контролируют защитный механизм клетки [17, 41, 42].

Вирусный белок vICA (viral inhibitor of caspase activation), кодируемый геном *UL36* ЦМВ, защищает клетки от апоптоза, запускаемого рядом рецепторов смерти, включая TNFR1, FAS/CD95 или рецептор Trail. vICA прямо взаимодействует с каспазным продоменом, ингибируя активацию каспазы 8, промежуточной в каскаде активации эффекторных протеаз 3, 6 и 7 [43]. Таким образом, vICA функционально сходен с клеточными ингибиторами протеаз, несмотря на отсутствие гомологичных последовательностей и структурного сходства между ними. При этом в инфицированных клетках также происходит активация клеточного ингибитора каспазы 8 (FLIP), в которой участвует сверххраненный белок IE2 ЦМВ [44].

Для предотвращения ответа клетки на проапоптотические сигналы ЦМВ использует разнообразные стратегии, меняющиеся по ходу инфекции. Кроме прямого воздействия на каспазу, связывание лигандов с соответствующими рецепторами может опосредованно влиять на апоптоз. Так, взаимодействие TNF α с TNFR1 активирует пути сигнальной трансдукции, которые, в конце концов, приводят к индукции двух основных регуляторов клеточной пролиферации, апоптоза и дифференцировки — ядерного фактора каппа-B (NF- κ B) и киназы c-JUN. Показано, что ЦМВ индуцирует экспрессию TNF α , одновременно вызывая изменение локализации его рецепторов (TNFR1), что позволяет дифференцированно влиять на неинфицированные окружающие клетки и при этом защищать инфицированную клетку от апоптоза [45]. Регуляцию лигандов, направленную на повышение активности, можно рассматривать как тактику, которая позволяет вирусу избегать апоптоза, индуцированного инфильтрирующими иммунными клетками с соответствующими поверхностными рецепторами. При этом нарушение экспонирования рецепторов на клеточной мембране инфицированных клеток ведет к исключению индуцированной TNF α активности Jun-киназы.

Другой механизм влияния ЦМВ на сигнально-рецепторный путь активации апоптоза может быть связан с вирусным белком, кодируемым геном *UL-144*. Продукт этого гена является ортологом и конкурентом клеточного рецептора TNFR. В отличие от TNFR, который связывается с разнообразными лигандами (LIGHT, LT α , VTLA, CD160 и gD ЦМВ) и может как активировать, так и ингибировать иммунный ответ, pUL144 связывает только VTLA, ингибируя активацию B- и T-клеток [46]. Показано также, что pUL144 действует как потенциальный активатор индуцированной NF- κ B транскрипции хемокина CCL22, который соединяется с рецептором супрессорных T-клеток и блокирует иммунный ответ [47].

ЦМВ отличается длительным периодом репродукции и широким клеточным тропизмом, поэтому он обладает множественными механизмами регуляции противовирусного ответа, ингибирующими апоптоз инфицированных клеток разного типа [48] и помогающими им избежать воздействия со стороны иммунной системы [49]. Продукты ряда вирусных генов ингибируют путь представления антигенов, блокируя апоптоз, запускаемый цитотоксическими Т-лимфоцитами (CTL) и естественными киллерными клетками (NK-клетками). Так, ген *US3*, локализованный в уникальном коротком районе вирусного генома, кодирует белок, который связывает и задерживает в эндоплазматическом ретикулуме молекулы главного комплекса гистосовместимости (МНС) I класса. Продукты генов *US2* и *US11* ЦМВ вызывают транслокацию этих молекул в цитозоль, где происходит их деградация. Вирусный белок *US6* блокирует транспорт антигенных пептидов в эндоплазматический ретикулум [50]. ЦМВ может быть задействован также и в нарушении представления антигенов, осуществляемого с помощью молекул МНС II класса [51, 50]. Гликопротеины, кодируемые генами *UL16*, *UL18* и *UL40* из уникального длинного района вирусного генома, помогают инфицированным клеткам избежать узнавания NK-клетками, осуществляющими неспецифические защитные функции на начальных этапах инфекции [52–54]. В инфицированных клетках опухоли ЦМВ стимулирует цитокины IL-10 и TGF- β [55] и даже создает свой собственный функциональный аналог IL-10. Ген *UL111A* ЦМВ кодирует ортолог IL-10 человека – *cmvIL-10*, который связывается с клеточным рецептором IL-10, активирует фактор транскрипции STAT3 и обладает высоким иммуносупрессирующим действием, в частности, путем подавления экспрессии белков МНС I и II. Латентно-ассоциированная изоформа *LAcmvIL-10* ингибирует клеточную микроРНК *miR-92a*, что ведет к активации хемокина *CCL8* и, в конечном счете, к ингибированию $CD4^+$ Т-клеток [56].

Таким образом, антиапоптотические механизмы ЦМВ, в которых участвует лиганд-рецепторный путь сигнальной трансдукции, могут быть частью стратегии, позволяющей вирусу уходить от иммунной “зачистки”.

Индукция апоптоза в ответ на разнообразные цитотоксические воздействия происходит обычно через внутренний сигнальный путь, связанный с нарушением проницаемости митохондриальной мембраны и высвобождением цитохрома С и других проапоптотических факторов из межмембранного пространства митохондрий в цитоплазму. В цитоплазме цитохром С совместно с АРАF1 и прокаспазой 9 образует апоптосому. В результате этого каскада реакций происходит активация каспазы 3 [57]. Другой выделяемый ми-

тохондриями проапоптотический фактор, белок АIF (apoptosis inducing factor), является основным эффектором собственного пути апоптоза, он индуцирует апоптотические реакции независимо от каспаз, из-за чего этот путь апоптоза называют также каспазанезависимым [58].

Центральную роль в контроле митохондриального пути апоптоза играют белки семейства BCL-2. Показано, что антиапоптотические члены этого семейства (BCL-2, BCL-X_L, BCL-W, MCL-1 и A1) стабилизируют митохондриальную мембрану и, следовательно, препятствуют высвобождению цитохрома С, тогда как проапоптотические (BAX, BAD, BAK, BIK, PUMA, NOXA и BID) дестабилизируют мембрану и способствуют освобождению цитохрома С. Опухолевый супрессор, белок p53, в свою очередь, участвует в регуляции активности BAX и других ключевых белков, вовлеченных в апоптоз, на уровне транскрипции и прямого взаимодействия в цитоплазме [59, 60]). Точный механизм участия белков семейства BCL-2 в этом процессе до конца не определен, хотя ряд экспериментальных фактов указывает на прямое влияние некоторых белков на изменение проницаемости митохондриальной мембраны через образование мегапор и их ингибирования другими белками семейства [61]. Показано также, что BCL-X_L может прямо связывать АРАF1 и блокировать его способность активировать прокаспазу 9 [57]. С другой стороны, с BCL-X_L может взаимодействовать и цитозольный цитохром С, нарушая функциональность апоптосомы [62]. Каким бы ни был механизм, сдвиг баланса в сторону антиапоптотических белков ведет к повышенной устойчивости клеток к апоптозу, индуцируемому цитотоксическими агентами или различными физиологическими стимулами, такими как стресс эндоплазматического ретикулума, нарушение гомеостаза ионов кальция в клетке, повреждение ДНК, лизосомный или окислительный стресс [63]. Следует отметить, что хотя в большинстве типов клеток внешний сигнальный путь апоптоза не опосредуется непосредственно митохондриями, он может также регулироваться с участием митохондрий через петлю обратной связи, в частности, посредством активации проапоптотического белка Bid инициаторной каспазой 8 [64].

Митохондриальный путь апоптоза, инициируемый разнообразными стимулами, не только опосредуется про- и антиапоптотическими белками семейства BCL-2, но и модулируется сигнальным путем PI3K/АКТ/mTOR. Сверхэкспрессия или активация протеинкиназы В (она же АКТ) наблюдается во многих злокачественных опухолях, где она служит основным медиатором клеточного выживания [65]. ЦМВ может влиять на внутренний путь активации апоптоза, воздействуя на эту киназу. Показано, что белки IE1 и

IE2 ЦМВ прямо активируют фосфатидилинозит-3-киназу (PI-3K) – первый компонент в цепи активации АКТ [66, 67]. Активация АКТ приводит к фосфорилированию и последующей репрессии таких белков, как BAD, каспаза 9 и факторы транскрипции, мишенями которых служат проапоптотические белки [68, 69]. В то же время АКТ может контролировать выживание клеток через фосфорилирование IκB (ингибитор NF-κB), что приводит к транслокации NF-κB в ядро и активации промоторов антиапоптотических генов [70]. Так, отмечено увеличение экспрессии *BCL-X_L* в инфицированных ЦМВ эндотелиальных клетках, а также экспрессии *BCL-2* в инфицированных клетках рака прямой кишки [68]. В клетках нейробластомы, персистентно инфицированных ЦМВ, активность *BCL-2* выше, а чувствительность к цитотоксическим препаратам этопозиду и цисплатину ниже, чем в неинфицированных клетках [71]. Конститутивно активная киназа АКТ спасает клетку от PTEN-опосредованного апоптоза [72]. Сверххранний белок IE1 ЦМВ, активируя NF-κB и АКТ, усиливает экспрессию еще одного регуляторного гена, *A20*, продукт которого защищает клетки от апоптоза, индуцированного разнообразными стимулами в клеточно-специфической манере [73].

Проникновение вируса в клетку происходит путем связывания вирусных гликопротеинов с интегринами и рецепторами эпидермального (EGFR) и тромбоцитарного (PDGFR) факторов роста [74, 75]. Повышенную экспрессию EGFR наблюдали в целом ряде злокачественных новообразований [76]. Показано, что белки ЦМВ pUL135 и pUL138 участвуют в тонкой настройке уровней этого рецептора на поверхности инфицированной клетки [77]. UL138-опосредованная стимуляция экспрессии EGFR в латентно инфицированных клетках предполагает, что вирусная регуляция этого рецептора вносит вклад в онкомодулирующие свойства ЦМВ [78]. PDGFR слабо экспрессируется в нормальных тканях, но сверхэкспрессируется во многих опухолях. Связывание вируса с рецепторами приводит к их фосфорилированию, что активирует путь PI-3K и индуцирует активируемую митогеном протеинкиназу (MAPK). Показано также, что вирусный гликопротеин B (gB), действуя в тандеме с gH, вызывает атипичную активацию АКТ, а, в итоге, подавляет апоптоз. В частности, активация АКТ, индуцированная гликопротеином gB ЦМВ, способствует выживанию моноцитов [79, 80]. Таким образом, ингибирование апоптоза начинается с момента самого первого взаимодействия вируса с клеткой.

ЦМВ может противодействовать апоптозу, активируя сигнальный путь RAS/RAF/MEK/ERK – наиболее хорошо изученный каскад митоген-активируемой протеинкиназы (MAPK), имеющий решающее значение для пролиферации, диффе-

ренцировки и выживания клеток [81, 82]. ЦМВ может влиять на этот путь, кодируя микроРНК miR-US5-2, которая подавляет EGF-опосредованные пути, включающие MEK/ERK и PI-3K. Оба эти пути (PI-3K и MEK/ERK) важны для выживания клеток и пролиферации. Показано, что miR-US5-2 способна регулировать экспрессию *UL138* во время инфекции, ослабляя передачу сигналов EGFR [83]. miR-US5-2 блокирует пролиферацию различных типов клеток с использованием множества механизмов. Согласно [83], микроРНК, кодируемые ЦМВ, играют важную роль, в модуляции клеточных сигнальных путей не только с целью изменения клеточной среды, но и для контроля экспрессии вирусных белков.

ЦМВ может влиять на внутренний сигнальный путь индукции апоптоза через белок vMIA (viral mitochondrial inhibitor of apoptosis), кодируемый геном *UL37x1*. Этот трансмембранный белок локализуется в митохондриях и ингибирует активацию митохондриальных мегапор, как и антиапоптотические члены семейства BCL-2. Клетки HeLa, экспрессирующие vMIA, устойчивы к апоптозу, индуцируемому доксорубицином. Белок vMIA, вопреки его структурному сходству с BCL-X_L, а также сходному влиянию на апоптоз, не гомологичен BCL-X_L. Однако подобно BCL-X_L vMIA связывается и секвестрирует проапоптотический белок BAX на внешней митохондриальной мембране [84], он является ингибитором апоптоза широкого спектра действия и супрессирует не только внутренний путь активации апоптоза, но и путь, индуцируемый доменами смерти. Кроме того, продукт вирусной открытой рамки считывания m41.1 представляет собой ингибитор ВАК-олигомеризации (vIBO), который совместно с vMIA полностью подавляет митохондриальный апоптоз [85] как зависимый, так и независимый от активации каспаз.

Уникален механизм, связанный с нетранслируемой РНК β2.7 ЦМВ, которая взаимодействует с внутренней митохондриальной мембраной и защищает клетку от апоптоза [86]. Интересно, что ЦМВ также индуцирует повышение уровня РНК HSA11, которая экспрессируется на высоком уровне в некоторых видах рака и опухолевых клеточных линиях. Показано, что в этой индукции участвуют одновременно два сверххранних вирусных белка, IE1 и IE2 [87]. Индукция HSA11, наблюдаемая как в инфицированных, так и в раковых клетках, предполагает зависимость обоих процессов от активируемых HSA11 регуляторных механизмов. Это, в свою очередь, позволяет рассматривать высокий уровень транскрипции этого сателлита в качестве онкомодулирующего вирусного фактора. Показано также, что РНК HSA11 может влиять на врожденный иммунитет, индуцируя IL-6 и TNFα [88].

Регуляция клеточных процессов с помощью микроРНК, имеет некоторые преимущества перед регуляцией с участием вирусных белков. В отличие от вирусных белков, микроРНК не иммуногенны, занимают меньше места в геноме и могут начать быстро действовать в клетках различного типа. Эти РНК помогают вирусу выживать, регулируя клеточные гены иммунной защиты, блокируя апоптоз и даже вступая в кооперацию с вирусными и клеточными белками, участвующими в тех же самых процессах [89]. МикроРНК ЦМВ обнаружена в астроцитарных опухолях [90] и глиобластомах [91], а также во внеклеточных везикулах сыворотки крови инфицированных детей [92]. Показано, что цитомегаловирусная miR UL-112 снижает экспрессию белка MСВ, лиганда рецепторов НК-клеток, что позволяет инфицированной клетке избежать апоптоза, индуцированного НК-клетками [93]. Функция этой микроРНК оценена экспериментально. Функции других микроРНК ЦМВ, способствующих выживанию инфицированных клеток, изучены с помощью биоинформатического поиска микроРНК генов, вовлеченных в апоптоз, и сравнения с гомологичными клеточными микроРНК, функции которых известны [94]. Поскольку для проявления онкогенных и онкомодулирующих свойств важна латентная или низкоуровневая инфекция, из всего репертуара вирусных микроРНК наибольший интерес представляют те, которые участвуют в установлении и поддержании генома ЦМВ в латентном состоянии. Впрочем, транскрипционное профилирование показало широкую, хотя и очень слабую экспрессию латентного генома [95]. Предполагается, что ключевыми регуляторами экспрессии белка во время латентного периода могут быть микроРНК ЦМВ [95].

Из 26 известных микроРНК ЦМВ только miR-UL70-3p и miR-UL148D эффективно связываются с 3'-UTR мРНК таких генов, как *MOAP1*, *PHAP* и *ERN1*. Все эти три гена играют роль в апоптозе. *MOAP1* (modulator of apoptosis1) участвует в митохондриальном и рецепторном апоптозе, поддерживая активацию *BAX* [96, 97] и передачу апоптотических сигналов, индуцируемых *TNF α* и *TRAIL* [98]. *PHAP1* контролирует формирование апоптосомы *CytC* + *Casp9* + *Araf-1* [99]. *ERN1* (endoplasmic reticulum-to-nucleus signaling 1) помогает индукции апоптоза через стресс эндоплазматического ретикулума [100]. Таким образом, вирусные микроРНК участвуют в основном в регуляции внутреннего пути активации апоптоза.

Многие проапоптотические белки семейства *BCL-2* контролируются транскрипционными факторами семейства *p53*, активация которых происходит под воздействием традиционных противоопухолевых препаратов. Белок *p53* вызывает задержку клеточного цикла, он может вызывать апоптоз при накоплении повреждений ДНК. Ответ зависит от

типа клеток. Продукт гена *ATM* (ataxia telangiectasia) принимает участие в процессе, который связывает обнаружение повреждений ДНК с повышенной регуляцией *p53*. Тетрамер *p53* функционирует как транскрипционный фактор, который связывается с консенсусными последовательностями в 5'-UTR генов-мишеней, к которым относятся уже упомянутые гены *BAX*, *PUMA*, *NOXA*. Повышение уровня *p53* ведет к увеличению экспрессии этих генов и, следовательно, к апоптозу. Однако эти белки не единственные эффекторы *p53*-опосредованного апоптоза.

Активация *p53* в клетках немелкоклеточного рака легких противоопухолевыми препаратами ингибирует передачу сигналов через рецептор эпидермального фактора роста (*EGFR*) и стимулирует образование АФК. АФК вызывают высвобождение цитохрома *C* из митохондрий, возможно, нарушая ионный транспорт в эти органеллы, что предполагает существование добавочного механизма *p53*-зависимой индукции апоптоза [101].

Показано, что белок *IE2* ЦМВ связывается с *p53* и подавляет его трансактиваторную функцию, важную для индукции апоптоза [70]. Экспрессия только одного сверххранного гена ЦМВ *IE1* в культурах клеток глиобластомы активировала сигнальный путь *PI-3K/AKT* и одновременно снижала уровни основных белков-супрессоров, принадлежащих к семействам *Rb* и *p53* [12, 102]. Однако есть основания считать, что для индукции апоптоза *p53* нуждается в других членах семейства, таких как *p63* и *p73* [103, 104].

ЦИТОМЕГАЛОВИРУС МОЖЕТ СНИЖАТЬ ЧУВСТВИТЕЛЬНОСТЬ К ХИМИОТЕРАПИИ, СДВИГАЯ БАЛАНС ИЗОФОРМ ТРАНСКРИПЦИОННОГО ФАКТОРА *p73*

Ген *p73* кодирует родственный *p53* белок. За последние годы показано, что именно *p73* является основной детерминантой чувствительности к химиотерапии, а мутантный белок *p53* делает клетки устойчивыми к противоопухолевым препаратам, образуя ингибиторные комплексы с *p73* [105, 106].

Белки семейства *p53* имеют общую структурную организацию, что позволяет им активировать одни и те же гены-мишени в опытах *in vitro*, такие как *BAX*, *PUMA*, *NOXA*, *BAD*, *BIK* и ген мембранного белка митохондрий *p53AIP1* [107]. В клетке каждый из этих белков выполняет, безусловно, свою специфическую функцию. Несмотря на структурное сходство белков этого семейства и их генов, функционально эти белки существенно различаются. Так, мутации в гене *p73* чрезвычайно редко встречаются в опухолях человека (0.5%), тогда как ген *p53* мутирован более чем в 50% опухолей. Более того, сверхэкспрессия

белка p73, наблюдаемая во многих опухолях, плохо согласуется с его ролью в качестве опухолевого супрессора.

Объяснение этого феномена лежит в структурной организации гена *p73*, обеспечивающей экспрессию как опухолесупрессорных, так и онкогенных изоформ его белка-продукта. В результате альтернативного сплайсинга 5'- и 3'-концов мРНК и использования альтернативных промоторов образуется несколько различных белковых продуктов. Укороченные с N-конца изоформы (DNp73) не имеют функционального трансктивирующего (ТА) домена и подавляют транскрипционную активность как белка p73 с полным трансктивирующим доменом, так и его гомолога p53, образуя с ними гетеротетрамеры. Кроме того, изоформа, транскрибируемая со второго (внутреннего) промотора, имеет собственную, хотя и слабую, транскрипционную активность в отношении генов, продукты которых обладают антиапоптотическим потенциалом – каспаза 2S, белок теплового шока HSP70 и др. [108, 109]. Показано также, что DNp73 локализуется непосредственно на сайте повреждения ДНК, взаимодействует с сенсорным белком 53BP1 и ингибирует активацию АТМ и последующее фосфорилирование p53, влияя на p53-зависимый апоптоз [110]. Таким образом, одни изоформы белка p73 обладают свойствами опухолевого супрессора, другие – свойствами онкогенного белка, и судьба клетки зависит от баланса этих изоформ [111–113].

В некоторых случаях ЦМВИ может изменять равновесие между супрессорными и онкогенными изоформами p73 – преобладание укороченных изоформ способствует устойчивости к противоопухолевым препаратам [113–115]. Показано также, что при ЦМВИ активируются молекулярные пути, включающие экспрессию транскрипционного фактора E2F1 [115], который может как активировать, так и ингибировать p73 [116]. Укороченные изоформы p73 противодействуют TAp73-зависимой транскрипции miR-205, контролирующей накопление E2F1 и действующей как негативный регулятор антиапоптотического белка BCL2 и АТР-связывающих кассетных транспортеров ABCA-2 и -5, ответственных за выведение из клетки цитотоксических противоопухолевых препаратов [117, 118]. Таким образом, резистентность инфицированных ЦМВ клеток, ассоциированная с высокими уровнями DNp73 и E2F1, может опосредоваться удалением ингибирующего воздействия miR205.

Белок DNp73, снижая экспрессию miR205, приводит к накоплению E2F1, который добавляет устойчивости к индуцированному апоптозу путем прямого взаимодействия с TAp73 и ингибирования его транскрипционной активности в отношении промоторов MDM2 и BAX. Показано,

что большие количества E2F1 индуцируют даже деградацию TAp73 [116]. Другой механизм, определяющий устойчивость инфицированных ЦМВ клеток к цитотоксическим препаратам, связан со способностью укороченных с N-конца вариантов p73 усиливать экспрессию еще одного трансмембранного белка – ABCB1/MDR1 (multidrug resistance), что достигается блокированием ингибирующего действия белка p53 на промотор гена *MDR1* [119].

Показано, что транскрипционная активность p73 сенсбилизирует клетки к апоптозу через рецепторы смерти в каспазозависимой манере. Активация p73 в результате либо обработки цисплатином, либо эктопической сверхэкспрессии индуцировала как транскрипцию, так и экспрессию FAS на клеточной мембране. Инфицирование ЦМВ ингибировало p73-зависимую сенсбилизацию к апоптозу. Механизм этого ингибирования связан с повышением экспрессии изоформы белка DNp73, укороченной с N-конца [120]. Поскольку FAS-зависимый апоптоз может участвовать в механизме удаления опухолевых клеток цитотоксическими лимфоцитами *in vivo*, вклад ЦМВИ в прогрессирование опухоли может быть существенным.

В норме при клеточном стрессе увеличивается количество TAp73 и его активность, что приводит, в конечном счете, к активации процессов, подавляющих рост опухоли, например, к задержке роста, индукции апоптоза, поддержанию генной целостности и предотвращению независимого от прикрепления роста клеток [111, 112, 121]. TAp73 действует не только в качестве транскрипционного фактора, он, как и p53, может влиять на апоптоз, прямо взаимодействуя с митохондриями [122]. Укороченные изоформы, транскрибируемые со второго внутреннего промотора, не только контролируют активность p73 и p53, но и сами находятся под их контролем. Промотор содержит очень эффективный элемент, связывающий p53/p73, который может усиливать транскрипцию с этого промотора, при этом создается петля обратной связи. Зависимая от p53/p73 активация внутреннего промотора противоречила бы проапоптотической роли этих белков в ответе на повреждение ДНК, если бы одновременно не индуцировалась быстрая и селективная деградация этой укороченной изоформы [123]. В связи с этим актуальным остается определение индуцируемых вирусом ключевых факторов, которые влияют на баланс супрессорных и онкогенных изоформ белка p73 и их связь с внутриклеточными молекулярными путями, участвующими в ответе опухолевых клеток на терапию.

Интересно, что наблюдаемый сдвиг баланса изоформ TA/DN в инфицированных ЦМВ опухолевых культурах не связан с изменением уров-

ней мРНК этих изоформ. Вероятно, это обусловлено с тем, что транскрипция обеих изоформ в опухолевых клетках значительно выше, чем в нормальных тканях [113]. Возможно, транскрипция DN-изоформы максимальна, что согласуется с гипометилированием внутреннего промотора в клетках рака легкого [124] и нейробластомы [125]. На клетках рака молочной железы показано, что состояние метилирования промоторов перенаправляет транскрипционный фактор NRF2, который регулирует экспрессию гена, с первого промотора на второй [126]. Поэтому влияние вируса на преобладание DN-изоформы в опухолевых клетках осуществляется, скорее всего, на белковом уровне.

Селективная деградация укороченной изоформы при генотоксическом стрессе может осуществляться через разные механизмы. Одним из ключевых регуляторов этого процесса может быть домен “безымянного пальца” убиквитинлигазы PIR2 – транскрипционной мишени белка TAp73 [127, 128]. Эта лигаза связывается с обеими изоформами p73, селективно стабилизирует TAp73 и деградирует DNp73, меняя соотношение этих изоформ. На баланс изоформ p73 могут влиять две другие убиквитинлигазы НЕСТ-типа: WWP2 и WWP1. WWP2 убиквитинирует TAp73-изоформу и направляет ее на деградацию в протеасому. С другой стороны, она может образовывать гетеродимер с убиквитинлигазой WWP1, что приводит к деградации изоформы DNp73. При генотоксическом стрессе фосфатаза PPM1G действует как молекулярный переключатель, вызывая изменение баланса между мономерным и гетеродимерным состоянием этих лигаз и, в конечном счете, изменение баланса изоформ p73 [129]. Использует ли ЦМВ эти пути для повышения выживаемости инфицированных клеток, неизвестно.

Однако селективная деградация DNp73 может происходить и по убиквитиннезависимому механизму, который регулируется системой метаболизма полиаминов. В его активации независимо участвуют три транскрипционных фактора – c-JUN, JUNB и FOSB из семейства активаторного белка AP-1, функционирующие при генотоксическом стрессе. Ингибируя транскрипцию гена ацетилполиаминоксидазы (АРАО), фермента катаболизма цикла полиаминов, эти факторы изменяют баланс индивидуальных полиаминов, что, в конечном счете, приводит к образованию функционально активного ингибитора биосинтеза соединений этого класса – антизима Az1. Этот небольшой ингибиторный белок связывается с DNp73 и направляет его на деградацию в протеасому [130]. Оказалось, что ЦМВ использует этот путь для формирования резистентности к доксорубину, повышая транскрипцию гена еще одного фермента катаболизма – спермидин/спермин-N¹-ацилтрансферазы (SSAT). Показано также, что

непосредственное ингибирование полиаминоксидаз их специфическим ингибитором MDL725.27 усиливает чувствительность инфицированных вирусом клеток моноцитарного лейкоза к апоптозу, индуцированному доксорубицином. При этом отношение TAp73/DNp73 сдвигается в сторону полноразмерной изоформы, а воздействие ЦМВ на SSAT оказывается недостаточным для защиты укороченной изоформы от деградации [113.]

ЦИТОМЕГАЛОВИРУС УЧАСТВУЕТ В РЕГУЛЯЦИИ АУТОФАГИИ В ОПУХОЛЕВЫХ КЛЕТКАХ

Вопросы о влиянии ЦМВ на аутофагию в зараженных клетках и о возможном участии ЦМВ в устойчивости опухолевых клеток к гибели путем аутофагии пока недостаточно изучены. Термин аутофагия впервые был введен в 1963 году. За открытие аутофагии и ее механизмов присуждены две Нобелевские премии. В 1974 г. Кристиану де Дюв (de Duve C.R.), Джорджу Паладе (Palade G.E.) и Альберу Клод (Claude A.) и в 2016 г. – Есинори Осуми (Ohsumi Y.). Аутофагия, направленная на устранение или переработку органелл или внутриклеточных компонентов с нарушенной структурой или функцией, активируется в критические моменты жизни клеток – при неблагоприятных изменениях внешней или внутренней среды, а также при проникновении патогенов. Спорным представляется мнение некоторых исследователей о том, что аутофагию следует рассматривать только как защитную реакцию. Однако имеющиеся данные указывают на необходимость гибели клеток путем аутофагии в процессе индивидуального роста и развития [131]. Более того, аутофагию рассматривают как один из механизмов запрограммированной гибели клеток наряду с апоптозом и другими программами гибели клеток [132, 133]. Сигнальные пути, участвующие в регуляции апоптоза и аутофагии, во многом перекрываются, приводя как к их конкуренции, так и к однонаправленному взаимодействию, хотя соотношение аутофагии и апоптоза пока до конца не изучено [134]. Сравнивая эти два явления, апоптоз можно охарактеризовать как “самоубийство” клетки, тогда как аутофагию – как “самопоедание” [135]. Под аутофагией в дальнейшем будем подразумевать макрофагию – один из типов аутофагии, который встречается чаще других типов, характеризуется формированием аутофагосом, регулируется широким спектром специальных белков (АТГ) и сигнальных путей, участвует в развитии, дифференцировке, старении и гибели клеток [136].

Процесс аутофагии включает несколько последовательных этапов, в результате которых образуются двухмембранные везикулы – аутофагосомы, затем – после слияния с лизосомами – аутолизосомы, в которых происходит деградация

их содержимого. К настоящему времени идентифицировано более 40 генов, связанных с аутофагией (*ATG*), 16–18 из которых относятся к основному механизму, поскольку они высококонсервативны у эукариот [137]. На начальном этапе — индукции — требуется экспрессия киназы ULK1 (*Unc-51-like kinase 1*) [138] и активация AMPK (*AMP activated protein kinase*) — регулирующей энергетический баланс как на клеточном уровне, так и на уровне всего организма, чтобы поддерживать энергетический гомеостаз [139]. ULK1 фосфорилирует многие мишени, которые важны для инициации аутофагии, в том числе белок *Beclin1*, кодируемый геном *BECN1*. *Beclin1* играет важную роль в регуляции образования мембраны аутофагосом, в созревании аутофагосом и в транспорте материала [140]. Несколько позже активируется цикл LC3 (*microtubule-associated protein light chain 3*) с образованием двух форм: LC3-I (цитозольной) и LC3-II (связанной с мембраной). Выявление и анализ LC3-II широко применяются для тестирования активности аутофагии, так как количество LC3-II прямо коррелирует с числом аутофагосом и служит индикатором степени образования зрелых аутофагосом [141].

В ходе эволюции вирусы, использующие аутофагию в своих интересах, нашли способы как ее активации, так и ингибирования [142, 143]. Описывая способность аутофагии воздействовать на вирусные компоненты и вызывать избирательную деградацию вирусных частиц, ввели термин вирофагия и заметили, что вирофагия может играть важную роль в репликации вирусов (коронавирусов, полиовируса, вируса гепатита С, вируса денге и ряда других вирусов) [144]. С другой стороны, предполагается, что индукция вирофагии может противодействовать инфекции на разных уровнях и может быть одним из полезных подходов в борьбе с вирусами, в том числе с новым коронавирусом SARS-CoV-2 [145]. Пока еще не сформировано единое мнение о про- и противовирусной роли аутофагии, что можно объяснить недостаточно полным пониманием взаимодействия вирусов и клеток-мишеней в ходе инфекционного процесса. (Информацию об ассоциации аутофагии с вирусами разных таксономических групп, можно найти в обзорах *Leonardi L.* и соавт. [146] и *Liang W.* и соавт. [147].)

Противоречивые результаты получены при оценке влияния ЦМВ на аутофагию. Неоднозначные результаты получены также при попытках ответить на вопрос, является ли аутофагия про- или противовирусным процессом [148–150]. Изучая влияние ЦМВ на фибробласты человека, *Zimmermann S.* и соавт. [151] показали, что рецептор аутофагии SQSTM1/p62 колокализуется с капсидами ЦМВ в ядре инфицированных клеток. Это наблюдение указывает на то, что аутофагия имеет место уже на ранних (ядерных) стадиях обра-

зования вирионов ЦМВ. Кроме того, связанная с мембраной форма LC3-II и несколько рецепторов аутофагии обнаружены в составе внеклеточных вирионов ЦМВ, что означает включение мембран аутофагосом в формирование вторичной оболочки вирионов вируса. Влияние аутофагии на репликацию ЦМВ анализировали [151], используя мутантный вирус, экспрессирующий доминантно-негативную версию клеточной протеазы ATG4B, которая необходима для расщепления LC3 и последующей конъюгации с мембраной. Репликация вирусного генома и высвобождение вируса в клетках, инфицированных мутантным вирусом, протекают более активно, чем в контрольных штаммах ЦМВ. Сделан вывод, что в ходе ЦМВИ аутофагия действует как противовирусный процесс. С другой стороны, блокирование аутофагии ингибирует экспрессию IE2 и репликацию вируса [152]. Это соответствует стратегии ЦМВ, направленной на поддержание выживания клетки-хозяина, которая гарантирует успешную репликацию вируса. Таким образом, в литически инфицированных ЦМВ клетках могут быть активны конкурентные процессы аутофагии. Вызванная вирусом аутофагия может препятствовать репликации ДНК ЦМВ и высвобождению вирусного потомства на ранних стадиях инфекции. На более поздних стадиях вирус использует мембраны аутофагосом для образования собственных вирионов, вследствие чего аутофагия может способствовать увеличению вирусного потомства и распространению инфекции.

Необходимо отметить, что существуют и данные, указывающие на подавление аутофагии белками вируса. Так, белки TRS1 и IRS1 ЦМВ взаимодействуют с клеточным белком *Beclin1* и подавляют аутофагию, причем для полного ингибирования аутофагии необходимо участие обоих вирусных белков [148]. Имеются также данные об участии в регуляции аутофагии сверххранного белка IE2 ЦМВ, так как усиление экспрессии этого белка после заражения ассоциировано с повышением таких показателей аутофагии, как LC3II и ATG3, тогда как снижение экспрессии этого белка сопровождается подавлением аутофагии [152].

Приведенные выше результаты получены при изучении клеток, чувствительных к ЦМВ и способных поддерживать литическую инфекцию. Интерес представляет роль аутофагии в латентно инфицированных ЦМВ клетках, которые составляют большинство в организме после первичной/острой инфекции, а также в опухолевых клетках. Этот вопрос изучали на модели клеток лейкоза человека ТНР-1, инфицированных ЦМВ [153]. Оказалось, что через 5 сут после заражения клеток ТНР-1 инфекция переходит в латентное состояние. Подсчет аутофагосом методом электронной микроскопии показал, что неинфицированные клетки (в контроле) содержали по две—

три везикулы, через 1 сут после заражения число везикул повышалось до 10–13, а через 5 и 9 сут составляло уже 80 и 30 везикул соответственно. Уровни экспрессии мРНК генов, связанных с аутофагией (*LC3*, *Beclin1*, *Atg5*), несколько отличались в процессе инфекции, но также увеличивались через 1 сут, достигали пика к 5 сут, затем снижались к 7–9 сут, оставаясь при этом повышенными. Полученные результаты показали, что после заражения клеток лейкоза ТНР-1 ЦМВ может индуцировать аутофагию, но после установления латентного состояния способность стимулировать аутофагию снижается. Сравнивая данные о подавлении аутофагии в литически инфицированных клетках [154] и об индукции аутофагии в клетках ТНР-1, предположили, что аутофагия участвует в установлении латентности. Индукция аутофагии в клетках глиомы U251 с использованием пути AMPK/Akt/mTOR приводила к установлению латентного состояния вируса простого герпеса (ВПГ-1) и обеспечивала их выживание [155]. Причины противоречий в данных о влиянии вируса на аутофагию не установлены. Возможно, это связано с различиями в действии инфекции в клетках разного происхождения на разных стадиях жизненного цикла вируса: при активной инфекции, переходе к латентности и при реактивации вируса.

АУТОФАГИЯ В УСТОЙЧИВОСТИ ОПУХОЛЕВЫХ КЛЕТОК К ХИМИОТЕРАПИИ

Аутофагия может играть двойную роль в канцерогенезе: защищать злокачественные клетки от повреждения и таким образом способствовать прогрессированию опухоли, либо вызывать аутофагическую гибель клеток, которая подавляет рост опухоли [156, 157].

Оценка роли аутофагии как механизма, влияющего на устойчивость к противоопухолевым средствам, привела к заключению, что следует различать летальную (токсическую) аутофагию, которая вызывает повышенную гибель клеток, и защитную аутофагию, которая считается основной причиной выживания, метастазирования и резистентности опухолевых клеток к химиотерапии [158]. Летальная аутофагия показана на примерах глиобластомы и гепатоцеллюлярной карциномы [159, 160], защитная – при раке поджелудочной железы, колоректальном раке, раке легкого [161–163]. Установлено, что в большинстве случаев аутофагия повышает устойчивость опухолевых клеток, в том числе стволовых (опухоль-иницирующих клеток), к традиционным методам химиотерапии [164–166].

Для восстановления чувствительности опухолевых клеток к химиотерапии необходимо понимать механизмы регуляции аутофагии и апоптоза,

которые пока изучены недостаточно. Тем не менее описано восстановление чувствительности клеток гепатокарциномы посредством регуляции аутофагии и апоптоза через путь PI3K/AKT/mTOR [167]. Подавление аутофагии приводило к восстановлению чувствительности клеток остеосаркомы и индукции апоптоза в результате дезактивации сигнального пути VEGFR2/STAT3/BCL-2 [168].

УЧАСТИЕ АУТОФАГИИ И АПОПТОЗА В РЕЗИСТЕНТНОСТИ ОПУХОЛЕВЫХ КЛЕТОК, ИНФИЦИРОВАННЫХ ЦИТОМЕГАЛОВИРУСОМ, К ХИМИОТЕРАПИИ

Острые и латентные вирусные инфекции способны регулировать аутофагию, влияя на устойчивость опухолевых клеток к противоопухолевой терапии [169]. Некоторые вирусы повышают выживаемость инфицированных клеток, подавляя апоптоз с использованием механизма, зависящего от аутофагии. Вирусы используют разные пути, такие как подавление ATG5 или *Beclin1*, а также индукция фосфорилирования STAT3 – важного транскрипционного фактора, участвующего в выживании опухолей [146].

Клетки лейкоза ТНР-1, чувствительные к противоопухолевому агенту доксорубину, после заражения ЦМВ приобретают устойчивость к антибиотикам. Выживание клеток коррелирует с подавлением путей апоптотической гибели клеток, в том числе со снижением активности инициаторных и эффекторных каспаз 8, 9 и 3, а также с предотвращением разрывов ДНК [113]. Учитывая данные об усилении аутофагии в клетках ТНР-1, инфицированных ЦМВ [153], можно предположить, что в установлении устойчивости клеток лейкоза к доксорубину участвует аутофагия, запуск которой препятствует апоптотической гибели клеток. Показано, что в формировании устойчивости принимают участие ферменты катаболизма биогенных полиаминов [113] и молекулярный путь PI3K/AKT/mTOR [170]. Восстановление чувствительности к доксорубину под действием ингибиторов mTOR можно объяснить связыванием этой киназы с ULK1 и подавлением взаимодействия ULK1 с AMPK, что приводит к инактивации ULK1 и подавлению аутофагии [171].

Данные о возможности преодоления резистентности опухолевых клеток привели к проведению более 50 доклинических и клинических испытаний препаратов, направленных на процессы аутофагии. В обзоре Galluzzi L и соавт. [172] подробно рассмотрены многочисленные фармакологические подходы, предложенные для модуляции аутофагии на различных этапах процесса и при различных патологических состояниях. Однако в настоящее время вмешательства, направленные на модуляцию аутофагии, несмотря на их большой

потенциал, не получили разрешения на клиническое применение. Действительно, хотя несколько лицензированных препаратов (рапамицин, хлорохин, гидроксихлорохин) активируют или ингибируют аутофагию, они не испытаны в достаточной степени, чтобы применяться именно с этой целью. Недавно проведен компьютерный анализ 1565 одобренных FDA лекарственных средств и определены три препарата (Ponatinib, Simeprevir и Nilotinib), которые потенциально могут использоваться для ингибирования аутофагии и проявления апоптоза в микроокружении опухоли [173]. Однако эти данные получены на неинфицированных линиях клеток.

В связи с рассмотренными данными о значительном количестве опухолей, содержащих ЦМВ в латентном состоянии, а также об обнаружении маркеров аутофагии в латентно инфицированных клетках (ТНР-1) и об участии вирусных белков в регуляции аутофагии, представляют интерес дальнейшие исследования роли вирусных факторов в устойчивости опухолевых клеток при латентном состоянии ЦМВ и при его реактивации в опухолевых клетках. Эти сведения необходимы для разработки средств, способных восстановить чувствительность опухолей к противоопухолевым препаратам.

В дальнейших исследованиях следует учитывать, что аутофагия и апоптоз могут работать синергично, чтобы вызвать запрограммированную гибель клеток, или антагонистично, чтобы обеспечить выживание клеток [174]. Следовательно, влияние аутофагии на чувствительность клеток может зависеть от того, какие пути взаимодействуют друг с другом. Реализация терапевтического потенциала модуляторов аутофагии позволит создать новые противоопухолевые препараты и повысить чувствительность опухолевых клеток к химиотерапии.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Приведенные в обзоре данные показывают, что ЦМВ вмешивается в процессы регуляции апоптоза и аутофагии, которые контролируют выживаемость/гибель клеток. Эта инфекция даже в латентной стадии приводит к повышению устойчивости опухолевых клеток к противоопухолевым агентам, ключевую роль в которой играют метаболические и редокс-зависимые процессы. Тем не менее известно несколько примеров преодоления вирус-ассоциированной резистентности при помощи низкомолекулярных ингибиторов ферментов метаболических и сигнальных путей, еще больше данных получено для неинфицированных клеток. Таким образом, это направление может стать одним из наиболее динамично развивающихся и позволит создать подходы к повышению эффективности терапии опухолей.

Работа поддержана Российским научным фондом (грант №19-14-00197).

В исследовании не использованы биологические материалы, полученные от людей или животных.

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Cobbs C.S., Harkins L., Samanta M., Gillespie G.Y., Bharara S., King P.H., Nabors L.B., Cobbs C.G., Britt W.J. (2002) Human cytomegalovirus infection and expression in human malignant glioma. *Cancer Res.* **62**, 3347–3350.
2. Samanta M., Harkins L., Klemm K., Britt W.J., Cobbs C.S. (2003) High prevalence of human cytomegalovirus in prostatic intraepithelial neoplasia and prostatic carcinoma. *J. Urol.* **170**, 998–1002. <https://doi.org/10.1097/01.ju.0000080263.46164.97>
3. Harkins L.E., Matlaf L.A., Soroceanu L., Klemm K., Britt W.J., Wang W., Bland K.I., Cobbs C.S. (2010) Detection of human cytomegalovirus in normal and neoplastic breast epithelium. *Herpesviridae.* **1**, 8. <https://doi.org/10.1186/2042-4280-1-8>
4. Taher C., de Boniface J., Mohammad A.A., Religa P., Hartman J., Yaiw K.C., Frisell J., Rahbar A., Söderberg-Naucler C. (2013) High prevalence of human cytomegalovirus proteins and nucleic acids in primary breast cancer and metastatic sentinel lymph nodes. *PLoS One.* **8**, e56795. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0056795>
5. Chen H.P., Chan Y.J. (2014) The oncomodulatory role of human cytomegalovirus in colorectal cancer: implications for clinical trials. *Front. Oncol.* **4**, 314. <https://doi.org/10.3389/fonc.2014.00314>
6. Paradowska E., Jabłońska A., Studzińska M., Wilczyński M., Wilczyński J.R. (2019) Detection and genotyping of CMV and HPV in tumors and fallopian tubes from epithelial ovarian cancer patients. *Sci. Rep.* **9**, 19935. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-56448-1>
7. Athanasiou E., Gargalionis A.N., Boufidou F., Tsakris A. (2021) The association of human herpesviruses with malignant brain tumor pathology and therapy: two sides of a coin. *Int. J. Mol. Sci.* **22**, 2250. <https://doi.org/10.3390/ijms22052250>
8. Touma J., Liu Y., Rahbar A., Pantalone M.R., Almazan N.M., Vetvik K., Söderberg-Naucler C., Geisler J., Sauer T. (2021) Detection of human cytomegalovirus proteins in paraffin-embedded breast cancer tissue specimens – a novel, automated immunohistochemical staining protocol. *Microorganisms.* **9**, 1059. <https://doi.org/10.3390/microorganisms9051059>
9. Peredo-Harvey I., Rahbar A., Söderberg-Naucler C. (2021) Presence of the human cytomegalovirus in glioblastomas—a systematic review. *Cancers (Basel).* **13**, 5051. <https://doi.org/10.3390/cancers13205051>

10. Soliman S.H.A., Orlacchio A., Verginelli F. (2021) Viral manipulation of the host epigenome as a driver of virus-induced oncogenes. *Microorganisms*. **9**, 1179. <https://doi.org/10.3390/microorganisms9061179>
11. Söderberg-Nauclér C. (2008) HCMV microinfections in inflammatory diseases and cancer. *J. Clin. Virol.* **41**, 218–223.
12. Cobbs C.S., Soroceanu L., Denham S., Zhang W., Kraus M.H. (2008) Modulation of oncogenic phenotype in human glioma cells by cytomegalovirus IE1-mediated mitogenicity. *Cancer Res.* **68**, 724–730.
13. Cobbs C.S. (2011) Evolving evidence implicates cytomegalovirus as a promoter of malignant glioma pathogenesis. *Herpesviridae*. **2**, 10.
14. Herbein G. (2018). The human cytomegalovirus, from oncomodulation to oncogenesis. *Viruses*. **10**, E408. <https://doi.org/10.3390/v10080408>
15. Söderberg-Nauclér C., Geisler J., Vetvik K. (2019) The emerging role of human cytomegalovirus infection in human carcinogenesis: a review of current evidence and potential therapeutic implications. *Oncotarget*. **10**, 4333–4347.
16. Blaylock R.I. (2019) Accelerated cancer aggressiveness by viral oncomodulation: new targets and newer natural treatments for cancer control and treatment. *Surg. Neurol. Int.* **10**, 199. https://doi.org/10.25259/SNI_361_2019
17. Baba R.E., Herbein G. (2021) Immune landscape of CMV infection in cancer patients: from “canonical” diseases toward virus-elicited oncomodulation. *Front. Immunol.* **12**, 730765. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2021.730765>
18. Hanahan D., Weinberg R.A. (2000) The hallmarks of cancer. *Cell*. **100**, 57–70. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(00\)81683-9](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(00)81683-9)
19. Hanahan D., Weinberg R.A. (2011) Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell*. **144**, 646–674. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2011.02.013>
20. Colotta F., Allavena P., Sica A., Garlanda C., Mantovani A. (2009) Cancer-related inflammation, the seventh hallmark of cancer: links to genetic instability. *Carcinogenesis*. **30**, 1073–1081. <https://doi.org/10.1093/carcin/bgp127>
21. Flavahan W.A., Gaskell E., Bernstein B.E. (2017) Epigenetic plasticity and the hallmarks of cancer. *Science*. **357**(6348), eaal2380. <https://doi.org/10.1126/science.aal2380>
22. Senga S.S., Grose R.P. (2021) Hallmarks of cancer—the new testament. *Open Biol.* **11**, 200358. <https://doi.org/10.1098/rsob.20.035>
23. Seyfried T.N., Flores R.E., Poff A.M., D’Agostino D.P. (2014) Cancer as a metabolic disease: Implications for novel therapeutics. *Carcinogenesis*. **35**, 515–527.
24. Seyfried T.N., Chinopoulos C. (2021) Can the mitochondrial metabolic theory explain better the origin and management of cancer than can the somatic mutation theory? *Metabolites*. **11**, 572. <https://doi.org/10.3390/metabo11090572>
25. Durah T., García-Romero N., Carrión-Navarro J., Madurga R., Mendivil A.O., Prat-Acin R., García-Cañamaque L., Ayuso-Sacido A. (2021) Beyond the Warburg effect: oxidative and glycolytic phenotypes coexist within the metabolic heterogeneity of glioblastoma. *Cells*. **10**, 202. <https://doi.org/10.3390/cells10020202>
26. Chen X., Yi C., Yang M.J., Sun X., Liu X., Ma H., Li Y., Li H., Wang C., He Y., Chen G., Chen S., Yu L., Yu D. (2021) Metabolomics study reveals the potential evidence of metabolic reprogramming towards the Warburg effect in precancerous lesions. *J. Cancer*. **12**, 1563–1574. eCollection, 2021. <https://doi.org/10.7150/jca.54252>
27. Vaupel P., Multhoff G. (2021) Revisiting the Warburg effect: historical dogma versus current understanding. *J. Physiol.* **599**, 1745–1757. <https://doi.org/10.1113/JP278810>
28. Munger J., Bajad S.U., Collier H.A., Shenk T., Rabinowitz J.D. (2006) Dynamics of the cellular metabolome during human cytomegalovirus infection. *PLoS Pathog.* **2**, e132.
29. Yu Y., Clippinger A.J., Alwine J.C. (2011) Viral effects on metabolism: changes in glucose and glutamine utilization during human cytomegalovirus infection. *Trends Microbiol.* **19**, 360–367. <https://doi.org/10.1016/j.tim.2011.04.002>
30. Williamson C.D., DeBiasi R.L., Colberg-Poley A.M. (2012) Viral product trafficking to mitochondria, mechanisms and roles in pathogenesis. *Infect. Disord. Drug Targets*. **12**, 18–37. <https://doi.org/10.2174/187152612798994948>
31. DeBerardinis R.J., Chandel N.S. (2020) We need to talk about the Warburg effect. *Nat. Metabolism*. **2**, 127–129.
32. Vogelstein B., Papadopoulos N., Velculescu V.E., Zhou S., Diaz L.A. J., Kinzler K.W. (2013) Cancer genome landscapes. *Science*. **339**(6127), 1546–1558. <https://doi.org/10.1126/science.1235122>
33. Hui L., Chen Y. (2015) Tumor microenvironment: sanctuary of the devil. *Cancer Lett.* **368**, 7–13. <https://doi.org/10.1016/j.canlet.2015.07.039>
34. Bajaj J., Diaz E., Reya T.J. (2020) Stem cells in cancer initiation and progression. *Cell Biol.* **219**, e201911053. <https://doi.org/10.1083/jcb.201911053>
35. Alonso-Álvarez S., Colado E., Moro-García M.A., Alonso-Arias R. (2021) Cytomegalovirus in hematological tumours. *Front. Immunol.* **12**, 703256. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2021.703256>
36. Soroceanu L., Matlaf L., Khan S., Akhavan A., Singer E., Bezrookove V., Decker S., Ghanny S., Hadaczek P., Bengtsson H., Ohlfestb J., Luciani-Torres M.G., Harkinsf L., Perryg A., Guoc H., Sotero-poulosc P., Charles S., Cobbs C.S. (2015) Cytomegalovirus immediate-early proteins promote stemness properties in glioblastoma. *Cancer Res.* **75**, 3065–3076. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-14-3307>
37. Teo W.H., Chen H.P., Huang J.C., Chan Y.J. (2017) Human cytomegalovirus infection enhances cell proliferation, migration and upregulation of EMT markers in colorectal cancer-derived stem cell-like cells.

- Int. J. Oncol.* **51**, 1415–1426.
<https://doi.org/10.3892/ijo.2017.4135>
38. Li J.-W., Yang D., Yang D., Chen Z., Miao J., Liu W., Wang X., Qiu Z., Jin M., Shen Z. (2017) Tumors arise from the excessive repair of damaged stem cells. *Med. Hypotheses*. **102**, 112–122.
<https://doi.org/10.1016/j.mehy.2017.03.005>
 39. Zakaria S., Arakelyan A., Palomino R.A.Ñ., Fitzgerald W., Vanpouille C., Lebedeva A., Schmitt A., Bomsel M., Brittg W., Margolis L. (2018) Human cytomegalovirus-infected cells release extracellular vesicles that carry viral surface proteins. *Virology*. **524**, 97–105.
 40. McSharry B.P., Avdic S., Slobedman B. (2012) Human cytomegalovirus encoded homologs of cytokines, chemokines and their receptors: roles in immunomodulation. *Viruses*. **4**, 2448–2470.
<https://doi.org/10.3390/v4112448>
 41. Fu M., Gao Y., Zhou Q., Zhang Q., Peng Y., Tian K., Wang J., Zheng X. (2014) Human cytomegalovirus latent infection alters the expression of cellular and viral microRNA. *Gene*. **536**(2), 272–278.
 42. Buzdin A.A., Artcibasova A.V., Fedorova N.E., Suntsova M.V., Garazha A.V., Sorokin M.I., Allina D., Shalatonin M., Borisov N.M., Zhavoronkov A.A., Kovalchuk I., Kovalchuk O., Kushch A.A. (2016) Early stage of cytomegalovirus infection suppresses host microRNA expression regulation in human fibroblasts. *Cell Cycle*. **15**, 3378–3389.
<https://doi.org/10.1080/15384101.2016.1241928>
 43. Skaletskaya A., Bartle L.M., Chittenden T., A. Louise McCormick A.L., Mocarski E.S., Victor S. Goldmacher V.S. (2001) A cytomegalovirus-encoded inhibitor of apoptosis that suppresses caspase-8 activation. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*. **98**, 7829–7834.
 44. Chiou S.H., Yang Y.P., Lin J.C., Hsu C.H., Jhang H.C., Yang Y.T., Lee C.H., Ho L.L., Hsu W.M., Ku H.H., Chen S.J., Chen S.S., Chang M.D., Wu C.W., Juan L.J. (2006) The immediate early 2 protein of human cytomegalovirus (HCMV) mediates the apoptotic control in HCMV retinitis through up-regulation of the cellular FLICE-inhibitory protein expression. *J. Immunol.* **177**, 6199–6206.
<https://doi.org/10.4049/jimmunol.177.9.6199>
 45. Baillie J., Sahlender D.A., Sinclair J.H. (2003) Human cytomegalovirus infection inhibits tumor necrosis factor alpha (TNF- α) signaling by targeting the 55-kilodalton TNF- α receptor. *J. Virol.* **77**, 7007–7716.
 46. Bitra A., Nemcovicová I., Picarda G., Doukov T., Wang J., Chris A., Benedict C.A., Zajonc D.M. (2019) Structure of human cytomegalovirus UL144, an HVEM orthologue, bound to the B and T cell lymphocyte attenuator. *J. Biol. Chem.* **294**, 10519–10529.
 47. Poole E., King C.A., Sinclair J.H., Alcamí A. (2006) The UL144 gene product of human cytomegalovirus activates NF κ B via a TRAF6-dependent mechanism. *EMBO J.* **25**, 4390–4399.
 48. Andoniou C.E., Degli-Esposti M.A. (2006) Insights into the mechanisms of CMV-mediated interference with cellular apoptosis. *Immun. Cell Biol.* **84**, 99–106.
 49. Cox M., Kartikasari A.E.R., Gorry P.R., Flanagan K.L., Plebanski M. (2021) Potential impact of human cytomegalovirus infection on immunity to ovarian tumours and cancer progression. *Biomedicines*. **9**, 351.
<https://doi.org/10.3390/biomedicines9040351>
 50. Craig R.R., Salcedo S.P., Gorvel J.-P.E. (2006) Pathogen–endoplasmic-reticulum interactions: in through the out door. *Nat. Rev. Immunol.* **6**, 137–147.
 51. Johnson D.C., Hegde N.R. (2002) Inhibition of the MHC class II antigen presentation pathway by human cytomegalovirus. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* **269**, 101–115.
 52. Johnsen J.I., Baryawno N., Söderberg-Nauclér C. (2011) Is human cytomegalovirus a target in cancer therapy? *Oncotarget*. **2**, 1329–1338.
 53. Wilkinson G.W., Tomasec P., Stanton R.J., Armstrong M., Prod'homme V., Aicheler R., McSharry B.P., Rickardsa C.R., Cochrane D., Llewellyn-Lacey S., Wang E.C., Griffin C.A., Davison A.J. (2008) Modulation of natural killer cells by human cytomegalovirus. *J. Clin. Virol.* **41**, 206–212.
 54. Berry R., Watson G.M., Jonjic S., Degli-Esposti M.A., Rossjohn J. (2020) Modulation of innate and adaptive immunity by cytomegaloviruses. *Nat. Rev. Immunol.* **20**, 113–127.
<https://doi.org/10.1038/s41577-019-0225-5>
 55. Dziurzynski K., Wei J., Qiao W., Hatiboglu M.A., Kong L.Y., Wu A., Wang Y., Cahill D., Levine N., Prabhu S., Rao G., Sawaya R., Heimberger A.B. (2011) Glioma-associated cytomegalovirus mediates subversion of the monocyte lineage to a tumor propagating phenotype. *Clin. Cancer Res.* **17**, 4642–4649.
<https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-11-0414>
 56. Chinta P., Garcia E.C., Tajuddin K.H., Akhidenor N., Davis A., Faure L., Spencer J.V. (2020) Control of cytokines in latent cytomegalovirus infection. *Pathogens*. **9**, 858.
<https://doi.org/10.3390/pathogens9100858>
 57. Würstle M.L., Rehm M.A. (2014) Systems biology analysis of apoptosome formation and apoptosis execution supports allosteric procaspase-9 activation. *J. Biol. Chem.* **289**, 26277–26289.
<https://doi.org/10.1074/jbc.M114.590034>
 58. Hevlera J.F., Chiozzia R.Z., Cabrera-Oreficec A., Brandtc U., Arnoldc S., Hecka A.J.R. (2021) Molecular characterization of a complex of apoptosis-inducing factor 1 with cytochrome c oxidase of the mitochondrial respiratory chain. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **118**, e2106950118.
<https://doi.org/10.1073/pnas.2106950118>
 59. Laptenko O., Prives C. (2006) Transcriptional regulation by p53: one protein, many possibilities. *Cell Death Differ.* **13**, 951–961.
<https://doi.org/10.1038/sj.cdd.4401916>
 60. Geng Y., Walls K.C., Ghosh AP., Akhtar R.S., Klocke B.J., Roth K.A. (2010) Cytoplasmic p53 and activated Bax regulate p53-dependent, transcription-independent neural precursor cell apoptosis. *J. Histochem. Cytochem.* **58**, 265–275.
<https://doi.org/10.1369/jhc.2009.954024>

61. Dadsena S., King L.E., García-Sáez A.J. (2021) Apoptosis regulation at the mitochondria membrane level. *Biochim. Biophys. Acta Biomembranes*. 1863, **183716**.
<https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2021.183716>
62. Bertini I., Chevance S., Del Conte R., Lalli D., Turano P. (2011) The anti-apoptotic Bcl-xL protein, a new piece in the puzzle of pytochrome C interactome. *PLoS One*. **6**(4), e18329.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0018329>
63. Singh R., Letai A., Sarosiek K. (2019) Regulation of apoptosis in health and disease: the balancing act of BCL-2 family proteins. *Nat. Rev. Mol. Cell. Biol.* **20**(3), 175–193.
<https://doi.org/10.1038/s41580-018-0089-8>
64. Kantari C., Walczak H. (2011) Caspase-8 and Bid: caught in the act between death receptors and mitochondria. *Biochim. Biophys. Acta*. **1813**, 558–563.
<https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2011.01.026>
65. Song M., Bode A.M., Dong Z., Lee M.H. (2019) AKT as a therapeutic target for cancer. *Cancer Res*. **79**, 1019–1031.
<https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-18-2738>
66. Johnson R.A., Wang X., Ma X.L., Huong S.M., Huang E.S. (2001) Human cytomegalovirus upregulates the phosphatidylinositol 3-kinase (PI3-K) pathway: inhibition of PI3-K activity inhibits viral replication and virus-induced signaling. *J. Virol.* **75**, 6022–6032.
<https://doi.org/10.1128/JVI.75.13.6022-6032.2001>
67. Yu Y., Alwine J.C. (2002) Human cytomegalovirus major immediate-early proteins and simian virus 40 large T antigen can inhibit apoptosis through activation of the phosphatidylinositide 3'-OH kinase pathway and the cellular kinase Akt. *J. Virol.* **76**, 3731–3738.
<https://doi.org/10.1128/jvi.76.8.3731-3738.2002>
68. Cinatl J. Jr., Vogel J.U., Kotchetkov R., Doerr H.W. (2004) Oncomodulatory signals by regulatory proteins encoded by human cytomegalovirus: A novel role for viral infection in tumor progression. *FEMS Microbiol. Rev.* **28**, 59–77.
<https://doi.org/10.1016/j.femsre.2003.07.005>
69. Kamada H., Nito C., Endo H., Chan P.H. (2007) Bad as a converging signaling molecule between survival PI3-K/Akt and death JNK in neurons after transient focal cerebral ischemia in rats. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* **27**, 521–533.
<https://doi.org/10.1038/sj.jcbfm.9600367>
70. Paulus C., Nevels M. (2009) The human cytomegalovirus major immediate-early proteins as antagonists of intrinsic and innate antiviral host responses. *Viruses*. **1**, 760–779.
<https://doi.org/10.3390/v1030760>
71. Cinatl J.Jr., Cinatl J., Vogel J.U., Kotchetkov R., Driever P.H., Kabickova H., Kornhuber B., Schwabe D., Doerr H.W. (1998) Persistent human cytomegalovirus infection induces drug resistance and alteration of programmed cell death in human neuroblastoma cells. *Cancer Res*. **58**, 367–372.
72. Porta C., Paglino C., Mosca A. (2014) Targeting PI3K/Akt/mTOR signaling in cancer. *Front. Oncol.* **4**, 64.
<https://doi.org/10.3389/fonc.2014.00064>
73. Abbasi A., Forsberg K., Bischof F. (2015) The role of the ubiquitin-editing enzyme A20 in diseases of the central nervous system and other pathological processes. *Front. Mol. Neurosci.* **8**, 21.
<https://doi.org/10.3389/fnmol.2015.00021>
74. Soroceanu L., Akhavan A., Cobbs C.S. (2008) Platelet-derived growth factor- α receptor activation is required for human cytomegalovirus infection. *Nature*. **455**, 391–395.
<https://doi.org/10.1038/nature07209>
75. Kabanova A., Marcandalli J., Zhou T., Bianchi S., Baxa U., Tsybovsky Y., Lilleri D., Silacci-Fregni C., Foglierini M., Fernandez-Rodriguez B.M., Druz A., Zhang B., Geiger R., Pagani M., Sallusto F., Kwong P.D., Corti D., Antonio Lanzavecchia A., Perez L. (2016) Platelet-derived growth factor- α receptor is the cellular receptor for human cytomegalovirus gHgLgO trimer. *Nat. Microbiol.* **8**, 16082.
<https://doi.org/10.1038/nmicrobiol.2016.82>
76. Lindsey S., Langhans S.A. (2015) Epidermal growth factor signaling in transformed cells. *Int. Rev. Cell Mol. Biol.* **314**, 1–41.
<https://doi.org/10.1016/bs.ircmb.2014.10.001>
77. Buehler J., Zeltzer S., Reitsma J., Petrucelli A., Umashankar M., Rak M., Zagallo P., Schroeder J., Terhune S., Goodrum F. (2016) Opposing regulation of the EGF receptor: a molecular switch controlling cytomegalovirus latency and replication. *PLoS Pathog.* **12**(5), e1005655.
<https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1005655>
78. Goodrum F., Reeves M., Sinclair J., High K., Shenk T. (2007) Human cytomegalovirus sequences expressed in latently infected individuals promote a latent infection in vitro. *Blood*. **110**, 937–945.
<https://doi.org/10.1182/blood-2007-01-070078>
79. Cojohari O., Peppenelli M.A., Chan G.C. (2016) Human cytomegalovirus induces an atypical activation of Akt to stimulate the survival of short-lived monocytes. *J. Virol.* **90**, 6443–6452.
<https://doi.org/10.1128/JVI.00214-16>
80. Mahmud J., Miller M.J., Altman A.M., Chan G.C. (2020) Human cytomegalovirus glycoprotein-initiated signaling mediates the aberrant activation of Akt. *J. Virol.* **94**(16), e00167-20.
<https://doi.org/10.1128/JVI.00167-20>
81. Filippakis H., Spandidos D.A., Sourvinos G. (2010) Herpesviruses: hijacking the Ras signaling pathway. *Biochim. Biophys. Acta*. **1803**, 777–785.
<https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2010.03.007>
82. Barbosa R., Acevedo L.A., Marmorstein R. (2021) The MEK/ERK network as a therapeutic target in human cancer. *Mol. Cancer Res*. **19**, 361–374.
<https://doi.org/10.1158/1541-7786.MCR-20-0687>
83. Hancock M.H., Mitchell J., Goodrum F.D., Nelson J.A. (2020) Human cytomegalovirus miR-US5-2 down-regulation of GAB1 regulates cellular proliferation and UL138 expression through modulation of epidermal

- growth factor receptor signaling pathways. *mSphere*. **5**(4), e00582-20.
<https://doi.org/10.1128/mSphere.00582-20>
84. Maa J., Edlichb F., Bermejo G.A., Norrisb K.L., Youleb R.J., Tjandraa N. (2012) Structural mechanism of Bax inhibition by cytomegalovirus protein vMIA. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **109**, 20901–20906. www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.1217094110
 85. Pauleau A.-L., Larochette N., Giordanetto F., Scholz S.R., Poncet D., Zamzami N., Goldmacher V.S., Kroemer G. (2007) Structure–function analysis of the interaction between Bax and the cytomegalovirus-encoded protein vMIA. *Oncogene*. **26**, 7067–7080. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1210511>
 86. Reeves M.B., Davies A.A., McSharry B.P., Wilkinson G.W., Sinclair J.H. (2007) Complex I binding by a virally encoded RNA regulates mitochondria-induced cell death. *Science*. **316**, 1345–1348. <https://doi.org/10.1126/science.1142984>
 87. Nogalski M.T., Solovyov A., Kulkarni A.S., Desai N., Oberstein A., Levine A.J., Ting D.T., Shenk T., Greenbaum B.D. (2019) A tumor-specific endogenous repetitive element is induced by herpesviruses. *Nat. Commun.* **10**, 90. <https://doi.org/10.1038/s41467-018-07944-x>
 88. Tanne A., Muniz L.R., Puzio-Kuter A., Leonova K.I., Gudkov A.V., Ting D.T., Monasson R., Cocco S., Levine A.J., Bhardwaj N., Greenbaum B.D. (2015) Distinguishing the immunostimulatory properties of noncoding RNAs expressed in cancer cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **112**, 15154–15159. <https://doi.org/10.1073/pnas.1517584112>
 89. Gottwein E., Cullen B.R. (2008) Viral and cellular micro RNAs as determinants of viral pathogenesis and immunity. *Cell Host Microbe*. **3**, 375–387. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2008.05.002>
 90. Deshpande R.P., Panigrahi M., Chandrasekhar Y.B.V.K., Babu P.P. (2018) Profiling of microRNAs modulating cytomegalovirus infection in astrocytoma patients. *Neurol. Sci.* **39**, 1895–1902. <https://doi.org/10.1007/s10072-018-3518-8>
 91. Liang Q., Wang K., Wang B., Cai Q. (2017) HCMV-encoded miR-UL112-3p promotes glioblastoma progression via tumour suppressor candidate 3. *Sci. Rep.* **7**, 44705.
 92. Zhang J., Huang Y., Wang Q., Ma Y., Qi Y., Liu Z., Deng J., Ruan Q. (2020) Levels of human cytomegalovirus miR-US25-1-5p and miR-UL112-3p in serum extracellular vesicles from infants with HCMV active infection are significantly correlated with liver damage. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* **39**, 471–481. <https://doi.org/10.1007/s10096-019-03747-0>
 93. Stern-Ginossar N., Elefant N., Zimmermann A., Wolf D.G., Saleh N., Biton M., Horwitz E., Prokocimer Z., Prichard M., Hahn G., Goldman-Wohl D., Greenfield C., Yagel S., Hengel H., Altuvia Y., Margalit H., Mandelboim O. (2007) Host immune system gene targeting by a viral miRNA. *Science*. **317**, 376–381. <https://doi.org/10.1126/science.1140956>
 94. Babu S.G., Pandeya A., Verma N., Shukla N., Kumar R.V., Saxena S. (2014) Role of HCMV miR-UL70-3p and miR-UL148D in overcoming the cellular apoptosis. *Mol. Cell. Biochem.* **393**, 89–98. <https://doi.org/10.1007/s11010-014-2049-8>
 95. Diggins N.L., Skalsky R.L., Hancock M.H. (2021) Regulation of latency and reactivation by human cytomegalovirus miRNAs. *Pathogens*. **10**, 200. <https://doi.org/10.3390/pathogens10020200>
 96. Fu N.Y., Sukumaran S.K., Yu V.C. (2007) Inhibition of ubiquitin-mediated degradation of MOAP-1 by apoptotic stimuli promotes Bax function in mitochondria. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **104**, 10051–10056. www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.0700007104
 97. Tan C.T., Zhou Q.-L., Su Y.-C., Fu N.Y., Chang H.-C., Tao R.N., Sukumaran S.K., Baksh S., Tan Y.-J., Sabapathy K., Yu C.-D., Yu V.C. (2016) MOAP-1 mediates Fas-induced apoptosis in liver by facilitating tBid recruitment to mitochondria. *Cell Rept.* **16**, 174–185.
 98. Tan K.O., Fu N.Y., Sukumaran S.K., Chan S.L., Kang J.H., Chen B.S., Yu V.C. (2005) Map-1, is a mitochondrial effector of bax. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **50**, 14623–14628.
 99. Monian P., Jiang X. (2012) Clearing the final hurdles to mitochondrial apoptosis: regulation post cytochrome C release. *Exp. Oncol.* **34**, 185–191.
 100. Tabas I., Ron D. (2011) Integrating the mechanism of apoptosis induced by endoplasmic reticulum stress. *Nat. Cell. Biol.* **13**, 184–190. <https://doi.org/10.1038/ncb0311-184>
 101. Zhang Y., Han C.Y., Duan F.G., Fan X.-X., Yao X.-J., Parks R.J., Tang Y.-J., Wang M.-F., Liu L., Tsang B.K., Leung E.L.-H. (2019) p53 sensitizes chemoresistant non-small cell lung cancer via elevation of reactive oxygen species and suppression of EGFR/PI3K/AKT signaling. *Cancer Cell Int.* **19**, 188. [doi.org/https://doi.org/10.1186/s12935-019-0910-2](https://doi.org/10.1186/s12935-019-0910-2)
 102. Hwang F.S., Zhang Z., Cai H., Huang D.Y., Huang S.M., Cha C.Y., Huang E.S. (2009) Human cytomegalovirus IE1-72 protein interacts with p53 and inhibits p53-dependent transactivation by a mechanism different from that of IE2-86 protein. *J. Virol.* **83**, 12388–12398.
 103. Alexandrova E.M., Moll U.M. (2012) Role of p53 family members p73 and p63 in human hematological malignancies. *Leuk. Lymphoma*. **53**, 2116–2129. <https://doi.org/10.3109/10428194.2012.684348>
 104. Rozenberg J.M., Zvereva S., Dalina A., Blatov I., Zubarev I., Luppov D., Bessmertnyi A., Romanishin A., Alsoulaiman L., Kumeiko V., Kagansky A., Melino G., Ganini C., Barlev N.A. (2021) The p53 family member p73 in the regulation of cell stress response. *Biol. Direct.* **16**, 23.
 105. Lunghi P., Costanzo A., Mazzerla L., Rizzoli V., Massimo Levrero M., Bonati A. (2009) The p53 family protein p73 provides new insights into cancer chemosensitivity and targeting. *Clin. Cancer Res.* **15**, 6495–6502.
 106. Hong B., Prabhu V.V., Zhang S., van den Heuvel A.P.J., Dicker D.T., Kopelovich L., El-Deiry W.S. (2014) Prodigiosin rescues deficient p53 signaling and anti-

- tumor effects via up-regulating p73 and disrupting its interaction with mutant p53. *Cancer Res.* **74**, 1153–1165.
<https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-13-0955>
107. Pietsch E.C., Sykes S.M., McMahon S.B., Murphy M.E. (2008) The p53 family and programmed cell death. *Oncogene.* **27**, 6507–6521.
 108. Toh W.H., Logette E., Corcos L., Sabapathy K. (2008) TAp73b and DNp73b activate the expression of the pro-survival caspase-2S. *Nucl. Acids Res.* **36**, 4498–4509.
 109. Tanaka Y., Kameoka M., Itaya A., Ota K., Yoshihara K. (2004) Regulation of HSF1-responsive gene expression by N-terminal truncated form of p73. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **317**, 865–872.
<https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2004.03.124>
 110. Wilhelm M.T., Rufini A., Wetzel M.K., Tsuchihara K., Inoue S., Tomasini R., Itie-Youten A., Wakeham A., Arsenian-Henriksson M., Melino G., Kaplan D.R., Miller F.D., Mak T.W. (2010) Isoform specific p73 knockout mice reveal a novel role for delta Np73 in the DNA damage response pathway. *Genes Dev.* **24**, 549–560.
 111. Виноградская Г.Р. (2013) Белок p73 в канцерогенезе и ответе на противоопухолевую терапию. *Вопросы онкологии.* **59**(2), 42–48.
 112. Engelmann D., Meier C., Alla V., Putzer B.M. (2015) A balancing act: orchestrating amino-truncated and full-length p73 variants as decisive factors in cancer progression. *Oncogene.* **34**, 4287–4299.
 113. Fedorova N.E., Chernoryzh Y.Y., Vinogradskaya G.R., Emelianova S.S., Zavalysheva L.E., Yurlov K.I., Zakirova N.F., Verbenko V.N., Kochetkov S.N., Kushch A.A., Ivanov A.V. (2019) Inhibitor of polyamine catabolism MDL72.527 restores the sensitivity to doxorubicin of monocytic leukemia THP-1 cells infected with human cytomegalovirus. *Biochimie.* **158**, 82–89.
<https://doi.org/10.1016/j.biochi.2018.12.012>
 114. Allart S., Martin H., Detraives C., Terrasson J., Caput D., Davrinche C. (2002) Human cytomegalovirus induces drug resistance and alteration of programmed cell death by accumulation of DN-p73. *J. Biol. Chem.* **277**, 29063–29068.
 115. Емельянова С.С., Чернорыж Я.Ю., Юрлов К.И., Федорова Н.Е., Иванов А.В., Кочетков С.Н., Вербенко В.Н., Куш А.А., Виноградская Г.Р. (2018) Участие транскрипционных факторов E2F1 и P73 в формировании резистентности к доксорубину опухолевых клеток THP-1, инфицированных цитомегаловирусом человека. *Цитология.* **60**, 527–530.
 116. Ozaki T., Okoshi R., Ono S., Kubo N., Nakagawara A. (2009) Deregulated expression of E2F1 promotes proteolytic degradation of tumor suppressor p73 and inhibits its transcriptional activity. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **387**, 143–148.
 117. Alla V., Kowtharapu B.S., Engelmann D., Emmrich S., Schmitz U., Steder M., Pulzer B.M. (2012) E2F1 confers anticancer drug resistance by targeting ABC transporter family members and Bcl-2 via the p73/DNp73-miR205 circuitry. *Cell Cycle.* **11**, 3067–3078.
 118. Ferrari E., Gandellini P. (2020) Unveiling the ups and downs of miR-205 in physiology and cancer: transcriptional and post-transcriptional mechanisms. *Cell Death Dis.* **11**, 980.
<https://doi.org/10.1038/s41419-020-03192-4>
 119. Vilgelm A., Wei J.X., Piazuolo M.B., Washington M.K., Prassolov V., El-Rifai W., Zaika A. (2008) Δ Np73 α regulates MDR1 expression by inhibiting p53 function. *Oncogene.* **27**, 2170–2176.
<https://doi.org/10.1038/sj.onc.1210862>
 120. Terrasson J., Allart S., Martin H., Lulé J., Haddada H., Caput D., Davrinche C. (2005) P73-dependent apoptosis through death receptor: impairment by human cytomegalovirus infection. *Cancer Res.* **65**, 2787–2794.
 121. Logotheti S., Richter C., Murr N., Spitschak A., Marquardt S., Pützer B.M. (2021) Mechanisms of functional pleiotropy of p73 in cancer and beyond. *Front. Cell. Dev. Biol.* **9**, 737735.
<https://doi.org/10.3389/fcell.2021.737735.34650986>
 122. Liu T., Roh S.E., Woo J.A., Ryu H., Kang D.E. (2013) Cooperative role of RanBP9 and P73 in mitochondria-mediated apoptosis. *Cell Death Dis.* **4**, e476.
 123. Maisse C., Munarriz E., Barcaroli D., Melino G., De Laurenzi V. (2004) DNA damage induces the rapid and selective degradation of the DNp73 isoform, allowing apoptosis to occur. *Cell Death Differ.* **11**, 685–687.
 124. Daskalos A., Logotheti S., Markopoulou S., Xinarianos G., Gosney J.R., Kastania A.N., Zoumpourlis V., Field J.K., Liloglou T. (2011) Global DNA hypomethylation-induced DeltaNp73 transcriptional activation in non-small cell lung cancer. *Cancer Lett.* **300**, 79–86.
 125. Casciano I., Banelli B., Croce M., Allemanni G., Ferrini S., Tonini G.P., Ponzoni M., Romani M. (2002) Role of methylation in the control of DeltaNp73 expression in neuroblastoma. *Cell Death Differ.* **9**, 343–345.
 126. Lai J., Nie W., Zhang W., Wang Y., Xie R., Wang Y., Gu J., Xu J., Song W., Yang F., Huang G., Cao P., Guan X. (2014) Transcriptional regulation of the p73 gene by Nrf-2 and promoter CpG methylation in human breast cancer. *Oncotarget.* **5**, 6909–6922.
 127. Sayan B.S., Yang A.L., Conforti F., Tucci P., Piro M.C., Browne G.J., (2010) Differential control of TAp73 and DNp73 protein stability by the ring finger ubiquitin ligase PIR2. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **107**, 12877–12882.
 128. Taebunpakul P., Sayan B.S., Flinterman M., Klarrit P., Gäken J., Odell E.W., Melino G., Tavassoli M. (2012) Apoptin induces apoptosis by changing the equilibrium between the stability of TAp73 and Δ Np73 isoforms through ubiquitin ligase PIR2. *Apoptosis.* **17**, 762–776.
<https://doi.org/10.1007/s10495-012-0720-7>
 129. Chaudhary N., Maddika S. (2014) WWP2-WWP1 ubiquitin ligase complex coordinated by PPM1G maintains the balance between cellular p73 and DNp73 levels. *Mol. Cell. Biol.* **34**, 3754–3764.

130. Bunjobpol W., Dulloo I., Igarashi K., Concin N., Matsuo K., Sabapathy K. (2014) Suppression of acetyl polyamine oxidase by selected AP-1 members regulates DNP73 abundance: mechanistic insights for overcoming DNP73-mediated resistance to chemotherapeutic drugs. *Cell Death Differ.* **21**, 1240–1249.
131. Cao W., Li J., Yang K., Cao D. (2021) An overview of autophagy: mechanism, regulation and research progress. *Bull. Cancer.* **108**, 304–322.
<https://doi.org/10.1016/j.bulcan.2020.11.004>
132. Yu L., Wan F., Dutta S., Welsh S., Liu Z., Freundt E., Baehrecke E.H., Lenardo M. (2006) Autophagic programmed cell death by selective catalase degradation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **103**, 4952–4957.
<https://doi.org/10.1073/pnas.0511288103>
133. Cui J., Zhao S., Li Y., Zhang D., Wang B., Xie J., Wang J. (2021) Regulated cell death: discovery, features and implications for neurodegenerative diseases. *Cell Commun. Signal.* **19**, 120.
<https://doi.org/10.1186/s12964-021-00799-8>
134. Шляпина В.Л., Юртаева С.В., Рубцова М.П., Донцова О.А. (2021) На распутье: механизмы апоптоза и аутофагии в жизни и смерти клетки. *Acta Naturae.* **13**, № 2(49). 106–115.
135. Babaei G., Aziz S.G., Jaghi N.Z.Z. (2021) EMT, cancer stem cells and autophagy; the three main axes of metastasis. *Biomed. Pharmacother.* **133**, 110909.
<https://doi.org/10.1016/j.biopha.2020.110909>
136. Urbańska K., Orzechowski A. (2021) The secrets of alternative autophagy. *Cells.* **10**, 3241.
<https://doi.org/10.3390/cells10113241>
137. Gómez-Sánchez R., Rose J., Guimarães R., Mari M., Papinski D., Rieter E., Geerts W.J., Hardenberg R., Kraft C., Ungermann C., Reggiori F. (2018) Atg9 establishes Atg2-dependent contact sites between the endoplasmic reticulum and phagophores. *J. Cell. Biol.* **217**, 2743–2763.
<https://doi.org/10.1083/jcb.201710116>
138. Li X., He S., Ma B. (2020) Autophagy and autophagy-related proteins in cancer. *Mol. Cancer.* **19**(1), 12.
<https://doi.org/10.1186/s12943-020-1138-4>
139. Bujak A.L., Crane J.D., Lally J.S., Ford R.J., Kang S.J., Rebalka I.A., Green A.E., Kemp B.E., Hawke T.J., Schertzer J.D., Gregory R Steinberg G.R. (2015) AMPK activation of muscle autophagy prevents fasting-induced hypoglycemia and myopathy during aging. *Cell. Metab.* **21**, 883–890.
<https://doi.org/10.1016/j.cmet.2015.05.016>
140. Hill S.M., Wrobel L., Rubinsztein D.C. (2019) Post-translational modifications of Beclin 1 provide multiple strategies for autophagy regulation. *Cell Death Differ.* **26**, 617–629.
<https://doi.org/10.1038/s41418-018-0254-9>
141. Klionsky D.J., Abdelmohsen K., Abe A., et al. The consortium (2016) Guidelines for the use and interpretation of assays for monitoring autophagy (3rd edition). *Autophagy.* **12**, 1–222.
<https://doi.org/10.1080/15548627.2015.1100356.26799652>
142. Pradel B., Robert-Hebmann V., Espert L. (2020) Regulation of innate immune responses by autophagy: a goldmine for viruses. *Front. Immunol.* **11**, 578038.
<https://doi.org/10.3389/fimmu.2020.578038>
143. Sharma V., Verma S., Seranova E., Sarkar S., Kumar D. (2018) Selective autophagy and xenophagy in infection and disease. *Front. Cell. Dev. Biol.* **6**, 147.
<https://doi.org/10.3389/fcell.2018.00147>
144. Choi Y., Bowman J.W., Jung J.U. (2018) Autophagy during viral infection – a double-edged sword. *Nat. Rev. Microbiol.* **16**, 341–354.
<https://doi.org/10.1038/s41579-018-0003-6>
145. Mijaljica D., Klionsky D.J. (2020) Autophagy/virophagy: a “disposal strategy” to combat COVID-19. *Autophagy.* **16**, 2271–2272.
<https://doi.org/10.1080/15548627.2020.1782022>
146. Leonardi L., Sibéris S., Alifano M., Cremer I., Joubert P.E. (2021) Autophagy modulation by viral infections influences tumor development. *Front. Oncol.* **11**, 743780.
<https://doi.org/10.3389/fonc.2021.743780>
147. Liang W., Liu H., He J., Ai L., Meng Q., Zhang W., Yu C., Wang H., Liu H. (2021) Studies progression on the function of autophagy in viral infection. *Front. Cell. Dev. Biol.* **9**, 772965.
<https://doi.org/10.3389/fcell.2021.772965>
148. Mouna L., Hernandez E., Bonte D., Brost R., Amazit L., Delgui L.R., Brune W., Geballe A.P., Beau I., Esclatine A. (2016) Analysis of the role of autophagy inhibition by two complementary human cytomegalovirus BECN1/Beclin 1-binding proteins. *Autophagy.* **12**, 327–342.
149. Belzile J.P., Sabalza M., Craig M., Clark A.E., Morello C.S., Spector D.H. (2016) Trehalose, an mTOR-independent inducer of autophagy, inhibits human cytomegalovirus infection in multiple cell types. *J. Virol.* **90**, 1259–1277.
150. Zhang X., Zhang L., Bi Y., Xi T., Zhang Z., Huang Y., Lu Y.Y., Liu X., Shu S., Fang F. (2021) Inhibition of autophagy by 3-methyladenine restricts murine cytomegalovirus replication. *J. Med. Virol.* **93**, 5001–5016.
<https://doi.org/10.1002/jmv.26787>
151. Zimmermann C., Krämer N., Krauter S., Strand D., Sehn E., Wolfrum U., Freiwald A., Butter F., Plachter B. (2021) Autophagy interferes with human cytomegalovirus genome replication, morphogenesis, and progeny release. *Autophagy.* **17**, 779–795.
<https://doi.org/10.1080/15548627.2020.1732686>
152. Zhang X., Xi T., Zhang L., Bi Y., Huang Y., Lu Y., Liu X., Fang F. (2021) The role of autophagy in human cytomegalovirus IE2 expression. *J. Med. Virol.* **93**, 3795–3803.
<https://doi.org/10.1002/jmv.26357>
153. Liu Y., Pan J., Liu L., Li W., Tao R., Chen Y., Li H., Shang S. (2017) The influence of HCMV infection on autophagy in THP-1 cells. *Medicine (Baltimore).* **96**, e8298.
<https://doi.org/10.1097/MD.00000000000008298>
154. Chaumorcet M., Souquère S., Pierron G., Codogno P., Esclatine A. (2008) Human cytomegalovirus controls a new autophagy-dependent cellular antiviral defense

- mechanism. *Autophagy*. **4**(1), 46–53.
<https://doi.org/10.4161/auto.5184>
155. Tovilovic G., Ristic B., Siljic M., Nikolic V., Kravic-Stevovic T., Dulovic M., Milenkovic M., Knezevic A., Bosnjak M., Bumbasirevic V., Stanojevic M., Trajkovic V. (2013) mTOR-independent autophagy counteracts apoptosis in herpes simplex virus type 1-infected U251 glioma cells. *Microbes Infect.* **15**(8–9), 615–624.
<https://doi.org/10.1016/j.micinf.2013.04.012>
156. Usman R.M., Razzaq F., Akbar A., Farooqui A.A., Iftikhar A., Latif A., Hassan H., Zhao J., Carew J.S., Nawrocki S.T., Anwer F. (2021) Role and mechanism of autophagy-regulating factors in tumorigenesis and drug resistance. *Asia Pac. J. Clin. Oncol.* **17**, 193–208.
<https://doi.org/10.1111/ajco.13449>
157. Chiou J.T., Huang C.H., Lee Y.C., Wang L.J., Shi Y.J., Chen Y.J., Chang L.-S. (2020) Compound C induces autophagy and apoptosis in parental and hydroquinone-selected malignant leukemia cells through the ROS/p38 MAPK/AMPK/TET2/FOXP3 axis. *Cell Biol Toxicol.* **36**, 315–331.
158. Linder B., Kögel D. (2019) Autophagy in cancer cell death. *Biology*. **8**(4), 82.
<https://doi.org/10.3390/biology8040082>
159. Tao Z., Li T., Ma H., Yang Y., Zhang C., Hai L., Liu P., Yuan F., Li J., Yi L., Tong L., Wang Y., Xie Y., Ming H., Yu S., Yang X. (2018) Autophagy suppresses self-renewal ability and tumorigenicity of glioma-initiating cells and promotes Notch1 degradation. *Cell Death Dis.* **9**, 1063.
<https://doi.org/10.1038/s41419-018-0957-3>
160. Barthet V.J.A., Brucoli M., Ladds M., Nössing C., Kiourtis C., Baudot A.D., O'Prey J., Zunino B., Müller M., May S., Nixon C., Long J.S., Bird T.G., Ryan K.M. (2021) Autophagy suppresses the formation of hepatocyte-derived cancer-initiating ductular progenitor cells in the liver. *Sci. Adv.* **7**, eabf9141.
<https://doi.org/10.1126/sciadv.abf9141>
161. Zhu H., Wang D., Zhang L., Xie X., Wu Y., Liu Y., Shao G., Su Z. (2014) Upregulation of autophagy by hypoxia-inducible factor-1 α promotes EMT and metastatic ability of CD133+ pancreatic cancer stem-like cells during intermittent hypoxia. *Oncol. Rep.* **32**, 935–942.
<https://doi.org/10.3892/or.2014.3298>
162. Zhu Y., Huang S., Chen S., Chen J., Wang Z., Wang Y., Zheng H. (2021) SOX2 promotes chemoresistance, cancer stem cells properties, and epithelial-mesenchymal transition by β -catenin and Beclin1/autophagy signaling in colorectal cancer. *Cell Death Dis.* **12**, 449.
<https://doi.org/10.1038/s41419-021-03733-5>
163. Zhou Q., Cui F., Lei C., Ma S., Huang J., Wang X., Qian H., Zhang D., Yang Y. (2021) ATG7-mediated autophagy involves in miR-138-5p regulated self-renewal and invasion of lung cancer stem-like cells derived from A549 cells. *Anti-Cancer Drugs.* **32**, 376–385.
<https://doi.org/10.1097/CAD.0000000000000979>
164. Wang X., Lee J., Xie C. (2022) Autophagy regulation on cancer stem cell maintenance, metastasis, and therapy resistance. *Cancers (Basel)*. **14**, 381.
<https://doi.org/10.3390/cancers14020381>
165. Bao L., Jaramillo M.C., Zhang Z., Zheng Y., Yao M., Zhang D.D., Yi X. (2015) Induction of autophagy contributes to cisplatin resistance in human ovarian cancer cells. *Mol. Med. Rep.* **11**, 91–98.
<https://doi.org/10.3892/mmr.2014.2671>
166. Cheng C.Y., Liu J.C., Wang J.J., Li Y.H., Pan J., Zhang Y.R. (2017) Autophagy inhibition increased the anti-tumor effect of cisplatin on drug-resistant esophageal cancer cells. *J. Biol. Regul. Homeost. Agents.* **31**, 645–652.
167. Yang J., Pi C., Wang G. (2018) Inhibition of PI3K/Akt/mTOR pathway by apigenin induces apoptosis and autophagy in hepatocellular carcinoma cells. *Biomed. Pharmacother.* **103**, 699–707.
<https://doi.org/10.1016/j.biopha.2018.04.072>
168. Liu K., Ren T., Huang Y., Sun K., Bao X., Wang S., Zheng B., Guo W. (2017) Apatinib promotes autophagy and apoptosis through VEGFR2/STAT3/BCL-2 signaling in osteosarcoma. *Cell Death Dis.* **8**, e3015.
<https://doi.org/10.1038/cddis.2017.422>
169. Antonioli M., Pagni B., Vescovo T., Ellis R., Cosway B., Rollo F., Bordonio V., Agratia C., Labus M., Covelloe R., Benevoloe M., Ippolito G., Robinson M., Piacentini M., Lovatc P., Fimia G.M. (2021) HPV sensitizes OPSCC cells to cisplatin-induced apoptosis by inhibiting autophagy through E7-mediated degradation of AMBRA1. *Autophagy*. **17**, 2842–2855.
<https://doi.org/10.1080/15548627.2020.1847444>
170. Чернорыж Ю.Ю., Федорова Н.Е., Юрлов К.И., Симонов Р.А., Корнев А.В., Карпов Д.С., Закирова Н.Ф., Иванов А.В., Куш А.А., Гинцбург А.Л. (2019) Резистентность клеток лейкемии ТНР-1, инфицированных цитомегаловирусом, к противоопухолевому антибиотику доксорубину и восстановление чувствительности ингибиторами молекулярного пути PI3K/AKT/mTOR. *Докл. Акад. Наук: биохимия, биофизика, молекуляр. биология.* **489**(4), 433–437.
171. Chang P.H., Graham J., Hao J., Ni J., Bucci N.J., Cozzi P.J., Kearsley J.H., Li Y. (2013) Acquisition of epithelial-mesenchymal cancer stem cell phenotypes is associated with activation of the PI3K/Akt/mTOR pathway in prostate cancer radioresistance. *Cell Death Dis.* **4**, e875.
<https://doi.org/10.1038/cddis.2013.407>
172. Galluzzi L., Pedro J.M.B.-S., Levine B., Green D.R., Kroemer G. (2017) Pharmacological modulation of autophagy: therapeutic potential and persisting obstacles. *Nat. Rev. Drug Discov.* **16**, 487–511.
<https://doi.org/10.1038/nrd.2017.22>
173. Prerna K., Dubey V.K. (2021) Repurposing of FDA-approved drugs as autophagy inhibitors in tumor cells. *J. Biomol. Struct. Dyn.* **20**, 1–12.
<https://doi.org/10.1080/07391102.2021.1873862>
174. Xie Q., Liu Y., Li X. (2020) The interaction mechanism between autophagy and apoptosis in colon cancer. *Transl. Oncol.* **13**, 100871.
<https://doi.org/10.1016/j.tranon.2020.100871>

MECHANISMS OF SURVIVAL OF TUMOR CELLS INFECTED BY CYTOMEGALOVIRUS

G. R. Vinogradskaya^{1, *}, A. V. Ivanov², and A. A. Kushch³

¹ *Konstantinov Petersburg Nuclear Physics Institute, National Research Center "Kurchatov Institute", Gatchina, 188300 Russia*

² *Engelhardt Institute of Molecular Biology, Russian Academy of Sciences, Moscow, 119991 Russia*

³ *Gamaleya National Research Center for Epidemiology and Microbiology, Ministry of Health of the Russian Federation, Moscow, 123098 Russia*

**e-mail: gvinogradskaya@mail.ru*

Often detection of human cytomegalovirus (HCMV) DNA and proteins in malignant tumors raises a question about an impact of the virus in carcinogenesis and tumor progression. HCMV proteins were shown to regulate the key processes involved in tumorigenesis. Whereas assessment of a role of HCMV as an oncogenic factor is only starting, its ability to promote tumor progression is generally accepted. In the current review we discuss viral factors and cellular molecular pathways that affect resistance of cancer cells to therapy. CMV inhibits apoptosis of tumor cells, which not only promotes tumor progression, but also reduces the sensitivity of cells to antitumor therapy. It was shown that in various types of tumors autophagy can promote either cell survival or cell death. In leukemia cells HCMV induced a "protective" autophagy that suppresses apoptosis. Further investigation of viral factors that mediate drug resistance is needed, as it may help to the development of agents that can restore sensitivity of tumors to anticancer agents.

Keywords: cytomegalovirus, oncomodulation, apoptosis, autophagy, drug resistance

**ВИРУСНЫЕ ИНФЕКЦИИ: ОТ МЕХАНИЗМОВ РЕПЛИКАЦИИ
И ПАТОГЕНЕЗА К ПОДХОДАМ ТЕРАПИИ**

УДК 616-006; 578.7

**ОНКОЛИТИЧЕСКИЕ ВИРУСЫ В ТЕРАПИИ
ЛИМФОПРОЛИФЕРАТИВНЫХ ЗАБОЛЕВАНИЙ**© 2022 г. П. О. Воробьев^a, Ф. Э. Бабаева^b, А. В. Панова^c, Я. Шакиба^d,
С. К. Кравченко^b, А. В. Соболева^a, А. В. Липатова^a, *^aИнститут молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта Российской академии наук, Москва, 119991 Россия^bНациональный медицинский исследовательский центр гематологии Министерства здравоохранения России,
Москва, 125167 Россия^cИнститут общей генетики им. Н.И. Вавилова Российской академии наук, Москва, 117971 Россия^dМосковский физико-технический институт, Долгопрудный, Московская обл., 141701 Россия

*e-mail: lipatovaanv@gmail.com

Поступила в редакцию 01.04.2022 г.

После доработки 28.04.2022 г.

Принята к публикации 04.05.2022 г.

В настоящее время онкологические заболевания остаются одной из основных причин смертности. Несмотря на достижение значительных успехов в терапии лимфопролиферативных заболеваний (ЛПЗ), проблемы рецидивов и лекарственной резистентности до сих пор актуальны. Онколитические вирусы могут реплицироваться в опухолевых клетках и разрушать их, не воздействуя на нормальные, здоровые ткани. Активируя противоопухолевый иммунитет, вирусные препараты эффективны в отношении злокачественных новообразований различной природы. Для резистентных ЛПЗ описано много случаев ремиссии на фоне применения виротерапии. Благодаря современному уровню развития методов молекулярной биологии и накопленным знаниям о биологии вирусов и механизмах их взаимодействия с клеткой хозяина, удалось создать уникальные штаммы с высокой опухолевой специфичностью, которые вошли в широкое применение в клинической практике в последние годы.

Ключевые слова: лимфопролиферативные заболевания, спонтанная ремиссия, онколитические вирусы, клинические испытания, виротерапия

DOI: 10.31857/S0026898422050147**ВВЕДЕНИЕ**

Открытие Д.И. Ивановским в 1892 году “фильтруемых агентов”, вызывающих заболевания [1], послужило поводом для детального изучения природы и свойств таких инфекционных агентов. В том числе было выявлено, что некоторые вирусы способны эффективно размножаться в клетках злокачественных опухолей, приводя в дальнейшем к гибели последних.

В начале XX века был описан ряд случаев спонтанной ремиссии у пациентов как с гематологическими, так и с солидными опухолями после вакцинации или перенесенного вирусного заболевания. Так, в 1904 году сообщали о случае ремиссии лимфомы после перенесенного гриппа [2], а в 1912 году – после экстренной вакцинации живой антирабической вакциной – наблюдали ремиссию рака шейки матки [3]. Описания подобных клинических случаев послужили предпосылками для дальнейшего изучения вирусов в качестве противоопухолевых агентов.

Первые задокументированные описания различных вирусов в качестве онколитических агентов приведены в табл. 1.

Исследования онколитических вирусов в России связаны с именем профессора Марины Константиновны Ворошиловой. Под ее руководством получены первые штаммы непатогенных энтеровирусов (живые энтеровирусные вакцины) и в 1970-х годах на базе Института полиомиелита и вирусных энцефалитов Академии медицинских наук СССР выявлены их уникальные онколитические свойства [11, 12]. Под руководством А.Я. Муцениеце противоопухолевые свойства вирусов были проанализированы на сотнях пациентов с терминальными стадиями опухолей различного гистогенеза. Один из изученных вирусных штаммов – ЕСНО-7, прошедший последующую адаптацию на опухолевых клетках методом биоселекции, – был одобрен для лечения меланомы под названием RIGVIR® и получил

широкое распространение в клинической практике в ряде стран [13].

В исследованиях, проводимых во второй половине XX века, использовали различные способы доставки вируса – в зависимости от локализации опухоли и распространенности опухолевого процесса. В качестве перспективных стратегий рассматривали также комбинации радикального хирургического лечения с последующим введением вирусного препарата. Однако недостаточное понимание механизмов онколитического действия вирусов и наличие случаев с тяжелыми побочными эффектами ограничивали возможности разработки новых терапевтических схем [14].

Современные методы генной инженерии позволяют повысить опухолевую специфичность вирусов за счет усиления их репликативной активности в опухолевых клетках, а также модулировать их иммуногенные свойства. На сегодняшний день область разработки и изучения новых штаммов онколитических вирусов переживает бурный рост [15]. Некоторые из них уже одобрены для применения в клинической практике и используются в качестве препаратов противоопухолевой терапии [13, 16–19].

МЕХАНИЗМЫ ВИРУСНОГО ОНКОЛИЗА

Онколитические вирусы способны селективно разрушать опухолевые клетки с помощью двух ос-

новных механизмов: 1) путем прямого онколиза (лизиса зараженных опухолевых клеток) и 2) вызывать иммуноопосредованную гибель опухолевых клеток через усиление иммунных реакций, формирующих в том числе противоопухолевый иммунитет. Кроме того, онколитические вирусы могут индуцировать гибель клеток, устойчивых к апоптозу, а также резистентных к существующим препаратам противоопухолевой терапии [15]. Результат прямого онколиза – это лизис опухолевых клеток на этапе очередной итерации жизненного цикла вируса – когда ресурсы клетки полностью истощены и она не может больше служить “фабрикой” вирусных частиц. К факторам, обуславливающим селективность заражения вирусом именно опухолевых клеток, относят отсутствие четкой архитектуры опухолевой ткани, наличие кровеносных сосудов с повышенной проницаемостью [20], нарушения в системе клеточного противовирусного ответа, повышенную экспрессию молекул, которые служат рецепторами для проникновения вируса в клетку [21], и другие. Благодаря перечисленным естественным особенностям опухолевых клеток, в организме они становятся “предпочтительными” хозяевами для вирусов – в сравнении с нормальными клетками организма, – так как в них эффективно проходит инфекционный цикл и распространение вирионов в межклеточном матриксе. Проникновение вируса в клетку может быть опосредовано различными механизмами эндо-

Таблица 1. Первые клинические испытания онколитических вирусов

Дата, год	Заболевание, число участников	Вводимый вирус/способ введения	Итоги исследования
1949	Лимфома Ходжкина, 22 пациента	Вирус гепатита А/парентеральное введение	У 14 пациентов развилась инфекция, у 4 – уменьшился объем опухоли, у 2 – непродолжительная ремиссия [4]
1951	Менингеальный меланоматоз, 30 пациентов	Живая антирабическая вакцина/подкожное введение	У 8 пациентов – положительная динамика [5]
1952	Резистентные опухоли различного генеза, 34 пациента	Вирус лихорадки Западного Нила Egipt 101/внутривенное, внутримышечное введение	У 4 пациентов – регрессия [6, 7]
1956	Рак шейки матки, 40 пациентов	Аденовирус, собранный с культуры клеток HeLa/внутривенное, внутриартериальное, внутриопухолевое введение	У 26 пациентов – некроз опухолевых тканей без видимых повреждений здоровых тканей; в биопсийном материале обнаружена репликация аденовируса, уровень противовирусных антител в сыворотке крови существенно повысился [8, 9]
1976	Опухоли различного генеза на терминальной стадии, 90 пациентов	Вирус паротита (неаттенуированный)/ наружное, внутривенное, внутриопухолевое, ингаляционное введение	У 42 пациентов – полная или более чем 50%-ная регрессия; у 79 – уменьшение объема опухоли; у 11 – не было ответа на терапию [10]

цитоза [22, 23]. Рецепторопосредованный эндоцитоз считается одним из ключевых факторов, определяющих эффективность заражения и тканевой тропизм вирусных частиц в целом. На сегодняшний день накоплены обширные сведения о рецепторах и вспомогательных молекулах, необходимых для успешного распространения вирусной инфекции [24–27]. В ряде случаев наблюдается корреляция между представленностью вирусного рецептора на клеточной поверхности и эффективностью вирусной репликации [28, 29]. Методы генной инженерии, в том числе системы редактирования генома, такие как TALEN и CRISPR/Cas9, позволяют выявлять ранее неизвестные рецепторы вирусов и другие ключевые молекулы, необходимые для инициации инфекционного цикла.

Один из ключевых механизмов противовирусной защиты на клеточном уровне — система индукции интерферона [30], в результате активации которой клетка приобретает состояние противовирусной защиты: ингибируются процессы транскрипции и трансляции с целью предотвращения продукции вирусных компонентов, в межклеточное пространство секретируется интерферон- β , что служит “предупредительным сигналом” для соседних клеток. Секретируемый зараженной клеткой интерферон взаимодействует со своими рецепторами на поверхности незараженных клеток, тем самым активируя в них систему противовирусной защиты [31]. В таком состоянии, когда синтетический аппарат клетки практически не работает, клетка утрачивает способность к делению. Опухолевые клетки, стратегия которых предполагает бесконтрольное деление в процессе злокачественной трансформации, как правило, утрачивают механизмы, способные остановить/предотвратить процесс пролиферации. Так, в геноме опухолевых клеток происходит накопление мутаций, ведущих к утрате механизмов противовирусной защиты. Клетки, утратившие чувствительность к интерферону, становятся легкой мишенью для вирусов и благоприятной средой для их дальнейшего распространения [32].

К факторам, повышающим чувствительность клеток к вирусам и облегчающим вирус-опосредованный онколиз, относятся мутации в белках сигнальных путей Ras/ERK, (PI3K)/Akt и MAPK/ERK [33, 34], а также усиление экспрессии HIF-1 α [35]. Среди наиболее часто встречаемых нарушений отмечают также мутации генов TP53 и PTEN [36–40]. Изменения в различных сигнальных путях, создающие благоприятные условия для репликации вирусов исключительно в опухолевых клетках, могут происходить на эпигенетическом уровне [41].

ИЗУЧЕНИЕ ВИРУСНОГО ОНКОЛИЗА НА МОДЕЛЯХ *in vitro* И *in vivo*

В начале прошлого века противоопухолевые свойства вирусов изучали исключительно на моделях *in vivo* — на спонтанно возникающих опухолях грызунов. В 1922 году Левадити и Николау (Levaditi & Nicolau) [42] впервые описали онколитические свойства вируса осповакцины на различных моделях опухолей крыс и мышей. Со второй половины XX века для исследования биологических механизмов стали активно применять метод культивирования клеток млекопитающих *in vitro*. Культуры клеточных линий L929 и HeLa, полученные в 1948 г. и 1951 г. соответственно, стали первыми моделями вирусного онколиза *in vitro* [43, 44].

В 1954 году было обнаружено, что предварительное пассирование вируса энцефалита *in vitro* при последующей внутриопухолевой инокуляции приводит к уменьшению доли мышей, заболевших энцефалитом, а также значительно снижает способность вируса к репликации в нормальных тканях [45]. В дальнейшем такой подход лег в основу метода биоселекции вирусов с тропизмом к опухолевым клеткам. В 1950–1960 годы провели ряд исследований, в которых обнаружили следующее: 1) онколитический эффект вируса болезни Ньюкасла и вируса гриппа на модели асцитической карциномы Эрлиха [46–48], 2) онколитическое действие различных энтеровирусов (полиовируса, вирусов Коксаки групп А и В) на моделях иммунодефицитных мышей с ксенотрансплантами опухолевых клеток [49].

На животных моделях лимфолейкоза (L4946) и лейкемии Шая выявили позитивное влияние на общую выживаемость введения энтеровируса крупного рогатого скота [50], УФ-инактивированного и/или живого вируса осповакцины [51].

Благодаря развитию клеточных технологий, стало возможным поддержание жизнеспособности первичных культур лимфоидных опухолей *in vitro*. Впервые модельные линии лимфоидных опухолей были получены в 1963 году от нигерийских пациентов с лимфомой Беркитта: RAJ1, JIJOYE, OGUN, KUDI [52]. К концу XX века был получен ряд различных культур Т- и В-клеточных ЛПЗ: культуры лимфомы Беркитта EB-1, -2, -3 (из которых впоследствии был выделен вирус Эпштейна–Барр) [53], культуры Т-клеточного острого лимфобластного лейкоза MOLT-1 и MOLT-5 [54], миелоцитарная клеточная линия KG-1 [55] и десятки других [56–61]. Наиболее охарактеризованные модельные линии, среди которых Namalwa, Raji, U-937, Jurkat, депонированы в Американской коллекции культур (ATCC). Ряд онколитических штаммов успешно протестирован на этих культурах [62–65].

Несмотря на возможность получения стабильных клеточных линий, первичные культуры опухолевых клеток, как правило, служат более достоверными моделями для исследований [66, 67]. Так, Ф. Бабаева и соавт. [68] исследовали онколитическую активность непатогенных энтеровирусов на первичных культурах клеток различных В-клеточных ЛПЗ.

Первичные культуры лимфом представляют собой трехмерные образования, для поддержания жизнеспособности которых используют метод культивирования клеток в сфероидах [69, 70]. Такая модель наиболее приближена к физиологическим условиям — ведь опухоль, по сути, всегда представляет собой трехмерный объект. Взаимодействие вируса с конгломератом клеток происходит иначе, нежели с клетками двумерных культур, находящихся в монослое, так как в 3D-формате, как и в опухоли *in situ*, не все клетки конгломерата доступны для инфекции на начальном этапе заражения. Но есть ряд дополнительных факторов, облегчающих распространение вирусной инфекции и влияющих на эффективность репродукции вируса. Так, сфероиды опухолевых клеток продуцируют большое количество катепсинов (как и некоторые опухоли), что способствует проникновению вирусных частиц в незараженные клетки путем, не зависящим от канонических рецепторов. Например, клетки линии U118-MG с “выключенным” рецептором JAM-A сохраняют чувствительность к реовирусной инфекции, находясь в сфероиде, в то время как в монослое эта культура становится резистентной к заражению реовирусом [26].

ОНКОЛИТИЧЕСКИЕ ВИРУСЫ В ТЕРАПИИ ЛИМФОПРОЛИФЕРАТИВНЫХ ЗАБОЛЕВАНИЙ

Случаи спонтанных ремиссий злокачественных заболеваний, возникающие после вакцинации или перенесения вирусной инфекции, создавали благоприятную почву для исследований, направленных на изучение онколитических свойств различных представителей вирусных семейств.

В 1971 году были описаны два случая спонтанной регрессии лимфоидных опухолей у жителей Уганды после коревой инфекции [71]:

- лимфома Беркитта с поражением лицевого скелета полностью регрессировала в течение недели (крупная опухоль на лице быстро уменьшалась в размерах вплоть до полного исчезновения);
- полное исчезновение клинической симптоматики у пациента с лимфомой Ходжкина (наблюдалось уменьшение лимфатических узлов, регресс В-симптомов).

Временное, но существенное улучшение клинической картины наблюдали после введения ви-

русов Лангат и болезни Кьясанурского леса в борьбе с лейкозом и другими злокачественными новообразованиями [72].

Вирус кори

В 70-е годы прошлого века был описан ряд случаев спонтанной ремиссии лимфомы Ходжкина у детей после коревой инфекции [71, 73–76]. Существенное улучшение состояния наблюдали в случае острого лимфобластного лейкоза с рецидивом, отягощенным химиорезистентностью [77].

Вирус кори представляет собой РНК-содержащий вирус, принадлежащий к семейству Paramyxoviridae, геном которого включает в себя одну молекулу РНК негативной полярности. При проникновении вируса в клетку рецепторами служат молекулы CD150 [78], CD46 [79, 80] и нектин-4 [81, 82]. Гиперэкспрессия молекул CD46 и нектин-4 на опухолевых клетках служит фактором дополнительной селективности вируса кори в отношении злокачественных клеток [83, 84]. С помощью методов генной инженерии можно модифицировать гемагглютинин вируса кори с целью расширения тропизма вируса к опухолевым клеткам [85–87] или защиты вируса от элиминации нейтрализующими антителами [88].

В связи с высокой безопасностью и генетической стабильностью вакцинные штаммы вируса кори детально исследовали в качестве онколитических агентов [89]. Многообещающие результаты были получены в открытом швейцарском исследовании, в котором принимали участие пациенты с кожной Т-клеточной лимфомой IIb стадии, резистентные к традиционной терапии [90]. Несмотря на проведение терапии в локальном режиме — внутриопухолевых инъекций вакцинного штамма вируса кори (Эдмонтон-Загреб), — в некоторых случаях наблюдали регресс также и отдаленных очагов. Побочные эффекты были минимальными, что свидетельствовало о безопасности применения данного штамма.

На сегодняшний день вирус кори считают перспективным онколитическим агентом, терапевтическая эффективность которого продемонстрирована как на животных моделях, так и в клинических испытаниях с участием онкологических больных [91–95], в том числе со множественной миеломой [96, 97].

Реовирус

Реовирусы, безоболочечные вирусы сферической формы, принадлежат к семейству реовирусов Reoviridae, геном которых представлен сегментированной молекулой двухцепочечной РНК.

В 2013 году зарегистрирован препарат REOLYSIN® (“Oncolytic Biotech”, Канада), известный

также под торговым названием Pelareorep. Это немодифицированный реовирус типа 3, обладающий широким тропизмом к опухолевым клеткам, как, впрочем, и другие орторевовирусы человека [98]. Препарат широко используют в терапии различных онкологических заболеваний. Успешно завершена фаза III клинических испытаний комбинированного лечения опухолей головы и шеи по схеме паклитаксел + карбоплатин + реолизин [99].

При системном введении реовируса наблюдается феномен антителозависимого усиления инфекции, который заключается в формировании комплекса “реовирус–антитело”, его интернализации клетками иммунной системы и последующей репликации вируса в них. Благодаря этому механизму, цитотоксическое действие реовируса при внутривенном введении не только не снижается, но, наоборот, усиливается [100].

При исследовании онколитической активности реовируса в отношении клеток множественной миеломы показано, что его репликация идет эффективнее в образцах с резистентностью к бортезомибу – препарату, широко используемому в химиотерапии миеломы. Модельные клеточные линии и первичные культуры, полученные от пациентов с рефрактерным течением заболевания, были высокочувствительны к реовирусу при повышенной экспрессии молекулы адгезии JAM-A, что и характерно для опухолевых клеток, не восприимчивых к бортезомибу [101]. При изучении механизмов онколитического действия реовируса выявлена связь между активацией сигнального пути Ras, экспрессией катепсинов B и эффективностью вирусного онколиза [102, 103].

Вирус везикулярного стоматита

Вирус везикулярного стоматита (VSV) принадлежит к семейству вирусов семейства Rhabdoviridae, геном которых представлен одноцепочечной молекулой РНК негативной полярности. В качестве клеточного рецептора для VSV идентифицирован белок LDL-R (рецептор липопротеинов низкой плотности) [104]. Причины, позволяющие рассматривать VSV в качестве перспективного онколитического агента, следующие: 1) низкая патогенность; 2) широкий тропизм вируса к клеткам различного происхождения, который обусловлен широкой рецепторной специфичностью гликопротеина G; 3) высокая чувствительность вируса к интерферону (VSV преимущественно реплицируется в клетках с нарушенной системой индукции интерферона и интерферонового ответа, что характерно для некоторых опухолевых клеток [105]); 4) короткий 4-часовой цикл репликации способствует быстрой гибели опухолевых клеток по механизму прямого онколиза [106]. Т-лимфоциты могут быть использованы в качестве клеточного носителя для доставки VSV в очаг опухолевого ро-

ста [107]. Кроме того, VSV можно использовать в качестве вектора, экспрессирующего иммуномодулирующие белки [108].

К перспективным направлениям виротерапии относится лечение острых миелоидных лейкозов (ОМЛ). Для пациентов с рецидивом ОМЛ спектр терапевтических возможностей невелик. Именно в случае комбинированного подхода с использованием виро- и иммунотерапии достигали наилучшего эффекта при лечении ОМЛ на мышиной модели *in vivo* [109].

Для предсказания эффективности виротерапии используют анализ молекулярно-генетических детерминант чувствительности опухолевых клеток [110].

Вирус осповакцины

Вирус осповакцины, разработанный для борьбы с натуральной оспой [111], имеет самую длинную и обширную историю изучения по сравнению с другими вирусами. В том числе исследованы онколитические свойства вируса осповакцины.

Исходный вирус оспы принадлежит к семейству самых крупных ДНК-содержащих вирусов Poxviridae. В рамках программы глобальной ликвидации оспы была проведена вакцинация более 3 млрд человек, а впоследствии описаны клинические случаи спонтанных ремиссий гематологических злокачественных заболеваний. Так, 78-летний мужчина с хроническим лимфолейкозом (ХЛЛ) после вакцинации и купирования выраженной местной реакции и генерализованной сыпи введением человеческого глобулина против коревой оспы оставался в полной ремиссии в течение 3 лет. В клинической картине отсутствовали все признаки ХЛЛ, количество лейкоцитов было в пределах нормы [112].

В последние годы различные штаммы вируса осповакцины изучают в качестве онколитического агента при различных ЛПЗ, в частности на *in vivo* и *in vitro* моделях множественной миеломы [113–116].

Вирус осповакцины обладает выраженным тропизмом к опухолевым клеткам, а крупный размер вирусной частицы делает его привлекательным вектором для доставки вспомогательных терапевтических агентов непосредственно к опухоли. Благодаря методам генной инженерии, создается все больше онколитических штаммов на основе вируса осповакцины, с помощью которых возможна доставка различных противоопухолевых и/или иммуностимулирующих белков, таких как гранулоцитарно-макрофагальный колониестимулирующий фактор (GM-CSF) [117], апоптин [118], лактоферрин, интерлейкин-15 [119], а также противоопухолевые микроРНК [120] и другие молекулы [116].

В настоящее время проходят клинические испытания онколитического препарата RGV004 для лечения рефрактерной/рецидивирующей В-клеточной лимфомы (NCT04887025). Этот штамм на основе вируса осповакцины содержит в качестве терапевтического агента химерное антитело двойной специфичности: к молекулам CD19 и CD3 [121]. Антигены CD19 и CD3 – компоненты мультибелковых комплексов на поверхности Т- и В-лимфоцитов соответственно. Таким образом, достигается преимущественная репликация онколитического штамма в опухоли, а терапевтический компонент, анти-CD19/CD3-антитело, индуцирует дополнительный иммуностимулирующий эффект [122].

Вирус болезни Ньюкасла

Вирус болезни Ньюкасла (NDV) – РНК-содержащий птичий вирус из семейства Paramyxoviridae. NDV вызывает летальную инфекцию у некоторых видов птиц, особенно отряда куриных, и абсолютно безопасен для человека [123]. Благодаря высокой чувствительности к интерферону, репликация NDV эффективно протекает только в опухолевых клетках [124], так как в них нарушена система индукции интерферона и интерфероновый ответ.

Онколитическая активность некоторых штаммов NDV выявлена в отношении различных опухолей *in vitro*, среди которых клетки нейробластомы, фибросаркомы, колоректального и гепатоцеллюлярного рака, рака желудка и легкого, опухолей молочной и предстательной желез и, что немаловажно, глиобластомы [125]. Исследования *in vitro* и *in vivo* проводили также в отношении ЛПЗ [126–131], в том числе в середине XX века NDV применяли для лечения острых лейкозов [132].

При системном введении NDV в клинических испытаниях с участием пациентов с метастатическими солидными опухолями (колоректальный рак, карциномы поджелудочной железы, почки, молочной железы и немелкоклеточный рак легкого) получены следующие результаты: в фазе I испытаний улучшение (полный, частичный ответ или стабилизация) наблюдали в 11,4% случаев [133]; в фазе II зарегистрировано увеличение общей выживаемости [134]. В фазе III клинических испытаний, в которой приняли участие 567 пациентов, было выявлено увеличение общей выживаемости больных раком толстой кишки [135].

Онколитические энтеровирусы

Энтеровирусы – это безоболочечные вирусы, принадлежащие к семейству Picornaviridae, геном которых представлен одноцепочечной молекулой РНК положительной полярности.

В 50-х годах прошлого века появились данные о способности некоторых штаммов энтеровирусов реплицироваться в опухолевых клетках, вызывая гибель последних [50, 136]. Результаты исследований цитолитической активности энтеровирусов на моделях *in vitro*, *in vivo*, а также для лечения злокачественных опухолей у пациентов представлены для эховирусов (ЕНО) серотипов 1, 7 и 12 [11, 137–139], полиовируса типа 1 [140–143] и вируса Коксаки А21 [144–146]. Вирус Коксаки А21 зарегистрирован под торговым названием CAVATAK® и применяется для лечения меланомы, неинвазивного рака мочевого пузыря [16] и других злокачественных нозологий.

Несколько непатогенных штаммов из группы вирусов ЕНО и Коксаки в период вакцинации от полиомиелита были выделены от здоровых детей, у которых после вакцинации не сформировался полноценный иммунитет против полиомиелита. Бессимптомная энтеровирусная инфекция, по-видимому, препятствует заселению кишечника полиовирусом вакцинного штамма из-за эффекта интерференции. Именно этот эффект послужил ступенью в разработке профилактических живых энтеровирусных вакцин (ЖЭВ), которые были получены в Институте полиомиелита и вирусных энцефалитов Академии медицинских наук СССР в 1960–1970-х годах [147]. Две такие вакцины, полученные на основе непатогенных штаммов ЕНО-12 и ЕНО-1 (ЖЭВ-7 и ЖЭВ-4 соответственно), прошли испытания на большой когорте людей в период вспышек сезонных вирусных заболеваний, была продемонстрирована их безопасность и эффективность [147, 148]. В период проведения массовой вакцинации обнаружили ряд дополнительных полезных свойств ЖЭВ, среди которых отметим следующие: клиническое улучшение состояния больных с герпетическими инфекциями, рассеянным склерозом и онкологическими заболеваниями. В течение нескольких лет был проведен ряд исследований, в результате которых подтвердили положительное влияние ЖЭВ и вакцинных штаммов полиовируса на течение онкологических заболеваний с резистентным фенотипом [149]. Установлено, что в опухолевых клетках происходит репликация энтеровирусов, запускается индукция интерферонов, стимулируется Т-клеточный противоопухолевый иммунитет. Показано, что вирохимию можно комбинировать с другими методами лечения [150].

T-VEC – препарат на основе рекомбинантного вируса герпеса

Как известно, “назначение” иммунной системы – распознавать и выводить чужеродные молекулы из организма, что справедливо и в отношении онколитических вирусов. Именно поэтому их действие ограничено периодом формирования

адаптивного иммунного ответа. И все-таки иммунная система может действовать как в качестве барьера, так и в качестве “союзника” в борьбе с опухолевыми клетками.

Модулирование реакций иммунной системы в целях минимизации противовирусного ответа и одновременно содействие иммуноопосредованному лизису опухолевых клеток остается одной из ключевых задач виротерапии. Так, Talimogene laherparepvec (T-VEC, Imlygic™) – вирусный препарат, одобренный Управлением по контролю за пищевыми продуктами и лекарственными средствами США (FDA) для лечения метастатической меланомы в 2013 году, – представляет собой рекомбинантный штамм вируса простого герпеса типа 1 (HSV-1) [17, 18]. Это первый препарат “двойного” онколитического действия. Он вызывает гибель опухолевых клеток по механизму прямого онколиза, а также за счет подавления иммуносупрессии и стимуляции иммунной системы вследствие продукции зараженными клетками GM-CSF. Препарат T-VEC содержит в экспрессионной cassette нуклеотидную последовательность GM-CSF, а HSV-1 “служит” векторной системой доставки в опухолевые клетки. Эта конструкция обеспечивает экспрессию GM-CSF в опухолях пациентов в течение 48 ч [151]. В фазе III клинических испытаний препарата установили, что локальные внутриопухолевые инъекции T-VEC пациентам с распространенной меланомой не только подавляют рост опухоли, но также, благодаря системному действию, продлевают общую выживаемость [18].

Другие вирусы с онколитической активностью

Вирус паротита рассматривается в качестве перспективного онколитического агента в терапии гинекологических злокачественных образований [152].

Аденовирусы относятся к наиболее хорошо изученным моделям для использования как в качестве векторов для разработки вакцин, так и в качестве модели вирусного онколиза [153]. В 1996 году был сконструирован мутантный штамм ONYX-015, в котором делетирован вирусный белок E1B-55K, ответственный за связывание с транскрипционным фактором p53 клетки-хозяина и его инактивацию [154]. Предполагали, что отсутствие этого белка в мутантном аденовирусе исключает возможность его репликации в нормальных клетках, содержащих p53 дикого типа, но сохраняет способность размножаться в опухолевых клетках с мутантным p53. Сходный по механизму действия аденовирус H101 в ноябре 2005 года был одобрен Управлением по контролю качества пищевых продуктов и лекарственных средств Китая (SFDA, теперь CFDA) для лечения онкологических заболеваний, переименован в Op-

corine® (“Shanghai Sunway Biotech Co., Ltd”, Китай) и в настоящее время продается на китайском рынке [19].

В период пандемии COVID-19, вызванной коронавирусом-2 тяжелого острого респираторного синдрома (SARS-CoV-2), сообщалось о случаях спонтанной ремиссии и регресса различных ЛПЗ: НК/Т-клеточной лимфомы [155], первичной кожной анапластической крупноклеточной лимфомы [88], диффузной В-крупноклеточной лимфомы [156], острого миелоидного лейкоза и Т-клеточно-острого лимфобластного лейкоза [157], а также грибovidного микоза [158]. Возможно, в регрессе опухолей лимфатической системы на фоне инфекции SARS-CoV-2 вносит вклад и феномен антителозависимого усиления инфекции, описанный в том числе и для коронавирусов [159]. В рамках этого процесса может происходить массовая гибель иммунных клеток, несущих рецептор FcRIIγ (CD32), в том числе моноцитов и других клеток иммунной системы. На данный момент в литературе не представлены сведения о регрессе опухолей иного генеза во время пандемии COVID-19.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Природные онколитические свойства вирусов были открыты больше века назад, а прогресс в понимании молекулярных механизмов злокачественной трансформации клеток и биологии вирусов привел к разработке новых эффективных и высокоселективных онколитических штаммов.

В клинических испытаниях уже продемонстрирована безопасность, хорошая переносимость ряда онколитических вирусов, а также их эффективность как в качестве препаратов для монотерапии, так и в сочетании с традиционными режимами хирургического лечения, лучевой, химио- и иммунотерапии [99, 160–162]. Кроме того, виротерапия может рассматриваться как перспективный подход в борьбе с рецидивирующими химиорезистентными опухолями [90, 101, 163]. Более детальное исследование механизмов вирусного онколиза позволит находить и создавать новые штаммы и терапевтические схемы для лечения резистентных и рецидивирующих лимфопролиферативных заболеваний.

Проект был поддержан Российским научным фондом (Соглашение № 20-75-10157 от 14 августа 2020 года “Изучение возможностей получения рекомбинантных штаммов онколитических вирусов с опухоль-специфической репликацией и экспрессией иммуномодулирующих белков”).

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

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Ivanowski D. (1892) Ueber die mosaikkrankheit der tabakspflanze. *St. Petersb. Acad. Imp. Sci. Bul.* **35**, 67–70.
- Dock G. (1904) The influence of complicating diseases upon leukemia. *Am. J. Med. Sci.* **127**, 563.
- De Pace N. (1912) Sulla scomparsa di un enorme cancro vegetante del collo dell'utero senza cura chirurgica. *Ginecologia.* **9**, 82–89.
- Hoster H.A., Zanes R.P., Jr., Von Haam E. (1949) Studies in Hodgkin's syndrome; the association of viral hepatitis and Hodgkin's disease; a preliminary report. *Cancer Res.* **9**, 473–480.
- Higgins G.K., Pack G.T. (1951) Virus therapy in the treatment of tumors. *Bull. Hosp. Joint Dis.* **12**, 379–382.
- Koprowska I. (1953) Morphologic changes of exfoliated cells in effusions of cancer patients following induced viral infections; preliminary observations. *Am. J. Pathol.* **29**, 1105–1121.
- Moore A.E. (1954) Effects of viruses on tumors. *Annu. Rev. Microbiol.* **8**, 393–410.
- Huebner R.J., Bell J.A., Rowe W.P., Ward T.G., Suskind R.G., Hartley J.W., Paffenbarger R.S., Jr. (1955) Studies of adenoidal-pharyngeal-conjunctival vaccines in volunteers. *J. Am. Med. Assoc.* **159**, 986–989.
- Huebner R.J., Rowe W.P., Schatten W.E., Smith R.R., Thomas L.B. (1956) Studies on the use of viruses in the treatment of carcinoma of the cervix. *Cancer.* **9**, 1211–1218.
- Okuno Y., Asada T., Yamanishi K., Otsuka T., Takahashi M., Tanioka T., Aoyama H., Fukui O., Matsumoto K., Uemura F., Wada A. (1978) Studies on the use of mumps virus for treatment of human cancer. *Biken J.* **21**, 37–49.
- Ворошилова М.К. (1988) Вирусологические и иммунологические аспекты применения ЖЭВ при онкологических заболеваниях. В кн: *Полезные для организма непатогенные штаммы энтеровирусов: Профилактическое и лечебное их применение.* Москва: Изд-во Минздрава СССР, 24–29.
- Ворошилова М.К., Тольская Е.А., Королева Г.А., Чумаков К.М., Чумаков П.М. (1970) Изучение биологических и морфологических свойств вирусов ЕСНО-1 и ЕСНО-12. *Энтеровирусные инфекции. Труды ИПВЭ АМН СССР.* Москва. 269–274.
- Vabiker H.M., Riaz I.B., Husnain M., Borad M.J. (2017) Oncolytic virotherapy including RIGVIR and standard therapies in malignant melanoma. *Oncolytic Virother.* **6**, 11–18.
- Newman W., Southam C.M. (1954) Virus treatment in advanced cancer; a pathological study of fifty-seven cases. *Cancer.* **7**, 106–118.
- De Munck J., Binks A., McNeish I.A., Aerts J.L. (2017) Oncolytic virus-induced cell death and immunity: a match made in heaven? *J. Leukoc. Biol.* **102**, 631–643.
- Annels N.E., Mansfield D., Arif M., Ballesteros-Merino C., Simpson G.R., Denyer M., Sandhu S.S., Melcher A.A., Harrington K.J., Davies B., Au G., Grose M., Bagwan I., Fox B., Vile R., Mostafid H., Shafren D., Pandha H.S. (2019) Phase I trial of an ICAM-1-targeted immunotherapeutic-Coxsackievirus A21 (CVA21) as an oncolytic agent against non muscle-invasive bladder cancer. *Clin. Cancer Res.* **25**, 5818–5831.
- Dolgin E. (2015) Oncolytic viruses get a boost with first FDA-approval recommendation. *Nat. Rev. Drug Discov.* **14**, 369–371.
- Schmidt C. (2011) Amgen spikes interest in live virus vaccines for hard-to-treat cancers. *Nat. Biotechnol.* **29**, 295–296.
- Liang M. (2018) Oncorine, the world first oncolytic virus medicine and its update in China. *Curr. Cancer Drug Targets.* **18**, 171–176.
- Tseng J.C., Granot T., DiGiacomo V., Levin B., Meruelo D. (2010) Enhanced specific delivery and targeting of oncolytic sindbis viral vectors by modulating vascular leakiness in tumor. *Cancer Gene Ther.* **17**, 244–255.
- Matveeva O., Kochneva G., Netesov S., Onikienko S., Chumakov P. (2015) Mechanisms of oncolysis by paramyxovirus Sendai. *Acta Naturae.* **7**, 6–16.
- Maginnis M.S. (2018) Virus-receptor interactions: the key to cellular invasion. *J. Mol. Biol.* **430**, 2590–2611.
- Marsh M., Helenius A. (2006) Virus entry: open sesame. *Cell.* **124**, 729–740.
- Zhao X., Zhang G., Liu S., Chen X., Peng R., Dai L., Qu X., Li S., Song H., Gao Z., Yuan P., Liu Z., Li C., Shang Z., Li Y., Zhang M., Qi J., Wang H., Du N., Wu Y., Bi Y., Gao S., Shi Y., Yan J., Zhang Y., Xie Z., Wei W., Gao G.F. (2019) Human neonatal Fc receptor is the cellular uncoating receptor for enterovirus B. *Cell.* **177**, 1553–1565.e1516.
- Barrass S.V., Butcher S.J. (2020) Advances in high-throughput methods for the identification of virus receptors. *Med. Microbiol. Immunol.* **209**, 309–323.
- Dautzenberg I.J., van den Wollenberg D.J., van den Hengel S.K., Limpens R.W., Barcana M., Koster A.J., Hoeben R.C. (2014) Mammalian orthoreovirus T3D infects U-118 MG cell spheroids independent of junction adhesion molecule-A. *Gene Ther.* **21**, 609–617.
- Lipatova A.V., Le T.H., Sosnovtseva A.O., Babaeva F.E., Kochetkov D.V., Chumakov P.M. (2018) Relationship between cell receptors and tumor cell sensitivity to oncolytic enteroviruses. *Bull. Exp. Biol. Med.* **166**, 58–62.
- Huang Y.Y., Yu Z., Lin S.F., Li S., Fong Y., Wong R.J. (2007) Nectin-1 is a marker of thyroid cancer sensitivity to herpes oncolytic therapy. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **92**, 1965–1970.
- Friedman G.K., Langford C.P., Coleman J.M., Casady K.A., Parker J.N., Markert J.M., Yancey Gillespie G. (2009) Engineered herpes simplex viruses efficiently infect and kill CD133⁺ human glioma xenograft cells that express CD111. *J. Neurooncol.* **95**, 199–209.
- Geoffroy K., Bourgeois-Daigneault M.C. (2020) The pros and cons of interferons for oncolytic virotherapy. *Cytokine Growth Factor Rev.* **56**, 49–58.
- Katze M.G., He Y., Gale M., Jr. (2002) Viruses and interferon: a fight for supremacy. *Nat. Rev. Immunol.* **2**, 675–687.
- Wollmann G., Robek M.D., van den Pol A.N. (2007) Variable deficiencies in the interferon response enhance susceptibility to vesicular stomatitis virus onco-

- lytic actions in glioblastoma cells but not in normal human glial cells. *J. Virol.* **81**, 1479–1491.
33. Jin K.T., Tao X.H., Fan Y.B., Wang S.B. (2021) Crosstalk between oncolytic viruses and autophagy in cancer therapy. *Biomed. Pharmacother.* **134**, 110932.
 34. Choi A.H., O'Leary M.P., Lu J., Kim S.I., Fong Y., Chen N.G. (2018) Endogenous akt activity promotes virus entry and predicts efficacy of novel chimeric orthopoxvirus in triple-negative breast cancer. *Mol. Ther. Oncolytics.* **9**, 22–29.
 35. Chakrabarty R., Tran H., Selvaggi G., Hagerman A., Thompson B., Coffey M. (2015) The oncolytic virus, pelareorep, as a novel anticancer agent: a review. *Invest. New Drugs.* **33**, 761–774.
 36. Lin L., Su Z., Lebedeva I.V., Gupta P., Boukerche H., Rai T., Barber G.N., Dent P., Sarkar D., Fisher P.B. (2006) Activation of Ras/Raf protects cells from melanoma differentiation-associated gene-5-induced apoptosis. *Cell Death Differ.* **13**, 1982–1993.
 37. Noser J.A., Mael A.A., Sakuma R., Ohmine S., Marcato P., Lee P.W., Ikeda Y. (2007) The RAS/Raf1/MEK/ERK signaling pathway facilitates VSV-mediated oncolysis: implication for the defective interferon response in cancer cells. *Mol. Ther.* **15**, 1531–1536.
 38. Blackham A.U., Northrup S.A., Willingham M., Srintrapun J., Russell G.B., Lyles D.S., Stewart J.H. (2014) Molecular determinants of susceptibility to oncolytic vesicular stomatitis virus in pancreatic adenocarcinoma. *J. Surg. Res.* **187**, 412–426.
 39. Cascallo M., Capella G., Mazo A., Alemany R. (2003) Ras-dependent oncolysis with an adenovirus VAI mutant. *Cancer Res.* **63**, 5544–5550.
 40. Pikor L.A., Bell J.C., Diallo J.-S. (2015) Oncolytic viruses: exploiting cancer's deal with the devil. *Trends Cancer.* **1**, 266–277.
 41. Li Q., Tainsky M.A. (2011) Epigenetic silencing of *IRF7* and/or *IRF5* in lung cancer cells leads to increased sensitivity to oncolytic viruses. *PLoS One.* **6**, e28683.
 42. Levaditi C., Nicolau S. (1922) Sur le culture du virus vaccinal dans les neoplasmes epithelieux. *CR Soc. Biol.* **86**, 928.
 43. Weller T.H., Robbins F.C., Enders J.F. (1949) Cultivation of poliomyelitis virus in cultures of human foreskin and embryonic tissues. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* **72**, 153–155.
 44. Grayston J.T., Johnston P.B., Loosli C.G., Smith M.E. (1956) An improved technique for the neutralization test with adenoviruses in HeLa cell cultures. *J. Infect. Dis.* **99**, 188–198.
 45. Moore A.E. (1951) Inhibition of growth of five transplantable mouse tumors by the virus of Russian Far East encephalitis. *Cancer.* **4**, 375–382.
 46. Cassel W.A. (1957) Multiplication of influenza virus in the Ehrlich ascites carcinoma. *Cancer Res.* **17**, 618–622.
 47. Flanagan A.D., Love R., Tesar W. (1955) Propagation of Newcastle disease virus in Ehrlich ascites cells *in vitro* and *in vivo*. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* **90**, 82–86.
 48. Nemunaitis J. (1999) Oncolytic viruses. *Invest. New Drugs.* **17**, 375–386.
 49. Suskind R.G., Huebner R.J., Rowe W.P., Love R. (1957) Viral agents oncolytic for human tumors in heterologous host; oncolytic effect of Coxsackie B viruses. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* **94**, 309–318.
 50. Taylor M.W., Cordell B., Souhrada M., Prather S. (1971) Viruses as an aid to cancer therapy: regression of solid and ascites tumors in rodents after treatment with bovine enterovirus. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **68**, 836–840.
 51. Zakay-Roness Z., Bernkopf H. (1964) Effect of active and ultraviolet-irradiated inactive vaccinia virus on the development of Shay leukemia in rats. *Cancer Res.* **24**, 373–378.
 52. Pulvertaft J.V. (1964) Cytology of Burkitt's tumour (African lymphoma). *Lancet.* **1**, 238–240.
 53. Epstein M.A., Barr Y.M. (1965) Characteristics and mode of growth of tissue culture strain (Eb1) of human lymphoblasts from Burkitt's lymphoma. *J. Natl. Cancer Inst.* **34**, 231–240.
 54. Minowada J., Onuma T., Moore G.E. (1972) Rosette-forming human lymphoid cell lines. I. Establishment and evidence for origin of thymus-derived lymphocytes. *J. Natl. Cancer Inst.* **49**, 891–895.
 55. Koeffler H.P., Golde D.W. (1978) Acute myelogenous leukemia: a human cell line responsive to colony-stimulating activity. *Science.* **200**, 1153–1154.
 56. Lozzio B.B., Lozzio C.B. (1979) Properties and usefulness of the original K-562 human myelogenous leukemia cell line. *Leuk. Res.* **3**, 363–370.
 57. Sundstrom C., Nilsson K. (1976) Establishment and characterization of a human histiocytic lymphoma cell line (U-937). *Int. J. Cancer.* **17**, 565–577.
 58. Schneider U., Schwenk H.U., Bornkamm G. (1977) Characterization of EBV-genome negative "null" and "T" cell lines derived from children with acute lymphoblastic leukemia and leukemic transformed non-Hodgkin lymphoma. *Int. J. Cancer.* **19**, 621–626.
 59. Hurwitz R., Hozier J., LeBien T., Minowada J., Gajl-Peczalska K., Kubonishi I., Kersey J. (1979) Characterization of a leukemic cell line of the pre-B phenotype. *Int. J. Cancer.* **23**, 174–180.
 60. Drexler H.G., Minowada J. (1998) History and classification of human leukemia-lymphoma cell lines. *Leuk. Lymphoma.* **31**, 305–316.
 61. Drexler H.G., MacLeod R.A. (2003) Leukemia-lymphoma cell lines as model systems for hematopoietic research. *Ann. Med.* **35**, 404–412.
 62. Maurer S., Salih H.R., Smirnow I., Lauer U.M., Berchtold S. (2019) Suicide gene-armed measles vaccine virus for the treatment of AML. *Int. J. Oncol.* **55**, 347–358.
 63. Hall K., Scott K.J., Rose A., Desborough M., Harrington K., Pandha H., Parrish C., Vile R., Coffey M., Bowen D. (2012) Reovirus-mediated cytotoxicity and enhancement of innate immune responses against acute myeloid leukemia. *BioRes. Open Access.* **1**(1), 3–15.
 64. Madlambayan G.J., Bartee E., Kim M., Rahman M.M., Meacham A., Scott E.W., McFadden G., Cogle C.R. (2012) Acute myeloid leukemia targeting by myxoma virus *in vivo* depends on cell binding but not permissiveness to infection *in vitro*. *Leuk. Res.* **36**, 619–624.
 65. Koldehoff M., Lindemann M., Opalka B., Bauer S., Ross R.S., Elmaagacli A.H. (2015) Cytomegalovirus induces apoptosis in acute leukemia cells as a virus-versus-leukemia function. *Leuk. Lymphoma.* **56**, 3189–3197.
 66. Drexler H.G., Pommerenke C., Eberth S., Nagel S. (2018) Hodgkin lymphoma cell lines: to separate the wheat from the chaff. *Biol. Chem.* **399**, 511–523.

67. Younes A., Drach J., Katz R., Jendiroba D., Sabourian M.H., Sarris A.H., Swan F., Jr., Hill D., Cabanillas F., Ford R., Andreeff M. (1994) Growth inhibition of follicular small-cleaved-cell lymphoma cells in short-term culture by interleukin-3. *Ann. Oncol.* **5**, 265–268.
68. Бабаева Ф., Липатова А., Кочетков Д., Чумаков П., Кравченко С. (2019) Исследование репродукции онколитических вирусов в органных культурах лимфоидных опухолей человека. *Онкогематология*. **14**, 84–90.
69. Foxall R., Narang P., Glaysher B., Hub E., Teal E., Coles M.C., Ashton-Key M., Beers S.A., Cragg M.S. (2020) Developing a 3D B cell lymphoma culture system to model antibody therapy. *Front. Immunol.* **11**, 605231.
70. Lamaison C., Latour S., Helaine N., Le Morvan V., Saint-Vanne J., Mahouche I., Monvoisin C., Dussert C., Andrique L., Deleurme L., Dessauge E., Pangault C., Baulande S., Legoix P., Seffals M., Broca-Brisson L., Alessandri K., Carlotti M., Soubeyran P., Merlio J.P., Mourcin F., Nassoy P., Recher G., Tarte K., Bresson-Bepoldin L. (2021) A novel 3D culture model recapitulates primary FL B-cell features and promotes their survival. *Blood Adv.* **5**, 5372–5386.
71. Bluming A.Z., Ziegler J.L. (1971) Regression of Burkitt's lymphoma in association with measles infection. *Lancet.* **2**, 105–106.
72. Webb H.E., Wetherley-Mein G., Smith C.E., McMahon D. (1966) Leukaemia and neoplastic processes treated with Langat and Kyasanur forest disease viruses: a clinical and laboratory study of 28 patients. *Br. Med. J.* **1**, 258–266.
73. Pasquinucci G. (1971) Possible effect of measles on leukaemia. *Lancet.* **1**, 136.
74. Zygiert Z. (1971) Hodgkin's disease: remissions after measles. *Lancet.* **1**, 593.
75. Mota H.C. (1973) Infantile hodgkin's disease: remission after measles. *Br. Med. J.* **2**, 421.
76. Taqi A.M., Abdurrahman M.B., Yakubu A.M., Fleming A.F. (1981) Regression of Hodgkin's disease after measles. *Lancet.* **1**, 1112.
77. Gross S. (1971) Measles and leukaemia. *Lancet.* **1**, 397–398.
78. Romanets-Korbut O., Kovalevska L.M., Seya T., Sidorenko S.P., Horvat B. (2016) Measles virus hemagglutinin triggers intracellular signaling in CD150-expressing dendritic cells and inhibits immune response. *Cell Mol. Immunol.* **13**, 828–838.
79. Nanche D., Varior-Krishnan G., Cervoni F., Wild T., Rossi B., Rabourdin-Combe C., Gerlier D. (1993) Human membrane cofactor protein (CD46) acts as a cellular receptor for measles virus. *J. Virol.* **67**, 6025–6032.
80. Anderson B.D., Nakamura T., Russell S.J., Peng K.W. (2004) High CD46 receptor density determines preferential killing of tumor cells by oncolytic measles virus. *Cancer Res.* **64**, 4919–4926.
81. Dorig R., Marcil A., Chopra A. (1993) The human CD46 molecule is a receptor for measles virus (Edmonston strain) cell. *Cell.* **75**, 295–305.
82. Mateo M., Navaratnarajah C.K., Syed S., Cattaneo R. (2013) The measles virus hemagglutinin β -propeller head β 4- β 5 hydrophobic groove governs functional interactions with nectin-4 and CD46 but not those with the signaling lymphocytic activation molecule. *J. Virol.* **87**, 9208–9216.
83. Jurianz K., Ziegler S., Garcia-Schüler H., Kraus S., Bohana-Kashtan O., Fishelson Z., Kirschfink M. (1999) Complement resistance of tumor cells: basal and induced mechanisms. *Mol. Immunol.* **36**, 929–939.
84. Surowiak P., Materna V., Maciejczyk A., Kaplenko I., Spaczynski M., Dietel M., Lage H., Zabel M. (2006) CD46 expression is indicative of shorter relapse-free survival for ovarian cancer patients. *Anticancer Res.* **26(6C)**, 4943–4948.
85. Allen C., Vongpunawad S., Nakamura T., James C.D., Schroeder M., Cattaneo R., Giannini C., Krempski J., Peng K.-W., Goble J.M. (2006) Retargeted oncolytic measles strains entering via the EGFRvIII receptor maintain significant antitumor activity against gliomas with increased tumor specificity. *Cancer Res.* **66**, 11840–11850.
86. Munoz-Alia M.A., Nace R.A., Tischer A., Zhang L., Bah E.S., Auton M., Russell S.J. (2021) MeV-stealth: a CD46-specific oncolytic measles virus resistant to neutralization by measles-immune human serum. *PLoS Pathog.* **17**, e1009283.
87. Msaouel P., Iankov I.D., Allen C., Russell S.J., Galanis E. (2012) Oncolytic measles virus retargeting by ligand display. *Methods Mol. Biol.* **797**, 141–162.
88. Gambichler T., Boms S., Hessam S., Tischoff I., Tannapfel A., Luttringhaus T., Beckman J., Stranzenbach R. (2021) Primary cutaneous anaplastic large-cell lymphoma with marked spontaneous regression of organ manifestation after SARS-CoV-2 vaccination. *Br. J. Dermatol.* **185**, 1259–1262.
89. Cutts F.T., Markowitz L.E. (1994) Successes and failures in measles control. *J. Infect. Dis.* **170**, S32–S41.
90. Heinzerling L., Kunzi V., Oberholzer P.A., Kundig T., Naim H., Dummer R. (2005) Oncolytic measles virus in cutaneous T-cell lymphomas mounts antitumor immune responses *in vivo* and targets interferon-resistant tumor cells. *Blood.* **106**, 2287–2294.
91. Allen C., Paraskevovou G., Liu C., Iankov I.D., Msaouel P., Zollman P., Myers R., Peng K.W., Russell S.J., Galanis E. (2008) Oncolytic measles virus strains in the treatment of gliomas. *Expert Opin. Biol. Ther.* **8(2)**, 213–220.
92. Galanis E., Hartmann L.C., Cliby W.A., Long H.J., Peethambaram P.P., Barrette B.A., Kaur J.S., Haluska P.J., Aderca I., Zollman P.J. (2010) Phase I trial of intraperitoneal administration of an oncolytic measles virus strain engineered to express carcinoembryonic antigen for recurrent ovarian cancer. *Cancer Res.* **70**, 875–882.
93. Iankov I.D., Msaouel P., Allen C., Federspiel M.J., Bulur P.A., Dietz A.B., Gastineau D., Ikeda Y., Ingle J.N., Russell S.J. (2010) Demonstration of antitumor activity of oncolytic measles virus strains in a malignant pleural effusion breast cancer model. *Breast Cancer Res. Treat.* **122**, 745–754.
94. Liu C., Sarkaria J.N., Petell C.A., Paraskevovou G., Zollman P.J., Schroeder M., Carlson B., Decker P.A., Wu W., James C.D. (2007) Combination of measles virus virotherapy and radiation therapy has synergistic activity in the treatment of glioblastoma multiforme. *Clin. Cancer Res.* **13**, 7155–7165.
95. Msaouel P., Iankov I.D., Allen C., Morris J.C., Von Messling V., Cattaneo R., Koutsilieris M., Russell S.J.,

- Galanis E. (2009) Engineered measles virus as a novel oncolytic therapy against prostate cancer. *Prostate*. **69**, 82–91.
96. Dingli D., Peng K.W., Harvey M.E., Greipp P.R., O'Connor M.K., Cattaneo R., Morris J.C., Russell S.J. (2004) Image-guided radiovirotherapy for multiple myeloma using a recombinant measles virus expressing the thyroidal sodium iodide symporter. *Blood*. **103**, 1641–1646.
 97. Ong H.T., Timm M.M., Greipp P.R., Witzig T.E., Dispenzieri A., Russell S.J., Peng K.W. (2006) Oncolytic measles virus targets high CD46 expression on multiple myeloma cells. *Exp. Hematol.* **34**, 713–720.
 98. Muller L., Berkeley R., Barr T., Ilett E., Errington-Mais F. (2020) Past, present and future of oncolytic reovirus. *Cancers* (Basel). **12**, 3219.
 99. Carew J.S., Espitia C.M., Zhao W., Kelly K.R., Coffey M., Freeman J.W., Nawrocki S.T. (2013) Reolysin is a novel reovirus-based agent that induces endoplasmic reticular stress-mediated apoptosis in pancreatic cancer. *Cell Death Dis.* **4**, e728.
 100. Berkeley R.A., Steele L.P., Mulder A.A., van den Wolleberg D.J.M., Kottke T.J., Thompson J., Coffey M., Hoeben R.C., Vile R.G., Melcher A., Ilett E.J. (2018) Antibody-neutralized reovirus is effective in oncolytic virotherapy. *Cancer Immunol. Res.* **6**, 1161–1173.
 101. Kelly K.R., Espitia C.M., Zhao W., Wendlandt E., Tricot G., Zhan F., Carew J.S., Nawrocki S.T. (2015) Junctional adhesion molecule-A is overexpressed in advanced multiple myeloma and determines response to oncolytic reovirus. *Oncotarget*. **6**, 41275–41289.
 102. Strong J.E., Coffey M.C., Tang D., Sabinin P., Lee P.W. (1998) The molecular basis of viral oncolysis: usurpation of the Ras signaling pathway by reovirus. *EMBO J.* **17**, 3351–3362.
 103. Phillips M.B., Stuart J.D., Rodriguez Stewart R.M., Berry J.T., Mainou B.A., Boehme K.W. (2018) Current understanding of reovirus oncolysis mechanisms. *Oncolytic. Virother.* **7**, 53–63.
 104. Nikolic J., Belot L., Raux H., Legrand P., Gaudin Y., Albertini A.A. (2018) Structural basis for the recognition of LDL-receptor family members by VSV glycoprotein. *Nat. Commun.* **9**, 1029.
 105. Dunn G.P., Bruce A.T., Ikeda H., Old L.J., Schreiber R.D. (2002) Cancer immunoediting: from immunosurveillance to tumor escape. *Nat. Immunol.* **3**, 991–998.
 106. Finkelshtein D., Werman A., Novick D., Barak S., Rubinstein M. (2013) LDL receptor and its family members serve as the cellular receptors for vesicular stomatitis virus. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **110**, 7306–7311.
 107. Qiao J., Kottke T., Willmon C., Galivo F., Wongthida P., Diaz R.M., Thompson J., Ryno P., Barber G.N., Chester J., Selby P., Harrington K., Melcher A., Vile R.G. (2008) Purging metastases in lymphoid organs using a combination of antigen-nonspecific adoptive T cell therapy, oncolytic virotherapy and immunotherapy. *Nat. Med.* **14**, 37–44.
 108. Lichty B.D., Power A.T., Stojdl D.F., Bell J.C. (2004) Vesicular stomatitis virus: re-inventing the bullet. *Trends Mol. Med.* **10**, 210–216.
 109. Shen W., Patnaik M.M., Ruiz A., Russell S.J., Peng K.W. (2016) Immunovirotherapy with vesicular stomatitis virus and PD-L1 blockade enhances therapeutic outcome in murine acute myeloid leukemia. *Blood*. **127**, 1449–1458.
 110. Hastie E., Cataldi M., Marriott I., Grdzlishvili V.Z. (2013) Understanding and altering cell tropism of vesicular stomatitis virus. *Virus Res.* **176**(1–2), 16–32.
 111. Jenner E. (1800) Dr. Jenner on the vaccine inoculation. *Med. Phys. J.* **3**(16), 502–503.
 112. Hansen R.M., Libnoch J.A. (1978) Remission of chronic lymphocytic leukemia after smallpox vaccination. *Arch. Intern. Med.* **138**, 1137–1138.
 113. Lei W., Wang S., Xu N., Chen Y., Wu G., Zhang A., Chen X., Tong Y., Qian W. (2020) Enhancing therapeutic efficacy of oncolytic vaccinia virus armed with Beclin-1, an autophagic gene in leukemia and myeloma. *Biomed. Pharmacother.* **125**, 110030.
 114. Futami M., Sato K., Miyazaki K., Suzuki K., Nakamura T., Tojo A. (2017) Efficacy and safety of doubly-regulated vaccinia virus in a mouse xenograft model of multiple myeloma. *Mol. Ther. Oncolytics*. **6**, 57–68.
 115. Deng H., Tang N., Stief A.E., Mehta N., Baig E., Head R., Sleep G., Yang X.Z., McKerlie C., Trudel S., Stewart A.K., McCart J.A. (2008) Oncolytic virotherapy for multiple myeloma using a tumour-specific double-deleted vaccinia virus. *Leukemia*. **22**, 2261–2264.
 116. Guo Z.S., Lu B., Guo Z., Giehl E., Feist M., Dai E., Liu W., Storkus W.J., He Y., Liu Z., Bartlett D.L. (2019) Vaccinia virus-mediated cancer immunotherapy: cancer vaccines and oncolytics. *J. Immunother. Cancer*. **7**, 6.
 117. Thorne S.H., Hwang T.H., O'Gorman W.E., Bartlett D.L., Sei S., Kanji F., Brown C., Werier J., Cho J.H., Lee D.E., Wang Y., Bell J., Kirn D.H. (2007) Rational strain selection and engineering creates a broad-spectrum, systemically effective oncolytic poxvirus, JX-963. *J. Clin. Invest.* **117**, 3350–3358.
 118. Zhou S., Zhang M., Zhang J., Shen H., Tangsakara E., Wang J. (2012) Mechanisms of apoptin-induced cell death. *Med. Oncol.* **29**, 2985–2991.
 119. Kowalsky S.J., Liu Z., Feist M., Berkey S.E., Ma C., Ravindranathan R., Dai E., Roy E.J., Guo Z.S., Bartlett D.L. (2018) Superagonist IL-15-armed oncolytic virus elicits potent antitumor immunity and therapy that are enhanced with PD-1 blockade. *Mol. Ther.* **26**, 2476–2486.
 120. Lei W., Wang S., Yang C., Huang X., Chen Z., He W., Shen J., Liu X., Qian W. (2016) Combined expression of miR-34a and Smac mediated by oncolytic vaccinia virus synergistically promote anti-tumor effects in multiple myeloma. *Sci. Rep.* **6**, 32174.
 121. Topp M.S., Gokbuget N., Zugmaier G., Klappers P., Stelljes M., Neumann S., Viardot A., Marks R., Die-drich H., Faul C., Reichle A., Horst H.A., Bruggemann M., Wessiepe D., Holland C., Alekar S., Mergem N., Einsele H., Hoelzer D., Bargou R.C. (2014) Phase II trial of the anti-CD19 bispecific T cell-engager blinatumomab shows hematologic and molecular remissions in patients with relapsed or refractory B-precursor acute lymphoblastic leukemia. *J. Clin. Oncol.* **32**, 4134–4140.
 122. Lei W., Ye Q., Hao Y., Chen J., Huang Y., Yang L., Wang S., Qian W. (2022) CD19-targeted bite expression by an oncolytic vaccinia virus significantly aug-

- ments therapeutic efficacy against B-cell lymphoma. *Blood Cancer J.* **12**, 35.
123. Yurchenko K.S., Zhou P., Kovner A.V., Zavjalov E.L., Shestopalova L.V., Shestopalov A.M. (2018) Oncolytic effect of wild-type Newcastle disease virus isolates in cancer cell lines *in vitro* and *in vivo* on xenograft model. *PLoS One.* **13**, e0195425.
 124. Zhang S., Sun Y., Chen H., Dai Y., Zhan Y., Yu S., Qiu X., Tan L., Song C., Ding C. (2014) Activation of the PKR/eIF2 α signaling cascade inhibits replication of Newcastle disease virus. *Viol. J.* **11**, 62. <https://doi.org/10.1186/1743-422X-11-62>
 125. Матвеева О.В., Кочнева Г.В., Зайнутдинов С.С., Ильинская Г.В., Чумаков П.М. (2018) Онколитические парамиксовирусы: механизм действия, доклинические и клинические исследования. *Молекуляр. биология.* **52**(3), 360–379.
 126. Cassel W.A., Garrett R.E. (1965) Newcastle disease virus as an antineoplastic agent. *Cancer.* **18**, 863–868.
 127. Bar-Eli N., Giloh H., Schlesinger M., Zakay-Rones Z. (1996) Preferential cytotoxic effect of Newcastle disease virus on lymphoma cells. *J. Cancer Res. Clin. Oncol.* **122**, 409–415.
 128. Eaton M.D., Almquist S.J. (1975) Antibody response of syngeneic mice to membrane antigens from NDV-infected lymphoma. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* **148**, 1090–1094.
 129. Eaton M.D., Levinthal J.D., Scala A.R. (1967) Contribution of antiviral immunity to oncolysis by Newcastle disease virus in a murine lymphoma. *J. Natl. Cancer Inst.* **39**, 1089–1097.
 130. Al-Shammari A.M., Rameez H., Al-Tae M.F. (2016) Newcastle disease virus, rituximab, and doxorubicin combination as anti-hematological malignancy therapy. *Oncolytic Virother.* **5**, 27–34.
 131. Klafuric E. (2022) Combining Newcastle disease virus and decitabine enhances leukemia cell death in models of murine acute T-cell lymphocytic and acute myeloid leukemias. *Thesis of Master of Science in Pathobiology, University of Guelph.* <https://atrium.lib.uoguelph.ca/xmlui/handle/10214/26655>
 132. Wheelock E.F., Dingle J.H. (1964) Observations on the repeated administration of viruses to a patient with acute leukemia. A preliminary report. *N. Engl. J. Med.* **271**, 645–651.
 133. Lorence R.M., Scot Roberts M., O'Neil J.D., Groene W.S., Miller J.A., Mueller S.N., Bamat M.K. (2007) Phase 1 clinical experience using intravenous administration of PV701, an oncolytic Newcastle disease virus. *Curr. Cancer Drug Targets.* **7**, 157–167.
 134. Csatory L., Eckhardt S., Bukosza I., Czeglédi F., Fenyvesi C., Gergely P., Bodey B., Csatory C. (1993) Attenuated veterinary virus vaccine for the treatment of cancer. *Cancer Detect. Prev.* **17**, 619–627.
 135. Liang W., Wang H., Sun T.-M., Yao W.-Q., Chen L.-L., Jin Y., Li C.-L., Meng F.-J. (2003) Application of autologous tumor cell vaccine and NDV vaccine in treatment of tumors of digestive tract. *World J. Gastroenterol.* **9**, 495–498.
 136. Au G.G., Beagley L.G., Haley E.S., Barry R.D., Shafren D.R. (2011) Oncolysis of malignant human melanoma tumors by Coxsackieviruses A13, A15 and A18. *Viol. J.* **8**, 22.
 137. Berry L.J., Au G.G., Barry R.D., Shafren D.R. (2008) Potent oncolytic activity of human enteroviruses against human prostate cancer. *Prostate.* **68**, 577–587.
 138. Haley E.S., Au G.G., Carlton B.R., Barry R.D., Shafren D.R. (2009) Regional administration of oncolytic Echovirus 1 as a novel therapy for the peritoneal dissemination of gastric cancer. *J. Mol. Med.* **87**, 385–399.
 139. Муцениеце А.Я. (1978) Изучение чувствительности меланом человека к энтеровирусам, адаптированным к этим опухолям. В кн.: *Вирусы в терапии опухолей.* Рига: Зинатне, 175–189.
 140. Dobrikova E.Y., Broad T., Poiley-Nelson J., Yang X., Soman G., Giardina S., Harris R., Gromeier M. (2008) Recombinant oncolytic poliovirus eliminates glioma *in vivo* without genetic adaptation to a pathogenic phenotype. *Mol. Ther.* **16**, 1865–1872.
 141. Gromeier M., Lachmann S., Rosenfeld M.R., Guttin P.H., Wimmer E. (2000) Intergeneric poliovirus recombinants for the treatment of malignant glioma. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **97**, 6803–6808.
 142. Toyoda H., Ido M., Hayashi T., Gabazza E.C., Suzuki K., Kisenge R.R., Kang J., Hori H., Komada Y. (2004) Experimental treatment of human neuroblastoma using live-attenuated poliovirus. *Int. J. Oncol.* **24**, 49–58.
 143. Toyoda H., Wimmer E., Cello J. (2011) Oncolytic poliovirus therapy and immunization with poliovirus-infected cell lysate induces potent antitumor immunity against neuroblastoma *in vivo*. *Int. J. Oncol.* **38**, 81–87.
 144. Au G.G., Lincz L.F., Enno A., Shafren D.R. (2007) Oncolytic Coxsackievirus A21 as a novel therapy for multiple myeloma. *Br. J. Haematol.* **137**, 133–141.
 145. Au G.G., Lindberg A.M., Barry R.D., Shafren D.R. (2005) Oncolysis of vascular malignant human melanoma tumors by Coxsackievirus A21. *Int. J. Oncol.* **26**, 1471–1476.
 146. Skelding K.A., Barry R.D., Shafren D.R. (2009) Systemic targeting of metastatic human breast tumor xenografts by Coxsackievirus A21. *Breast Cancer Res. Treat.* **113**, 21–30.
 147. Чумаков М.П., Ворошилова М.К., Анцупова А.С., Бойко В.М., Блинова М.И., Приймаги Л.С., Родин В.И., Сейбиль В.Б., Синяк К.М., Смородинцев А.А., Степанчук В.А., Терехов С.Н., Трофимова Л.И., Чумаков П.М. (1992) Живые энтеровирусные вакцины для экстренной неспецифической профилактики массовых респираторных заболеваний во время осенне-зимних эпидемий гриппа и острых респираторных заболеваний. *Журн. микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии.* **11–12**, 37–40.
 148. Ворошилова М.К. (1970) Живые энтеровирусные вакцины. *Материалы 13 Всесоюзного съезда эпидемиологов, микробиологов и инфекционистов.* Тбилиси, 355.
 149. Voroshilova M.K. (1989) Potential use of nonpathogenic enteroviruses for control of human disease. *Prog. Med. Virol.* **36**, 191–202.
 150. Ворошилова М.К., Горюнова А.Г., Горбачкова Е.А., Чумаков П.М., Оганян Г.Р., Кодкинд Г.Х. (1977) Изучение клеточного иммунитета у онкологических больных в процессе бессимптомной энтеровирусной инфекции. В кн.: *Виротерапия и искусственная гетерогенизация опухолей.* Рига: Зинатне, 17–19.

151. Hu J.C., Coffin R.S., Davis C.J., Graham N.J., Groves N., Guest P.J., Harrington K.J., James N.D., Love C.A., McNeish I., Medley L.C., Michael A., Nutting C.M., Pandha H.S., Shorrock C.A., Simpson J., Steiner J., Steven N.M., Wright D., Coombes R.C. (2006) A phase I study of OncovexGM-CSF, a second-generation oncolytic herpes simplex virus expressing granulocyte macrophage colony-stimulating factor. *Clin. Cancer Res.* **12**, 6737–6747.
152. Shimizu Y., Hasumi K., Okudaira Y., Yamanishi K., Takahashi M. (1988) Immunotherapy of advanced gynecologic cancer patients utilizing mumps virus. *Cancer Detect. Prev.* **12**, 487–495.
153. Stepanenko A.A., Chekhonin V.P. (2018) A compendium of adenovirus genetic modifications for enhanced replication, oncolysis, and tumor immunosurveillance in cancer therapy. *Gene.* **679**, 11–18.
154. Kim D., Hermiston T., McCormick F. (1998) ONYX-015: clinical data are encouraging. *Nat. Med.* **4**, 1341–1342.
155. Pasin F., Mascacchi Calveri M., Calabrese A., Pizzarelli G., Bongiovanni I., Andreoli M., Cattaneo C., Rignanese G. (2020) Oncolytic effect of SARV-CoV2 in a patient with NK lymphoma. *Acta Biomed.* **91**(3), e2020047.
156. Paz A., Condori X., Hofmann A., Soares T., Predebon V., Siqueira V., Dortzbacher F., Calvache E., Gomes C., Portich J. (2021) SARS-CoV-2 induced remission of diffuse large B-cell lymphoma: a case report. *Hematol. Transfusion Cell Therapy.* **43**(S1), s103. <https://doi.org/10.1016/j.htct.2021.10.175>
157. Kandeel E.Z., Refaat L., Abdel-Fatah R., Samra M., Bayoumi A., Abdellateif M.S., Abdel-Hady H., Ali M., Khafagy M. (2021) Could COVID-19 induce remission of acute leukemia? *Hematology.* **26**, 870–873.
158. Ohadi L., Hosseinzadeh F., Dadkhahfar S., Nasiri S. (2022) Oncolytic effect of SARS-CoV-2 in a patient with mycosis fungoides (MF): a case report. *Clin. Case Rep.* **10**(4), e05682.
159. Nechipurenko Y.D., Anashkina A.A., Matveeva O.V. (2020) Change of antigenic determinants of SARS-CoV-2 virus S-protein as a possible cause of antibody-dependent enhancement of virus infection and cytokine storm. *Biophysics (Oxford).* **65**, 703–709.
160. Markert J.M., Liechty P.G., Wang W., Gaston S., Braz E., Karrasch M., Nabors L.B., Markiewicz M., Lakeman A.D., Palmer C.A., Parker J.N., Whitley R.J., Gillespie G.Y. (2009) Phase Ib trial of mutant herpes simplex virus G207 inoculated pre- and post-tumor resection for recurrent GBM. *Mol. Ther.* **17**, 199–207.
161. Sun L., Funchain P., Song J.M., Rayman P., Tannenbaum C., Ko J., McNamara M., Marcela Diaz-Montero C., Gastman B. (2018) Talimogene laherparepvec combined with anti-PD-1 based immunotherapy for unresectable stage III–IV melanoma: a case series. *J. Immunother. Cancer.* **6**, 36.
162. Mell L.K., Brumund K.T., Daniels G.A., Advani S.J., Zakeri K., Wright M.E., Onyema S.J., Weisman R.A., Sanghvi P.R., Martin P.J., Szalay A.A. (2017) Phase I trial of intravenous oncolytic vaccinia virus (GL-ONC1) with cisplatin and radiotherapy in patients with locoregionally advanced head and neck carcinoma. *Clin. Cancer Res.* **23**, 5696–5702.
163. Beasley G.M., Nair S.K., Farrow N.E., Landa K., Selim M.A., Wiggs C.A., Jung S.H., Bigner D.D., True Kelly A., Gromeier M., Salama A.K. (2021) Phase I trial of intratumoral PVSRIPO in patients with unresectable, treatment-refractory melanoma. *J. Immunother. Cancer.* **9**, e002203

ONCOLYTIC VIRUSES IN THE THERAPY OF LYMPHOPROLIFERATIVE DISEASES

**P. O. Vorobyov¹, F. E. Babaeva², A. V. Panova³, J. Shakiba⁴, S. K. Kravchenko²,
A. V. Soboleva¹, and A. V. Lipatova¹ ***

¹ Engelhardt Institute of Molecular Biology, Russian Academy of Sciences, Moscow, 119991 Russia

² National Medical Research Center for Hematology, Ministry of Health the Russian Federation, Moscow, 125167 Russia

³ Vavilov Institute of General Genetics, Russian Academy of Sciences, Moscow, 117971 Russia

⁴ Moscow Institute of Physics and Technology, Dolgoprudny, Moscow Region, 141701 Russia

*e-mail: lipatovaanv@gmail.com

Cancer is currently one of the leading causes of death. Despite the achievement of significant success in the treatment of lymphatic system tumors, the problems of relapse, drug resistance and effectiveness of therapy remain relevant. Oncolytic viruses are able to replicate in tumor cells and destroy them without affecting normal, healthy tissues. By activating antitumor immunity, viruses are effective against malignant neoplasms of various nature. In lymphoproliferative diseases with drug-resistant phenotype, many cases of remissions have been described after viral therapy. The current level of understanding of viral biology and discovery of host cell interaction mechanisms made it possible to create unique strains with high oncoselectivity for widely used in clinical practice in recent years.

Keywords: lymphoproliferative diseases, spontaneous remission, oncolytic viruses, clinical trials, virotherapy

**ВИРУСНЫЕ ИНФЕКЦИИ: ОТ МЕХАНИЗМОВ РЕПЛИКАЦИИ
И ПАТОГЕНЕЗА К ПОДХОДАМ ТЕРАПИИ**

УДК 577.152.314:576.08+576.535.5:576.52

**БЛОКИРОВАНИЕ ДВУХ АЛЬТЕРНАТИВНЫХ ПУТЕЙ ВЫЖИВАНИЯ
КЛЕТОК КАСУМИ-1 С ПОМОЩЬЮ РИБОНУКЛЕАЗЫ БИНАЗЫ
И ИНГИБИТОРА КИНАЗ АКТ1/2**© 2022 г. В. А. Митькевич^{a, b, *}, И. Ю. Петрушанко^a, М. Г. Энгельгардт^a,
О. И. Кечко^a, А. А. Макаров^a^aИнститут молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта Российской академии наук, Москва, 119991 Россия^bИнститут фундаментальной медицины и биологии, Казанский (Приволжский) федеральный университет,
Казань, 420008 Россия

*e-mail: mitkevich@gmail.com

Поступила в редакцию 11.03.2022 г.

После доработки 01.04.2022 г.

Принята к публикации 01.04.2022 г.

Лечение злокачественных новообразований зачастую требует использования комбинаций химиотерапевтических средств. Однако, чтобы подобрать комбинации, эффективные против конкретных опухолевых клеток, необходимо понимать механизмы действия препаратов, входящих в состав комбинации. Рибонуклеаза *Bacillus pumilus* (биназа) рассматривается в качестве адьювантного противоопухолевого средства, причем чувствительность злокачественных клеток к апоптогенному действию биназы зависит от определенных онкогенов. В линии клеток острого миелогенного лейкоза Касуми-1 биназа блокирует путь пролиферации, опосредованный мутантной тирозинкиназой КИТ, что, как показано в нашей работе, активировать альтернативный путь пролиферации через АКТ-киназу. В клетках Касуми-1 биназа в сочетании с ингибитором Akt1/2 индуцирует апоптоз, при этом их токсические эффекты складываются: ингибитор Akt1/2 блокирует путь, индуцируемый биназой, после подавления КИТ-зависимого пути. Таким образом комбинация биназы и ингибиторов АКТ-киназ может эффективно блокировать различные пути пролиферации опухолевых клеток и использоваться для их элиминации.

Ключевые слова: рибонуклеаза, злокачественные клетки, противоопухолевая терапия, путь пролиферации, острый миелогенный лейкоз

DOI: 10.31857/S002689842205010X**ВВЕДЕНИЕ**

Монотерапия злокачественных заболеваний зачастую не позволяет полностью элиминировать раковые клетки из организма. Поэтому необходимо подбирать комбинации химиотерапевтических препаратов, эффективные для конкретной опухоли. Как правило, такой подбор основан на эмпирических закономерностях, он занимает достаточно много времени, отнимает силы у пациента и является дорогостоящей процедурой. Для разработки схем лечения злокачественных заболеваний требуется понимание механизмов действия химиотерапевтических препаратов на конкретные опухолевые клетки [1].

Сокращения: АФК – активные формы кислорода; ДМСО – диметилсульфоксид; DHR123 – дигидрородамин 123; FITC – флуоресцеинизотиоцианат; PBS – фосфатно-солевой буфер; PI – йодид пропидия; SD – стандартное отклонение.

биназы можно, используя ее в сочетании с други-

Считается, что рибонуклеазы могут использоваться в качестве средств адьювантной терапии опухолей, воздействующих как на сами злокачественные клетки, так и на продукты их “зловредной” деятельности – циркулирующие РНК [2–4]. Ранее мы показали эффективность РНКазы *Bacillus pumilus* (биназы) в направленной элиминации различных опухолевых клеток человека и в терапии опухолей у мышей [5–9]. В основе молекулярного механизма действия биназы лежит запуск апоптоза в опухолевых клетках, причем чувствительность злокачественных клеток к апоптогенному действию биназы определяется определенными онкогенами – *KIT*, *RAS*, *FLT3*, *AML1-ETO*, *E6*, *E7* [5, 7, 10–12]. Присутствие этих онкогенов можно рассматривать как фактор, предсказывающий эффективное уничтожение опухолевых клеток под действием РНКазы биназы [4, 13]. Кроме того, повысить эффективность ми терапевтическими средствами [7, 14].

Мишенью токсического действия биназы в клеточной линии Касуми-1 острого миелогенного лейкоза служит онкоген *KIT*, кодирующий рецепторную тирозинкиназу [5]. Точечные мутации в гене *KIT* приводят к конститутивной активации белка *KIT* и к неконтролируемой пролиферации и выживанию клеток острого миелогенного лейкоза [15]. Биназа блокирует путь пролиферации, обусловленный экспрессией этого онкогена, и запускает таким образом апоптоз в опухолевых клетках [13]. При этом блокирование активности тирозинкиназы *KIT* в клетках Касуми-1 специфическим ингибитором иматинибом снижает токсическое действие биназы [5]. Мы предположили, что выживаемость клеток в условиях блокирования сигнального пути *KIT*-*JNK* может быть связана с активацией альтернативного, независимого от *KIT* пути пролиферации, опосредованного АКТ-киназой, поскольку известно, что в клетках Касуми-1 АКТ-киназа конститутивно активирована и эта активация не связана с *PI3K* [16, 17]. В представленной работе изучено токсическое действие ингибитора киназ *Akt1/2* и его сочетания с биназой на клетки Касуми-1.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Фермент и клеточная культура. В работе использовали гуанилспецифичную РНКазу *B. pumilis* дикого типа (молекулярная масса 12.3 кДа, 109 аминокислотных остатков, рI 9.5), полученную согласно [18]. Ингибитор киназ *Akt1/2* (“Merck”, США) растворяли в ДМСО в концентрации 20 мМ и использовали в концентрации от 2.5 до 60 мкМ. Суспензионную клеточную культуру Касуми-1 выращивали на среде RPMI-1640, содержащей 10% эмбриональной телячьей сыворотки, 2 мМ глутамина, 100 Ед./мл пенициллина и 100 мкг/мл стрептомицина, при температуре 37°C в атмосфере 5% CO₂.

Оценка жизнеспособности клеток. Жизнеспособность клеток оценивали с помощью теста WST-1 (“Roche Diagnostics”, Швейцария). Тест основан на расщеплении водорастворимой соли тетразолия митохондриальными дегидрогеназами в живых клетках. Клетки Касуми-1 рассаживали в 96-луночные планшеты на 24 ч, затем обрабатывали биназой и/или ингибитором *Akt1/2* в течение 24 ч. После этого клетки инкубировали в течение 60 мин при 37°C в присутствии реагента WST-1. Поглощение образцов измеряли с помощью микропланшетного ридера Multiscan FC (“Thermo Fisher Scientific”, США) на длине волны 450 нм. Референсные значения определяли на длине волны 620 нм. В качестве контроля использовали смесь среды без клеток с реагентом WST-1. Жизнеспособность необработанных клеток принимали за 100%. Приведены средние значения, вычисленные из трех независимых измерений.

Проточная цитометрия. Апоптоз. Клетки исследовали методом проточной цитометрии на цитофлуориметре BD LSRFortessa (“Becton Dickinson”, США). При проведении цитометрических опытов клетки с поврежденной мембраной выявляли с помощью йодида пропидия (PI, “Sigma”, США) (Ex/Em = 535/617 нм). PI добавляли к клеточной суспензии до конечной концентрации 10 мкг/мл за 1 мин до начала измерений. Окрашиваемые PI (PI-положительные) клетки считали некротическими. Апоптотические клетки регистрировали с помощью аннексина V (“Invitrogen”, США), меченного флуоресцеинизотиоцианатом (FITC, Ex/Em = 494/518 нм). Клетки, которые окрашивались как PI, так и аннексином V, считали находящимися на поздних стадиях апоптоза. Для определения апоптоза суспензию клеток центрифугировали (1000 об./мин, 10 мин), отбирали супернатант и ресуспендировали в буфере для связывания аннексина (10 мМ HEPES, 140 мМ NaCl, 2.5 мМ CaCl₂, pH 7.4). Затем к 100 мкл суспензии клеток (10⁶ клеток/мл) добавляли 5 мкл раствора конъюгата аннексина. Пробы инкубировали в течение 15 мин в темноте при комнатной температуре, после чего добавляли 400 мкл буфера для связывания аннексина и ставили на лед.

Изменение митохондриального потенциала. Митохондриальный потенциал (Ψ) определяли с помощью красителя MitoProbeDilC1(5) (Ex/Em = 638/658 нм, “Invitrogen”, США). Клетки (1 × 10⁶) инкубировали с 0.5 мкМ DilC1(5) в течение 30 мин при 37°C в темноте. Затем клетки промывали фосфатно-солевым буфером (PBS) при 4°C и ресуспендировали в PBS.

Уровень активных форм кислорода, кальция и восстановленного глутатиона. Уровень активных форм кислорода (АФК) оценивали с помощью дигидрорадамина 123 (DHR123, Ex/Em = 507/525 нм, “Invitrogen”), который позволил определять уровень АФК не только в цитозоле, но и в митохондриях. Клетки окрашивали, добавляя DHR123 до конечной концентрации 10 мкМ, и инкубировали в течение 30 мин при 37°C в темноте. Уровень восстановленного глутатиона определяли с использованием ThiolTracker (Ex/Em = 405/525 нм, “Invitrogen”). Для окрашивания клеток ThiolTracker добавляли до конечной концентрации 7.5 мкМ и инкубировали в течение 30 мин при 37°C в темноте. Уровень Ca²⁺ определяли, окрашивая клетки fluo-4 (Ex/Em = 494/516 нм, “Invitrogen”). Клетки инкубировали с красителем в концентрации 2.5 мкМ в течение 30 мин при 37°C. Затем клетки отмывали и ресуспендировали в PBS. Данные представлены как среднее из трех независимых экспериментов в трех повторностях со стандартными отклонениями.

Вестерн-блоттинг. Клетки собирали, отмывали в холодном PBS, а затем лизировали при +4°C в

течение 30–60 мин при постоянном перемешивании в RIPA-буфере (25 мМ Трис-НСl рН 7.6, 150 мМ NaCl, 1% NP-40, 1% дезоксихолата натрия, 0.1% додецилсульфата Na (ДДС-Na), 0.2 мМ фенолметансульфонилфторид (PMSF), коктейль ингибиторов протеаз (“Roche”, Швейцария, одна таблетка на 10 мл буфера) из расчета 30 мкл буфера на 1 млн. клеток. Полученные лизаты центрифугировали (10 мин, 16000 g), надосадочный раствор отбирали и определяли в нем концентрацию белка. Далее образцы разделяли с помощью одномерного электрофореза в полиакриламидном геле и переносили на мембраны PVDF. Мембраны блокировали 5%-ным раствором обезжиренного молока в буфере PBST (10 мМ KH_2PO_4 , 150 мМ NaCl, 0.1% Tween-20) в течение 2 ч при комнатной температуре на качалке и инкубировали с первичными антителами к АКТ (#4691, разбавление 1 : 5000) и Phospho-Akt (Ser473) (#9271, разбавление 1 : 2000) от (“Cell Signaling Technol”, США) в течение ночи при 4°C. Затем блоты инкубировали в течение 30 мин при комнатной температуре с вторичными антителами (“ИМТЕК”, Россия), конъюгированными с пероксидазой хрена, которые брали в разведении 1 : 10000. Для визуализации использовали Bio-Rad ChemiDoc MP. Результаты обрабатывали в программе Image Lab. Перед визуализацией мембрану инкубировали в течение 2 мин с хемилюминесцентным субстратом SuperSignal™ West Femto Maximum Sensitivity Substrate kit (“Thermo Scientific”). Данные нормировали по актину, детектированному с помощью антител AM4302 (“Ambion”, США). В работе приведены средние значения, вычисленные из трех независимых измерений со стандартным отклонением.

Статистический анализ. Приведены средние данные со стандартным отклонением ($\pm SD$), вычисленные не менее чем из трех независимых экспериментов. Сравнение групп данных проводили с использованием *t*-критерия Стьюдента. Данные считали статистически значимыми при $p < 0.05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Действие биназы и ингибитора киназ Akt1/2 на жизнеспособность клеток Касуми-1

Для оценки влияния биназы и ингибитора Akt1/2 на жизнеспособность клеток Касуми-1 мы обработали клетки биназой в концентрации 0.8 мкМ и ингибитором Akt1/2 (2.5, 5, 10, 25, 40 и 60 мкМ) по отдельности и в комбинациях (рис. 1). Через 24 ч жизнеспособность клеток под действием биназы снижалась на 29%. Действие ингибитора Akt1/2 в использованных концентрациях приводило к снижению жизнеспособности клеток на 41, 48, 55, 85, 92 и 95%, а в комбинации с

биназой — на 64, 69, 86, 98, 98 и 98% соответственно.

Биназа усиливает чувствительность клеток Касуми-1 к ингибитору киназ Akt1/2

Чтобы проверить гипотезу об активации независимого от КИТ пути пролиферации, мы оценили уровень активации АКТ-киназы в клетках Касуми-1 в ответ на обработку биназой (0.8 мкМ) и ингибитором Akt1/2 (5 мкМ). Киназа АКТ конститутивно активирована в клетках этой линии, поэтому соотношение фосфо-АКТ к общему количеству АКТ в контрольных клетках приняли за базальный уровень. Под действием биназы уровень активации АКТ-киназы увеличивается на 25% (рис. 2). Это свидетельствует о том, что в клетках Касуми-1 биназа активирует путь пролиферации, опосредуемый АКТ-киназой. Ингибитор Akt1/2 снижал уровень активации киназы на 22%, тогда как комбинация биназы и ингибитора Akt1/2 снижала уровень активации АКТ-киназы на 90% (рис. 2). Таким образом, в присутствии биназы ингибитор Akt1/2 более эффективно блокирует активацию АКТ-киназы в клетках Касуми-1.

Биназа и ингибитор Akt1/2 оказывают проапоптотическое действие на клетки Касуми-1

С помощью проточной цитометрии установлено, что под действием биназы (0.8 мкМ) количество мертвых клеток в популяции увеличилось в 2.1 раза, тогда как под влиянием ингибитора Akt1/2 (5 мкМ) доля PI-положительных клеток возросла в 2.4 раза по сравнению с контролем (рис. 3а). Применение комбинации этих агентов привело к увеличению количества мертвых клеток в популяции в 3.4 раза. Применение биназы и ингибитора АКТ-киназ по отдельности приводило в обоих случаях к повышению количества апоптотических клеток в популяции в 1.7 раза, а совместное воздействие этих веществ вызывало двукратное увеличение количества таких клеток.

Апоптоз, вызываемый биназой и ингибитором Akt1/2, сопровождается увеличением количества клеток со сниженным мембранным потенциалом митохондрий (рис. 3б). Так, в присутствии биназы, ингибитора Akt1/2 и их комбинации количество таких клеток в популяции возрастает в 1.5, 1.7 и 2 раза соответственно. Под действием биназы уровень активных форм кислорода (АФК) в клетках Касуми-1 снижается на 27% (рис. 3в). Напротив, ингибитор Akt1/2 приводил к повышению уровня АФК в клетках на 58%, а сочетанное действие двух агентов увеличило содержание АФК на 112%. Сходным было и изменение уровня восстановленного глутатиона (рис. 3г). В присутствии биназы, ингибитора Akt1/2 и их комбинации уровень глутатиона составил 65, 158 и 167% от

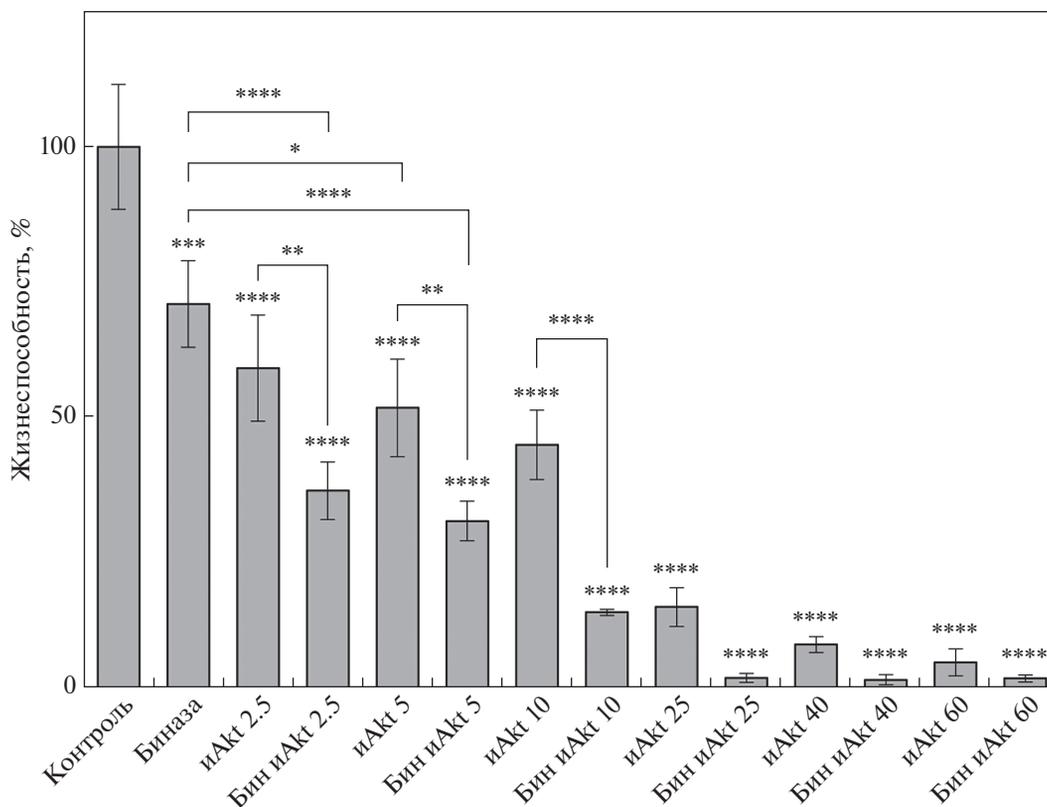


Рис. 1. Действие биназы (0.8 мкМ), ингибитора Akt1/2 (2.5, 5, 10, 25, 40 и 60 мкМ) и их комбинаций на жизнеспособность клеток Касуми-1 после 24 ч обработки. Жизнеспособность клеток в контроле взята за 100%. Представлены средние значения, вычисленные из трех независимых экспериментов в трипликатах \pm SD; * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, **** $p < 0.0001$.

уровня в контроле соответственно. Уровень внутриклеточного Ca^{2+} в клетках Касуми-1, обработанных биназой и ингибитором Akt1/2, возрастает на 50 и 80% соответственно, а при их совместном применении – на 245%.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Нами показано, что совместное применение биназы и ингибитора Akt1/2 индуцирует гибель клеток Касуми-1, при этом токсические эффекты этих соединений складываются. Под действием биназы в клетках Касуми-1, как показано ранее, блокируется пролиферативный путь, опосредуемый тирозинкиназой KIT [5]. Однако из полученных данных следует, что в условиях блокады антиапоптотического сигнала через KIT под действием биназы в клетках Касуми-1 активируется АКТ-киназа (рис. 2), что приводит к выживанию части клеток.

Известно, что конститутивно активированная в клетках Касуми-1 АКТ-киназа может дополнительно активироваться в ответ на различные стимулы [19, 20]. Путь PI3K/АКТ конститутивно активирован у 50–80% больных острыми миелоген-

ными лейкозами [20], хотя активирующих мутаций самой киназы АКТ при миелогенных лейкозах до сих пор не обнаружено [21]. Имеющиеся данные указывают на то, что различные ингибиторы АКТ-или PI3K-киназ могут оказывать проапоптотическое действие на разные линии миелогенных лейкозов. Например, показано значительное снижение темпов роста опухоли, а также увеличение количества апоптотических клеток при ингибировании АКТ-киназы [21]. Известно, что активация АКТ-киназы оказывает антиапоптотическое действие на клетки преимущественно через ингибирование апоптоз-зависимых событий в митохондриях [22]. Данные, полученные в этой работе, свидетельствуют, что апоптоз, индуцируемый ингибитором Akt1/2 в клетках Касуми-1, сопровождается падением митохондриального потенциала, увеличением уровней АФК, восстановленного глутатиона и внутриклеточного кальция.

Апоптоз, индуцируемый биназой в клетках Касуми-1, сопровождается снижением уровня АФК и восстановленного глутатиона, увеличением количества клеток со сниженным митохондриальным потенциалом и ростом уровня внутриклеточного кальция. Ранее также было по-

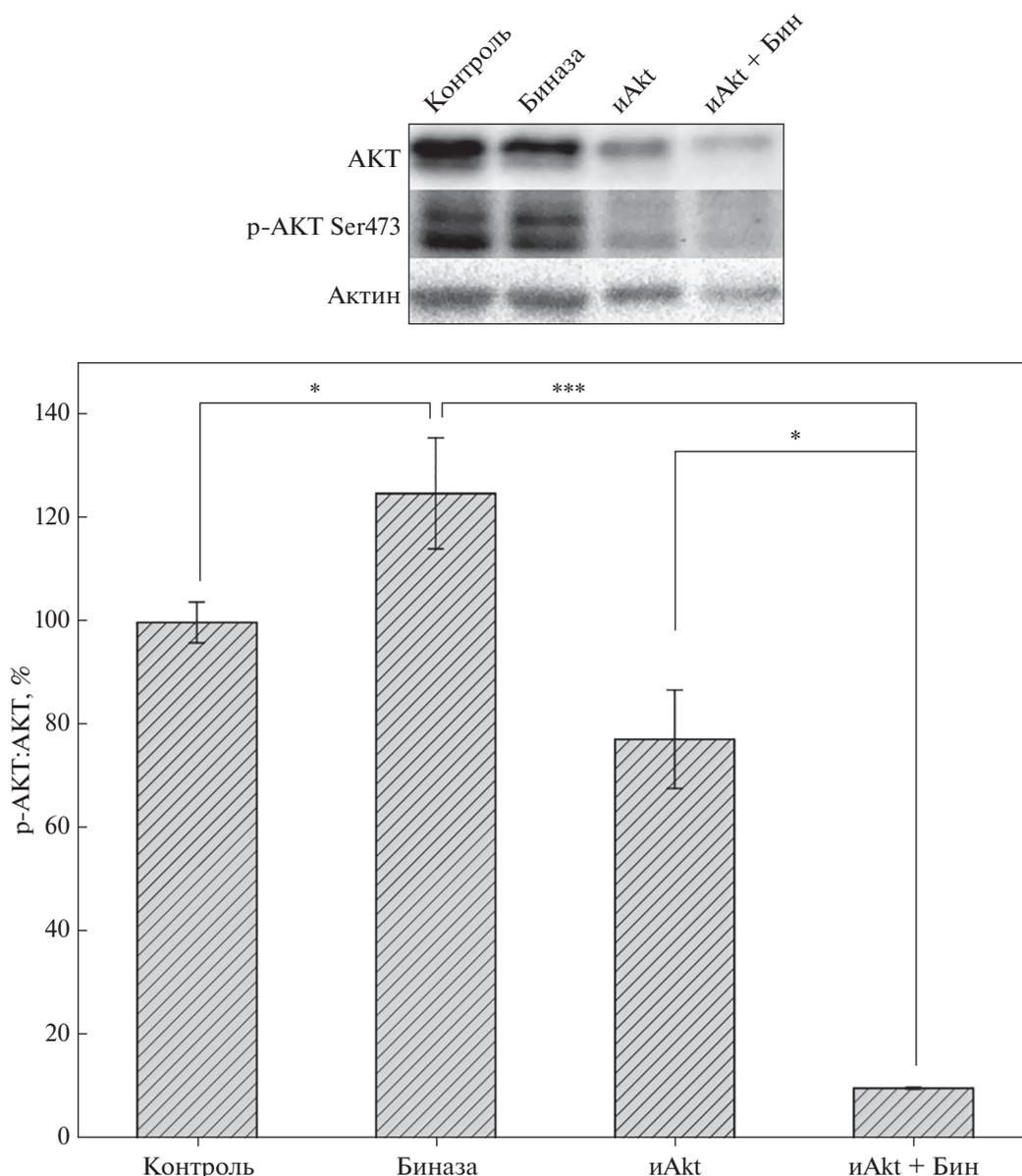


Рис. 2. Влияние биназы и ингибитора Akt1/2 на активацию АКТ-киназы в клетках Касуми-1. Репрезентативный Вестерн-блот, показывающий уровни белков АКТ, p-AKT Ser473 и актина в клетках Касуми-1, обработанных 0.8 мкМ биназы, 5 мкМ ингибитора Akt1/2 и их комбинацией в течение 24 ч, относительно необработанных клеток. Гистограмма показывает уровень активации АКТ-киназы в клетках, определенный как отношение уровней p-AKT Ser473 к общему уровню внутриклеточной АКТ-киназы. Каждый столбик представляет среднее значение \pm SD, вычисленное из трех независимых экспериментов. * $p < 0.05$, *** $p < 0.01$.

казано, что индуцируемый биназой апоптоз имеет признаки как рецепторного, так и митохондриального: действие биназы приводит к активации каспазы-8 и повреждению митохондрий [23].

Повышение уровня АФК в опухолевых клетках тесно связано с их метаболизмом и увеличенной скоростью пролиферации [24, 25]. При этом повышение уровня GSH во многих опухолевых клетках человека считается важным патологическим фактором и указывает на устойчивость к

противоопухолевой терапии [26, 27]. Роль редокс-баланса и, в частности, глутатиона в жизнеспособности раковых клеток активно изучается [28]. В качестве одного из средств терапии рассматривается истощение клеток по глутатиону [28]. Индукция небольшого сдвига редокс-статуса раковых клеток в сторону окислительного стресса вызывает адаптацию клеток к повышенному уровню АФК вследствие регуляции целого ряда белков антиоксидантной защиты, способствуя выживанию клеток и возникновению агрессивных,

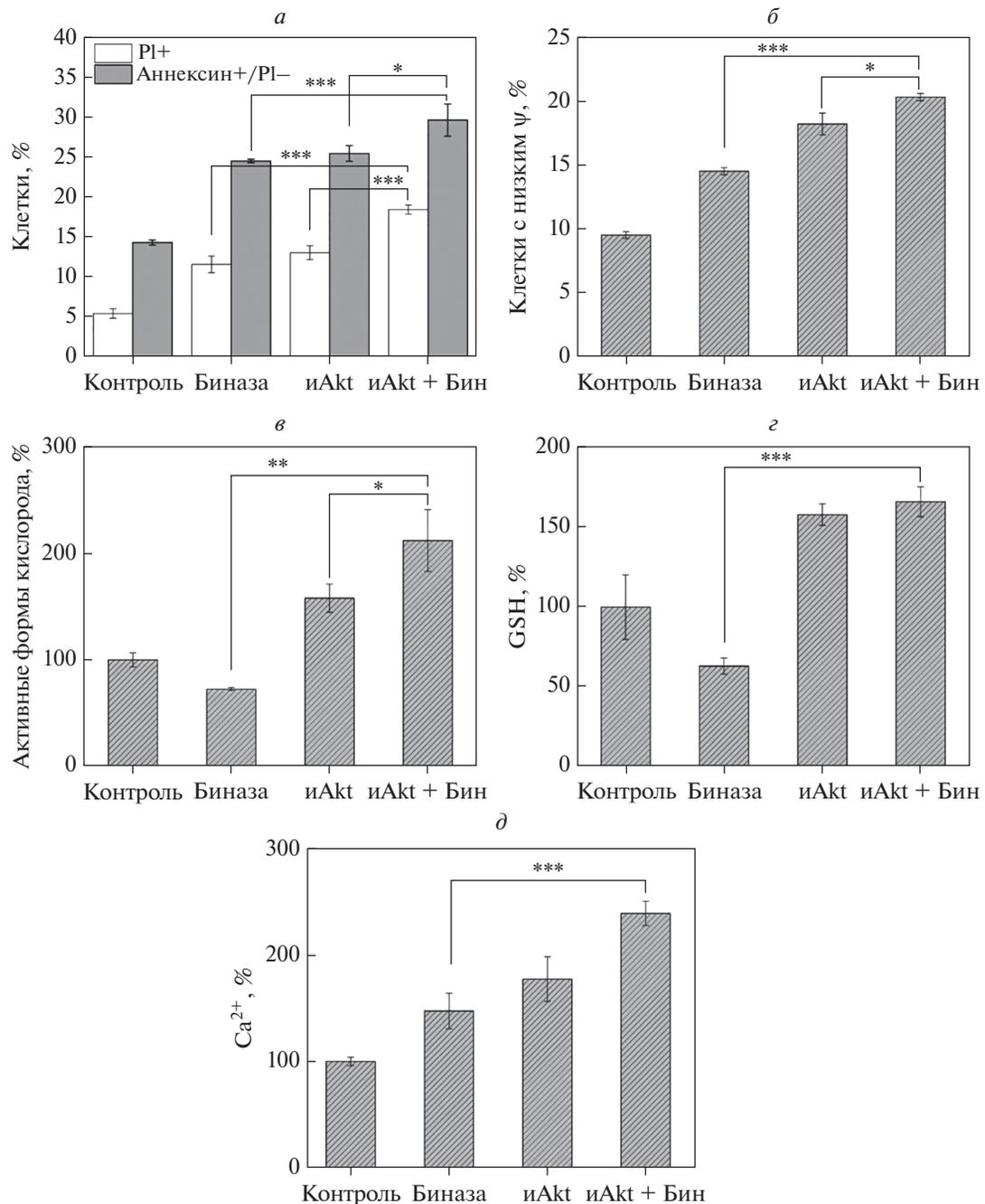


Рис. 3. Влияние биназы (0.8 мкМ), ингибитора Akt1/2 (5 мкМ) и их комбинации на клетки Касуми-1 через 24 ч инкубации. Количество мертвых клеток (пустые колонки) и апоптотических клеток (серые колонки) (а), и клеток с низким митохондриальным потенциалом ψ (б) представлено как процент от общего числа клеток в каждом варианте. Уровни АФК (в), GSH (г) и внутриклеточного Ca^{2+} (д) представлены относительно уровня в необработанном контроле. Приведены средние значения, вычисленные из трех независимых экспериментов в трипликатах \pm SD; * $p < 0.05$, ** $p < 0.02$, *** $p < 0.005$, **** $p < 0.0003$.

терапевтически устойчивых форм рака [29]. Несмотря на очевидное влияние АФК на развитие и прогрессию опухолей, лечение онкологических больных антиоксидантами не улучшает, а в некоторых случаях даже ухудшает исход болезни [30]. Для индукции гибели раковых клеток необходи-

мо значительное смещение их редокс-состояния в крайнее окислительное состояние [29].

Установлена тесная связь между редокс-статусом клеток и активностью АКТ-киназы. Экзогенная или эндогенная индукция АФК способствует активации АКТ-киназы в клетках гепатомы через

PI3K-зависимый путь [31], увеличивая пролиферацию клеток. Позже показали, что пероксид водорода или ингибирование синтеза глутатиона индуцирует фосфорилирование АКТ, что приводит к эндотелиальной дифференцировке сферических, подобных стволовым, клеток рака печени из линии HEP-G2 [32]. Оказалось, что редокс-чувствительность АКТ обусловлена модификациями остатков цистеина. Установлено, что АКТ содержит остатки цистеина, редокс-зависимая модификация которых может вызывать изменение ее фосфорилирования в ответ на изменение редокс-статуса клетки [33]. Замены этих остатков не влияют на базовую активность АКТ, но нарушают ее редокс-регуляцию и снижают способность клеток выживать в условиях окислительного стресса [33]. Обнаружено, что определяющую роль в редокс-регуляции АКТ играет глутатионилирование остатков цистеина [34, 35]. Снижение активности глутаредоксина, катализирующего реакцию глутатионилирования-деглутатионилирования, в зависимости от редокс-условий приводит к снижению активации (фосфорилирования) АКТ при окислительном стрессе [33, 34]. В частности, на клетках пигментного эпителия сетчатки показано, что при окислительном стрессе происходит активация АКТ и одновременное повышение глутатионилирования АКТ, при этом глутаредоксин снижает глутатионилирование АКТ, способствуя длительному существованию ее активной фосфорилированной формы (Ser473), что способствует выживанию клеток [34]. С другой стороны, в клетках нейробластомы SH-SY5Y наблюдается увеличение глутатионилирования фосфо-АКТ (Ser473) под действием липополисахаридов или ингибитора глутатионтрансферазы Omega 1-1, что предполагает клеточно-специфичную редокс-регуляцию АКТ [35]. Можно заключить, что умеренный окислительный стресс приводит к активации АКТ, способствуя выживаемости клеток, тогда как сильный окислительный стресс может приводить к полному окислению белка и его протеасомной деградации [33], что будет снижать жизнеспособность клеток.

Таким образом, нельзя исключить, что в активацию АКТ-зависимого пути пролиферации клеток Касуми-1 [19, 20] вовлечено повышение уровня АФК. Активация АКТ-зависимого пути пролиферации биназой может быть связана не только с инактивацией K1T-зависимого пути, как мы предполагали ранее [5], но и с изменением редокс-статуса клеток под действием биназы. Так, ранее мы показали, что биназа в концентрации от 1.5 до 40 мкМ приводит к дозозависимому снижению уровня АФК в клетках Касуми-1 [23]. В данной работе нами установлено, что биназа (уже в концентрации 0.8 мкМ) одновременно со снижением уровня АФК, повышенного в злокачественных клетках, приводит к снижению уровня

глутатиона, тем самым приближая величину редокс-статуса клеток Касуми-1 к значениям, характерным для нормальных клеток. В условиях опухолевого роста это должно отрицательно сказаться на адапционном потенциале клеток. Сдвиг редокс-статуса клеток может приводить к изменению глутатионилирования белков. Действительно, инкубация клеток Касуми-1 с биназой в концентрации 0.8 мкМ приводит к глутатионилированию Na,K-АТФазы, что вносит вклад в ингибирование ее активности [4]. Таким образом, можно предположить, что повышение уровня фосфорилирования АКТ связано с изменением уровня ее глутатионилирования вследствие изменения редокс-условий под действием биназы.

В отличие от биназы, ингибирование АКТ-зависимого пути пролиферации с помощью ингибитора Akt/2 приводит к существенному росту АФК и повышению уровня GSH (рис. 3в, г). Это свидетельствует о разных механизмах действия данных веществ, что, вероятно, позволяет им дополнять и усиливать действие друг друга. Повышение уровня АФК под действием ингибитора АКТ1/2 наблюдали ранее в кардиомиоцитах, однако это повышение было гораздо менее значительным [36]. Причина этого пока не установлена. Возрастание уровня кальция и содержания (%) клеток со сниженным митохондриальным потенциалом позволяет предположить, что в этот процесс вовлечено изменение состояния митохондрий, причем основной вклад в изменение пула АФК вносят митохондрии. Это предположение подтверждается тем фактом, что при использовании красителя DHR, позволяющего детектировать как цитозольные, так и митохондриальные АФК, мы наблюдали гораздо более выраженный рост АФК, чем при использовании красителя DCF [36], который выявляет только цитозольные АФК. Совместное применение биназы и ингибитора Akt1/2 приводит к существенному снижению уровня активной, фосфорилированной формы АКТ-1 и более значительному росту АФК, что и определяет повышение цитотоксического действия при совместном применении двух веществ.

Описано комбинированное применение ингибиторов АКТ-киназ с другими противоопухолевыми препаратами [37–39]. Нами показано, что обработка биназой делает клетки Касуми-1 более чувствительными к ингибированию АКТ-киназ, что проявляется в снижении соотношения р-АКТ: АКТ по сравнению с клетками, обработанными ингибитором Akt1/2 без биназы. Этот подход приводит к усилению процессов апоптоза и гибели большего количества клеток, чем при использовании этих агентов по отдельности.

Ранее биназу уже рассматривали в качестве компонента комплексной терапии. Так показано, что биназа восстанавливает чувствительность HPV-16-

положительных клеток SiHa (вирус папилломы человека типа 16) к интерферону [7]. Этот эффект обусловлен подавлением биназой вирусных белков E6 и E7, блокирующих проведение сигнала от рецептора интерферона. Также установлено, что биназа повышает эффективность полихимиотерапевтической комбинации доксорубицина, винкристина, циклофосамида и преднизолона, снижая при этом гепатотоксичность химиотерапии [8].

Полученные данные свидетельствуют о взаимодополняющем действии ингибитора Akt1/2 и биназы, которое достигается за счет ингибирования различных путей пролиферации опухолевых клеток и повышения эффективности действия ингибитора Akt1/2, в присутствии биназы. Таким образом, сочетанное применение биназы и ингибитора Akt1/2 может быть перспективным для терапии лейкозов и других злокачественных заболеваний, в основе которых лежит онкотрансформация, включающая изменение функционирования КИТ.

Авторы благодарят Лагуткина Дениса за помощь в проведении Вестерн-блот-гибридизации.

Работа выполнена в рамках Программы стратегического академического лидерства КФУ (Приоритет 2030) при финансовой поддержке гранта Российского фонда фундаментальных исследований (№ 18-29-08024) и гранта ICGEB № CRP/RUS20-01.

В исследовании не использованы биологические материалы, полученные от людей или животных.

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Pan S.T., Li Z.L., He Z.X., Qiu J.X., Zhou S.F. (2016) Molecular mechanisms for tumour resistance to chemotherapy. *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.* **43**, 723–737.
- Mironova N., Vlassov V. (2019) Surveillance of tumour development: the relationship between tumour-associated rnas and ribonucleases. *Front. Pharmacol.* **10**, 1019.
- Gotte G., Menegazzi M. (2019) Biological activities of secretory RNases: focus on their oligomerization to design antitumor drugs. *Front. Immunol.* **10**, 2626.
- Mitkevich V.A., Petrushanko I.Y., Makarov A.A. (2019) RNases disrupt the adaptive potential of malignant cells: perspectives for therapy. *Front. Pharmacol.* **10**, 922.
- Mitkevich V.A., Petrushanko I.Y., Spirin P.V., Fedorova T.V., Kretova O.V., Tchurikov N.A., Prassolov V.S., Ilinskaya O.N., Makarov A.A. (2011) Sensitivity of acute myeloid leukemia Kasumi-1 cells to binase toxic action depends on the expression of KIT and AML1-ETO oncogenes. *Cell Cycle.* **10**, 4090–4097.
- Sen'kova A.V., Mironova N.L., Patutina O.A., Mitkevich V.A., Markov O.V., Petrushanko I.Y., Burnysheva K.M., Zenkova M.A., Makarov A.A. (2014) Ribonuclease binase decreases destructive changes of the liver and restores its regeneration potential in mouse lung carcinoma model. *Biochimie.* **101**, 256–259.
- Mitkevich V.A., Burnysheva K.M., Petrushanko I.Y., Adzhubei A.A., Schulga A.A., Chumakov P.M., Makarov A.A. (2017) Binase treatment increases interferon sensitivity and apoptosis in SiHa cervical carcinoma cells by downregulating E6 and E7 human papilloma virus oncoproteins. *Oncotarget.* **8**, 72666–72675.
- Mironova N.L., Petrushanko I.Y., Patutina O.A., Sen'kova A.V., Simonenko O.V., Mitkevich V.A., Markov O.V., Zenkova M.A., Makarov A.A. (2013) Ribonuclease binase inhibits primary tumor growth and metastases via apoptosis induction in tumor cells. *Cell Cycle.* **12**, 2120–2131.
- Зеленихин П.В., Еад Мохамед И.С., Надырова А.И., Сироткина А.А., Ульянова В.В., Миронова Н.Л., Митькевич В.А., Макаров А.А., Зенкова М.А., Ильинская О.Н. (2020) Рибонуклеаза *Bacillus pumilus* ингибирует миграцию клеток аденокарциномы двенадцатиперстной кишки человека HuTu 80. *Молекуляр. биология.* **54**, 146–152.
- Митькевич В.А., Орлова Н.Н., Петрушанко И.Ю., Симоненко О.В., Спирин П.В., Прокофьева М.М., Stocking C., Макаров А.А., Прасолов В.С. (2013) Экспрессия онкогена FLT3-ITD сообщает предшественникам В-клеток мыши линии VAF3 чувствительность к цитотоксическому действию биназы. *Молекуляр. биология.* **47**, 282–285.
- Mitkevich V.A., Petrushanko I.Y., Kretova O.V., Spirin P.V., Zelenikhin P.V., Prassolov V.S., Tchurikov N.A., Ilinskaya O.N., Makarov A.A. (2010) Oncogenic c-kit transcript is a target for binase. *Cell Cycle.* **9**, 2674–2678.
- Ilinskaya O.N., Singh I., Dudkina E., Ulyanova V., Kayumov A., Barreto G. (2016) Direct inhibition of oncogenic KRAS by *Bacillus pumilus* ribonuclease (binase). *Biochim. Biophys. Acta.* **1863**, 1559–1567.
- Митькевич В.А., Макаров А.А., Ильинская О.Н. (2014) Клеточные мишени противоопухолевых рибонуклеаз. *Молекуляр. биология.* **48**, 214–222.
- Зеленихин П.В., Макеева А.В., Нгуен Т.Н., Сирадж Е.А., Ильинская О.Н. (2016). Сочетанное действие биназы и блеомицина на клетки аденокарциномы легких человека. *Биомед. химия.* **62**, 279–282.
- Wang Y.-Y., Zhou G.-B., Tong Y.T., Chen B., Shi J.Y., Liang W.-X., Jin X.-L., You J.-H., Yang G., Shen Z.-X., Chen J., Xiong S.-M., Chen G.-Q., Feng X., Liu Y.-W., Chen Z., Chen S.-J. (2005) AML1-ETO and C-KIT mutation/overexpression in t(8;21) leukemia: implication in stepwise leukemogenesis and response to Gleevec. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **102**, 1104–1109.
- Larizza L., Magnani I., Beghini A. (2005) The Kasumi-1 cell line: a t(8;21)-kit mutant model for acute myeloid leukemia. *Leuk. Lymphoma.* **46**, 247–255.

17. Martelli A.M., Evangelisti C., Chiarini F., McCubrey J.A. (2010) The phosphatidylinositol 3-kinase/Akt/mTOR signaling network as a therapeutic target in acute myelogenous leukemia patients. *Oncotarget*. **1**, 89–103.
18. Schulga A., Kurbanov F., Kirpichnikov M., Protasevich I., Lobachev V., Ranjbar B., Chekhov V., Polyakov K., Engelborghs Y., Makarov A. (1998) Comparative study of binase and barnase: experience in chimeric ribonucleases. *Protein Eng.* **11**, 775–782.
19. Blume-Jensen P., Janknecht R., Hunter T. (1998) The kit receptor promotes cell survival via activation of PI 3-kinase and subsequent Akt-mediated phosphorylation of Bad on Ser136. *Curr. Biol. CB*. **8**, 779–782.
20. Grandage V.L., Gale R.E., Linch D.C., Khwaja A. (2005) PI3-kinase/Akt is constitutively active in primary acute myeloid leukaemia cells and regulates survival and chemoresistance via NF-kappa B, MAP kinase and p53 pathways. *Leukemia*. **19**, 586–594.
21. Pei R., Si T., Lu Y., Zhou J.X., Jiang L. (2018) Salvianolic acid A, a novel PI3K/Akt inhibitor, induces cell apoptosis and suppresses tumor growth in acute myeloid leukemia. *Leuk. Lymphoma*. **59**, 1959–1967.
22. Ramos A.M., Fernández C., Amrán D., Sancho P., de Blas E., Aller P. (2005) Pharmacologic inhibitors of PI3K/Akt potentiate the apoptotic action of the anti-leukemic drug arsenic trioxide via glutathione depletion and increased peroxide accumulation in myeloid leukemia cells. *Blood*. **105**, 4013–4020.
23. Mitkevich V.A., Kretova O.V., Petrushanko I.Y., Burnysheva K.M., Sosin D.V., Simonenko O.V., Ilinskaya O.N., Tchurikov N.A., Makarov A.A. (2013) Ribonuclease binase apoptotic signature in leukemic Kasumi-1 cells. *Biochimie*. **95**, 1344–1349.
24. Moloney J.N., Cotter T.G. (2018) ROS signalling in the biology of cancer. *Semin. Cell Dev. Biol.* **80**, 50–64.
25. Galadari S., Rahman A., Pallichankandy S., Thayyullathil F. (2017) Reactive oxygen species and cancer paradox: to promote or to suppress? *Free Radic. Biol. Med.* **104**, 144–164.
26. Traverso N., Ricciarelli R., Nitti M., Marengo B., Furfaro A.L., Pronzato M.A., Marinari U.M., Domenicotti C. (2013) Role of glutathione in cancer progression and chemoresistance. *Oxid. Med. Cell. Longev.* **2013**, 972913.
27. Chen H.H., Kuo M.T. (2010) Role of glutathione in the regulation of cisplatin resistance in cancer chemotherapy. *Met. Based Drugs*. **2010**, 430939.
28. Lv H., Zhen C., Liu J., Yang P., Hu L., Shang P. (2019) Unraveling the potential role of glutathione in multiple forms of cell death in cancer therapy. *Oxid. Med. Cell. Longev.* **2019**, 3150145.
29. Chaiswing L., St Clair W.H., St Clair D.K. (2018) Redox paradox: a novel approach to therapeutics-resistant cancer. *Antioxid. Redox Signal.* **29**, 1237–1272.
30. DeNicola G.M., Karreth F.A., Humpton T.J., Gopinathan A., Wei C., Frese K., Mangal D., Yu K.H., Yeo C.J., Calhoun E.S., Scrimieri F., Winter J.M., Hruban R.H., Iacobuzio-Donahue C., Kern S.E., Blair I.A., Tuveson D.A. (2011) Oncogene-induced Nrf2 transcription promotes ROS detoxification and tumorigenesis. *Nature*. **475**, 106–109.
31. Shi D.-Y., Deng Y.-R., Liu S.-L., Zhang Y.-D., Wei L. (2003) Redox stress regulates cell proliferation and apoptosis of human hepatoma through Akt protein phosphorylation. *FEBS Lett.* **542**, 60–64.
32. Zhao Z., Gao J., Li C., Xu X., Hu Y., Huang S. (2020) Reactive oxygen species induce endothelial differentiation of liver cancer stem-like sphere cells through the activation of Akt/IKK signaling pathway. *Oxid. Med. Cell Longev.* **2020**, 1621687.
33. Ahmad F., Nidadavolu P., Durgadoss L., Ravindranath V. (2014) Critical cysteines in Akt1 regulate its activity and proteasomal degradation: implications for neurodegenerative diseases. *Free Radic. Biol. Med.* **74**, 118–128.
34. Liu X., Jann J., Xavier C., Wu H. (2015) Glutaredoxin 1 (Grx1) protects human retinal pigment epithelial cells from oxidative damage by preventing AKT glutathionylation. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* **56**, 2821–2832.
35. Saisawang C., Wongsantichon J., Robinson R.C., Ketterman A.J. (2019) Glutathione transferase Omega 1-1 (GSTO1-1) modulates Akt and MEK1/2 signaling in human neuroblastoma cell SH-SY5Y. *Proteins*. **87**, 588–595.
36. Yang Z., Wu Y., Wang L., Qiu P., Zha W., Yu W. (2020) Prokineticin 2 (PK2) Rescues cardiomyocytes from high glucose/high palmitic acid-induced damage by regulating the AKT/GSK3β pathway *in vitro*. *Oxid. Med. Cell Longev.* **2020**, 3163629.
37. Jilkova Z.M., Kuyucu A.Z., Kurma K., Ahmad Pour S.T., Roth G.S., Abbadessa G., Yu Y., Schwartz B., Sturm N., Marche P.N., Hainaut P., Decaens T. (2018) Combination of AKT inhibitor ARQ 092 and sorafenib potentiates inhibition of tumor progression in cirrhotic rat model of hepatocellular carcinoma. *Oncotarget*. **9**, 11145–11158.
38. Hudis C., Swanton C., Janjigian Y.Y., Lee R., Sutherland S., Lehman R., Chandarlapaty S., Hamilton N., Gajria D., Knowles J., Shah J., Shannon K., Tetteh E., Sullivan D.M., Moreno C., Yan L., Han H.S. (2013) A phase I study evaluating the combination of an allosteric AKT inhibitor (MK-2206) and trastuzumab in patients with HER2-positive solid tumors. *Breast Cancer Res.: BCR*. **15**, R110.
39. Tolcher A.W., Patnaik A., Papadopoulos K.P., Rasco D.W., Becerra C.R., Allred A.J., Orford K., Aktan G., Ferron-Brady G., Ibrahim N., Gauvin J., Motwani M., Cornfeld M. (2015) Phase I study of the MEK inhibitor trametinib in combination with the AKT inhibitor afuresertib in patients with solid tumors and multiple myeloma. *Cancer Chemother. Pharmacol.* **75**, 183–189.

**COMBINATION OF RNase BINASE AND AKT1/2 KINASE INHIBITOR
BLOCKS TWO ALTERNATIVE SURVIVAL PATHWAYS IN KASUMI-1 CELLS****V. A. Mitkevich^{1, 2, *}, I. Yu. Petrushanko¹, M. G. Engelhardt¹, O. I. Kechko¹, and A. A. Makarov¹**¹ *Engelhardt Institute of Molecular Biology, Russian Academy of Sciences, Moscow, 119991 Russia*² *Institute of Fundamental Medicine and Biology, Kazan Federal University, Kazan, 420008 Russia***e-mail: mitkevich@gmail.com*

The treatment of malignant neoplasms often requires the selection of effective combinations of chemotherapeutic agents. This requires an understanding of the molecular mechanisms of action of chemotherapeutic agents on specific tumor cells. Ribonuclease binase is considered as an antitumor agent, and the sensitivity of malignant cells to the apoptogenic action of binase is determined by the presence of certain oncogenes. In acute myelogenous leukemia cells, Kasumi-1 binase blocks the proliferation pathway mediated by the mutant tyrosine kinase KIT, while, as shown in this work by Western blot, an alternative proliferation pathway through AKT kinase is activated in cells. Using cell proliferation assay and flow cytometry we have shown that binase in combination with an Akt1/2 inhibitor induces apoptosis in Kasumi-1 cells, while their toxic effects add up. The complementary effects of the Akt1/2 inhibitor and binase are achieved by inhibiting different pathways of tumor cell proliferation, and increasing the sensitivity of Kasumi-1 cells to inhibition of AKT activation by binase. Thus, the combined use of binase and AKT kinase inhibitors can effectively block various pathways of tumor cell proliferation and be used for their elimination.

Keywords: ribonuclease, malignant cell, cancer therapy, proliferation pathway, acute myelogenous leukemia

**ВИРУСНЫЕ ИНФЕКЦИИ: ОТ МЕХАНИЗМОВ РЕПЛИКАЦИИ
И ПАТОГЕНЕЗА К ПОДХОДАМ ТЕРАПИИ**

УДК 578.286; 57.084.1

**МОДЕЛИРОВАНИЕ ИНФЕКЦИИ SARS-CoV-2 У МЫШЕЙ ЗА СЧЕТ
ТРАНЗИЕНТНОЙ ЭКСПРЕССИИ ГЕНА ACE2 ЧЕЛОВЕКА ПУТЕМ
ИНТРАНАЗАЛЬНОГО ВВЕДЕНИЯ AAV-hACE2**

© 2022 г. Д. В. Глазкова^a, Е. В. Богословская^a, Ф. А. Урусов^{a, b, *}, Н. П. Карташова^c,
Е. А. Глубокова^c, А. В. Грачева^c, Е. Б. Файзулов^c, Г. В. Трунова^d, В. А. Хохлова^d,
О. А. Безбородова^d, А. А. Панкратов^d, И. А. Ленева^c, Г. А. Шипулин^a

^aЦентр стратегического планирования и управления медико-биологическими рисками здоровью
Федерального медико-биологического агентства Российской Федерации, Москва, 119992 Россия

^bНаучно-исследовательский институт медицины труда им. академика Н.Ф. Измерова, Москва, 105275 Россия

^cНаучно-исследовательский институт вакцин и сывороток им. И.И. Мечникова, Москва, 105064 Россия

^dНациональный медицинский исследовательский центр радиологии Министерства здравоохранения Российской Федерации, Москва, 125284 Россия

*e-mail: flanger.fx@mail.ru

Поступила в редакцию 25.01.2022 г.

После доработки 08.04.2022 г.

Принята к публикации 12.04.2022 г.

Один из важнейших этапов в создании препаратов и вакцин для борьбы с новой коронавирусной инфекцией, COVID-19, — это их тестирование на релевантной модели животных. В экспериментальной медицине удобной моделью, с хорошо изученной иммунологией, считаются лабораторные мыши. Однако эти животные не подвержены заражению коронавирусом-2, вызывающим тяжелый острый респираторный синдром (SARS-CoV-2) у человека, из-за отсутствия на клетках его рецептора — ангиотензинпревращающего фермента-2 человека (hACE2), необходимого для проникновения вируса в клетку. Нами показано, что интраназальное введение аденоассоциированных вирусных векторов: AAV9 и AAV-DJ, — кодирующих hACE2, приводит к высокому уровню экспрессии гена этого белка, ACE2, в легких, в отличие от вектора AAV6, введение которого вызывает низкую экспрессию ACE2. При заражении SARS-CoV-2 мышью, экспрессирующей hACE2, вирус реплицировался в легких, что приводило к развитию бронхопневмонии на седьмые сутки после инфицирования. Таким образом, впервые предложена простая методика доставки гена ACE2 человека в легкие мышей путем интраназального введения аденоассоциированного вектора, позволяющая в короткие сроки получить модель животных для изучения инфекции SARS-CoV-2.

Ключевые слова: hACE2, SARS-CoV-2, AAV9, AAV6, AAV-DJ, мыши BALB/c

DOI: 10.31857/S0026898422050068

Для разработки и тестирования терапевтических и профилактических лекарственных средств против любой инфекции, включая новую коронавирусную инфекцию, COVID-19, необходимо использовать релевантные модели животных. Наиболее распространенные и доступные животные — лабораторные мыши — не могут быть использованы для моделирования течения заболевания, вызванного вирусом SARS-CoV-2. Это связано с тем, что для проникновения в хозяйскую клетку вириона SARS-CoV-2 необходим клеточный рецептор — ангиотензинпревращающий фермент-2 человека (hACE2), — связываясь с которым, вирус начинает свой инфекционный цикл. Мышиный же ортолог hACE2 (Ace2) не узнается этим коронавирусом, то есть не служит его ре-

цептором, и поэтому SARS-CoV-2 не может инфицировать клетки мышей. Появление в 2021 году трансгенных мышей, у которых ген hACE2, ACE2, присутствует в геноме и экспрессируется в клетках легких, отчасти решает эту проблему [1]. Однако эти животные не всегда доступны и, кроме того, ограничены линией с определенным генетическим бэкграундом, что не позволяет изучать влияние генетических особенностей на течение заболевания. Более простым и доступным решением может стать введение мышам вектора, несущего ген ACE2. Hassan A. и соавт. [2] показали, что интраназальное введение аденовирусного вектора (AdV), кодирующего hACE2, позволяет достичь экспрессии этого белка в легких мышей и получить животных, чувствительных к зараже-

нию SARS-CoV-2. Однако введение AdV сопровождается воспалительным процессом в бронхах, что может при последующем заражении исказить картину течения инфекции COVID-19. Также для доставки гена *ACE2* было предложено использование адноассоциированных вирусных векторов (AAV-векторов), не вызывающих воспаления, хотя в этом случае эффективным оказалось только интратрахеальное введение AAV-вектора в респираторный тракт мышей [3, 4]. Следует отметить, что интратрахеальное введение относится к инвазивным методам, что сильно усложняет получение трансдуцированных животных. На основании этих фактов мы поставили перед собой задачу оптимизировать доставку гена *ACE2* с помощью AAV-векторов в респираторный тракт мышей BALB/c и охарактеризовать экспериментальную модель инфекции COVID-19 у этих лабораторных животных.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Вирусы, клетки. Клетки линии HEK-293FT (“Invitrogen”, США) культивировали в среде DMEM (“Gibco”, США), содержащей 10% эмбриональной сыворотки крупного рогатого скота (FBS; “Gibco”) и 0.01 М NEPEP (“Gibco”). Клетки линии Vero CCL81 (ATCC, США) из коллекции Научно-исследовательского института вакцин и сывороток им. И.И. Мечникова (Россия) культивировали в среде DMEM с 5% FBS, 100 МЕ/мл пенициллина и 100 мкг/мл стрептомицина. Лабораторный штамм SARS-CoV-2 Dubrovka (GenBank Acc. No. MW161041.1) был выделен на культуре клеток Vero CCL81 из назофарингеального мазка больного COVID-19. Штамм прошел 20 последовательных пассажей на клетках Vero CCL81 и вызывал выраженное цитопатическое действие.

Конструирование плазмиды pAAV-hACE2. Плазида pсDNA3-sACE2(WT)-Fc(IgG1), содержащая N-концевую часть гена *ACE2*, кодирующего белок hACE2, получена из “Addgene” (Addgene plasmid #154104) [5]. Сборку C-концевой части проводили методом ПЦР с удлинением перекрывающихся участков [6]. Перекрывающиеся N- и C-концевые участки амплифицировали и объединяли, используя ПЦР. Фрагмент, содержащий полный ген, интегрировали в плазмидный вектор pAAV-GFP (“CellBioLabs, Inc.”, США) и получили плазмиду pAAV-hACE2, которую валидировали секвенированием.

Получение векторных частиц AAV-hACE2. Для наработки AAV-векторов использовали хелперную плазмиду pHelper (“CellBioLabs, Inc.”), векторную плазмиду pAAV-hACE2 и одну из плазмид pAAV6-RC6, pAAV9-RC или pAAVDJ-RC, кодирующих белки капсидов AAV серотипов 6, 9 или DJ (“CellBioLabs, Inc.”). Получение векторных частиц и их очистку проводили, используя протокол трансфекции с полиэтиленимином и очистки

полиэтиленгликолем (PEG 8000), описанный Т. Kimura и др. [7].

Определение титра AAV методом ПЦР. Для определения титра AAV (числа векторных геномов в 1 мл, вг/мл) ДНК из образца выделяли с помощью набора реагентов АмплиТест РИБО-преп (ФГБУ “Центр стратегического планирования и управления медико-биологическими рисками здоровью” ФМБА России, Россия) в соответствии с рекомендациями производителя. ПЦР в реальном времени проводили на приборе RotorGene Q, используя праймеры на область ITR AAV и соответствующую программу амплификации [8].

Экспериментальные животные. В исследовании использовали самок мышей линии BALB/c с массой тела 18–20 г, которые были получены из “БиоПитомника СТЕЗАР” (Россия).

Введение мышам вектора AAV-hACE2. Суспензию векторных частиц вводили мышам интраназально в общем объеме 60 мкл (30 мкл в каждую ноздрию) под легким эфирным наркозом, держа животных под углом 45° с зафиксированным в закрытом положении ротом [9].

Заражение животных. Мышей заражали вирусом SARS-CoV-2, взятым в титре 3.2×10^6 ТЦИД₅₀/мл, интраназально: общий объем – 60 мкл (по 30 мкл в каждую ноздрию) – под легким эфирным наркозом. Животным, входящим в группы сравнения, таким же образом и в таком же объеме интраназально вводили фосфатно-солевой буфер.

Определение инфекционного титра вируса в легких. Здесь и далее материал для исследований получали от гуманно умерщвленных под наркозом животных. В стерильных условиях извлекали легкие, которые гомогенизировали и ресуспендировали в фосфатно-солевом буфере. Суспензию осветляли центрифугированием. Клетки Vero CCL81 рассеивали в 96-луночные планшеты (“Corstar”, США) с плотностью 2×10^4 клеток на лунку и культивировали в течение 3 суток. Готовили 10-кратные разведения проб вируса из легких, которые вносили в лунки планшета (200 мкл/лунка) и инкубировали при 37°C в течение 5 суток до появления цитопатического действия в клетках вирусного контроля. Расчет титра вируса проводили по методу, описанному М.А. Ramakrishnan [10], и выражали в lg (ТЦИД₅₀/мл). Предел чувствительности метода составлял 1.5 lg.

Экстракция РНК из образцов легких мышей. Легкие извлекали, гомогенизировали в стерильных условиях в 1 мл раствора ExtractRNA (“Евроген”, Россия). Лизат осветляли центрифугированием и проводили экстракцию РНК хлороформом. Далее РНК выделяли с помощью набора реагентов АмплиТест РИБО-преп (ФГБУ “Центр стратегического планирования и управления медико-биологическими рисками здоровью” ФМБА России) согласно рекомендациям производителя.

Анализ экспрессии гена ACE2 в легких мышей. Образцы РНК обрабатывали ДНКазой в течение 20 мин, после чего прогревали при 70°C 10 мин. Количество мРНК hACE2 в образцах определяли с помощью ПЦР в реальном времени, используя праймеры: 5'-CTGGGAATCCAACCAACTCTG-3', 5'-CCACTACAATCACGTCCATC-3' – и зонд 5'-Fam-CCAGCCCCCGTTAGTATTTGGCTC-BHQ1-3'. В качестве внутреннего контроля использовали ПЦР в реальном времени с праймерами на ген бета-глюкуронидазы мыши (*Gusb*).

Определение РНК SARS-CoV-2 в легких. Тестирование образцов РНК на наличие РНК SARS-CoV-2 проводили с помощью набора реагентов АмплиТест SARS-CoV-2 (ФГБУ “Центр стратегического планирования и управления медико-биологическими рисками здоровью” ФМБА России) согласно инструкции производителя.

Морфологическое исследование. Правое легкое мышей фиксировали в 10%-ном нейтральном забуференном формалине в течение 24 ч, обезвоживали и заливали в Гистомикс (“BioVitrum”, Россия). На этапе заливки материал ориентировали вдоль длинной оси. Серийные срезы толщиной 3–5 мкм изготавливали на ротационном микротоме Leica RM 2125 RTS (“Leica”, Германия), затем окрашивали гематоксилином и эозином и заключали в канадский бальзам. Гистологические препараты исследовали под световым микроскопом BX 51 (“Olympus”, Япония) с системой фоторегистрации материала.

Статистическая обработка. Для количественных данных вычисляли групповое среднее арифметическое и стандартную ошибку среднего. Статистический анализ выполняли с использованием программы Statistica 8.0. Достоверность различий между группами данных оценивали с применением *U*-критерия Манна–Уитни. Различия считали достоверными при $p < 0.05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Экспрессия гена ACE2 в легких мышей после введения вектора

Для получения модельных мышей с транзитной экспрессией hACE2 необходимо доставить ген ACE2 в клетки легких. После интраназального введения AAV-вектор при вдыхании проникает в нижние дыхательные пути и трансдуцирует эпителиальные клетки легких. Экспрессия ACE2 в этих клетках приводит к появлению hACE2 на их поверхности, а значит к возможности связывания с ними вируса SARS-CoV-2. После связывания с hACE2 вирус проникает в клетку и запускает цикл репликации.

Для интраназального введения мы использовали модифицированную методику L. Santry и соавт. [9]. В первом эксперименте сравнивали экс-

прессию hACE2 в легких животных при использовании для доставки ACE2 AAV с капсидами трех разных серотипов: AAV9, AAV6 и AAV-DJ. AAV-векторы в дозах, указанных в табл. 1, вводили мышам в соответствии с процедурой, описанной в “Экспериментальной части”; AAV-вектор каждого серотипа вводили группе из трех животных. На 7, 14 и 21 сутки после введения AAV проводили забор легких и оценивали количество мРНК hACE2, используя обратную транскрипцию (ОТ) с ПЦР в реальном времени. Также для оценки эффективности выделения РНК и прохождения ОТ-ПЦР в образцах измеряли уровень мРНК бета-глюкуронидазы мыши (*Gusb*). Средний пороговый цикл (C_t) для мРНК *Gusb* составлял 18.4, а стандартное отклонение по C_t в образцах от разных животных не превышало 7%, что позволило сравнивать результаты измерения мРНК hACE2 без нормализации, используя в качестве параметра для сравнения значения C_t для ACE2.

Как видно из данных, приведенных в табл. 1, введение ACE2 с помощью вектора AAV6 приводило к экспрессии этого гена на очень низком уровне у части животных, у остальных мРНК hACE2 вообще не удалось обнаружить. После введения гена ACE2 с помощью векторов AAV9 и AAV-DJ наблюдали его стабильную экспрессию в легких. Уровень экспрессии ACE2 статистически значимо не отличался при доставке векторами AAV9 и AAV-DJ. При сравнении количества мРНК hACE2 в легких мышей при введении различных доз препаратов (от 6×10^9 до 6×10^{10} для вектора AAV9 и от 6×10^9 до 2×10^{10} для вектора AAV-DJ) выявлено, что экспрессия ACE2 отличалась незначительно и сохранялась на одном уровне вплоть до 21 суток. Для дальнейших экспериментов был выбран вектор AAV-DJ, так как при наработке давал более высокий выход.

Развитие инфекции, вызванной SARS-CoV-2, у трансдуцированных AAV-DJ-hACE2 мышей

Дизайн эксперимента по изучению развития инфекции, вызываемой SARS-CoV-2, у трансдуцированных и нетрансдуцированных животных представлен в табл. 2.

На 4 и 7 сутки после заражения у животных забирали легкие для определения инфекционного титра вируса, РНК SARS-CoV-2 и проведения гистологического исследования – в соответствии с табл. 2.

Результаты измерения инфекционного титра SARS-CoV-2 в легких приведены в табл. 3. В зараженной группе 2 все образцы были отрицательными. В группе 3, трансдуцированной AAV-DJ-hACE2, на четвертые сутки после заражения инфекционный титр, Ig ТЦИД₅₀/мл, составлял в среднем 3.08 ± 0.14 lg. В те же сроки у животных

Таблица 1. Средние значения пороговых циклов (C_t) для гена *ACE2* в образцах, полученных из легких мышей, после введения AAV-векторов

Вектор	Доза ^a	Среднее значение порогового цикла, C_t		
		время, сутки		
		7	14	21
AAV9	6×10^{10}	19.7 ± 0.8	19.2 ± 1.0	20.3 ± 0.1
	2×10^{10}	23.3 ± 1.8	20.4 ± 0.3	20.2 ± 0.3
	6×10^9	21.0 ± 0.5	21.7 ± 0.4	20.1 ± 0.8
AAV6	2×10^{10}	30.4 ± 1.6	30.2 (1 из 3) ^b	30.5 ± 0.2 (2 из 3) ^b
	6×10^9	31.6 (1 из 3) ^b	33.2 (1 из 3) ^b	34.3 (1 из 3) ^b
AAV-DJ	2×10^{10}	21.7 ± 2.0	20.3 ± 1.4	21.1 ± 1.1
	6×10^9	21.0 ± 0.5	23.0 ± 1.6	20.5 ± 0.5

^a Доза приведена в числе геномных эквивалентов AAV, введенных одному животному. ^b Указано число образцов, положительных по ПЦР, для которых вычисляли среднее значение C_t .

Таблица 2. Дизайн эксперимента по заражению мышей SARS-CoV-2

№ ^a	Число мышей	Время, сутки					
		1	10	14 (4 dpi ^d)		17 (7 dpi ^d)	
		введение вектора ^b	заражение ^c	левое легкое	правое легкое	левое легкое	правое легкое
1	3	–	–	н.з. ^e	н.з.	н.з.	Гистология
2	6	+	–	PHK ^f	ИТ ^g	PHK ИТ	Гистология
3	6	+	+	PHK	ИТ	PHK ИТ	Гистология
4	6	–	+	PHK	ИТ	PHK ИТ	Гистология

^a Номер группы; ^b вектор AAV-DJ-hACE2 в дозе 2×10^{10} вводили мышам интраназально; ^c мышей заражали вирусом SARS-CoV-2; ^d (day post-infection) – день после заражения; в каждой группе проводили забор легких у трех животных; ^e легкие не забирали; ^f определение PHK SARS-CoV-2; ^g инфекционный титр SARS-CoV-2.

группы 4 – не трансдуцированных вектором – титр был на порядок меньше и составлял 2.08 ± 0.14 lg. У животных, получивших AAV-DJ-hACE2, инфекционный титр снижался с 3.08 ± 0.14 lg на четвертых сутках до 2.17 ± 0.14 lg на седьмые, а в группе 4 на седьмые сутки вирус не детектировался вообще.

При тестировании PHK SARS-CoV-2 с помощью набора АмплиТест SARS-CoV-2 методом ОТ-ПЦР в реальном времени выделение PHK и качество анализа оценивали по внутреннему контролю, разброс значений C_t для которого не превышал 1, что позволило сравнивать значения C_t для PHK SARS-CoV-2 без нормализации. На четвертые сутки достоверных отличий в уровне PHK SARS-CoV-2 между группами 3 и 4 не было. Об-

разцы, полученные от всех трех мышей группы 3, были положительными – среднее значение C_t составляло 26.7. В группе 4 один из трех образцов был отрицательным, значения C_t для остальных составляли 24.8 и 26.8. PHK SARS-CoV-2 в образцах, полученных на седьмые сутки, не определялась, за исключением одного образца из группы 3, где был выявлен ее низкий уровень ($C_t = 29.1$)

Морфологическое исследование легких мышей

На 17 сутки эксперимента (7 день после заражения SARS-CoV-2 групп 3 и 4) у части животных проводили морфологическое исследование легких. Показано, что легкие интактных мышей (группа 1) и мышей группы 2 (17 сутки после введения AAV-DJ-hACE2) имели нормальное строе-

Таблица 3. Анализ инфекционного титра и РНК SARS-CoV-2 в легких мышей

Группа	№ мыши	Время, сутки			
		4 dpi		7 dpi	
		титр вируса, lg(ТЦИД ₅₀)	вирусная РНК, С _t	титр вируса, lg(ТЦИД ₅₀)	вирусная РНК, С _t
1	1			н.о. ^a	н.о.
	2			н.о.	н.о.
	3			н.о.	н.о.
2 (+AAV-DJ-hACE2)	1	– ^b	–	–	–
	2	–	–	–	–
	3	–	–	–	–
3 (+AAV-DJ -hACE2 +SARS-CoV-2)	1	3.25	28.4	2.25	29.1
	2	3.0	24.1	2.25	–
	3	3.0	27.5	2.0	–
	Среднее значение	3.08 ± 0.14	26.7 ± 2.3	2.17 ± 0.14	
4 (+SARS-CoV-2)	1	2.0	–	н.о.	–
	2	2.25	24.8	н.о.	–
	3	2.0	26.8	н.о.	–
	Среднее значение	2.08 ± 0.14			

^a Не определяли; ^b отрицательный результат.

ние (рис. 1а–г). На 7 сутки после инфицирования SARS-CoV-2 у мышей из группы 4 (не трансдуцированных AAV-DJ-hACE2) гистоструктура легких в целом соответствовала норме. Однако в стенке отдельных бронхов и в соединительной ткани вокруг единичных сосудов выявляли небольшие лимфогистиоцитарные скопления (рис. 1д, е).

При микроскопическом исследовании легких мышей из группы 3 (получивших AAV-DJ-hACE2) – на 7 сутки после заражения SARS-CoV-2 – у двух мышей из трех обнаружены участки с выраженными альтеративными и воспалительными изменениями. В легком одной мыши безвоздушные очаги и участки со сниженной воздушностью занимали 60–70% площади среза, у другой – 25–30% (рис. 2а). Просветы бронхов в этих очагах были заполнены гнойным экссудатом. Эпителиальная выстилка бронхов содержала клетки с дистрофическими изменениями, часть эпителиоцитов была слущена в просвет – вследствие цитопатического действия коронавируса. Собственная пластинка слизистой оболочки бронхов была умеренно инфильтрирована лимфоцитами, гистиоцитами и нейтрофилами (рис. 2б). В адвентициальном слое бронхов отмечена гиперплазия бронхоассоциированной лимфоидной ткани (БАЛТ). В расположенных перибронхиально альвеолярных ходах, альвеолах и периваскулярно выявлена вы-

раженная воспалительная инфильтрация из лимфоцитов и гистиоцитов, чередующаяся с обширными зонами гнойного воспаления, в которых просвет альвеол и межальвеолярные перегородки не определялись (рис. 2в). В зонах вне пневмонии видна гиперемия сосудов, выраженная гиперплазия БАЛТ и периваскулярной лимфоидной ткани (рис. 2г). Таким образом, на седьмые сутки после интраназального заражения SARS-CoV-2 мышей, экспрессирующих hACE2, в легких животных выявляли безвоздушные участки паренхимы, соответствовавшие бактериально-вирусной бронхопневмонии с началом абсцедирования.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Ни одну из моделей животных, используемых сегодня для моделирования COVID-19, нельзя считать идеальной и полностью отражающей течение инфекции в организме человека. Широко используемая модель заболевания на сирийских хомячках поддерживает размножение вируса и вызывает патологический процесс в легких животных, но не приводит к летальным исходам. Использование мышей имеет свои преимущества. Мыши – наиболее распространенные мелкие лабораторные животные, их использование дешевле и удобнее для проведения масштабных

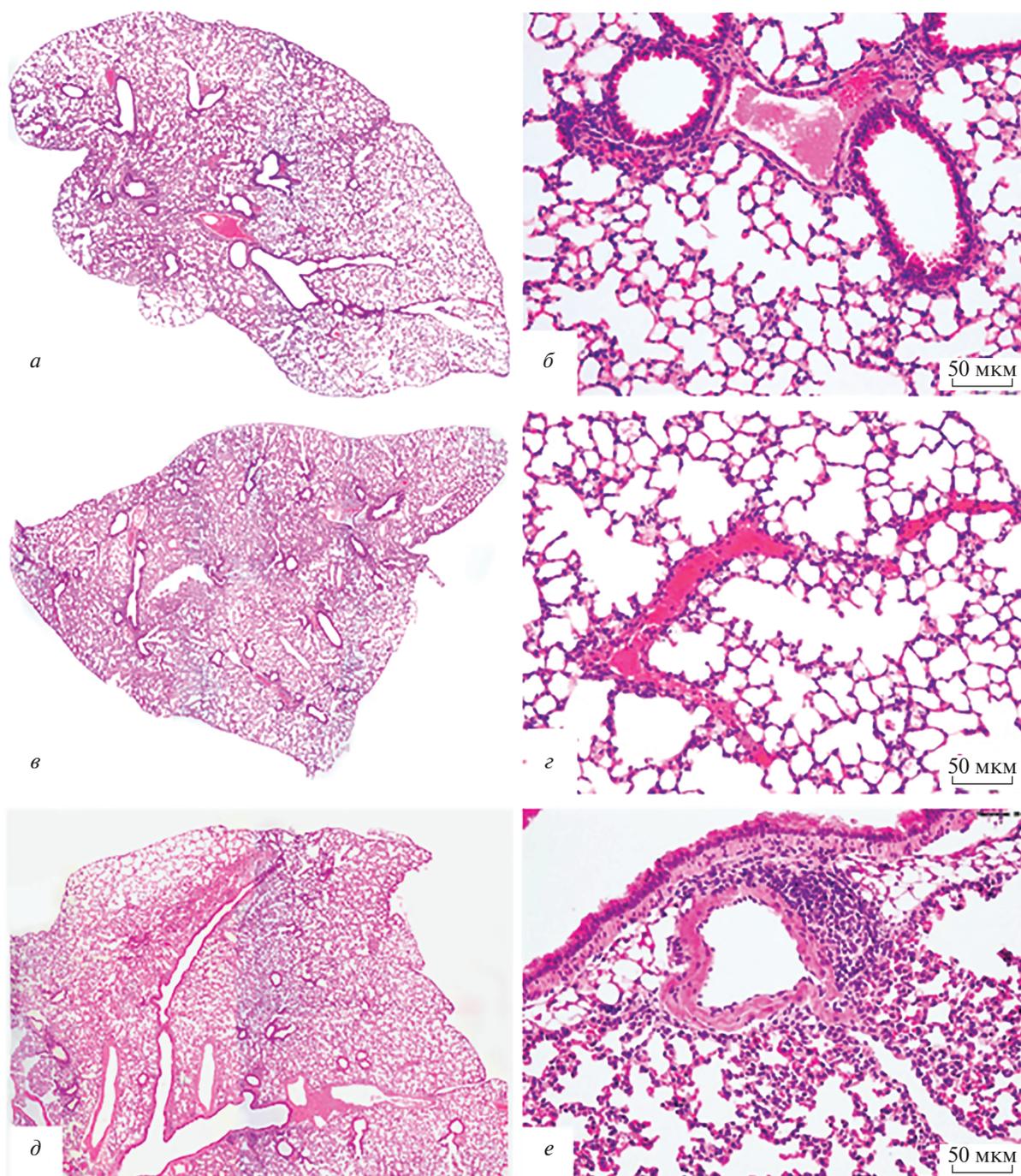


Рис. 1. Морфологическая характеристика легких мышей на 17 сутки эксперимента. Представлены легкие животных из контрольной группы 1 (*a, б*), из группы 2 (17 сутки после введения AAV-DJ-hACE2) (*в, з*) и из группы 4 (7 день после заражения SARS-CoV-2) (*д, е*). В легких животных групп 1 и 2 (*a–з*) просветы бронхов свободные, в их стенке видны единичные лимфоциты, равномерно воздушные просветы альвеолярных ходов и альвеол, тонкие межальвеолярные перегородки. В группе 4 в стенке бронха и периваскулярно расположены небольшие лимфогистиоцитарные скопления. Окраска гематоксилином и эозином; увеличение: $\times 40$ (*a, в, д*) и $\times 200$ (*б, з, е*).

исследований. Важное преимущество мышей – возможность детально исследовать Т-клеточный ответ, причем как с точки зрения его развития при инфекции COVID-19, так и после вакцинации [11]. Большой интерес представляет “леталь-

ная модель” трансгенных мышей, в геном которых встроен ген, кодирующий ACE2 человека – ACE2, – но доступ к таким животным ограничен.

Попытки обеспечить транзientную экспрессию ACE2 для создания модели мышей, пригод-

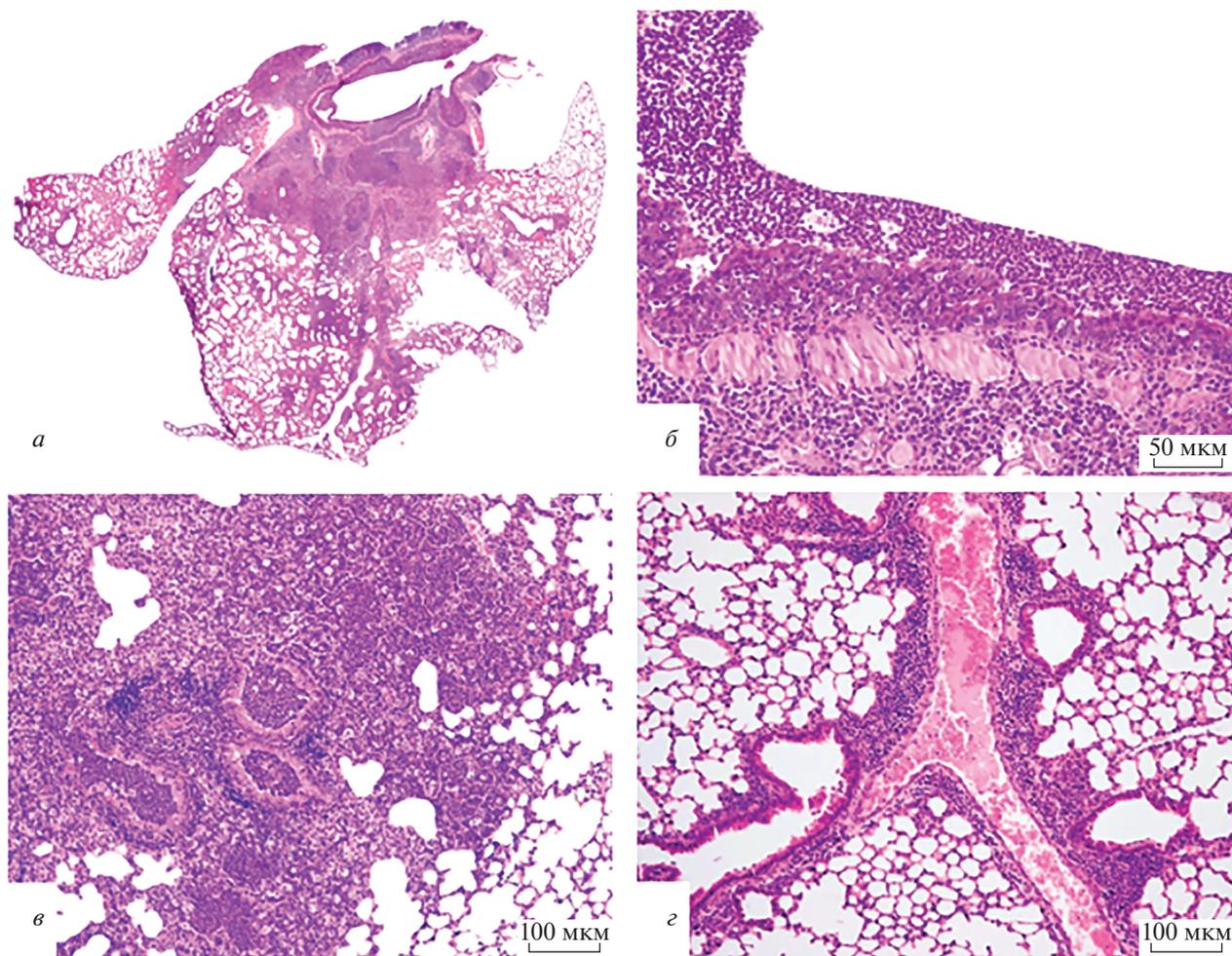


Рис. 2. Морфологическая характеристика легких мышей из группы 3, трансдуцированных AAV-DJ-hACE2 и зараженных SARS-CoV-2, на 17 сутки эксперимента. *a* – Картина бронхопневмонии; *б* – просвет крупного бронха содержит гнойный экссудат, эпителий с дистрофическими изменениями, лейкопедез, воспалительная инфильтрация стенки; *в* – очаг бронхопневмонии: просветы бронхов, бронхиол и альвеол заполнены гнойным экссудатом со значительной примесью макрофагов; *г* – зона вне бронхопневмонии: муфтообразный периваскулярный лимфогистиоцитарный инфильтрат, гиперплазия БАЛТ, полнокровие сосуда. Окраска гематоксилином и эозином. Увеличение: $\times 40$ (*a*), $\times 200$ (*б*), $\times 100$ (*в*, *г*).

ной для инфицирования как SARS-CoV-1, так и SARS-CoV-2, предпринимались ранее. Для доставки гена *ACE2* использовали аденовирусный вектор или аденоассоциированные векторы [2–4, 12]. С.-Р. Sun и соавт. [12] показали, что интраназальное введение мышам AAV6-hACE2 приводит к низкой трансдукции, в то время как интратрахеальное введение – к высокой эффективности трансдукции клеток легких. L. Santry и др. [9] предложили модифицированную методику интраназального введения, которая позволила провести эффективную доставку вектора AAV6 с маркерным геном GFP в легкие мышей. Мы также использовали модифицированную методику для интраназального введения AAV. Однако введение вектора AAV6-hACE2 приводило к очень низкому или недетектируемому уровню экспрессии hACE2 в лег-

ких мышей. В то же время использование векторов других серотипов: AAV9 и AAV-DJ – позволило успешно трансдуцировать клетки легких и достигнуть высокого и воспроизводимого уровня экспрессии *ACE2*. Таким образом, нам удалось избежать проблем, сопряженных с использованием интратрахеального введения вектора – сложного и инвазивного метода, который приводит к большой вариабельности результатов.

При заражении животных, трансдуцированных AAV-DJ-hACE2, SARS-CoV-2 эффективно реплицировался в легких модельных мышей: инфекционный титр на 4 сутки составлял $3.08 \lg$ и на 7 сутки снижался до $2.17 \lg$. Эти данные несколько отличаются от результатов, полученных В. Israelow и соавт. [3], которые показали полную элиминацию инфекционного вируса из легких на

7 сутки при использовании схожей модели. Неожиданным для нас фактом стало определение инфекционного вируса в низком титре у тех животных, которым не вводили AAV-hACE2, на 4 сутки после заражения SARS-CoV-2.

Данные по выявлению вирусной РНК оказались менее информативными, чем результаты по определению инфекционного титра: на 4 сутки после заражения вирусную РНК обнаруживали и в группе мышей, получивших AAV-DJ-hACE2, и в группе без AAV-DJ-hACE2. То, что вирусная РНК может циркулировать у мышей, не поддерживающих репликацию SARS-CoV-2, было продемонстрировано и в ранее опубликованных работах [3, 13].

Репликация SARS-CoV-2 в легких животных, трансдуцированных AAV-DJ-hACE2, приводила к развитию бактериально-вирусной бронхопневмонии на 7 сутки после заражения, в отличие от животных, не получивших AAV-DJ-hACE2. Присоединению бактериальной микрофлоры, вероятно, способствовало нарушение мукоцилиарного барьера воздухоносных путей, обусловленное прямым действием вируса на мерцательный эпителий бронхов. В легких нетрансдуцированных мышей на 7 сутки после заражения SARS-CoV-2 патологических изменений не обнаружено.

Таким образом, в проведенных нами экспериментах продемонстрирована возможность быстрого получения релевантной модели мышей, которые чувствительны к заражению SARS-CoV-2 и могут быть использованы для исследования эффективности разрабатываемых вакцин и препаратов для профилактики и лечения COVID-19.

Представленная нами модель может быть в дальнейшем усовершенствована для получения “летальной модели” инфекции SARS-CoV-2, которая наиболее востребована для исследования вакцин и лекарственных препаратов. Интересным направлением в оптимизации модели может быть введение AAV-hACE2 гуманизированным мышам. Использование таких мышей позволяет более точно имитировать клинические проявления COVID-19 у человека, в частности хроническое течение, развитие фиброза легких, а также системную лимфопению [13].

Исследование выполнено при финансовой поддержке РФФИ в рамках научного проекта № 20-04-60100. Работа выполнена с использованием оборудования Центра коллективного пользования Научно-исследовательского института вакцин и сывороток им. И.И. Мечникова.

Все работы с животными проводились в соответствии с правилами, принятыми Европейской конвенцией по защите позвоночных животных (Страсбург, 1986); Приказом Министерства здравоохранения Российской Федерации № 199Н от 1 апреля 2016 года, Principles of Good Laboratory

Practice (OECD, ENV/MC/CUEM (98)17, 1997); ГОСТ 33044-2014 “Принципы надлежащей лабораторной практики” (идентичен GLP OECD); Good Laboratory Practice for Nonclinical Laboratory Studies (21 CFR Part 58, 1978, USA, FDA), рассмотрены и утверждены комиссией ФГБНУ “Научно-исследовательского института вакцин и сывороток им. И.И. Мечникова” по уходу и использованию животных на предмет соответствия регулирующим актам.

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Winkler E.S., Bailey A.L., Kafai N.M., Nair S., McCune B.T., Yu J., Fox J.M., Chen R.E., Earnest J.T., Keeler S.P., Ritter J.H., Kang L.I., Dort S., Robichaud A., Head R., Holtzman M.J., Diamond M.S. (2020) SARS-CoV-2 infection of human ACE2-transgenic mice causes severe lung inflammation and impaired function. *Nat. Immunol.* **21**(11), 1327–1335.
2. Hassan A.O., Case J.B., Winkler E.S., Thackray L.B., Kafai N.M., Bailey A.L., McCune B.T., Fox J.M., Chen R.E., Alsoussi W.B., Turner J.S., Schmitz A.J., Lei T., Shrihari S., Keeler S.P., Fremont D.H., Greco S., McCray P.B., Jr., Perlman S., Holtzman M.J., Ellebedy A.H., Diamond M.S. (2020) A SARS-CoV-2 infection model in mice demonstrates protection by neutralizing antibodies. *Cell.* **182**(3), 744–753.e4.
3. Israelow B., Song E., Mao T., Lu P., Meir A., Liu F., Alfajaro M.M., Wei J., Dong H., Homer R.J., Ring A., Wilen C.B., Iwasaki A. (2020) Mouse model of SARS-CoV-2 reveals inflammatory role of type I interferon signaling. *J. Exp. Med.* **7**, 217(12), e20201241.
4. Sun J., Zhuang Z., Zheng J., Li K., Wong R. L., Liu D., Huang J., He J., Zhu A., Zhao J., Li X., Xi Y., Chen R., Alshukairi A. N., Chen Z., Zhang Z., Chen C., Huang X., Li F., Lai X., Chen D., Wen L., Zhuo J., Zhang Y., Wang Y., Huang S., Dai J., Shi Y., Zheng K., Leidinger M.R., Chen J, Li Y., Zhong N., Meyerholz D.K., McCray P.B. Jr, Perlman S., Zhao, J. (2020) Generation of a broadly useful model for COVID-19 pathogenesis, vaccination, and treatment. *Cell.* **182**(3), 734–743.
5. Chan K.K., Dorosky D., Sharma P., Abbasi S.A., Dye J.M., Kranz D.M., Herbert A.S., Procko E. (2020). Engineering human ACE2 to optimize binding to the spike protein of SARS coronavirus 2. *Science.* **369**(6508), 1261–1265.
6. Higuchi R., Krummel B., Saiki R. (1988) A general method of *in vitro* preparation and specific mutagenesis of DNA fragments: study of protein and DNA interactions. *Nucleic Acids Res.* **16**(15), 7351–7367.
7. Kimura T., Ferran B., Tsukahara Y., Shang Q., Desai S., Fedoce A., Pimentel D.R., Luptak I., Adachi T., Ido Y., Matsui R., Bachschmid M.M. (2019) Production of adeno-associated virus vectors for *in vitro* and *in vivo* applications. *Sci. Rep.* **9**(1), 13601.
8. Aurnhammer C., Haase M., Muether N., Hausl M., Rauschhuber C., Huber I., Nitschko H., Busch U., Sing A., Ehrhardt A., Baiker A. (2012) Universal real-

- time PCR for the detection and quantification of adeno-associated virus serotype 2-derived inverted terminal repeat sequences. *Hum. Gene Ther. Methods*. **23**(1), 18–28.
9. Santry L.A., Ingraio J.C., Yu D.L., de Jong J.G., van Lieshout L.P., Wood G.A., Wootton S.K. (2017) AAV vector distribution in the mouse respiratory tract following four different methods of administration. *BMC Biotechnol.* **17**(1), 43.
 10. Ramakrishnan M.A. (2016) Determination of 50% endpoint titer using a simple formula. *World J. Virol.* **5**(2), 85–86.
 11. Veit S., Jany S., Fux R., Sutter G., Volz A. (2018) CD8+ T cells responding to the middle east respiratory syndrome coronavirus nucleocapsid protein delivered by vaccinia virus MVA in mice. *Viruses*. **10**(12), 718.
 12. Sun C.-P., Jan J.-T., Wang I.-H., Ma H.-H., Ko H.-Y., Wu P.-Y., Kuo T.-J., Liao H.-N., Lan Y.-H., Sie Z.-L., Chen Y.-H., Ko Y.-A., Liao C.-C., Chen L.-Y., Lee I.-J., Tsung S.-I., Lai Y.-J., Chiang M.-T., Liang J.-J., Liu W.-C., Wang J.-R., Yuan J.P.-Y., Lin Y.-S., Tsai Y.-C., Hsieh S.-L., Li C.-W., Wu H.-C., Ko T.-M., Lin Y.-L., Tao M.-H. (2021) Rapid generation of mouse model for emerging infectious disease with the case of severe COVID-19. *PLoS Pathog.* **17**(8), e1009758.
 13. Sefik E., Israelow B., Mirza H., Zhao J., Qu R., Kaffé E., Song E., Halene S., Meffre E., Kluger Y., Nussenzweig M., Wilen C.B., Iwasaki A., Flavell R.A. (2022) A humanized mouse model of chronic COVID-19. *Nat. Biotechnol.* **40**, 906–920. <https://doi.org/10.1038/s41587-021-01155-4>

GENERATION OF SARS-CoV-2 MOUSE MODEL BY TRANSIENT EXPRESSION OF THE HUMAN *ACE2* GENE MEDIATED BY INTRANASAL ADMINISTRATION OF AAV-hACE2

D. V. Glazkova¹, E. V. Bogoslovskaya¹, F. A. Urusov^{1, 2, *}, N. P. Kartashova³, E. A. Glubokova³, A. V. Gracheva³, E. B. Faizuloev³, G. V. Trunova⁴, V. A. Khokhlova⁴, O. A. Bezborodova⁴, A. A. Pankratov⁴, I. A. Leneva³, and G. A. Shipulin¹

¹ Center for Strategic Planning and Management of Medical and Biological Health Risks, Federal Medical-Biological Agency of the Russian Federation, Moscow, 119992 Russia

² Izmerov Research Institute of Occupational Health, Moscow, 105275 Russia

³ Mechnikov Research Institute of Vaccines and Sera, Moscow, 105064 Russia

⁴ National Medical Research Radiological Centre, Ministry of Health of the Russian Federation, Moscow, 125284 Russia

*e-mail: flanger.fx@mail.ru

One of the most important steps in the development of drugs and vaccines against a new coronavirus infection is their testing on a relevant animal model. Laboratory mouse is the most preferred mammalian model in experimental medicine with well-studied immunology. However, mice are not susceptible to infection with SARS-CoV-2 due to the lack of human angiotensin-converting enzyme 2 (hACE2), which is the cell receptor of SARS-CoV-2 and necessary for the entry of the virus into the cell. In present work, it was shown that intranasal administration of adeno-associated vectors AAV9 and AAV-DJ encoding the hACE2 provided a high level of expression of *ACE2* gene in the lungs of mice. In contrast, the introduction of the AAV6 vector led to low level *ACE2* expression. Infection with SARS-CoV-2 of the mice expressing hACE2 in the lungs led to virus replication and development of bronchopneumonia on the 7th day after infection. Thus, a simple method for delivering the human *ACE2* gene to the mice lungs by intranasal administration of the AAV vector has been proposed. This approach enabled rapid generation of mouse model for studying coronavirus infection.

Keywords: hACE2, SARS-CoV-2, AAV9, AAV6, AAV-DJ, BALB/c mice

**ВИРУСНЫЕ ИНФЕКЦИИ: ОТ МЕХАНИЗМОВ РЕПЛИКАЦИИ
И ПАТОГЕНЕЗА К ПОДХОДАМ ТЕРАПИИ**

УДК 578.4+(578:616-036.22)

БЕЛОК НВх ПОТЕНЦИРУЕТ РЕАКТИВАЦИЮ ВИРУСА ГЕПАТИТА В

© 2022 г. С. А. Брезгин^{a, b}, А. П. Костюшева^{a, *}, Н. И. Пономарева^{a, b}, В. И. Гегечкори^c,
Н. П. Кирдяшкина^d, С. Р. Айвазян^e, Л. Н. Дмитриева^e, Л. Н. Кокорева^e,
В. П. Чуланов^{a, b, e, f}, Д. С. Костюшев^{a, b}

^aИнститут медицинской паразитологии, тропических и трансмиссивных заболеваний им. Е.И. Марциновского,
Первый Московский государственный медицинский университет им. И.М. Сеченова
(Сеченовский Университет), Москва, 119048 Россия

^bНаучно-технологический университет “Сириус”, Сочи, 354340 Россия

^cКафедра фармацевтической и токсикологической химии, Первый Московский государственный медицинский
университет им. И.М. Сеченова (Сеченовский Университет), Москва, 119991 Россия

^dНаучно-исследовательский институт медицины труда им. академика Н.Ф. Измерова, Москва, 105275 Россия

^eКафедра инфекционных болезней, Первый Московский государственный медицинский университет
им. И.М. Сеченова (Сеченовский Университет), Москва, 119048 Россия

^fНациональный медицинский исследовательский центр фтизиопульмонологии и инфекционных заболеваний,
Москва, 127994 Россия

*e-mail: dkostushev@gmail.com

Поступила в редакцию 31.03.2022 г.

После доработки 31.03.2022 г.

Принята к публикации 12.04.2022 г.

Вирус гепатита В (ВГВ) вызывает одно из распространенных инфекционных заболеваний — хронический гепатит В. Во всем мире в контакте с ВГВ находятся около 2 млрд. человек, при этом до 250 млн хронически инфицированы. У пациентов с хронической инфекцией и сопутствующими заболеваниями, прием лекарственных препаратов может приводить к резкому усилению репликации вируса — реактивации инфекции, часто с развитием декомпенсации печени и летальным исходом. Механизмы реактивации инфекции в основном связаны с подавлением иммунного надзора и активацией провирусных сигнальных каскадов. Определение механизмов реактивации ВГВ-инфекции необходимо для рационального использования лекарственных средств и снижения смертности пациентов с хронической формой инфекции. Нами впервые изучена роль вирусного белка НВх в реактивации ВГВ. На модели метилированной рекомбинантной формы генома ВГВ выявлена возможность реактивации вируса из транскрипционно-неактивного состояния, а также изучена возможность реактивации инфекции под действием генотоксических соединений (доксорубин, пероксид водорода) и препаратов таргетной терапии (сунитиниб, бортезомиб). Показано, что НВх дикого типа и, в большей степени, мутированная форма этого белка без сигнала ядерного экспорта потенцирует репликацию вируса и способствует его реактивации. Впервые показана возможность реактивации ВГВ из транскрипционно-неактивного состояния. Доксорубин и пероксид водорода вызывают реактивацию ВГВ как на модели транскрипционно-активной, так и неактивной формы генома ВГВ. Сунитиниб вызывает слабую реактивацию ВГВ, тогда как бортезомиб не вызывает реактивации вируса на моделях *in vitro*.

Ключевые слова: АТМ, АТР, Chk1/2, кольцевая ковалентно-замкнутая ДНК, вирус гепатита В, вирусная нагрузка, повреждение генома, противоопухолевые препараты, коморбидность

DOI: 10.31857/S0026898422050044

ВВЕДЕНИЕ

Хронический гепатит В (ХГВ) — одно из распространенных инфекционных заболеваний, смертность от исходов которого превышает 1 млн человек в год [1] — вызывается вирусом гепатита В (ВГВ). Полное излечение ХГВ при использовании современных противовирусных препаратов невозможно. В редких случаях при длительном приеме проти-

вовирусных препаратов может происходить сероконверсия по антигенам ВГВ, сопровождаемая подавлением вирусной репликации и снижением вирусной нагрузки с помощью иммуноопосредованных механизмов [2]. Снижение вирусной репликации ассоциировано со значительным уменьшением рисков развития гепатоцеллюлярной карциномы и цирроза печени [1, 3].

При лечении пациентов с ХГВ либо со скрытой формой ХГВ с сопутствующими заболеваниями прием лекарственных препаратов часто приводит к реактивации инфекции – резкому увеличению уровней репликации вируса [4–7]. Последствия такой реактивации могут варьировать от бессимптомных до фатальной декомпенсации функции печени. В этой связи для снижения/предотвращения нежелательных реакций и снижения смертности пациентов с ХГВ и сопутствующими заболеваниями необходим мониторинг маркеров ВГВ-инфекции и рациональное назначение лекарственных средств. Понимание вирусологических основ реактивации ВГВ-инфекции при приеме различных препаратов позволит подбирать нужные препараты и определять оптимальные стратегии лечения подобных пациентов, тем самым сводя к минимуму риски неблагоприятных исходов.

Вирусный белок НВх является основным фактором, ответственным за регуляцию репликации ВГВ в зараженных клетках. Белок НВх участвует в инициации и поддержании транскрипции всех вирусных РНК с матриц кольцевой ковалентно замкнутой ДНК (ккзДНК) ВГВ [8]. В зараженных клетках НВх локализуется как в ядре, так и в цитоплазме. Преимущественная локализация белка определяется уровнем экспрессии НВх и, соответственно, уровнями вирусной репликации. Низкий уровень НВх в клетке способствует ядерной локализации белка, при среднем уровне белок распределен равномерно по клетке, в то время как при высоких значениях вирусной репликации НВх локализуется преимущественно в цитоплазме [9, 10]. В активации вирусного цикла принимают участие как цитоплазматическая, так и внутриядерная формы НВх, причем обе формы вносят практически одинаковый вклад в активацию транскрипции с ккзДНК [9].

НВх осуществляет многофакторную регуляцию транскрипции ккзДНК, главным образом, за счет разрушения комплекса SMC5/6 (structural maintenance of chromosomes 5/6) [11] и ремоделирования хроматина, ассоциированного с ккзДНК [12]. НВх связывает E3-содержащую убиквитинлигазу DDB1, тем самым способствуя убиквитинированию SMC5/6, что, в свою очередь, приводит к деградации комплекса. В отсутствие НВх либо при нарушении взаимодействия НВх с DDB1 происходит восстановление комплексов SMC5/6, которые связываются с ккзДНК и блокируют транскрипцию вирусного генома. Другой механизм активации вирусного цикла белком НВх в ядре – эпигенетическое ремоделирование хроматина ккзДНК за счет привлечения факторов, вызывающих образование эухроматина (гистоновых деацетилаз HDAC1 и Sirt1, ацетилтрансфераз p300, CBP, PCAF, а также ряда факторов транскрипции, включая E2F1) [13]. Усиление транскрипции ВГВ цито-

плазматическим НВх связано с активацией ряда сигнальных путей. За счет С-концевого региона НВх проявляет тропность к мембране митохондрий (значительная часть цитоплазматического НВх связывается с митохондриями) [14]. В результате НВх вызывает образование значительного количества активных форм кислорода, которые вносят одноцепочечные и двухцепочечные разрывы в ДНК инфицированной клетки и активируют сигнальные пути, участвующие в репарации ДНК, включая сигнальный путь ATM/ATR [15]. Известно, что повреждение генома и кислородный стресс влияют на репликацию многочисленных вирусов [16–18].

Белки ATM (ataxia telangiectasia mutated) и ATR (ataxia telangiectasia and Rad3-related) принадлежат к семейству фосфоинозитид-3-киназа-зависимых киназ и являются ключевыми регуляторами ответа на повреждение ДНК. Мишенями ATM и ATR служат в том числе факторы прохождения клеточного цикла – киназы контрольных точек 1 и 2 (Chk2, Chk1, checkpoint kinase 2 и 1) соответственно. Впервые роль ATR в репликации ВГВ показали Zhao и соавт. [19, 20]. В частности, показано, что усиление репликации ВГВ происходит за счет ATR-зависимого фосфорилирования Chk1, p53 и H2AX. Кроме того, Kim и соавт. [15] показали, что цитоплазматический НВх индуцирует образование активных форм кислорода в клетке, активируя ATM и вызывая фосфорилирование Chk2. Недавно нашей группой показано, что химиотерапевтический препарат доксорубин, а также пероксид водорода усиливают транскрипцию ATM и ATR и вызывают многократное усиление репликации ВГВ [21]. Помимо этого, Luo и соавт. впервые обнаружили участие пути ATR-Chk1 в ключевом этапе поддержания персистенции вируса – образовании ккзДНК ВГВ из предшественника. Подавление образования ATR и Chk1 снижало формирование ккзДНК. В последней работе, посвященной данной проблеме, Lubyova и соавт. [22] показали, что химиотерапевтические лекарственные препараты активируют путь ATM-Chk2, вызывая фосфорилирование корового белка ВГВ (НВсAg), увеличение инкапсидирования прегеномной РНК ВГВ и образование промежуточных форм генома.

В целом, возможность реактивации ВГВ-инфекции при действии различных препаратов остается малоизученной. Известна возможность реактивации вируса при воздействии иммуносупрессоров, антрациклинов (доксорубин, эпирубин) и распространенных химиопрепаратов, а также ритуксимаба и других препаратов, разрушающих В-клетки, ингибиторов фактора некроза опухолей- α , ингибиторов тирозинкиназ, ингибиторов кальцинейрина (циклоспорин, такролимус), использовании антиметаболитов (азатиоприн, 6-меркаптопурин, метотрексат), ингибиторов кон-

трольных точек иммунного ответа PD1/PD1-L/CTLA4 (ниволумаб, пембролизумаб, ипимумаб). Зарегистрированы также единичные случаи реактивации при применении ряда препаратов прямого противовирусного действия для лечения инфекции, вызванной вирусом гепатита С. Описаны различные механизмы, посредством которых в реактивации вируса участвуют разные группы препаратов. В целом, можно выделить два основных механизма: подавление иммунного ответа и повреждение клеточного генома человека с активацией провирусных сигнальных путей. Частота реактивации, вызываемой разными группами препаратов, может варьировать от нескольких процентов до 50–70% [23]. Тем не менее, возможность реактивации ВГВ под действием большинства традиционных химиотерапевтических препаратов до сих пор не анализировали.

К серологическим факторам риска реактивации инфекции относятся: наличие HBsAg, HBeAg в сыворотке крови, высокая вирусная нагрузка (уровни ДНК ВГВ в сыворотке крови >10000 МЕ/мл) и уровни анти-HBc-антител (≥ 6.41 МЕ/мл) [23]. Известно, что высокая вирусная нагрузка является одним из факторов риска реактивации ВГВ-инфекции, однако роль HBx, основного регулятора вирусной транскрипции, а также цитоплазматической и ядерной форм белка HBx в реактивации ВГВ-инфекции, фактически не изучена.

В нашей работе изучено влияние белка HBx дикого типа и белка HBxNESM с ядерной локализацией (мутация в сигнале ядерного экспорта, NES (nuclear exportation signal) нарушает выход белка в цитоплазму) [24] на реактивацию ВГВ-инфекции при действии ДНК-повреждающих агентов (доксорубицин, пероксид водорода) и препаратов таргетной терапии (ингибитор тирозинкиназ сунитиниб, ингибитор протеасом бортезомиб).

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Получение рекомбинантной ккзДНК и метилированной рекомбинантной ккзДНК. Рекомбинантная ккзДНК (рккзДНК) ВГВ получена с использованием технологии “minicircle” в системе бактериальной рекомбинации ZYCY10P3S2T *E. coli*, как показано ранее [25], и выделена с помощью коммерческого набора MaxiPrep Plasmid Kit (“QIAGEN”, ФРГ). рккзДНК метилировали с помощью M.SssI CpG-метилтрансферазы (“СибЭнзим”, Россия) в соответствии с инструкцией производителя. рккзДНК (1 мг) инкубировали с M.SssI CpG-метилтрансферазой при 37°C в течение 30 мин с последующей очисткой набором Qiagen PCR purification kit (“QIAGEN”, ФРГ). Метилирование ккзДНК подтверждали путем рестрикционного анализа с использованием чувстви-

Таблица 1. Концентрация веществ, использованных в работе

Вещество	Концентрация
Доксорубицин	0.2 мкМ
H ₂ O ₂	0.4 мМ
Сунитиниб	1.25 мкМ
Бортезомиб	50 нМ
ДМСО	1.25 мкМ

тельной к метилированию рестриктазы Hpa II, как показано ранее [26].

Культивирование клеток человека. Линию клеток HepG2 культивировали в среде DMEM с высоким содержанием глюкозы (4.5 г/л) с добавлением 10% фетальной сыворотки крупного рогатого скота (FBS), 2 мкМ L-глутамина и 1% пенициллина/стрептомицина. Клетки рассеивали в культуральные планшеты до достижения ~60% конfluентности ко дню трансфекции. Клетки трансфицировали с помощью реагента Lipofectamine3000 (“Thermo Fisher Scientific”, США), как описано ранее [21], плазмидой, кодирующей одну из форм белка HBx (HBx, addgene #65463; HBxNESM, addgene #24932) либо контрольной плазмидой, не кодирующей HBx, и рккзДНК в соотношении 1 : 1.

Обработка клеток. Через 48 ч после трансфекции, клетки обрабатывали препаратами либо пероксидом водорода в течение 1 ч в концентрациях, указанных в табл. 1. После инкубации в течение 1 ч клетки дважды промывали фосфатным буфером и добавляли полную культуральную среду.

Выделение нуклеиновых кислот. Нуклеиновые кислоты выделяли с помощью набора AmpliSens Riboprep (“AmpliSens”, Россия) в соответствии с инструкциями производителя на 4 сут после трансфекции. Для анализа ккзДНК нуклеиновые кислоты обрабатывали T5 экзонуклеазой (“New England Biolabs”, США) в течение 60 мин при 37°C с инактивацией фермента при 70°C в течение 20 мин.

ПЦР-анализ. Количественную полимеразную цепную реакцию (кПЦР) в режиме реального времени проводили с использованием флуоресцентных зондов TaqMan. В образце нуклеиновых кислот анализировали ДНК ВГВ. В образце, обработанном T5 экзонуклеазой, определяли ккзДНК ВГВ. Праймеры для амплификации ДНК и ккзДНК ВГВ использовали согласно [27, 28]. Уровни ДНК ВГВ и ккзДНК нормировали на уровни ДНК β -глобина человека. Относительные уровни рассчитывали с помощью метода $\Delta\Delta C_t$.

Иммунохимический анализ. Клетки HepG2 рассаживали в культуральные планшеты с прозрачными стеклами. В конечной точке эксперимента клетки фиксировали 4%-ным раствором параформальдегида в течение 10 мин, после чего от-

мывали 3 раза Трис-гидрохлоридом (50 мМ, pH 8.0) с последующей инкубацией в течение 30 мин в блокирующем буфере (0.02% Тритон X-100, 10% лошадиная сыворотка, 150 мМ NaCl в растворе Трис-гидрохлорида (50 мМ, pH 8.0)). Далее стекла инкубировали с первичными поликлональными кроличьими анти-НВх-антителами (Abcam ab39716, Великобритания) в течение 1 ч при комнатной температуре, затем стекла отмывали 3 раза в течение 10 мин отмывочным буфером (0.02% Тритон X-100, 200 мМ NaCl в растворе Трис-гидрохлорида (50 мМ, pH 8.0) и инкубировали со вторичными анти-кроличьими антителами козы, конъюгированными с меткой Alexa Fluor 594 (Abcam ab150080) и реактивом для окрашивания ядер Hoechst33342 (Abcam ab228551) при комнатной температуре в течение 1 ч. Стекла заключали в среду Fluoroshield (Abcam ab104135). Визуализацию проводили на флуоресцентном микроскопе Leica DMI6000 с иммерсионными объективами $\times 100$. Работу проводили с использованием оборудования ЦКП ИБР им. Н.К. Кольцова РАН.

Статистический анализ. Статистическую обработку данных проводили в программе GraphPad Prism 7 с помощью *t*-критерия Стьюдента. Различия считали значимыми при $p < 0.05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Сверхэкспрессия НВх и НВхNESM усиливает цикл вируса гепатита В

Первым этапом изучения влияния НВх на реактивацию ВГВ-инфекции при воздействии различных препаратов стала оценка влияния НВх и мутированной формы НВх на репликацию ВГВ *per se*.

Для оценки отличий в клеточной локализации НВх клетки HepG2 трансфицировали плазмидами, кодирующими один из белков НВх (НВх дикого типа либо НВхNESM), а также рккзДНК. Через 48 ч после трансфекции проводили иммуноцитохимический анализ распределения белка НВх в клетках HepG2 (рис. 1а). Как и ожидалось, белок дикого типа распределен по ядру и цитоплазме клеток, в то время как белок с мутантным сигналом ядерного экспорта NES (НВхNESM) локализовался исключительно в ядре и не детектировался в цитоплазме (рис. 1а).

Далее с помощью ПЦР-анализа уровней суммарной внутриклеточной ДНК ВГВ и ккзДНК на модели рккзДНК изучены эффекты НВх и НВхNESM на репликацию ВГВ (рис. 1б). Показано, что оба вида белка НВх вызывают значительное увеличение уровней ДНК ВГВ (НВх — в ~ 2.5 раза и НВхNESM — в ~ 7 раз) и ккзДНК ВГВ (НВх — в ~ 14 раз и НВхNESM — в ~ 9 раз) (рис. 1б). Белок НВхNESM вызывал более значимое увеличение

уровней ДНК ВГВ, чем НВх дикого типа, но менее существенно повышал уровни ккзДНК (рис. 1б). Следовательно, НВх дикого типа и НВхNESM усиливают репликацию ВГВ, но с неодинаковой выраженностью.

Белок НВх усиливает реактивацию ВГВ-инфекции при действии генотоксических агентов

Далее было изучено влияние НВх дикого типа и НВхNESM на реактивацию ВГВ при действии генотоксических агентов (доксорубин — докс, и пероксида водорода — H_2O_2) и препаратов таргетной терапии (сунитиниб — Сун, и бортезомиб — Борт). Таргетные препараты широко используются в терапии онкологических заболеваний, однако механизм их действия основан не на прямом повреждении генома, как в случае генотоксических агентов, а на блокаде отдельных сигнальных путей.

С этой целью клетки, трансфицированные плазмидой НВх, НВхNESM либо некодирующей плазмидой, а также рккзДНК, обрабатывали соединениями в выбранных концентрациях. Контрольный образец обрабатывали раствором диметилсульфоксида (ДМСО).

Обработка клеток доксорубином, пероксидом водорода либо сунитинибом приводила к увеличению уровней ДНК и ккзДНК ВГВ в $\sim 2-7$ раз (рис. 2а-в). Напротив, бортезомиб снижал параметры ВГВ (рис. 2г). В условиях сверхэкспрессии НВх либо НВхNESM уровни реактивации ВГВ были значительно выше при использовании генотоксических агентов (рис. 2а, б). Уровни ккзДНК/ДНК ВГВ увеличивались в $\sim 40-200$ раз при обработке доксорубином и пероксидом водорода в клетках с гиперпродукцией НВх/НВхNESM (рис. 2а, б), в то время как сунитиниб приводил к $\sim 4-5$ -кратному увеличению уровней ДНК ВГВ (рис. 2в). В контрольной группе с бортезомибом отмечено снижение вирусной репликации, однако в условиях сверхэкспрессии НВх/НВхNESM бортезомиб индуцировал $\sim 2-5$ -кратное увеличение уровней ДНК и ккзДНК ВГВ (рис. 2г). Повышение уровней вирусной репликации при использовании препаратов таргетной терапии совместно с НВх было сопоставимым с действием НВх с ДМСО (рис. 1, рис. 2в, г).

Таким образом, сверхэкспрессия различных форм НВх потенцирует реактивацию ВГВ-инфекции при действии генотоксических агентов. Сунитиниб слабо влияет на реактивацию ВГВ, бортезомиб не вызывает реактивации ВГВ *in vitro*.

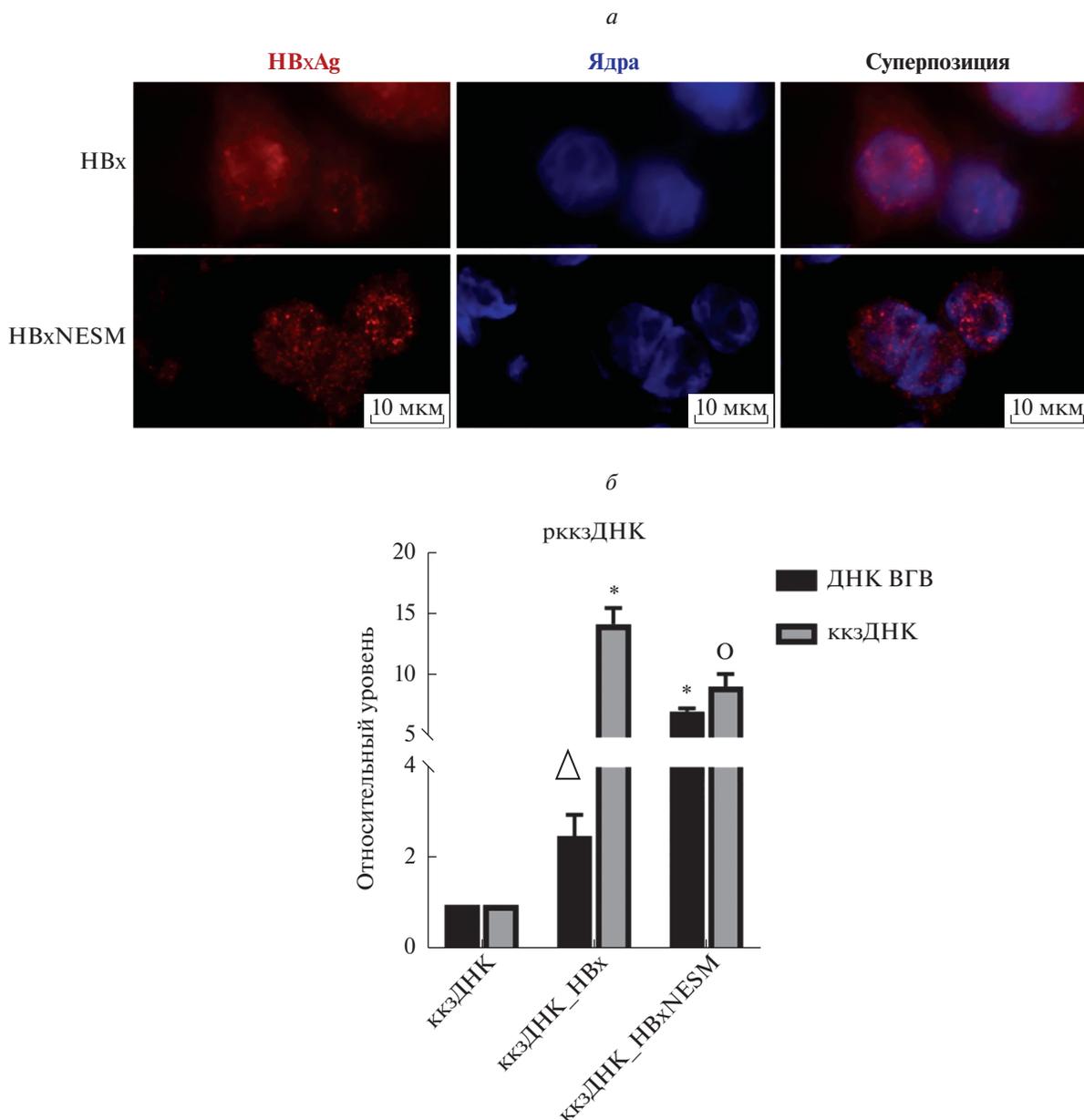


Рис. 1. Влияние HBx и HBxNESM на репликацию ВГВ. *а* – Иммуноцитохимическое выявление белка HBx (красное свечение). Ядра окрашены красителем Hoescht33324 (синее свечение). *б* – Относительные уровни внутриклеточной ДНК ВГВ (черные столбцы) и ккзДНК ВГВ (серые столбцы) при действии HBx либо HBxNESM на модели с рккзДНК по данным ПЦР в реальном времени. Нормирование проведено на уровни ДНК β-глобина человека. Планки погрешностей соответствуют стандартным отклонениям. Уровни значимости: ⁺*p* < 0.05; ^Δ*p* < 0.01; ^o*p* < 0.005; **p* < 0.001.

Реактивация транскрипционно-неактивной метилированной ккзДНК ВГВ

Основная форма генома ВГВ, ккзДНК, в ходе патогенеза ХГВ и при приеме различных препаратов [29] подвергается различным эпигенетическим модификациям, таким как модификация гистонов и метилирование ДНК [30]. Метилирование ккзДНК снижает транскрипцию и подавляет репликацию ВГВ. Действительно, гиперметилирование ккзДНК приводит к снижению образования

прегеномной РНК ВГВ на >90% [26]. Криптическая транскрипционно-неактивная ккзДНК может служить своего рода депо для восстановления вирусной репликации и реактивации ВГВ-инфекции. Особенно это касается пациентов с низкими либо недетектируемыми уровнями вирусных маркеров (ДНК ВГВ), и с анти-HBc-антителами (маркером контакта организма с ВГВ). Вместе с этим, возможность реактивации транскрипционно-неактивной формы генома ВГВ ранее не была

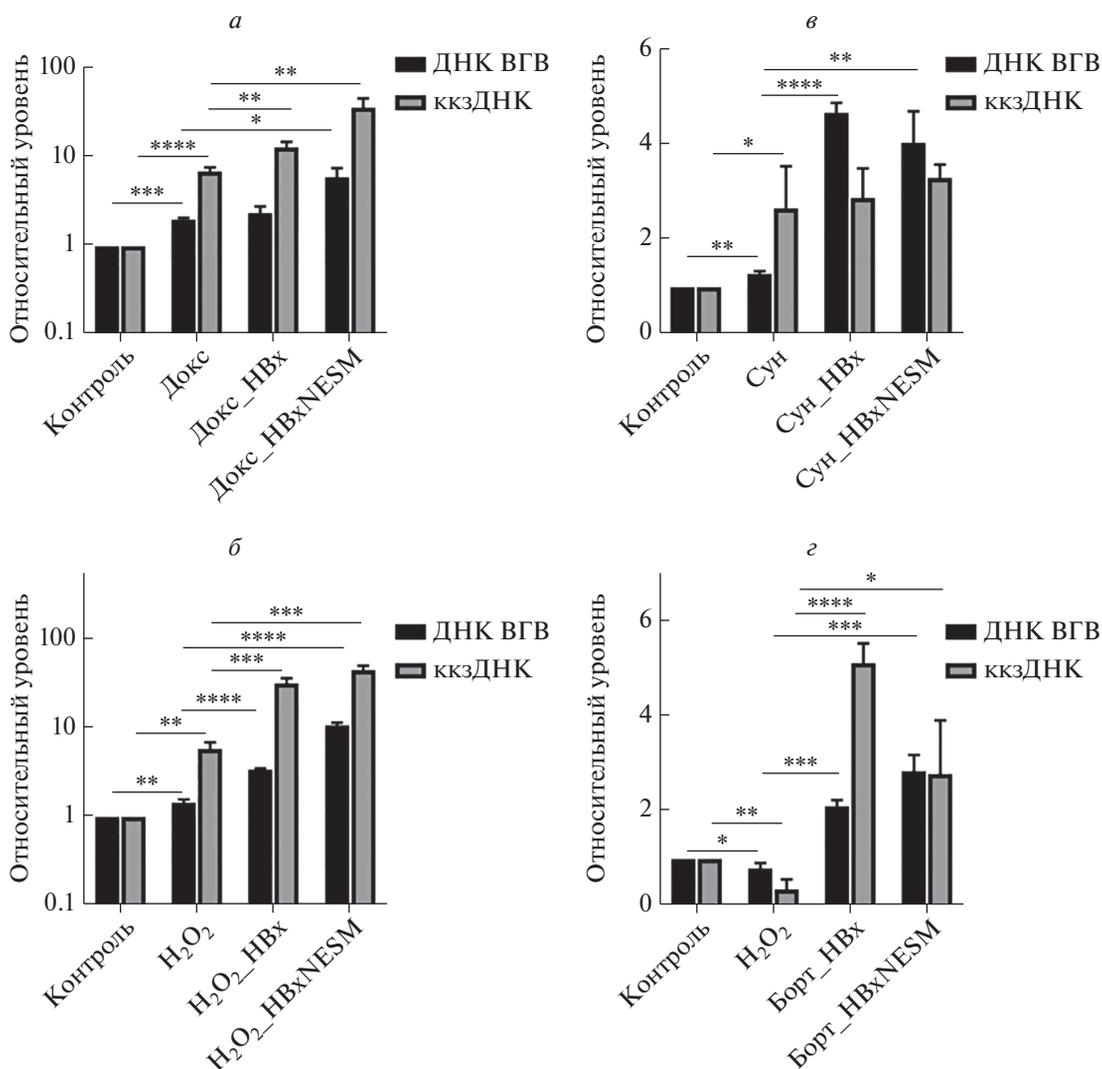


Рис. 2. Влияние белков HBx на реактивацию ВГВ-инфекции под действием генотоксических агентов и препаратов для таргетной терапии. Уровни репликации ВГВ при действии доксорубина (а), пероксида водорода (б), сунитиниба (в) и бортезомиба (г). ДНК ВГВ и ккзДНК анализировали с помощью ПЦР в реальном времени. Контроль – клетки, трансфицированные рккзДНК; Докс, H₂O₂, Сун, Борт – клетки, трансфицированные рккзДНК и обработанные соответствующим агентом. Планки погрешностей соответствуют стандартным отклонениям. * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.005$; **** $p < 0.001$.

исследована. В данной работе впервые изучена возможность реактивации репликации гиперметилированного генома вируса при действии различных форм HBx-белка, а также и при действии генотоксических агентов и препаратов для таргетной терапии (б).

Нами показано, что увеличение репликации гиперметилированной рккзДНК ВГВ (~трехкратное повышение уровней ккзДНК) происходит только при использовании HBx дикого типа (рис. 3). HBxNESM не вызывает статистически значимого увеличения уровней вирусных интермедиатов.

В рамках данной работы впервые выявлена возможность реактивации гиперметилированной

рккзДНК ВГВ под действием генотоксических агентов (рис. 4а, б). Доксорубин не влиял на уровни ДНК ВГВ, однако вызывал увеличение уровней ккзДНК в ~5.5 раз. Обработка пероксидом водорода повышала уровни как ДНК ВГВ, так и ккзДНК ВГВ в ~4 раза (рис. 4б).

С другой стороны, среди препаратов таргетной терапии только бортезомиб незначительно увеличивал уровни ДНК ВГВ (рис. 4г). Реактивация вирусной репликации происходила только при продукции белка HBx дикого типа и действии генотоксических соединений. Совместное действие сунитиниба либо бортезомиба с HBx не усиливало репликацию ВГВ в сравнении с действием индивидуальных факторов (рис. 3, рис. 4в, г). При

экспрессии HBxNESM уровни вирусных маркеров не отличались от уровней в образцах, обработанных химическим агентом. Наиболее значительная реактивация (вплоть до 100-кратного увеличения ккзДНК) происходила при одновременной продукции HBx и обработке генотоксическими соединениями (рис. 4а, б).

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Реактивацию ВГВ можно купировать с помощью современных препаратов прямого противовирусного действия [31]. Тем не менее, у пациентов с хронической формой инфекции нередко возможны тяжелые либо даже смертельные последствия реактивации ВГВ. По различным данным смертность при реактивации ВГВ может варьировать от 0–20 до >50% [31]. Нами изучена роль ключевого фактора транскрипции ВГВ – белка HBx – в реактивации ВГВ генотоксическими препаратами и препаратами таргетной терапии. Белок HBx необходим для инициации и поддержания репликации ВГВ. Взаимодействуя с ккзДНК в ядре, HBx активирует транскрипцию вирусных РНК. В цитоплазме HBx активирует пути трансдукции сигналов, способствующие вирусной репликации, включая пути выживания клетки, метаболизма, пролиферации и транскрипции. HBx взаимодействует более чем со 100 различными белками в клетке [32]. Поскольку цитоплазматический HBx индуцирует образование активных форм кислорода и повреждение генома клетки, этот белок может также стимулировать репликацию ВГВ за счет активации путей репарации повреждений ДНК (например, АТМ и АТР) [21]. Вместе с этим, роль HBx в реактивации ВГВ до сих пор оставалась неизученной. В данной работе впервые показано, что белок HBx может значительно потенцировать реактивацию ВГВ-инфекции, причем потенцирование происходит при использовании как HBx дикого типа, так и HBxNESM (рис. 2а, б). Интересно, что усиление реактивации наблюдается только при действии HBx с генотоксическими агентами, в то время как потенцирование действия препаратов таргетной терапии не происходит (рис. 2в, г). Последнее указывает не только на различия в механизмах реактивации препаратами разных групп, но и позволяет предположить существование особенностей влияния HBx на жизненный цикл ВГВ в измененных условиях функционирования клеток.

Как отмечено выше, существуют два принципиальных механизма реактивации ВГВ: за счет подавления иммунного ответа (кортикостероиды, ритуксимаб, ингибиторы фактора некроза опухоли- α и др.) и индукции вирусной репликации в инфицированных клетках, главным образом за счет активации путей репарации повреждений ДНК (доксорубин, винкристин, цис-

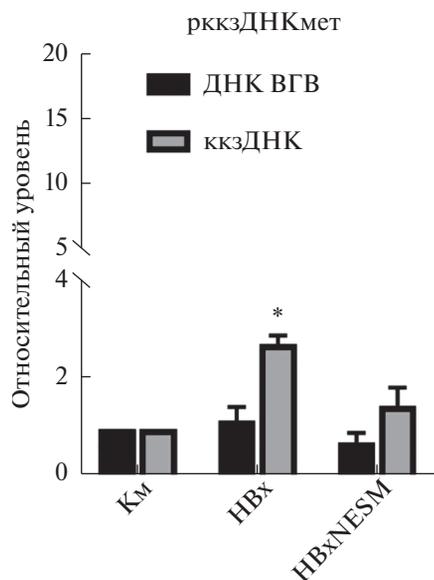


Рис. 3. Влияние белков HBx на репликацию транскрипционно-неактивной рккзДНК. Планки погрешностей соответствуют стандартным отклонениям. * $p < 0.001$. Км – контрольный образец с метилированной рккзДНК ВГВ.

платин, бусульфан, циклофосфамид и др.) [33]. Тем не менее, возможность реактивации ВГВ за счет непосредственного воздействия большинства лекарственных препаратов с установленным иммуносупрессорным действием на инфицированные клетки не изучали.

Ряд препаратов таргетной терапии, включая ингибиторы протеасом и ингибиторы тирозинкиназ, имеют средний (от 1 до 10%) риск реактивации ВГВ у хронически инфицированных пациентов [19]. В отличие от генотоксических соединений (доксорубин и пероксид водорода), которые индуцируют выраженную реактивацию ВГВ-инфекции (рис. 2), препарат таргетной терапии бортезомиб не вызывает реактивацию ВГВ, только сунитиниб слабо увеличивает репликацию вируса (рис. 2в, г). Реактивация ВГВ под действием генотоксических соединений связана с активацией сигнальных каскадов АТМ и АТР. В то же время механизмы действия препаратов таргетной терапии до сих пор не изучены.

Сунитиниб – мультитаргетный ингибитор тирозинкиназ. Мишенью сунитиниба служат рецепторы фактора роста эндотелия сосудов, FMS-подобной тирозинкиназы-3 и колониестимулирующего фактора [34]. Помимо этого, сунитиниб оказывает миелосупрессорное действие за счет подавления активности c-kit [35]. Предполагается, что механизмом реактивации ВГВ при действии сунитиниба как раз и является миелосупрессорная активность. Вместе с этим, на модели клеток *in vitro* нами впервые показана слабая ре-

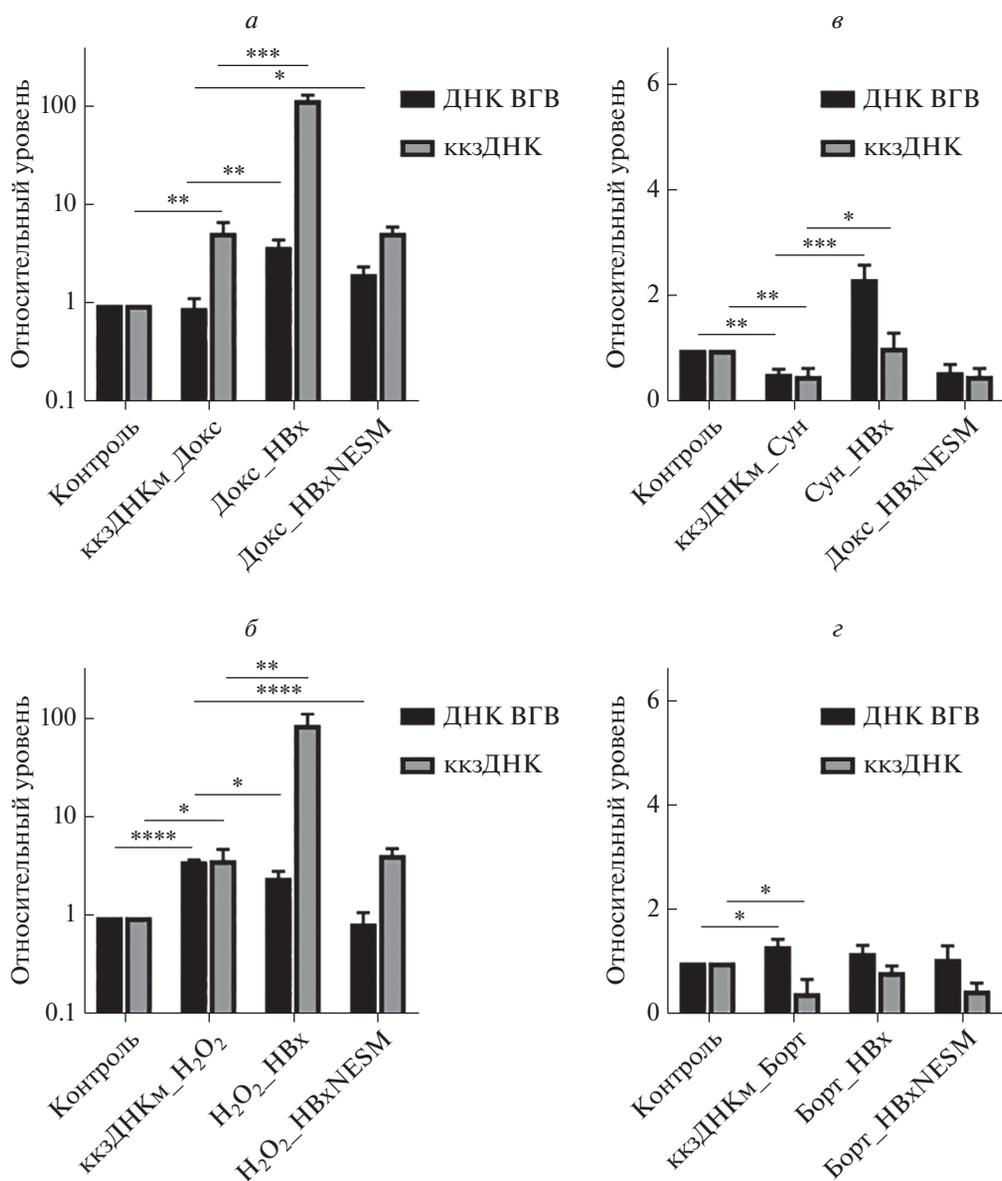


Рис. 4. Реактивация транскрипционно-неактивной метилированной ккзДНК ВГВ. Уровни ДНК ВГВ и ккзДНК ВГВ при обработке клеток с метилированной рккзДНК доксорубицином (а), перексидом водорода (б), сунитинибом (в) и бортезомибом (г). Планки погрешностей соответствуют стандартным отклонениям. * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.005$; **** $p < 0.001$.

активирующая активность сунитиниба (рис. 2в). Следовательно, сунитиниб может вызывать реактивацию ВГВ-инфекции у пациентов с хроническим гепатитом В как за счет миелосупрессорных эффектов, так и за счет прямого воздействия на ВГВ-инфицированные клетки. Ранее показали, что сунитиниб вызывает повреждение ДНК и увеличивает образование фокусов γ -H2AX (маркеры разрывов ДНК) в клетках, а также незначительно усиливает экспрессию ATM и ATR [21, 22], что может стимулировать жизненный цикл вируса. Кроме того, сунитиниб вызывает остановку клеточного цикла в фазе G_1/S за счет увеличения

экспрессии фактора транскрипции DEC1 [23]. Известно, что прекращение деления клеток, инфицированных ВГВ, способствует накоплению ккзДНК ВГВ в клетках и увеличению вирусной репликации [36]. Определение механизмов противовирусного действия сунитиниба требует дальнейших исследований.

Бортезомиб – ингибитор протеасом и антинеопластический агент, используемый при множественной миеломе и некоторых лимфомах. Бортезомиб также негативно влияет на функции В-клеток и плазматических клеток, включая ВГВ-специфичные [19]. Обработка бортезомибом

культивируемых клеток *in vitro* не вызывала реактивации ВГВ. Напротив, нами отмечено снижение параметров вирусного цикла, особенно уровней ккзДНК ВГВ (рис. 2а). С использованием в качестве модели трансгенных мышей *Vand1* и соавт. показали, что бортезомиб значительно снижает (около 90%) параметры вирусного цикла [24], что согласуется с нашими данными. Возможными механизмами снижения вирусного цикла могут быть увеличение времени жизни вирусной полимеразы за счет блокады протеасомной деградации и ускорение инкапсидирования прегеномной РНК ВГВ. С другой стороны, влияние бортезомиба на вирусный цикл в работе *Vand1* и соавт. было дозозависимым: при этом средняя доза (1 мг/кг) подавляла вирусный цикл, а высокая (5 мг/кг) оказывала провирусное действие [24]. Описано также увеличение уровней НВх в клетке, вызванное действием других ингибиторов протеасом [37–39], за счет блокирования протеасомно-разрушения НВх, что может приводить к увеличению вирусного цикла, объясняя провирусное действие высоких доз бортезомиба.

Один из наименее изученных аспектов вирусного гепатита В – эпигенетическая гетерогенность внутриядерного пула ккзДНК, основной формы генома ВГВ, и возможность реактивации/восстановления репликации вируса из транскрипционно-инактивированного состояния [40]. Эти аспекты приобретают особую актуальность в связи с разработкой методов эпигенетического подавления активности ккзДНК и других перспективных подходов к функциональному излечению ХГВ [41, 42]. Молекулы ккзДНК содержат три–четыре канонических островка CpG, которые служат мишенями для ДНК-метилтрансфераз. В зависимости от стадии заболевания и вирусологических особенностей при ХГВ выявляют молекулы ккзДНК с разной степенью метилирования. Метилирование ккзДНК ассоциировано со снижением вирусной репликации, частой конверсией ВГВ по НВеAg, в целом, оно ассоциировано с более низкой вирусной нагрузкой [30]. В нашей работе впервые установлена возможность восстановления вирусной репликации белком НВх из гиперметилированного состояния генома ВГВ. Экспрессия белка НВх дикого типа более чем в 3 раза увеличивала уровни ккзДНК (рис. 3). Более 10 лет назад было показано, что внутриядерный НВх связывается с минихромосомами ккзДНК и эпигенетически активирует транскрипцию вируса [12]. Однако возможность активации транскрипции гиперметилированной (транскрипционно-неактивной) ккзДНК белком НВх не изучали. Мы впервые показали, что внутриядерный белок НВхNESM не вызывает активацию вирусной репликации, в то время как НВх дикого типа способствует восстановлению цикла ВГВ (рис. 3). Эти данные указывают на то, что восстановление

репликации из гиперметилированного состояния ккзДНК может быть связано не с прямым взаимодействием НВх с минихромосомами, а с активацией цитоплазматических провирусных каскадов. Кроме того, впервые показана возможность реактивации ВГВ из гиперметилированного состояния при воздействии генотоксических агентов (рис. 4а, б). Подобная реактивация потенцируется только белком НВх дикого типа (рис. 4а, б).

Известно, что после разрешения острой ВГВ-инфекции ккзДНК может сохраняться в гепатоцитах человека в течение всей жизни. Отсутствие активной вирусной инфекции в таких случаях объясняют развитием иммунологического контроля и подавлением активности ккзДНК [43]. Действительно, у лиц с ослабленным иммунитетом и историей острой ВГВ-инфекции в анамнезе возможна реактивация инфекции, обусловленная активацией транскрипции остаточной ккзДНК [44]. Наши результаты впервые указывают на возможность реактивации транскрипционно-неактивной ккзДНК под действием генотоксических агентов, что может иметь существенное значение для лечения лиц с историей инфекции ВГВ (определяется по наличию анти-НВс-антител).

В заключение следует отметить, что реактивация ВГВ-инфекции остается актуальной проблемой современного здравоохранения. Определение спектра лекарственных препаратов и механизмов реактивации инфекции необходимо для снижения частоты нежелательных побочных явлений и смертности при лечении лиц с историей ВГВ-инфекции.

Работа выполнена при поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (№ 20-515-12010 и № 20-015-00442).

В данной работе не использовали людей и животных в качестве объекта исследования.

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Kostyusheva A., Kostyushev D., Brezgin S., Volchkova E., Chulanov V. (2018) Clinical implications of hepatitis B virus RNA and covalently closed circular DNA in monitoring patients with chronic hepatitis B today with a gaze into the future: the field is unprepared for a sterilizing cure. *Genes* (Basel). **9**, 483.
2. Perceau G., Diris N., Estines O., Derancourt C., Levy S., Bernard P. (2006) Late lethal hepatitis B virus reactivation after rituximab treatment of low-grade cutaneous B-cell lymphoma. *Br. J. Dermatol.* **155**, 1053–1056. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2133.2006.07451.x>
3. Чуланов В.П., Зуева А.П., Костюшев Д.С., Брезгин С.А., Волчкова Е.В., Малеев В.В. (2017) Гепатит В – следующий? *Терапевтический архив* (архив до 2018 г.) **89**, 4–13.

4. Xu L., Tu Z., Xu G., Hu J.-L., Cai X.-F., Zhan X.-X., Wang Y.-W., Huang Y., Chen J., Huang A.-L. (2015) S-Phase arrest after vincristine treatment may promote hepatitis B virus replication. *World J. Gastroenterol.* **21**, 1498–1509.
<https://doi.org/10.3748/wjg.v21.i5.1498>
5. Chen Y.-F., Chong C.-L., Wu Y.-C., Wang Y.-L., Tsai K.-N., Kuo T.-M., Hong M.-H., Hu C.-P., Chen M.-L., Chou Y.-C., Chang C. (2015) Doxorubicin activates hepatitis B virus replication by elevation of p21 (Waf1/Cip1) and C/EBP α expression. *PLoS One.* **10**, e0131743–e0131743.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0131743>
6. Li X., Pan E., Zhu J., Xu L., Chen X., Li J., Liang L., Hu Y., Xia J., Chen J., Chen W., Hu J., Wang K., Tang N., Huang A. (2018) Cisplatin enhances hepatitis B virus replication and PGC-1 α expression through endoplasmic reticulum stress. *Sci. Rep.* **8**, 3496.
<https://doi.org/10.1038/s41598-018-21847-3>
7. Pisaturo M., Macera M., Alessio L., Calo F., Coppola N. (2019) Hepatitis B virus (HBV) reactivation following pharmacological eradication of hepatitis C virus (HCV). *Viruses.* **11**(9), 850.
<https://doi.org/10.3390/v11090850>
8. Lucifora J., Arzberger S., Durantel D., Belloni L., Strubin M., Levrero M., Zoulim F., Hantz O., Protzer U. (2011) Hepatitis B virus X protein is essential to initiate and maintain virus replication after infection. *J. Hepatol.* **55**, 996–1003.
9. Cha M.-Y., Ryu D.-K., Jung H.-S., Chang H.-E., Ryu W.-S. (2009) Stimulation of hepatitis B virus genome replication by HBx is linked to both nuclear and cytoplasmic HBx expression. *J. Gen. Virol.* **90**, 978–986.
10. Henkler F., Hoare J., Waseem N., Goldin R.D., McGarvey M.J., Koshy R., King I.A. (2001) Intracellular localization of the hepatitis B virus HBx protein. *J. Gen. Virol.* **82**, 871–882.
11. Murphy C.M., Xu Y., Li F., Nio K., Reszka-Blanco N., Li X., Wu Y., Yu Y., Xiong Y., Su L. (2016) Hepatitis B virus X protein promotes degradation of SMC5/6 to enhance HBV replication. *Cell. Rep.* **16**, 2846–2854.
12. Belloni L., Pollicino T., Nicola F.De, Guerrieri F., Raffa G., Fanciulli M. (2009) Nuclear HBx binds the HBV minichromosome and modifies the epigenetic regulation of cccDNA function. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **106**(47), 19975–19979.
<https://doi.org/10.1073/pnas.0908365106>
13. Rivière L., Gerossier L., Ducroux A., Dion S., Deng Q., Michel M.L., Buendia M.A., Hantz O., Neuveut C. (2015) HBx relieves chromatin-mediated transcriptional repression of hepatitis B viral cccDNA involving SETDB1 histone methyltransferase. *J. Hepatol.* **63**(5), 1093–1002.
<https://doi.org/10.1016/j.jhep.2015.06.023>
14. Clippinger A.J., Bouchard M.J. (2008) Hepatitis B virus HBx protein localizes to mitochondria in primary rat hepatocytes and modulates mitochondrial membrane potential. *J. Virol.* **82**, 6798–6811.
15. Kim S., Lee H.-S., Ji J.-H., Cho M.-Y., Yoo Y.-S., Park Y.-Y., Cha H.-J., Lee Y., Kim Y., Cho H. (2015) Hepatitis B virus X protein activates the ATM–Chk2 pathway and delays cell cycle progression. *J. Gen. Virol.* **96**, 2242–2251.
16. Ivanov A.V., Valuev-Elliston V.T., Tyurina D.A., Ivanova O.N., Kochetkov S.N., Bartosch B., Isaguliant M.G. (2017) Oxidative stress, a trigger of hepatitis C and B virus-induced liver carcinogenesis. *Oncotarget.* **8**, 3895.
17. Ivanov A.V., Smirnova O.A., Ivanova O.N., Masalova O.V., Kochetkov S.N., Isaguliant M.G. (2011) Hepatitis C virus proteins activate NRF2/ARE pathway by distinct ROS-dependent and independent mechanisms in HUH7 cells. *PLoS One.* **6**, e24957.
18. Ivanov A.V., Bartosch B., Smirnova O.A., Isaguliant M.G., Kochetkov S.N. (2013) HCV and oxidative stress in the liver. *Viruses.* **5**, 439–469.
19. Zhao F., Hou N.-B., Song T., He X., Zheng Z.-R., Ma Q.-J., Li L., Zhang Y.-H., Zhong H. (2008) Cellular DNA repair cofactors affecting hepatitis B virus infection and replication. *World J. Gastroenterol.* **14**, 5059.
20. Zhao F., Hou N.-B., Yang X.-L., He X., Liu Y., Zhang Y.-H., Wei C.-W., Song T., Li L., Ma Q.-J. (2008) Ataxia telangiectasia-mutated-Rad3-related DNA damage checkpoint signaling pathway triggered by hepatitis B virus infection. *World J. Gastroenterol.* **14**, 6163.
21. Kostyusheva A., Brezgin S., Bayurova E., Gordeychuk I., Isaguliant M., Goptar I., Urusov F., Nikiforova A., Volchkova E., Kostyushev D. (2019) ATM and ATR expression potentiates HBV replication and contributes to reactivation of HBV infection upon DNA damage. *Viruses.* **11**, 997.
22. Lubyova B., Tikalova E., Krulova K., Hodek J., Zabransky A., Hirsch I., Weber J. (2021) ATM-dependent phosphorylation of hepatitis B core protein in response to genotoxic stress. *Viruses.* **13**, 2438.
23. Chang Y., Jeong S.W., Jang J.Y. (2021) Hepatitis B virus reactivation associated with therapeutic interventions. *Front. Med.* **8**, 770124.
24. Forgues M., Marrogi A.J., Spillare E.A., Wu C.-G., Yang Q., Yoshida M., Wang X.W. (2001) Interaction of the hepatitis B virus X protein with the Crm1-dependent nuclear export pathway. *J. Biol. Chem.* **276**, 22797–22803.
25. Guo X., Chen P., Hou X., Xu W., Wang D., Wang T., Zhang L., Zheng G., Gao Z., He C.-Y. (2016) The recombined cccDNA produced using minicircle technology mimicked HBV genome in structure and function closely. *Sci. Rep.* **6**, 1–10.
26. Kostyushev D., Brezgin S., Kostyusheva A., Zarifyan D., Goptar I., Chulanov V. (2019) Orthologous CRISPR/Cas9 systems for specific and efficient degradation of covalently closed circular DNA of hepatitis B virus. *Cell. Mol. Life. Sci.* **76**, 1779–1794.
<https://doi.org/10.1007/s00018-019-03021-8>
27. Kostyushev D., Kostyusheva A., Brezgin S., Zarifyan D., Utkina A., Goptar I., Chulanov V. (2019) Suppressing the NHEJ pathway by DNA-PKcs inhibitor NU7026 prevents degradation of HBV cccDNA cleaved by CRISPR/Cas9. *Sci. Rep.* **9**, 1–11.
<https://doi.org/10.1038/s41598-019-38526-6>
28. Костюшева А.П., Костюшев Д.С., Брезгин С.А., Зарифьян Д.Н., Волчкова Е.В., Чуланов В.П. (2019) Низкомолекулярные ингибиторы путей репарации двухцепочечных разрывов ДНК усиливают противовирусное действие системы CRISPR/Cas9

- на моделях вируса гепатита В. *Молекуляр. биология*. **53**(2), 311–323.
29. Tropberger P., Mercier A., Robinson M., Zhong W., Ganem D.E., Holdorf M. (2015) Mapping of histone modifications in episomal HBV cccDNA uncovers an unusual chromatin organization amenable to epigenetic manipulation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **112**, E5715–E5724.
<https://doi.org/10.1073/pnas.1518090112>
 30. Костюшев Д.С., Зуева А.П., Брезгин С.А., Липатников А.Д., Волчкова Е.В., Малеев В.В., Чуланов В.П. (2018) Роль ДНК-метилтрансфераз в жизненном цикле вируса гепатита В и патогенезе хронического гепатита В. *Вопросы вирусологии*. **63**, 19–29.
 31. Garg H., Sarin S.K., Kumar M., Garg V., Sharma B.C., Kumar A. (2011) Tenofovir improves the outcome in patients with spontaneous reactivation of hepatitis B presenting as acute-on-chronic liver failure. *Hepatology*. **53**, 774–780.
 32. Wu Z.-J., Zhu Y., Huang D.-R., Wang Z.-Q. (2010) Constructing the HBV-human protein interaction network to understand the relationship between HBV and hepatocellular carcinoma. *J. Exp. Clin. Cancer Res*. **29**, 1–10.
 33. Loomba R., Liang T.J. (2017) Hepatitis B reactivation associated with immune suppressive and biological modifier therapies: current concepts, management strategies, and future directions. *Gastroenterology*. **152**, 1297–1309.
 34. Roskoski Jr.R. (2007) Sunitinib: a VEGF and PDGF receptor protein kinase and angiogenesis inhibitor. *Biochem. Biophys. Res. Commun*. **356**, 323–328.
 35. DiNitto J.P., Deshmukh G.D., Zhang Y., Jacques S.L., Coli R., Worrall J.W., Diehl W., English J.M., Wu J.C. (2010) Function of activation loop tyrosine phosphorylation in the mechanism of c-Kit auto-activation and its implication in sunitinib resistance. *J. Biochem*. **147**, 601–609.
 36. Chong C.-L., Chen M.-L., Wu Y.-C., Tsai K.-N., Huang C.-C., Hu C., Jeng K.-S., Chou Y.-C., Chang C. (2011) Dynamics of HBV cccDNA expression and transcription in different cell growth phase. *J. Biomed. Sci*. **18**, 1–16.
 37. Zhang Z., Protzer U., Hu Z., Jacob J., Liang T.J. (2004) Inhibition of cellular proteasome activities enhances hepadnavirus replication in an HBX-dependent manner. *J. Virol*. **78**, 4566–4572.
 38. Kim J.-H., Kang S., Kim J., Ahn B.-Y. (2003) Hepatitis B virus core protein stimulates the proteasome-mediated degradation of viral X protein. *J. Virol*. **77**, 7166–7173.
 39. Hu Z., Zhang Z., Doo E., Coux O., Goldberg A.L., Liang T.J. (1999) Hepatitis B virus X protein is both a substrate and a potential inhibitor of the proteasome complex. *J. Virol*. **73**, 7231–7240.
 40. Tropberger P., Mercier A., Robinson M., Zhong W., Ganem D.E., Holdorf M. (2015) Mapping of histone modifications in episomal HBV cccDNA uncovers an unusual chromatin organization amenable to epigenetic manipulation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **112**, E5715–E5724.
 41. Kostyushev D., Kostyusheva A., Ponomareva N., Brezgin S., Chulanov V. (2022) CRISPR/Cas and hepatitis B therapy: technological advances and practical barriers. *Nucl. Acid. Ther*. **32**, 14–28.
 42. Koumbi L., Karayiannis P. (2016) The epigenetic control of hepatitis B virus modulates the outcome of infection. *Front. Microbiol*. **6**, 1–9.
<https://doi.org/10.3389/fmicb.2015.01491>
 43. Reherrmann B., Ferrari C., Pasquinelli C., Chisari F.V. (1996) The hepatitis B virus persists for decades after patients' recovery from acute viral hepatitis despite active maintenance of a cytotoxic T-lymphocyte response. *Nat. Med*. **2**, 1104–1108.
 44. Yang S., Zeng W., Zhang J., Lu F., Chang J., Guo J.-T. (2021) Restoration of a functional antiviral immune response to chronic HBV infection by reducing viral antigen load: if not sufficient, is it necessary? *Emerg. Microbes Infect*. **10**, 1545–1554.
<https://doi.org/10.1080/22221751.2021.1952851>

HBx PROTEIN POTENTIATES HEPATITIS B VIRUS REACTIVATION

S. A. Brezgin^{1, 2}, A. P. Kostyusheva^{1, *}, N. I. Ponomareva^{1, 2}, V. I. Gegechkori³,
N. P. Kirdyashkina⁴, S. R. Ayvasyan⁵, L. N. Dmitrieva⁵, L. N. Kokoreva⁵,
V. P. Chulanov^{1, 2, 5, 6}, and D. S. Kostyushev^{1, 2}

¹ Martsinovskiy Institute of Medical Parasitology, Tropical and Vector-Borne Diseases, Sechenov First Moscow State Medical University, Ministry of Health of the Russian Federation (Sechenov University), Moscow 119048 Russia

² Sirius University of Science and Technology, Sochi, 354340 Russia

³ Department of Pharmaceutical and Toxicological Chemistry, Sechenov First Moscow State Medical University, Ministry of Health of the Russian Federation (Sechenov University), Moscow, 119991 Russia

⁴ Izmerov Research Institute of Occupational Health, Moscow, 105275 Russia

⁵ Department of Infectious Diseases, Sechenov First Moscow State Medical University, Ministry of Health of the Russian Federation (Sechenov University), Moscow, 119048 Russia

⁶ National Medical Research Center for Tuberculosis and Infectious Diseases, Moscow, 127994 Russia

*e-mail: dkostushev@gmail.com

Hepatitis B virus (HBV) can cause chronic hepatitis B, one of the most widespread infectious diseases. Worldwide estimates suggest that over 2 billion people are affected by HBV, with over 250 million people developing chronic infection. Patients with chronic infection during the treatment of comorbidities may develop abrupt increase of viral replication – HBV reactivation, leading to liver decompensation and, in some cas-

es, death. Mechanisms of HBV reactivation occur mostly due to suppression of antiviral immune response and activation of intracellular pro-viral signaling. Defining the mechanisms of HBV reactivation is necessary for the rational use of drugs and reducing mortality of patients with chronic infection. In this study, for the first time we studied the effects of HBx protein on HBV reactivation, described reactivation of HBV from transcriptionally inactivated state at the model of methylated recombinant genome of HBV, and investigated HBV reactivation upon treatment with genotoxic agents (doxorubicin, hydrogen peroxide) and targeted drug therapies (sunitinib, bortezomib). We report that both wild type HBx protein and, to a greater extent, a mutant form of HBx protein without nuclear exportation signal, potentiate viral replication and promote HBV reactivation. For the first time, we demonstrate that HBV can reactivate from transcriptionally inactivated genomic form. Doxorubicin and hydrogen peroxide induce HBV reactivation both at the model of transcriptionally active and at the model of transcriptionally silenced viral genome. Sunitinib weakly reactivates HBV, while bortezomib does not affect HBV replication in vitro.

Keywords: ATM, ATR, Chk1/2, cccDNA, HBV DNA, viral load, DNA damage, anticancer therapies, comorbidities

**ВИРУСНЫЕ ИНФЕКЦИИ: ОТ МЕХАНИЗМОВ РЕПЛИКАЦИИ
И ПАТОГЕНЕЗА К ПОДХОДАМ ТЕРАПИИ**

УДК 577.121:576.385.5;578.7

**ЭКСПРЕССИЯ ОБРАТНОЙ ТРАНСКРИПТАЗЫ ВИЧ-1 ВЫЗЫВАЕТ
УСИЛЕНИЕ ДЫХАТЕЛЬНОЙ АКТИВНОСТИ МИТОХОНДРИЙ
В КЛЕТКАХ АДЕНОКАРЦИНОМЫ МЫШЕЙ****© 2022 г. Н. Ф. Закирова^{a, #}, А. С. Кондрашова^{b, #, *}, М. В. Голиков^a,
О. Н. Иванова^a, А. В. Иванов^a, М. Г. Исагулянц^{a, c, d, e, #}, Е. О. Баюрова^{b, d, #}**^aИнститут молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта Российской академии наук, Москва, 119991 Россия^bФедеральный научный центр исследований и разработки иммунобиологических препаратов им. М.П. Чумакова Российской академии наук (Институт полиомиелита), Москва, 108819 Россия^cРоссийский университет дружбы народов, Москва, 117198 Россия^dНациональный исследовательский центр эпидемиологии и микробиологии им. почетного академика Н.Ф. Гамалеи Министерства здравоохранения России, Москва, 123098 Россия^eРижский университет им. Страдыня, Рига, LV-1007 Латвия

*e-mail: kondrashova_as@chumakovs.su

Поступила в редакцию 03.05.2022 г.

После доработки 04.05.2022 г.

Принята к публикации 04.05.2022 г.

Изменения метаболических путей часто связаны с развитием широкого спектра патологий. Усиленный гликолиз в условиях достаточного снабжения тканей кислородом и его разобщение с циклом Кребса, известные как аэробный гликолиз, или эффект Варбурга, — отличительная черта многих злокачественных новообразований. Идентификация конкретных метаболических сдвигов позволяет характеризовать метаболическое программирование отдельных типов опухолевых клеток, стадию их трансформации и прогнозировать их метастатический потенциал. Вирусная инфекция также может изменять метаболизм клеток для обеспечения процесса вирусной репликации. Инфекция вирусом иммунодефицита человека 1 типа (ВИЧ-1) ассоциирована с повышенной частотой развития различных онкологических заболеваний, а для отдельных вирусных белков выявлен онкогенный потенциал. В частности, ранее нами показано, что экспрессия обратной транскриптазы (ОТ) ВИЧ-1 в клетках аденокарциномы молочной железы 4T1 приводит к усилению туморогенного и метастатического потенциала клеток *in vitro* и *in vivo* по механизму, связанному со способностью ОТ индуцировать в клетках активные формы кислорода (АФК). Целью представленной работы было изучение молекулярного механизма этого процесса, а именно влияние ОТ ВИЧ-1 на ключевые метаболические пути, связанные с опухолевой прогрессией: гликолиз и митохондриальное дыхание. Экспрессия ОТ ВИЧ-1 не оказывала эффекта на процесс гликолиза. В то же время она приводила к усилению митохондриального дыхания и уровня синтеза АТФ в клетке, при этом не влияя на доступность субстратов — доноров углерода для цикла Кребса, — что исключает влияние ОТ на метаболические ферменты клеток. Усиление митохондриального дыхания было связано с восстановлением митохондриальной сети, несмотря на ОТ-индуцированное снижение митохондриальной массы. Усиление митохондриального дыхания может увеличивать подвижность клеток, что объясняет их повышенную туморогенность и метастатический потенциал. Эти данные важны для понимания патогенеза инфекции ВИЧ-1, включая стимуляцию процесса образования и распространения ассоциированных с ВИЧ-1 злокачественных новообразований.

Ключевые слова: ВИЧ-1, обратная транскриптаза, клетки аденокарциномы молочной железы, гликолиз, митохондриальное дыхание, метаболические ферменты, митохондриальная масса

DOI: 10.31857/S0026898422050160

Развитие широкого спектра патологий сопровождается изменением метаболизма клеток. К наиболее известным примерам относится эффект

Варбурга, заключающийся в усилении гликолиза и разобщении этого процесса с циклом Кребса [1]. Такое усиление сопровождается активацией

[#] Эти авторы внесли равный вклад.

Сокращения: ECAR (extracellular acidification rate) — скорость внеклеточного закисления; FCCP (carbonyl cyanide-4-(trifluoromethoxy)phenylhydrazone) — карбонилцианид-4-трифторметоксифенилгидразон; MN (mitochondrial network) — митохондриальная сеть; OCR (oxygen consumption rate) — скорость поглощения кислорода; SD (standard deviation) — стандартное отклонение; АФК — активные формы кислорода; ВГВ — вирус гепатита В; ВГС — вирус гепатита С; ВИЧ-1 — вирус иммунодефицита человека 1 типа; ВПЧ ВКР — вирус папилломы человека высокого канцерогенного риска; ВЭБ — вирус Эпштейна—Барр; ОТ — обратная транскриптаза; СПИД — синдром приобретенного иммунного дефицита; фг — фемтограмм.

анаболических путей, связанных с гликолизом: пентозофосфатного пути (биосинтез нуклеотидов), *de novo* биосинтез серина/глицина (связанных с фолатным циклом), пути биосинтез глюкозаминогликанов и т.д. [1]. Разобщение гликолиза и цикла Кребса не означает снижения дыхательной активности митохондрий, так как донорами углерода могут становиться процессы глутаминолиза [2], окисления жирных кислот [3], синтеза ацетилкоэнзима А напрямую из ацетата [4, 5]. В опухолевых клетках происходит нарушение интенсивности системы окислительного фосфорилирования и связанной с ней продукции активных форм кислорода (АФК), что приводит к окислительному стрессу [6, 7]. Считается, что митохондрии вносят наибольший вклад во внутриклеточную продукцию АФК в большинстве типов клеток [8–10]. Сдвиги в использовании субстрата в метаболизме, характерные для опухолевых клеток, могут быть зарегистрированы посредством измерения скорости поглощения кислорода (OCR, oxygen consumption rate) для количественной оценки митохондриального дыхания и скорости внеклеточного закисления культуральной среды (ECAR, extracellular acidification rate) – индикатора гликолиза. Такие измерения позволяют охарактеризовать метаболическое программирование отдельных типов опухолевых клеток, стадию их трансформации и прогнозировать их метастатический потенциал.

Около 10% всех опухолей связаны с инфекцией онкогенными вирусами, к которым принято относить вирус гепатита С (ВГС), вирус гепатита В (ВГВ), вирусы папилломы человека высокого канцерогенного риска (ВПЧ ВКР), вирус Эпштейна–Барр (ВЭБ), вирус герпеса, ассоциированный с саркомой Капоши, вирус Т-клеточного лейкоза человека I типа и полиомавирус клеток Меркеля [11, 12]. С инфекцией ВПЧ ВКР ассоциировано до 4.5% общего числа зарегистрированных злокачественных новообразований и большинство случаев рака шейки матки (вирусную ДНК выявляют у 99.7% больных), злокачественных опухолей аногенитальной области, рака головы и шеи [13, 14]. До 65% зарегистрированных в мире случаев наиболее распространенной формы злокачественного новообразования печени – гепатоцеллюлярной карциномы – ассоциировано с хронической инфекцией ВГВ и/или ВГС [15].

Для многих вирусных инфекций описаны нарушения тех или иных метаболических путей в инфицированных клетках [16, 17]. Интересно, что, по крайней мере, ряд хронических вирусных инфекций вызывает в клетках и в организме в целом метаболические изменения, сходные с таковыми в опухолевых клетках и злокачественных новообразованиях [18–20]. Яркий пример – эффект Варбурга. Это преимущественная выработка опухолевыми клетками энергии не в цикле Креб-

са и окислительного фосфорилирования в митохондриях, а путем анаэробного гликолиза, заключающегося в преимущественном поглощении глюкозы с образованием молочной кислоты не в митохондриях, а в цитоплазме – даже в присутствии в клетках достаточного количества кислорода [21]. Важная роль эффекта Варбурга заключается в обеспечении быстро делящихся опухолевых клеток достаточным количеством нуклеотидов, аминокислот и липидов [22]. Логично предположить, что это необходимо и вирусам для обеспечения синтеза компонентов вирионов. И действительно, при хронической вирусной инфекции часто происходит усиление эффекта Варбурга и глутаминолиза (например, см. [18, 19, 23]). Этот феномен может отражать как создание условий для индукции вирусассоциированного онкогенеза, так и быть его следствием (последствием уже индуцированной вирусом злокачественной трансформации) [24]. Кроме того, вирусы способны изменять метаболизм клетки для противодействия АФК, вырабатываемым хозяином в ответ на вирусную инфекцию [25, 26]. Для молекулярной медицины крайне актуально изучение механизмов вирусассоциированной злокачественной трансформации клеток и влияния инфекции на опухолевую прогрессию.

Инфекция ВИЧ-1 ассоциирована с повышенной частотой развития различных онкологических заболеваний как связанных, так и не связанных с развитием синдрома приобретенного иммунного дефицита (СПИД) [27, 28]. Принято считать, что ВИЧ-1-ассоциированный онкогенез связан с иммуносупрессией и системной иммунной дисфункцией, не полностью преодолеваемыми антиретровирусной терапией [29–31]. Однако канцерогенный потенциал выявлен и для целого ряда белков ВИЧ-1 [32]. Недавно нами показано, что экспрессия обратной транскриптазы (ОТ) ВИЧ-1 в клетках аденокарциномы молочной железы 4Т1 приводит к усилению туморогенного и метастатического потенциала этих клеток *in vitro* и *in vivo* по механизму, зависящему от ОТ-индуцированного повышения уровня АФК [33].

Целью представленной работы было изучение молекулярных механизмов, вовлеченных в этот процесс, в частности влияния продукции ОТ ВИЧ-1 на два ключевых метаболических процесса клеток: гликолиз и митохондриальное дыхание, – в значительной степени определяющих опухолевую прогрессию.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Производные клеточной линии 4Т1luc2, стабильно экспрессирующие ОТ ВИЧ-1. В работе была использована клеточная линия аденокарциномы молочной железы мышей 4Т1luc2 (Bioware Ultra Cell Line 4Т1luc2; “Caliper Life Sciences Inc.”,

США) и ее производные, экспрессирующие консенсусный вариант ОТ ВИЧ-1: 4T1luc2_RT-1.3, 4T1luc2_RT-5.3, 4T1luc2_RT-20.1, — описанные нами ранее [33] и характеризующиеся возрастающей продукцией ОТ на клетку (40–200 фемтограммов (фг)).

Культивирование клеточных линий. Клетки культивировали при 37°C во влажной атмосфере с 5% CO₂ в среде RPMI-1640 (“Gibco”, США), содержащей 10% фетальной сыворотки крупного рогатого скота (FBS; “HyClone”, США), 2 мМ глутамин (“ПанЭко”, Россия), 50 ед./мл пенициллина (“ПанЭко”) и 50 мкг/мл стрептомицина (“ПанЭко”). Пересев клеток проводили каждые 2–3 суток при достижении 90–95% монослоя.

Анализ интенсивностей гликолиза и митохондриального дыхания. За 24 ч до анализа высаживали 3×10^4 клеток на ячейку планшета для анализатора Seahorse XFe24 (“Agilent”, США) в среде RPMI-1640 с 10% FBS. За 30 мин до анализа культуральную среду заменяли на среду DMEM (“Gibco”), не содержащую бикарбонатного буфера и фенолового красного и содержащую 2 мМ глутамин и, в случае теста Mitostress, 11 мМ глюкозы (“Sigma”, Германия), и до проведения теста держали в CO₂-термостате при температуре 37°C и концентрации CO₂ 5%. Тест проводили на анализаторе Seahorse, как описано ранее [34]. После проведения анализа клетки лизировали и измеряли концентрацию тотального белка с использованием набора PierceBCA Protein Assay Kit (“Thermo Fisher Scientific”, США), согласно инструкции производителя. Результаты тестов Mitostress и Glycostress нормировали на уровни тотального белка.

Анализ цитотоксичности ингибиторов метаболических ферментов. За 24 ч до начала эксперимента высаживали 1×10^4 клеток на ячейку 96-луночного планшета, затем вносили ингибитор гликолиза (2-дезоксид-D-глюкоза; “Sigma”) в диапазоне концентраций 0.63–15 мМ, глутаминазы (CB839; “Cayman Chemical”, США) в концентрациях 0.5–10 мкМ, карнитинового транспортера (Etomoxir; “Sigma”) в концентрациях 31–500 мкМ или ингибиторов респираторных комплексов: метформина (“Sigma”) и фенформина (“Sigma”) в концентрациях 0.5–10 мМ и 1–50 мкМ соответственно. Через 48 ч оценивали количество жизнеспособных клеток стандартным МТТ-тестом, как описано ранее [34].

Измерение массы митохондрий. Клетки 4T1luc2 и производные линии, экспрессирующие ОТ ВИЧ-1, высевали на 12-луночные планшеты при плотности 2×10^5 клеток/ячейка. При достижении 90%-ного монослоя культуральную среду удаляли и заменяли свежей, содержащей 1.5 мкМ красителя Mitotracker Red CM-H2XROS (“Thermo Fisher

Scientific”). После 45 мин инкубации при 37°C клетки промывали теплой свежей средой, обрабатывали 0.05%-ным раствором трипсина с ЭДТА (“Serva”, Германия), ресуспендировали, осаждали центрифугированием и ресуспендировали в свежей среде DMEM без фенолового красного. Уровни флуоресценции измеряли на проточном цитометре BD LSR Fortessa Flow Cytometer (“Becton Dickinson”, США) при возбуждении флуоресценции лазером с длиной волны 561 нм и регистрации сигнала при 610 нм. Анализ данных проводили при помощи программы Flowing Software версия 2.5.1 (<https://bioscience.fi/services/cell-imaging/flowing-software/>; University of Turku, Финляндия).

Анализ морфологии митохондрий. Клетки высевали в конфокальные чашки диаметром 35 мм со стеклянными вставками. Через 24 ч добавляли Mitotracker Red CM-H2XROS до конечной концентрации 1.5 мкМ в свежей, предварительно нагретой среде; через 45 мин клетки промывали теплым фосфатно-солевым буфером, а затем средой DMEM без фенолового красного. Конфокальные 8-битные цифровые изображения получали с использованием конфокального лазерного сканирующего микроскопа Leica TCS SP5 (“Leica Microsystems”, Германия), оснащенного масляным иммерсионным объективом HCX PLAPO CS 63 × 1.4. Флуоресценцию возбуждали при 543 нм и регистрировали в диапазоне 560–600 нм. Доступ к фенотипу митохондриальной морфологии был получен, по крайней мере, в 30 клетках. Каждая клетка была классифицирована в соответствии с общим статусом фенотипа митохондрий. Клетку относили к нитчатому фенотипу, если >70% митохондрий в ней были удлиненными, к фрагментированному фенотипу, если <30% митохондрий были слившимися, или к промежуточному фенотипу (50%). Подсчет проводили вслепую, независимо два исследователя. Оценивали число клеток, принадлежащих к каждому из фенотипов, относительно общего числа полученных изображений клеток.

Статистический анализ данных. Все данные представляют средние значения ± стандартное отклонение (SD). Для тестов, в которых число измерений (повторов измерений) или число независимых измерений не превышало 10, статистическую значимость оценивали с помощью критерия Крускала–Уоллиса с критерием множественных сравнений Данна и попарно с применением критерия Манна–Уитни (Prism, GraphPad Software, США). Корреляции между наборами данных оценивали с использованием критерия ранжирования Спирмена (Prism). Для остальных тестов различия величин оценивали *t*-тестом с применением критерия Стьюдента, тогда как множественные сравнения были выполнены с помощью дисперсионного анализа (ANOVA) с апостериорным критерием

Тьюки или по Фридману с критерием согласованности Кендалла для сравнения зависимых выборок. Для парных сравнений использовали знаковый тест (sign test). Величина $p < 0.05$ считалась статистически значимой, если не указано иное (Statistica Axa 11, “Tibco”, США).

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Экспрессия ОТ ВИЧ-1 не влияет на гликолиз

Гликолиз представляет собой процесс превращения глюкозы в пируват, который может быть транспортирован в митохондрии для последующего включения в цикл Кребса или секретирован в форме лактата. Оценка эффективности гликолиза оценивали при использовании анализатора Seahorse, который позволяет оценивать уровни закисления культуральной среды. Измерение проводили согласно методике теста Glycostress, т.е. сначала в отсутствие глюкозы (определяют уровень негликолитического закисления, который обусловлен отличными от гликолиза процессами в клетке), затем в присутствии глюкозы в концентрациях 1 г/л (11 мМ) и 4.5 г/л (30 мМ) (т.е., в стандартной и высокоглюкозной среде DMEM), после добавления ингибитора АТФазы митохондрий олигомицина (активирует гликолиз до максимально возможного уровня для компенсации синтеза АТФ), а в завершение – после добавления ингибитора первой стадии гликолиза, 2-дезоксид-*D*-глюкозы (рис. 1а). Емкость гликолитического резерва рассчитывали как разницу между максимальной гликолитической способностью и уровнем гликолиза при 30 мМ глюкозы.

В результате проведенных измерений показано, что клеточная линия 4T1luc2 и ее ОТ-экспрессирующие производные: 4T1luc2_RT-1.3, 4T1luc2_RT-5.3, 4T1luc2_RT-20.1 [33] – имели сходные уровни базального (в стандартной и высокоглюкозной среде) и максимального гликолиза (рис. 1б–г), т.е. экспрессия ОТ ВИЧ-1 в клетках опухоли молочной железы мышей не приводила к заметным изменениям в процессе гликолиза. Из различий в параметрах гликолиза между исходной линией и субклонами можно отметить пониженное негликолитическое закисление для субклона 4T1luc2_RT-20.1 в сравнении с остальными линиями (рис. 1е). Также для этого субклона был отмечен пониженный гликолитический резерв, по крайней мере в сравнении с субклоном 4T1luc2_RT-1.3 (рис. 1д).

Экспрессия ОТ ВИЧ-1 усиливает дыхательную активность митохондрий клеток

Еще один важнейший метаболический процесс – дыхание митохондрий, показывающее активность работы системы окислительного фос-

форилирования и связанных с ней процессов цикла Кребса, который обеспечивает дыхательную систему субстратами. Влияние ОТ ВИЧ-1 на дыхательную активность митохондрий, как и оценку эффективности гликолиза, определяли на анализаторе Seahorse, позволяющем также измерять уровни поглощения кислорода. Измерение дыхания по методике Mitostress проводили после последовательного добавления реагентов. Сначала определяли базовый уровень дыхания. Затем клетки обрабатывали олигомицином; уровень падения дыхательной активности отражал уровень синтеза АТФ системой окислительного фосфорилирования. Далее к клеткам добавляли разбавитель транспорта протонов через мембрану митохондрий и АТФ-синтазы – карбонилцианид-4-трифторметоксифенилгидразон (FCCP); при этом дыхание достигало максимально возможного уровня. Так как при высоких концентрациях разбавитель может, наоборот, ингибировать дыхание, то измерение проводили в присутствии двух концентраций FCCP. На основании полученных данных рассчитывали разницу между уровнями базального и максимального дыхания, определяемую как “свободный дыхательный запас” (spare respiratory capacity). На финальной стадии вносили ингибиторы митохондриальных комплексов I и III ротенон и антимицин и определяли остаточный уровень дыхания, отражающий уровень поглощения кислорода немитохондриальными ферментами (системами), – немитохондриальное дыхание. Разница между максимальным уровнем поглощения кислорода и уровнем после добавления олигомицина отражала интенсивность утечки протонов.

Результаты представлены на рис. 2. Можно видеть, что экспрессия ОТ ВИЧ-1 влияла на митохондриальное дыхание (рис. 2а–ж). В частности, достоверно повышался базальный уровень дыхания, продукция АТФ (рис. 2б, г, $p < 0.05$), максимальный уровень дыхания (рис. 2д, е) и свободный дыхательный запас (рис. 2ж, тенденция, $p = 0.05$, достоверно при попарных сравнениях). Экспрессия ОТ ВИЧ-1 не влияла ни на утечку протонов (рис. 2в), за исключением некоторого ее повышения для субклона 4T1luc2_RT-20.1 в сравнении с остальными линиями, ни на немитохондриальное дыхание (рис. 2з). Таким образом, синтез ОТ ВИЧ-1 в клетках опухоли молочной железы мышей индуцировал усиление их метаболической активности.

Субклоны 4T1luc2_RT-1.3, 4T1luc2_RT-5.3, 4T1luc2_RT-20.1 продуцировали ОТ ВИЧ-1 в количестве 40, 125 и 190 фг на клетку соответственно; уровень эндогенной ОТ в клетках 4T1luc2 был ниже порога чувствительности метода определения (<1 фг) [33]. Наличие этих данных позволило оценить количественную зависимость дыхательной активности митохондрий от уровня синтеза ОТ. Выявлено, что уровень базального дыхания и

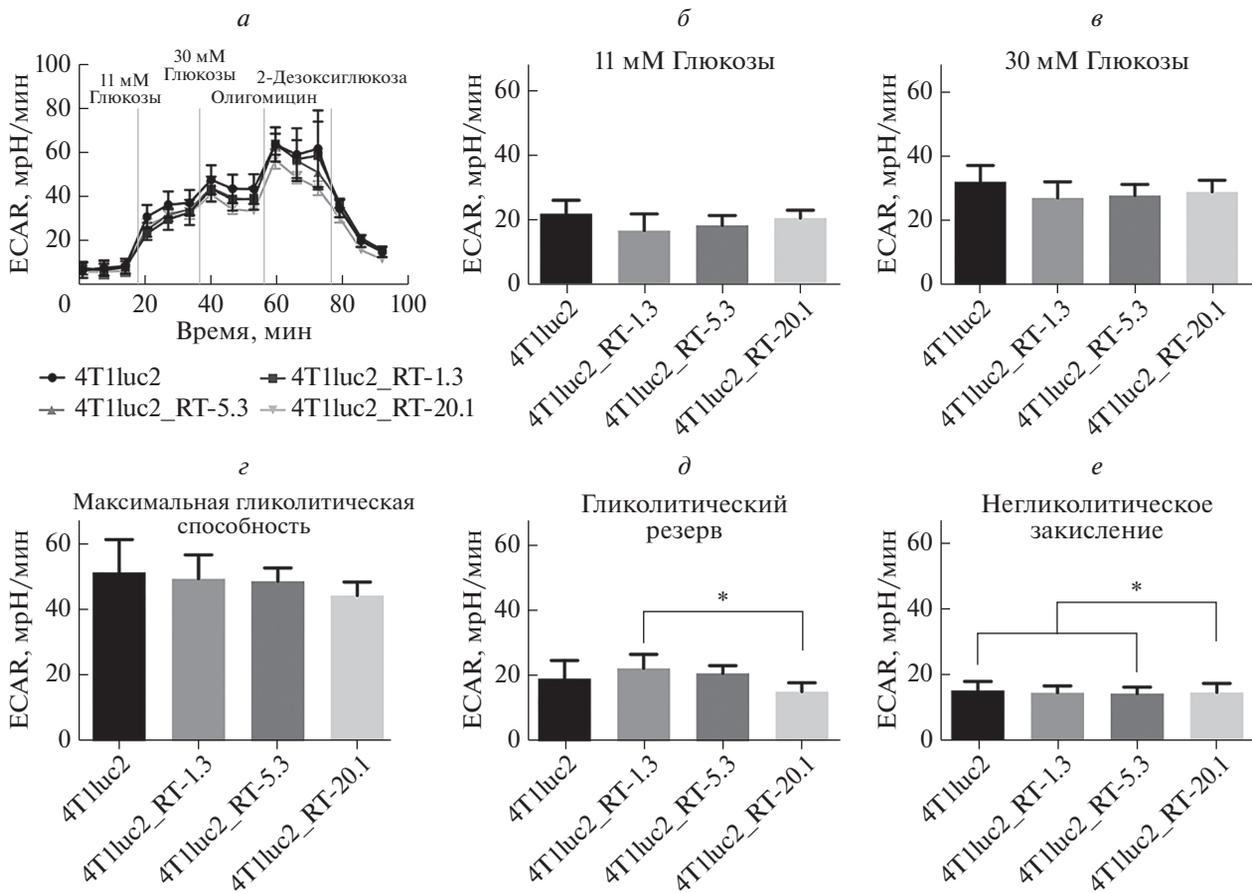


Рис. 1. Экспрессия обратной транскриптазы ВИЧ-1 в клетках 4T1luc2 не влияет на уровень гликолиза. *a* – Эффективность гликолиза ОТ-экспрессирующих вариантов: 4T1luc2_RT-1.3, 4T1luc2_RT-5.3, 4T1luc2_RT-20.1 – оценивали с использованием анализатора Seahorse, согласно методике теста Glycostress. Определение ECAR в среде со стандартной, 11 мМ (*б*), и высокой, 30 мМ (*в*), концентрацией глюкозы. *z* – Максимальные значения ECAR при стимуляции 1 мкМ олигомицином. *д* – Емкость гликолитического резерва, рассчитанная как разница между максимальной гликолитической способностью и уровнем ECAR в высокоглюкозной (30 мМ) среде. *е* – ECAR перед введением глюкозы (негликолитическое закисление). Значения ECAR выражены в единицах мрН/мин и нормализованы на 1 мг клеточного белка (мрН/min/ Norm. Unit). Гистограммы представлены как среднее значение ± SD для анализа, проведенного в четырех повторах. Статистическую значимость оценивали с помощью критерия Крускала–Уоллиса с критерием множественных сравнений Данна и попарно с применением критерия Манна–Уитни (* $p < 0.05$).

продукция АТФ напрямую зависят от количества синтезируемой клетками ОТ (рис. 2*а*); у обоих субклонов, характеризующихся высоким уровнем продукции ОТ (4T1luc2_RT-5.3 и 4T1luc2_RT-20.1), эти параметры были достоверно повышены по сравнению с исходной клеточной линией (рис. 2*б, г*; $p < 0.05$). В остальном различия в параметрах митохондриального дыхания между субклонами были минимальными. В частности, можно отметить пониженный “свободный дыхательный запас” для 4T1luc2_RT-20.1 в сравнении с 4T1luc2_RT-5.3 (рис. 2*г*; $p < 0.05$ – тест Манна–Уитни).

ОТ ВИЧ-1 не влияет на основные метаболические пути клетки

Одной из причин усиления дыхательной активности митохондрий может быть повышение

внутриклеточных концентраций субстратов – доноров углерода для цикла Кребса [35]. Вклад отдельных путей в усиление дыхательной активности можно оценить, изучив чувствительность клеток к ингибиторам соответствующих метаболических ферментов, как показано нами ранее [34]. В связи с этим следующим этапом стал анализ цитотоксичности блокаторов гликолиза, глутаминолиза и окисления жирных кислот: ингибиторов гексокиназы (2-дезоксид-*D*-глюкозы), глутаминазы (СВ839) и карнитинового транспортера митохондрий (этомоксира) соответственно. Кроме того, в исследовании использованы и ингибиторы митохондриальных респираторных комплексов: метформин и фенформин. Результаты представлены на рис. 3. Можно видеть, что экспрессия ОТ ВИЧ-1 не влияла на чувствительность клеток к указанным выше соединениям (при сравнении с исход-

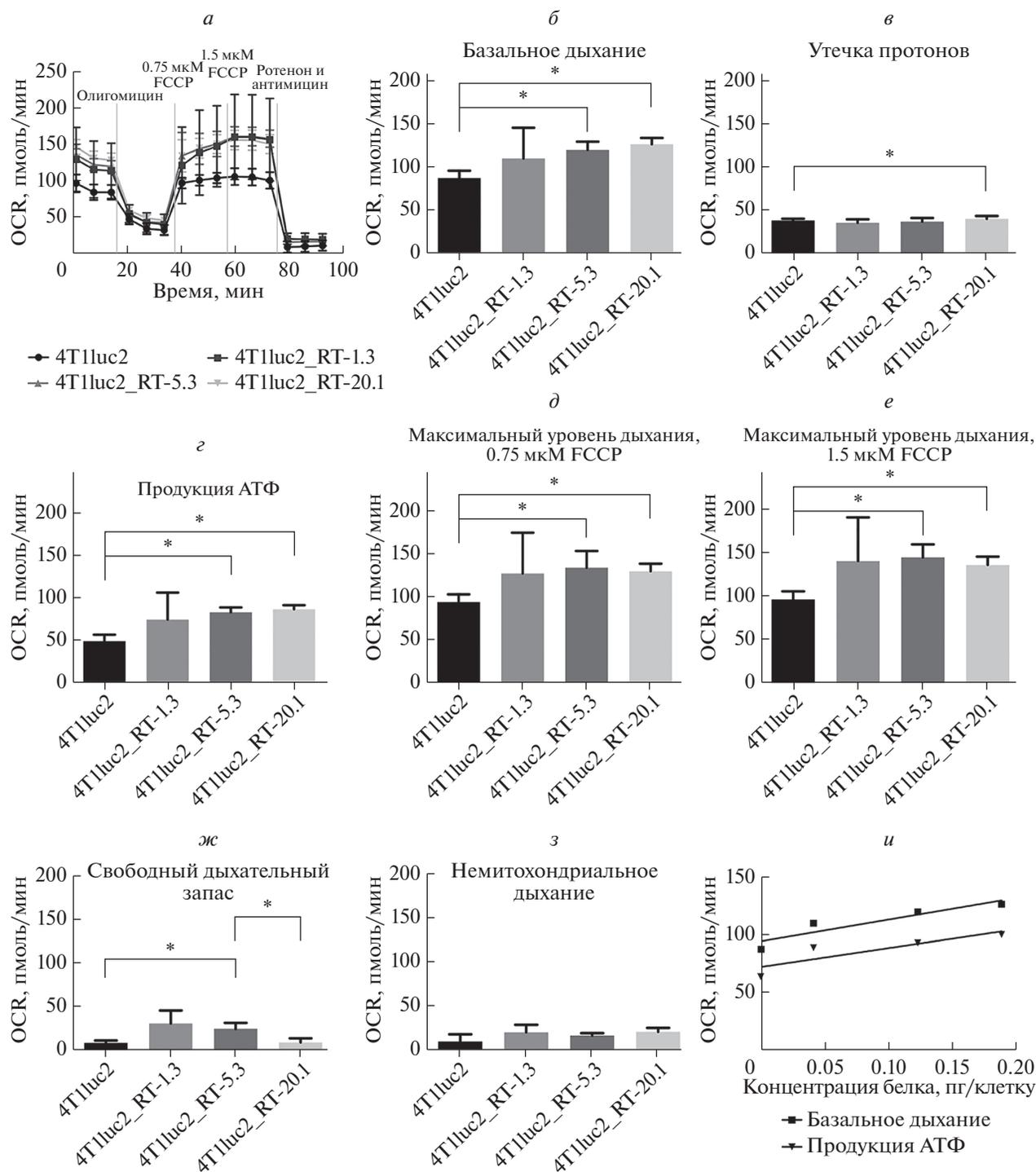


Рис. 2. Экспрессия обратной транскриптазы ВИЧ-1 в клетках 4T1luc2 усиливает дыхательную активность митохондрий. *а* – Дыхательную активность ОТ-экспрессирующих вариантов: 4T1luc2_RT-1.3, 4T1luc2_RT-5.3, 4T1luc2_RT-20.1 – анализировали при помощи технологии Seahorse и набора реагентов Mitostress. *б* – Базальный уровень дыхания определяли как разницу между базальным и немитохондриальными значениями OCR. *в* – Интенсивность утечки протонов оценивали после обработки олигомицином. *г* – АТФ-связанный OCR получен как разница между базальным значением OCR и OCR, ингибированным антимицином А. *д*, *е* – Максимальную величину OCR стимулировали добавлением FCCP в концентрациях 0.75 и 1.5 мкМ соответственно. *ж* – Свободный дыхательный запас рассчитывали как разницу между максимальным и базальным OCR. *з* – Базовые митохондриальные показатели OCR получали путем вычитания немитохондриального OCR. *и* – Корреляция показателей базального дыхания и продукции АТФ. Значения OCR выражены в единицах пмоль/мин и нормализованы на 1 мг клеточного белка (pmol/min/Norm. Unit). Гистограммы представлены как среднее значение \pm SD для анализа, проведенного в четырех повторах. Статистическую значимость оценивали с помощью критерия Крускала–Уоллиса с критерием множественных сравнений Данна (* $p < 0.05$) и попарно с применением критерия Манна–Уитни. Уровни базального дыхания и продукции АТФ коррелировали с использованием критерия ранжирования Спирмена.

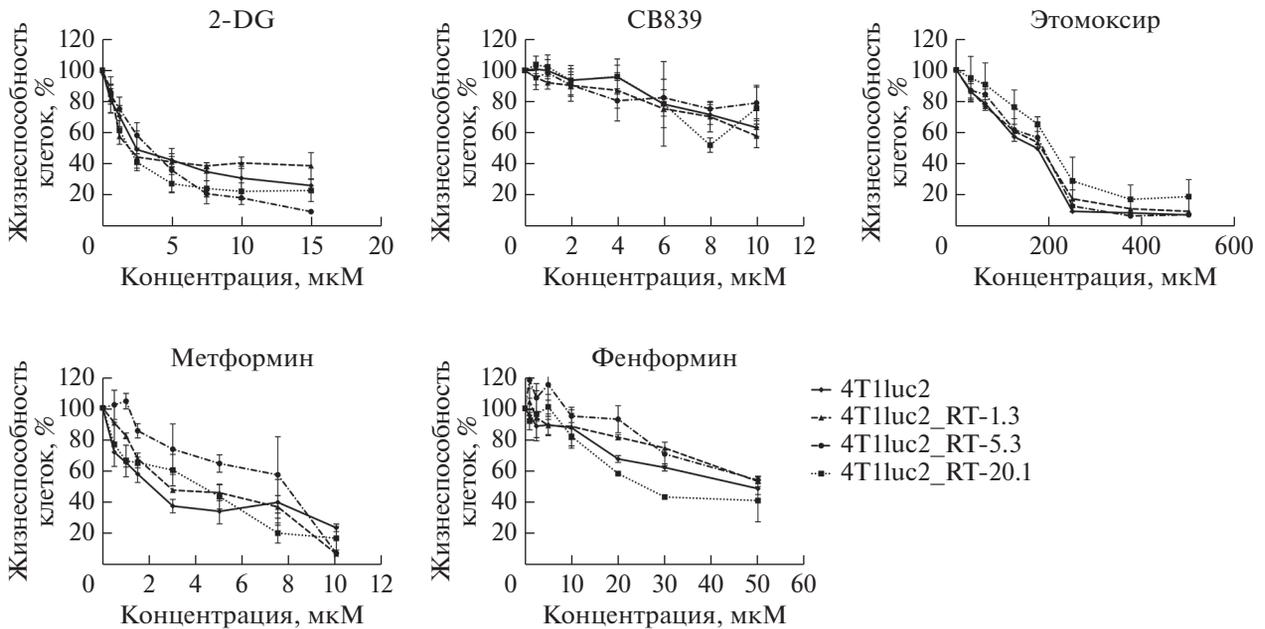


Рис. 3. Экспрессия обратной транскриптазы ВИЧ-1 не влияет на чувствительность клеток 4T1luc2 к ингибиторам метаболических путей. Клетки выдерживали в присутствии ингибиторов гликолиза (2-дезокси-D-глюкоза, 2-DG), глутаминолиза (CB839), карнитинового транспортера митохондрий (Этомоксир) и респираторных комплексов (Метформин, Фенформин) в течение 48 ч с последующим анализом жизнеспособности МТТ-тестом. Статистический анализ показал отсутствие различий между исходной линией и экспрессирующими ОТ ВИЧ-1 субклонами (все $p > 0.05$).

ной линией все $p > 0.05$). Отсюда можно сделать вывод, что усиление дыхательной активности митохондрий не связано с усилением активности гликолиза, глутаминолиза или окисления жирных кислот.

Высокий уровень экспрессии ОТ ВИЧ-1 снижает общую массу митохондрий

Другой причиной повышения дыхательной активности клеток может быть усиление биогенеза митохондрий и/или подавление их уничтожения (митофагии), что приводит к увеличению митохондриальной массы. Именно поэтому следующей задачей работы стала оценка влияния ОТ ВИЧ-1 на содержание митохондриальной массы, что было выполнено окраской клеток красителем MitoTracker Red с последующим измерением уровня флуоресцентного сигнала проточной цитометрией. Однако, вопреки ожиданиям, экспрессия ОТ ВИЧ-1 вызывала не повышение, а снижение митохондриальной массы (рис. 4). Эффект проявлялся для субклонов 4T1luc2_RT-5.3 и 4T1luc2_RT-20.1, характеризующихся высоким уровнем синтеза ОТ и усиленной дыхательной активностью митохондрий. Таким образом, усиление дыхания было сопряжено не с увеличением митохондриальной массы, а, напротив, с ее уменьшением.

Экспрессия ОТ ВИЧ-1 изменяет структуру митохондриальной сети

Еще одно возможное объяснение повышенной дыхательной активности – перестройка митохондрий в обширную сеть [36]. Структуру митохондриальной сети оценивали с помощью конфокальной микроскопии путем высаживания клеточных линий на чашки со стеклянным дном и окрашивания красителем MitoTracker Red. В каждом эксперименте визуализировали 30 клеток. Фенотип митохондрий каждой отдельной клетки классифицировали по окрашиванию на нитевидные митохондриальные сети ($MN > 70\%$ слившихся митохондрий), промежуточные (примерно равное число слившихся и поделившихся мембран, $MN \approx 50\%$) и фрагментированные ($MN < 30\%$ слившихся митохондрий). Типичные изображения и количественный анализ представлены на рис. 5а–д. Можно видеть, что во всех субклонах большая часть клеток содержала разрозненные или частично ассоциированные митохондрии. В случае клеток с максимальной экспрессией ОТ наблюдалось появление протяженных митохондриальных сетей, однако их доля не превышала 30%.

Частота клеток с фенотипом митохондрий $MN > 70\%$ в исходной клеточной линии 4T1luc2 и субклонах 4T1luc2_RT-1.3 и 4T1luc2_RT-5.3 не различалась ($p > 0.1$, знаковый тест; рис. 5б, в). Однако в сублоне 4T1luc2_RT-20.1, сверхэкспрессирующем ОТ, доля клеток с фенотипом

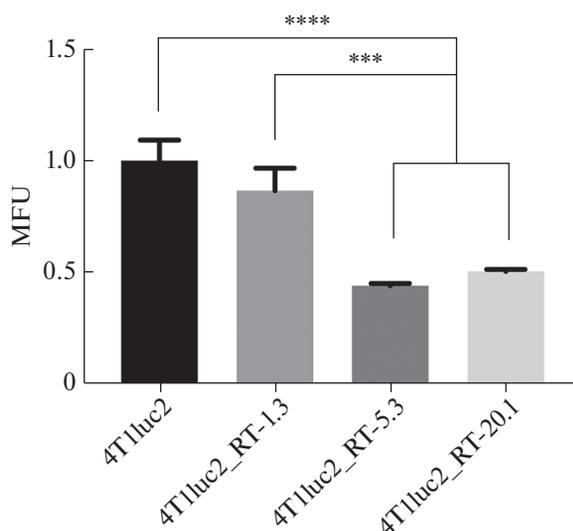


Рис. 4. Экспрессия обратной транскриптазы ВИЧ-1 в клетках 4T1luc2 приводит к снижению массы митохондрий. Общую массу митохондрий оценивали окрашиванием клеток реагентом MitoTracker Red с последующим измерением уровня сигнала проточной цитометрией (mean fluorescent unit, MFU). Различия проанализированы с использованием двустороннего непарного *t*-критерия Стьюдента, множественные сравнения выполнены с помощью дисперсионного анализа (ANOVA) с апостериорным критерием Тьюки. *** $p < 0.001$, **** $p < 0.000$.

MN > 70% значительно увеличилась (4T1luc2 по сравнению с 4T1luc2_RT-20.1, $p = 0.023$, знаковый тест; рис. 5б, в). Кроме того, в субклоне 4T1luc2_RT-20.1 было значительно больше клеток с фенотипом MN > 70%, чем в 4T1luc2_RT-1.3 ($p = 0.01$, знаковый тест; рис. 5б, в). Частота клеток с фенотипом митохондрий MN \approx 50% и MN < 30% не различалась между клетками исходной линии 4T1luc2 и субклонами, а также между субклонами (рис. 5б, г, д). Линия 4T1luc2_RT-20.1 имела слабую тенденцию к снижению числа клеток с фенотипом MN < 30% ($p = 0.096$) в сравнении с исходной линией 4T1luc2 и значительно меньше клеток с фенотипом MN < 30%, чем 4T1luc2_RT-1.3 ($p = 0.01$, знаковый тест; рис. 5б, д). По-видимому, это значит, что избыточная экспрессия ОТ ВИЧ-1 восстанавливает митохондриальные сети, нарушенные в исходных клетках и в субклонах с низким уровнем экспрессии ОТ.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

В клетках опухоли молочной железы снижен резерв митохондриального дыхания [37]. Однако недавно показано, что метастатическая аденокарцинома молочной железы характеризуется усиленным митохондриальным биогенезом и дыханием [38]. Согласно этим выводам, усиление митохондриального дыхания клеток злокачественного но-

вообразования молочной железы может привести к их повышенной метастатической активности, а именно опухолевые клетки с более высокой емкостью митохондриального дыхания будут с большей вероятностью мигрировать с образованием метастаз. Это согласуется с ранее опубликованными нами данными по экспрессии ОТ в клетках опухоли молочной железы 4T1. В *in vivo* исследовании на сингенных мышах мы продемонстрировали повышенную метастатическую активность клеток аденокарциномы молочной железы мышей 4T1luc2, экспрессирующих ОТ ВИЧ-1, в сравнении с исходными клетками 4T1luc2 [33]. Теперь нами показано, что в субклонах 4T1luc2 с высоким уровнем продукции ОТ (>100 фг на клетку) усилено митохондриальное дыхание, в частности более интенсивно базальное дыхание, повышены уровни АТФ и максимального дыхания. Уровни базального дыхания и продукции АТФ прямо коррелировали с уровнем продукции ОТ в клетках.

Интересно также отметить повышенный дыхательный запас, наблюдаемый у субклонов с низким и средним уровнями синтеза ОТ (4T1luc2_RT-1.3, 4T1luc2_RT-5.3), но не у сверхпродуцирующего субклона. Свободный дыхательный запас представляет собой особенно надежный функциональный параметр для оценки митохондриального резерва и приспособленности клетки (fitness) [35, 39]. Свободный дыхательный запас определяется как разница между уровнями базального и максимального дыхания. Когда клетки подвергаются стрессу, потребность в энергии увеличивается, что требует больших затрат АТФ для поддержания клеточных функций. Клетка со значительным свободным дыхательным запасом может производить больше АТФ и преодолеть большой стресс, включая окислительный стресс [40] и стресс эндоплазматического ретикулума [41]. Фактически нами показано, что ОТ ВИЧ-1, даже в относительно малом количестве (40 фг на клетку в случае субклона T1luc2-RT-1.3), индуцирует повышенную толерантность к стрессу в клетках аденокарциномы молочной железы.

Важно отметить, что экспрессия ОТ ВИЧ-1 не оказывала никакого влияния на процесс гликолиза, с усилением которого чаще всего связывают повышенную метастатическую активность. Так, недавно показано, что при злокачественном новообразовании желудка в клетках с высокой метастатической активностью происходит полное переключение метаболизма с окислительного фосфорилирования на аэробный гликолиз [42]. Гипергликолитическим фенотипом обладают и метастазирующие клетки опухоли молочной железы [43]. Нами описан альтернативный механизм повышенной агрессивности эпителиальных клеток аденокарциномы молочной железы мышей, обусловленный воздействием на опухолевые клетки белка ОТ ВИЧ-1. Скорее всего, ОТ воздействует на злокачествен-

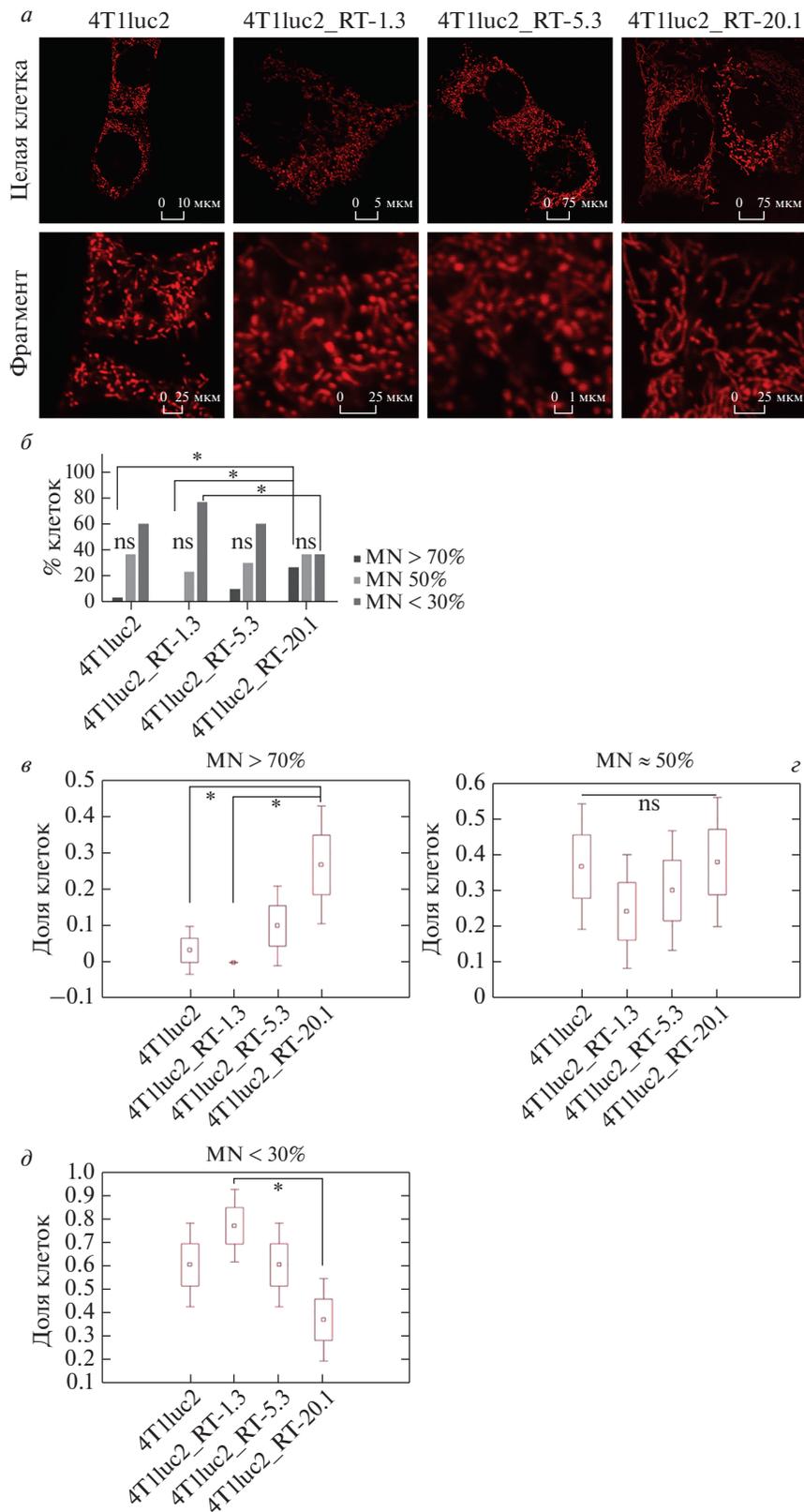


Рис. 5. Обратная транскриптаза ВИЧ-1 изменяет структуру митохондриальной сети в клетках. *а* – Клетки обрабатывали MitoTracker Red, окрашивание визуализировали конфокальной микроскопией. *б* – Количественное определение клеток с нитевидными (MN > 70%), промежуточными (MN ≈ 50%) и фрагментированными (MN < 30%) митохондриями проводили путем подсчета процента клеток, принадлежащих к каждому из фенотипов, от общего числа клеток. Пропорция клеток с фенотипом митохондрий MN > 70% (*в*), MN ≈ 50% (*г*), MN < 30% (*д*). **p* < 0.05 (ANOVA, Фридман).

ную эпителиальную клетку, повышая метастатическую активность за счет усиления митохондриального дыхания, что говорит о прямой роли белков ВИЧ-1 в индукции канцерогенеза [32]. Линия клеток аденокарциномы молочной железы мышей, использованная нами в этой работе, — классическая модель опухоли молочной железы человека [44], поэтому можно предположить, что аналогичный эффект ОТ ВИЧ-1 будет оказывать и на опухолевые клетки человека. На это косвенно указывают и эпидемиологические данные по высокой частоте встречаемости опухоли молочной железы среди инфицированных ВИЧ-1 [45].

В проведенном исследовании мы попытались установить механизм индуцированного ОТ ВИЧ-1 усиления дыхательной активности митохондрий. Усиление дыхания может быть связано с повышенными уровнями субстратов, поступающих в цикл Кребса посредством гликолиза, глутаминолиза, окисления жирных кислот или других путей. Однако при анализе цитотоксичности блокаторов этих процессов: гексокиназы (2-дезоксид-глюкоза), глутаминазы (СВ839) и карнитинового транспортера митохондрий (этомоксир) — не выявлено изменений в чувствительности клеток, экспрессирующих ОТ ВИЧ-1, к этим соединениям. Таким образом, нами показано, что ОТ-зависимое усиление дыхательной активности митохондрий не связано с усилением активности гликолиза, глутаминолиза или окисления жирных кислот. Следовательно, изменение дыхания не может быть результатом усиления митохондриального биогенеза, а вызвано другими факторами.

К одному из таких факторов относится структурная реорганизация митохондрий. Структура и расположение митохондрий в клетках имеют решающее значение и жестко регулируются процессами деления и слияния, биогенеза и митофагии, обеспечивая относительно постоянную митохондриальную популяцию [46]. Усиление митохондриального дыхания может быть связано с перестройкой митохондриальной сети. Действительно, ранее сообщалось, что в нитевидных митохондриях, по сравнению с фрагментированными, усилено окислительное фосфорилирование [36, 47]. Для исследования этой возможности мы проанализировали состояние митохондриальных сетей в ОТ-экспрессирующих субклонах в сравнении с исходными клетками. Оказалось, что высокий уровень экспрессии ОТ достоверно восстанавливал митохондриальные сети по сравнению с исходной линией 4T1Luc2 и субклонами с низким уровнем экспрессии ОТ, что выражалось в значимом увеличении доли клеток с митохондриальным фенотипом $MN > 70\%$ ($p = 0.023$) и значительным (по сравнению с низкоэкспрессирующими) и незначительным (по сравнению с исходной клеточной линией) уменьшением числа клеток с фенотипом $MN < 30\%$. Однако при этом не происходило увеличения митохондриальной мас-

сы. Наоборот, усиление дыхательной активности и увеличение пропорции клеток с превалирующим фенотипом митохондрий ($MN > 70\%$) регистрировали для субклонов, отличающихся сниженной митохондриальной массой. Одним из объяснений может служить сборка дыхательных комплексов в “суперкомплексы”, характеризующиеся повышенной эффективностью потока электронов и продукции АТФ [48].

Отсутствие зависимости параметров дыхания митохондрий от базовых ферментативных активностей и обратное ожиданием снижение митохондриальной массы указывали на наличие регуляторного ОТ-зависимого механизма. В частности, эффективность митохондриального дыхания определяется повышенной скоростью потока электронов и продукцией АТФ, необходимыми для функционирования дыхательных “суперкомплексов”.

Важную роль в регуляции митохондриального дыхания играют тирозинкиназы семейства Src. Src-киназы локализованы в нескольких внутриклеточных компартментах, включая митохондрии, где они нацелены на несколько белков, модулирующих активность этой органеллы. Сверхэкспрессия Src приводит к снижению жизнеспособности клеток, укорочению клеточного цикла, увеличению инвазивной способности и метастатической активности злокачественных клеток, что характерно для опухоли молочной железы [37]. Известно, что активность Src-киназ регулируется окислительно-восстановительными процессами и инактивируется путем окисления [49, 50]. Мы показали, что ОТ ВИЧ-1 индуцирует окислительный стресс в экспрессирующих ее клетках с продукцией АФК [33, 51]. АФК, индуцированные ОТ, могут инактивировать Src-киназы, приводя к восстановлению митохондриального дыхания. Это согласуется с описанной нами ранее прямой зависимостью между уровнями синтезируемой ОТ и продукцией АФК [33] и полученными теперь результатами по зависимости между уровнем ОТ и параметрами митохондриального дыхания (рис. 2). Ряд белков ВИЧ-1, таких как gp120, tat, nef и p17, также индуцирует продукцию АФК как в инфицированных, так и в неинфицированных “клетках-свидетелях” [32, 52]. Логично предположить, что они воздействуют на клетки опухоли молочной железы по типу ОТ. Вовлеченность в процесс усиления митохондриального дыхания Src-киназ заслуживает отдельного исследования.

Таким образом, нами выявлено ОТ-индуцированное усиление митохондриального дыхания в клетках аденокарциномы молочной железы, объясняющее их повышенную туморогенную и метастатическую активность. Способность ОТ ВИЧ-1 влиять на метаболизм опухолевых клеток может играть важную роль в патогенезе инфекции ВИЧ-1,

тем самым объясняя феномен ВИЧ-1-ассоциированного канцерогенеза, не связанного с иммунной супрессией и иммунной дисфункцией. Детальный механизм ОТ-индуцированного усиления митохондриального дыхания клеток аденокарциномы молочной железы и его последствий для патогенеза ВИЧ-1 еще предстоит установить.

Выполненные в период с 2017 по 2021 г. исследования, в части обоснования целей и задач, создания субклонов и характеристики их свойств, были поддержаны грантами РФФИ: 17-54-30002/НИН R01CA217715 (2017–2020 гг.), 19-04-01034 (2019–2021 гг.) – и Российским научным фондом (грант № 21-74-10146) в части метаболических измерений. Работа М.И. была поддержана грантом ЕС “Twinning on DNA Based Cancer Vaccines” No. 692293 (2016–2018).

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

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Vaupel P., Multhoff G. (2021) Revisiting the Warburg effect: historical dogma versus current understanding. *J. Physiol.* **599**, 1745–1757.
- Wang Z., Liu F., Fan N., Zhou C., Li D., Macvicar T., Dong Q., Bruns C.J., Zhao Y. (2020) Targeting glutaminolysis: new perspectives to understand cancer development and novel strategies for potential target therapies. *Front. Oncol.* **10**, 589508.
- Dong W., Nie X., Zhu H., Liu Q., Shi K., You L., Zhang Y., Fan H., Yan B., Niu C., Lyu L.D., Zhao G.P., Yang C. (2021) Mycobacterial fatty acid catabolism is repressed by FdmR to sustain lipogenesis and virulence. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **118**(16), e2019305118.
- Comerford S.A., Huang Z., Du X., Wang Y., Cai L., Witkiewicz A.K., Walters H., Tantawy M.N., Fu A., Manning H.C., Horton J.D., Hammer R.E., McKnight S.L., Tu B.P. (2014) Acetate dependence of tumors. *Cell.* **159**, 1591–1602.
- Mashimo T., Pichumani K., Vemireddy V., Hatanpaa K.J., Singh D.K., Sirasanagandla S., Nannepaga S., Piccirillo S.G., Kovacs Z., Foong C., Huang Z., Barnett S., Mickey B.E., DeBerardinis R.J., Tu B.P., Maher E.A., Bachoo R.M. (2014) Acetate is a bioenergetic substrate for human glioblastoma and brain metastases. *Cell.* **159**, 1603–1614.
- Foo B.J., Eu J.Q., Hirpara J.L., Pervaiz S. (2021) Interplay between mitochondrial metabolism and cellular redox state dictates cancer cell survival. *Oxid. Med. Cell Longev.* **2021**, 1341604.
- Lee H.Y., Nga H.T., Tian J., Yi H.S. (2021) Mitochondrial metabolic signatures in hepatocellular carcinoma. *Cells.* **10**(8), 1901.
- Zorov D.B., Juhaszova M., Sollott S.J. (2006) Mitochondrial ROS-induced ROS release: an update and review. *Biochim. Biophys. Acta.* **1757**, 509–517.
- Ott M., Gogvadze V., Orrenius S., Zhivotovsky B. (2007) Mitochondria, oxidative stress and cell death. *Apoptosis.* **12**, 913–922.
- Murphy M.P. (2009) How mitochondria produce reactive oxygen species. *Biochem. J.* **417**(Pt. 1), 1–13.
- Ivanov A.V., Valuev-Elliston V.T., Tyurina D.A., Ivanova O.N., Kochetkov S.N., Bartosch B., Isagulians M.G. (2017) Oxidative stress, a trigger of hepatitis C and B virus-induced liver carcinogenesis. *Oncotarget.* **8**, 3895–3932.
- Plummer M., de Martel C., Vignat J., Ferlay J., Bray F., Franceschi S. (2016) Global burden of cancers attributable to infections in 2012: a synthetic analysis. *Lancet Glob. Health.* **4**, e609–e616.
- Jiang B., Xue M. (2015) Correlation of E6 and E7 levels in high-risk HPV16 type cervical lesions with CCL20 and Langerhans cells. *Genet. Mol. Res.* **14**, 10473–10481.
- de Martel C., Plummer M., Vignat J., Franceschi S. (2017) Worldwide burden of cancer attributable to HPV by site, country and HPV type. *Int. J. Cancer.* **141**, 664–670.
- Baecker A., Liu X., La Vecchia C., Zhang Z.F. (2018) Worldwide incidence of hepatocellular carcinoma cases attributable to major risk factors. *Eur. J. Cancer Prev.* **27**, 205–212.
- Thaker S.K., Ch'ng J., Christofk H.R. (2019) Viral hijacking of cellular metabolism. *BMC Biol.* **17**, 59.
- Allen C.N.S., Arjona S.P., Santerre M., Sawaya B.E. (2022) Hallmarks of metabolic reprogramming and their role in viral pathogenesis. *Viruses.* **14**(3), 602.
- Mikaeloff F., Svensson Akusjarvi S., Ikomey G.M., Krishnan S., Sperk M., Gupta S., Magdaleno G.D.V., Escos A., Lyonga E., Okomo M.C., Tagne C.T., Babu H., Lorson C.L., Vegvari A., Banerjee A.C., Kele J., Hanna L.E., Singh K., de Magalhaes J.P., Benfeitas R., Neogi U. (2022) Trans cohort metabolic reprogramming towards glutaminolysis in long-term successfully treated HIV-infection. *Commun. Biol.* **5**, 27.
- Gelpi M., Mikaeloff F., Knudsen A.D., Benfeitas R., Krishnan S., Svensson Akusjarvi S., Hogg J., Murray D.D., Ullum H., Neogi U., Nielsen S.D. (2021) The central role of the glutamate metabolism in long-term antiretroviral treated HIV-infected individuals with metabolic syndrome. *Aging (Albany N.Y.).* **13**, 22732–22751.
- Levy P., Bartosch B. (2016) Metabolic reprogramming: a hallmark of viral oncogenesis. *Oncogene.* **35**, 4155–4164.
- Alfarouk K.O. (2016) Tumor metabolism, cancer cell transporters, and microenvironmental resistance. *J. Enzyme Inhib. Med. Chem.* **31**, 859–866.
- Vander Heiden M.G., Cantley L.C., Thompson C.B. (2009) Understanding the Warburg effect: the metabolic requirements of cell proliferation. *Science.* **324**, 1029–1033.
- Levy P.L., Duponchel S., Eischeid H., Molle J., Michelet M., Diserens G., Vermathen M., Vermathen P., Dufour J.F., Dienes H.P., Steffen H.M., Odenthal M.,

- Zoulim F., Bartosch B. (2017) Hepatitis C virus infection triggers a tumor-like glutamine metabolism. *Hepatology*. **65**, 789–803.
24. Yu L., Chen X., Wang L., Chen S. (2018) Oncogenic virus-induced aerobic glycolysis and tumorigenesis. *J. Cancer*. **9**, 3699–3706.
 25. Su M.A., Huang Y.T., Chen I.T., Lee D.Y., Hsieh Y.C., Li C.Y., Ng T.H., Liang S.Y., Lin S.Y., Huang S.W., Chiang Y.A., Yu H.T., Khoo K.H., Chang G.D., Lo C.F., Wang H.C. (2014) An invertebrate Warburg effect: a shrimp virus achieves successful replication by altering the host metabolome via the PI3K-Akt-mTOR pathway. *PLoS Pathog.* **10**, e1004196.
 26. Chen I.T., Lee D.Y., Huang Y.T., Kou G.H., Wang H.C., Chang G.D., Lo C.F. (2016) Six hours after infection, the metabolic changes induced by WSSV neutralize the host's oxidative stress defenses. *Sci. Rep.* **6**, 27732.
 27. Franzetti M., Ricci E., Bonfanti P. (2019) The pattern of non-AIDS-defining cancers in the HIV population: epidemiology, risk factors and prognosis. A review. *Curr. HIV Res.* **17**(1), 1–12.
 28. Yarchoan R., Uldrick T.S. (2018) HIV-associated cancers and related diseases. *N. Engl. J. Med.* **378**, 1029–1041.
 29. Petkov S., Chiodi F. (2022) Impaired CD4⁺ T cell differentiation in HIV-1 infected patients receiving early anti-retroviral therapy. *Genomics*. **114**, 110367.
 30. Liu X., Lin L., Lu L., Li X., Han Y., Qiu Z., Li X., Li Y., Song X., Cao W., Li T. (2022) Comparative transcriptional analysis identified characteristic genes and patterns in HIV-infected immunological non-responders. *Front. Immunol.* **13**, 807890.
 31. Wilson E.M., Sereti I. (2013) Immune restoration after antiretroviral therapy: the pitfalls of hasty or incomplete repairs. *Immunol. Rev.* **254**, 343–354.
 32. Isaguliant M., Bayurova E., Avdoshina D., Kondrashova A., Chiodi F., Palefsky J.M. (2021) Oncogenic effects of HIV-1 proteins, mechanisms behind. *Cancers (Basel)*. **13**(2), 305.
 33. Bayurova E., Jansons J., Skrastina D., Smirnova O., Mezale D., Kostyusheva A., Kostyushev D., Petkov S., Podschwadt P., Valuev-Elliston V., Sasinovich S., Korolev S., Warholm P., Latanova A., Starodubova E., Tukhvatulin A., Latyshev O., Selimov R., Metalnikov P., Komarov A., Ivanova O., Gorodnischeva T., Kochetkov S., Gottikh M., Strumfa I., Ivanov A., Gordeychuk I., Isaguliant M. (2019) HIV-1 reverse transcriptase promotes tumor growth and metastasis formation via ROS-dependent upregulation of twist. *Oxid. Med. Cell Longev.* **2019**, 6016278.
 34. Golikov M.V., Karpenko I.L., Lipatova A.V., Ivanova O.N., Fedyakina I.T., Larichev V.F., Zakirova N.F., Leonova O.G., Popenko V.I., Bartosch B., Kochetkov S.N., Smirnova O.A., Ivanov A.V. (2021) Cultivation of cells in a physiological plasmax medium increases mitochondrial respiratory capacity and reduces replication levels of RNA viruses. *Antioxidants (Basel)*. **11**(1), 97.
 35. Marchetti P., Fovez Q., Germain N., Khamari R., Kluzza J. (2020) Mitochondrial spare respiratory capacity: mechanisms, regulation, and significance in non-transformed and cancer cells. *FASEB J.* **34**, 13106–13124.
 36. Zorov D.B., Vorobjev I.A., Popkov V.A., Babenko V.A., Zorova L.D., Pevzner I.B., Silachev D.N., Zorov S.D., Andrianova N.V., Plotnikov E.Y. (2019) Lessons from the discovery of mitochondrial fragmentation (fission): a review and update. *Cells*. **8**(2), 175.
 37. Djeungoue-Petga M.A., Lurette O., Jean S., Hamel-Cote G., Martin-Jimenez R., Bou M., Cannich A., Roy P., Hebert-Chatelain E. (2019) Intramitochondrial Src kinase links mitochondrial dysfunctions and aggressiveness of breast cancer cells. *Cell Death Dis.* **10**, 940.
 38. Fendt S.M., Frezza C., Erez A. (2020) Targeting metabolic plasticity and flexibility dynamics for cancer therapy. *Cancer Discov.* **10**, 1797–1807.
 39. Jang D.H., Greenwood J.C., Spyres M.B., Eckmann D.M. (2017) Measurement of mitochondrial respiration and motility in acute care: sepsis, trauma, and poisoning. *J. Intensive Care Med.* **32**, 86–94.
 40. Hill B.G., Dranka B.P., Zou L., Chatham J.C., Darley-Usmar V.M. (2009) Importance of the bioenergetic reserve capacity in response to cardiomyocyte stress induced by 4-hydroxynonenal. *Biochem. J.* **424**, 99–107.
 41. Knupp J., Arvan P., Chang A. (2019) Increased mitochondrial respiration promotes survival from endoplasmic reticulum stress. *Cell Death Differ.* **26**, 487–501.
 42. Kogure A., Naito Y., Yamamoto Y., Yashiro M., Kiyono T., Yanagihara K., Hirakawa K., Ochiya T. (2020) Cancer cells with high-metastatic potential promote a glycolytic shift in activated fibroblasts. *PLoS One*. **15**, e0234613.
 43. Fujita M., Imadome K., Somasundaram V., Kawaniishi M., Karasawa K., Wink D.A. (2020) Metabolic characterization of aggressive breast cancer cells exhibiting invasive phenotype: impact of non-cytotoxic doses of 2-DG on diminishing invasiveness. *BMC Cancer*. **20**, 929.
 44. Pulaski B.A., Ostrand-Rosenberg S. (2001) Mouse 4T1 breast tumor model. *Curr. Protoc. Immunol.* Chapter 20, Unit 20.2. <https://doi.org/10.1002/0471142735.im2002s39>
 45. Chirkut S. (2019) Breast cancer, human immunodeficiency virus and highly active antiretroviral treatment; implications for a high-rate seropositive region. *Oncol. Rev.* **13**, 376.
 46. Osellame L.D., Blacker T.S., Duchon M.R. (2012) Cellular and molecular mechanisms of mitochondrial function. *Best Pract. Res. Clin. Endocrinol. Metab.* **26**, 711–723.
 47. Picard M., Shirihai O.S., Gentil B.J., Burelle Y. (2013) Mitochondrial morphology transitions and functions: implications for retrograde signaling? *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* **304**, R393–R406.
 48. Vercellino I., Sazanov L.A. (2022) The assembly, regulation and function of the mitochondrial respiratory chain. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **23**, 141–161.
 49. Dustin C.M., Heppner D.E., Lin M.J., van der Vliet A. (2020) Redox regulation of tyrosine kinase signalling: more than meets the eye. *J. Biochem.* **167**, 151–163.

50. Kemble D.J., Sun G. (2009) Direct and specific inactivation of protein tyrosine kinases in the Src and FGFR families by reversible cysteine oxidation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **106**, 5070–5075.
51. Isagulians M., Smirnova O., Ivanov A.V., Kilpelainen A., Kuzmenko Y., Petkov S., Latanova A., Krotova O., Engstrom G., Karpov V., Kochetkov S., Wahren B., Starodubova E. (2013) Oxidative stress induced by HIV-1 reverse transcriptase modulates the enzyme's performance in gene immunization. *Hum. Vaccin. Immunother.* **9**, 2111–2119.
52. Ivanov A.V., Valuev-Elliston V.T., Ivanova O.N., Kochetkov S.N., Starodubova E.S., Bartosch B., Isagulians M.G. (2016) Oxidative stress during HIV infection: mechanisms and consequences. *Oxid. Med. Cell. Longev.* **2016**, 8910396.

EXPRESSION OF HIV-1 REVERSE TRANSCRIPTASE IN MURINE CANCER CELLS INCREASES MITOCHONDRIAL RESPIRATION

N. F. Zakirova¹, A. S. Kondrashova^{2, *}, M. V. Golikov¹, O. N. Ivanova¹, A. V. Ivanov¹, M. G. Isagulians^{1, 3, 4, 5}, and E. O. Bayurova^{2, 4}

¹ Engelhardt Institute of Molecular Biology, Russian Academy of Sciences, Moscow, 119991 Russia

² Chumakov Federal Scientific Center for Research and Development of Immunobiological Products (Polio Institute), Russian Academy of Sciences, Moscow, 108819 Russia

³ Peoples' Friendship University of Russia (RUDN University), Moscow, 117198 Russia

⁴ Gamaleya National Research Center for Epidemiology and Microbiology, Ministry of Health of the Russian Federation, Moscow, 123098 Russia

⁵ Riga Stradins University, Riga, LV-1007 Latvia

*e-mail: kondrashova_as@chumakovs.su

Changes in metabolic pathways are often associated with the development of a wide range of pathologies. Increased glycolysis under conditions of sufficient tissue oxygen supply and its dissociation from the Krebs cycle, known as aerobic glycolysis or the Warburg effect, which is a hallmark of many malignant neoplasms. Identification of specific metabolic shifts can characterize the metabolic programming of individual types of tumor cells, the stage of their transformation, and predict their metastatic potential. Viral infection can also alter the metabolism of cells to support the process of viral replication. Infection with the human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) is associated with an increased incidence of various cancers, and for some viral proteins a direct oncogenic effect has been demonstrated. In particular, we have shown that the expression of HIV-1 reverse transcriptase (RT) in 4T1 breast adenocarcinoma cells leads to an increase in the tumorigenic and metastatic potential of cells *in vitro* and *in vivo* by a mechanism associated with the ability of RT to induce reactive oxygen species (ROS) in cells. The aim of this work was to study the molecular mechanism of this process, namely the effect of HIV-1 RT on the key metabolic pathways associated with tumor progression: glycolysis and mitochondrial respiration. Expression of HIV-1 RT had no effect on the glycolysis process. At the same time, it led to an increase in mitochondrial respiration and the level of ATP synthesis in the cell, while not affecting the availability of substrates, carbon donors for the Krebs cycle, which excludes the effect of RT on the metabolic enzymes of cells. Increased mitochondrial respiration was associated with restoration of the mitochondrial network despite RT-induced reduction in mitochondrial mass. Increased mitochondrial respiration may increase cell motility, which explains their increased tumorigenicity and metastatic potential. These data are important for understanding the pathogenesis of HIV-1 infection, including the stimulation of the formation and spread of HIV-1 associated malignancies.

Keywords: HIV-1, reverse transcriptase, breast adenocarcinoma cells, glycolysis, mitochondrial respiration, metabolic enzymes, mitochondrial mass

УДК 557.2

ДОРМАНТНОСТЬ: ТУДА И ОБРАТНО

© 2022 г. Е. С. Пшенникова^а, *, А. С. Воронина^а^аИнститут биохимии им. А.Н. Баха Федерального исследовательского центра
“Фундаментальные основы биотехнологии” Российской академии наук, Москва, 119071 Россия

*e-mail: pshennikova57@mail.ru

Поступила в редакцию 11.02.2022 г.

После доработки 27.03.2022 г.

Принята к публикации 27.03.2022 г.

Сохранять жизнеспособность в неделящемся состоянии при минимальном метаболизме в неблагоприятных условиях способны многие клетки, например, зародышевые клетки, стволовые клетки взрослых организмов, клетки микроорганизмов. К сожалению, в состоянии покоя, или дормантности, могут находиться и микобактерии туберкулеза (при латентной форме болезни), и опухолевые клетки, способные сформировать вторичные опухоли — метастазы — в разных частях тела. Эти клетки устойчивы к терапии, уничтожающей активно делящиеся клетки, и к действию иммунной системы хозяина. Каскад реакций, обеспечивающих вход и выход из состояния дормантности, запускается активностью регуляторных факторов из ближайшего окружения в нишах, где скрываются такие клетки. Именно соотношение запрещающих и разрешающих сигналов диктует, стать ли клеткам дормантными или начать пролиферацию. Отличие процессов регуляции дормантности клеток в норме и при патологии состоит лишь в том, что патогены, микобактерии и опухолевые клетки, способны влиять на собственную судьбу, активно изменяя свое микроокружение. Некоторые механизмы этих процессов рассмотрены в нашем обзоре.

Ключевые слова: опухолевые клетки, *Mycobacterium tuberculosis*, дормантность, метастазы, мезенхимальные стволовые клетки, метастатические ниши

DOI: 10.31857/S0026898422050111

Онкологические заболевания до сих пор входят в группу лидеров по количеству вызываемых ими смертей. Объясняется это возможностью рецидива заболевания через месяцы, годы или даже десятилетия после постановки диагноза и удаления первичной опухоли. Именно развитие вторичной, метастатической, формы болезни препятствует эффективному лечению и остается причиной множества смертей [1]. Механизм метастазирования до сих пор недостаточно изучен.

Подобно онкологическим заболеваниям, туберкулез, вызываемый *Mycobacterium tuberculosis* (*Mtb*), до пандемии коронавирусной инфекции убивал больше людей, чем любые другие инфекционные болезни. Так, по данным Всемирной организации здравоохранения в 2020 году выявлено более 10 млн новых случаев заражения ту-

беркулезом и более 1.5 млн смертей от этого заболевания [2]. Туберкулез остается важнейшей проблемой здравоохранения в большей степени из-за значительного числа латентно инфицированных людей, у которых болезнь может рецидивировать в активной форме через месяцы или десятилетия после диагностирования [3].

Антибиотикотерапия, наиболее часто применяемая при туберкулезе, как и противоопухолевая химиотерапия и радиотерапия — направлены на уничтожение только быстро делящихся опухолевых клеток и микобактерий. Однако неделящиеся или медленно делящиеся дормантные (от латинского *dormant* — спать, дремать) клетки, находящиеся в состоянии покоя, могут выжить и вызвать рецидив заболевания.

ДОРМАНТНОСТЬ *Mycobacterium tuberculosis*

Бациллы *Mtb*, попавшие в альвеолы легких вместе с вдыхаемым воздухом, обитают в макрофагах, где они реплицируются, уклоняясь разными способами от защитных механизмов организма хозяина [4, 5].

Сокращения: МСК — мезенхимальные стволовые клетки; КМ — костный мозг; ЭМП — эпителиально-мезенхимальный переход; МЭП — мезенхимально-эпителиальный переход; ЦОК — циркулирующие опухолевые клетки; ВКМ — внеклеточный матрикс; ДОК — диссеминированные опухолевые клетки; ОСК — опухолевые стволовые клетки; ГСК — гемопоэтические стволовые клетки; ПМН — преметастатическая ниша; МН — метастатическая ниша; ПВН — периваскулярная ниша.

Определение числа культивируемых *Mtb*, выделенных из мокроты пациентов в течение 14 дней медикаментозного лечения, показало [6], что число *Mtb* быстро уменьшалось в первые два дня терапии, а затем скорость элиминации снижалась. Это наблюдение могло свидетельствовать о том, что значительная доля микобактерий сохраняется в менее восприимчивом к терапии (дормантном) физиологическом состоянии [7].

Известно, что макрофаги поглощают микобактерии с образованием фагосом, в которых наблюдается повышение кислотности, уровня активных форм кислорода и азота и недостаток питательных веществ. Низкие значения pH внутри фагосом, обусловленные работой протонных насосов, а также активные формы кислорода и азота, образованные фагоцитарными NADPH-оксидазой и NO-синтазой, способны разрушить бактериальные клетки. Процессы активации макрофагов при попадании бактерий контролируются иммунной системой хозяина, например, цитокином интерфероном-гамма. В то же время происходит замедление микробного метаболизма [8, 9]. Считалось, что появление дормантных форм *Mtb* обусловлено иммунным ответом хозяина, в результате чего формируются гранулемы. Гранулема представляет собой отдельное образование, состоящее первоначально из клеток врожденного иммунитета — инфицированных макрофагов и нейтрофилов. Далее привлекаются антиген-специфические Т-лимфоциты и активируются инфицированные макрофаги. Формирование гранул способствует диссеминации инфицированных макрофагов [10]. В результате *Mtb* распространяется из гибнущих макрофагов во вновь привлеченные. Отличительным признаком гранулемы служит центральное ядро, содержащее инфицированные макрофаги, окруженные пенстыми макрофагами, фагоцитами моноцитарного происхождения и Т-лимфоцитами. Предполагалось, что ядро — это ниша, где длительное время сохраняются дормантные бактерии при латентной форме инфекции [11]. Полагали, что, формируя гранулему, организм хозяина пытается локализовать инфекцию. Считалось, что эти очаги инфекции с неблагоприятными условиями способствуют индукции и длительному поддержанию дормантного состояния бактерий (годы и даже десятилетия) [12]. В настоящее время известно, что в формировании гранул активно участвуют и сами бактерии [11, 13]. В опытах по заражению зародышей *Danio* микобактериями *M. marinum* обнаружено, что бактериальный 6 кДа белок вирулентности ESAT-6 (early secretory antigenic target) стимулирует в эпителии продукцию матричной металлопротеиназы 9 (MMP-9), меняющей структуру внеклеточного матрикса, и привлечение макрофагов к месту инфекции [14].

Кроме того, бактерии активно привлекают мезенхимальные стволовые клетки (МСК) внутрь гранул, где они выполняют функцию подавления Т-клеточного иммунитета, продуцируя оксид азота, фактор некроза опухоли- α (TNF- α) и хемокин RANTES (regulated on activation, normal T cell expressed and secreted), кодируемый геном *CCL5* человека [4]. Обнаружено также, что инфицирование макрофагов приводило к остановке клеточного цикла микобактерий при переходе G₀/G₁. Таким образом, вероятно, микобактериям удастся избежать элиминации цитотоксическими Т-клетками [15]. Продукты микобактериального гена сигма-фактора SigH, регулятора инициации транскрипции, вероятно, играют существенную роль в моделировании иммунного ответа хозяина, влияя на процессы хемотаксиса и апоптоза. Показано, что продукт этого гена частично снижает экспрессию бета-хемокинов, основных хемотактантов клеток иммунной системы, к месту инфекции. Таким образом обеспечивается защита *Mtb*. Кроме того, известно, что индукция провоспалительных факторов при инфекции сопровождается активацией синтеза простагландинов циклооксигеназой 2, которая не только снижает внутриклеточную концентрацию проапоптогенной арахидоновой кислоты, но и нарушает процесс апоптоза, вызванный белком p53. Активация экспрессии циклооксигеназы сигма-фактором SigH препятствует апоптозу инфицированных клеток и способствует сохранению инфекции [16].

Ранее считали, что в легких неделящиеся бактерии выживают внутри областей гранул, содержащих МСК, с ограниченной доступностью для терапии. Позже обнаружили, что *Mtb* инфицируют сами МСК [17, 18]. Показано, что они могут длительно оставаться жизнеспособными в стволовых клетках костного мозга (КМ) человека *in vitro*. Кроме того, *Mtb* содержатся в стволовых клетках КМ мышей с дормантной туберкулезной инфекцией. И, наконец, жизнеспособные бактерии обнаружены в стволовых клетках КМ пациентов, успешно прошедших длительную лекарственную терапию. При этом МСК активно экспрессируют гены АТР-зависимых АВС-транспортёров, обеспечивая таким образом их лекарственную устойчивость [19]. Исследование влияния заражения *Mtb* на метаболизм МСК человека показало, что микобактерии индуцируют экспрессию маркеров покоя, факторов транскрипции FOXO3a (член семейства Forkhead box O3), NOTCH1 (входит в семейство трансмембранных белков), и SOX9 (sex determining region Y-box transcription factor 9), характерных для стволовых клеток, и ингибируют экспрессию маркеров прогрессии клеточного цикла. При этом в инфицированных макрофагах, напротив, повышена экспрессия маркеров пролиферации — киназы 2 S-фазы (SKP2) и

циклина A1 (CCNA1). Таким образом, при латентной инфекции *Mtb* находится в инфицированных МСК в дормантном состоянии [20].

Показано, что специфическое микроокружение инфицированных МСК человека *in vitro* способствует активации синтеза микобактериального белка Rv1734, вызывающего дормантность, и гомолога альфа-кристаллина HspX, ассоциированного с клеточной стенкой и ответственного за ее постепенное утолщение при переходе в дормантное нерепликативное состояние. Наблюдалось также накопление в МСК липидных телец. При этом обнаружено снижение экспрессии белка вирулентности ESAT-6. Интересно, что такие изменения происходят уже на ранних стадиях инфекции, как только бациллы попадут в МСК, и никогда не происходят в инфицированных макрофагах. Ранние эксперименты по индукции *in vitro* дормантности *Mtb* в макрофагах человека и дендритных клетках не увенчались успехом [21–23].

В норме МСК обладают способностью к самообновлению, продуцируют хемокины, цитокины, факторы роста для поддержания гомеостаза, заживления ран и подавления реакции воспаления [24, 25]. Известно, что МСК человека проявляют прямую и непрямую антимикробную активность против *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus* и *Streptococcus pneumoniae*, секретируя антимикробный пептид LL-37 [26]. Они действуют как супрессоры иммунного ответа Т-клеток, дендритных клеток и макрофагов, создавая таким образом микроокружение лекарственно-устойчивых *Mtb* [27]. Обнаружено, что заражение МСК микобактериями активирует продукцию ими экзосом – нановезикул диаметром 30–150 нм, образуемых многими клетками. Нановезикулы окружены двойным липидным слоем, они содержат различные биомолекулы, включая регуляторные белки, гликаны, липиды, РНК и ДНК, метаболиты [28, 29]. Экзосомы могут захватываться другими клетками, при этом их содержимое поглощается и влияет на фенотип клетки-реципиента, поэтому они считаются важными медиаторами межклеточной коммуникации. Экзосомы МСК захватываются макрофагами и индуцируют воспалительную реакцию и повышение экспрессии факторов TNF- α , RANTES и индуцибельной синтазы оксида азота (iNOS) [30].

Известно, что вирус иммунодефицита человека (ВИЧ-1) также может десятилетиями находиться в латентном состоянии, а затем реактивироваться. В связи с этим определен интерес представляет изучение механизма реактивации ВИЧ-1, индуцированной инфекцией *Mtb* [31]. Как показано ранее, обычно в этот механизм вовлечен стандартный набор регуляторных факторов – воспаление, процессинг комплекса гистосовместимости МНС-II, сигнальный путь Toll-

подобных рецепторов, экспрессия рецепторов хемокинов CXCR4/CCR5, активация регуляторов транскрипции с LTR ВИЧ. Однако при совместной инфекции экзосомы, секретируемые макрофагами, содержащими *Mtb*, реактивировали ВИЧ-1, индуцируя окислительный стресс. Протеомный анализ таких экзосом выявил хозяйские сигнальные молекулы, способные реактивировать ВИЧ-1 путем нарушения окислительно-восстановительного метаболизма с последующим развитием воспаления и иммунного ответа [31].

В настоящее время принято считать, что дормантный фенотип *Mtb* характеризуется следующими особенностями.

1. Невозможность реплицироваться. Это состояние определяется как “жизнеспособное, но некультивируемое”, или “нерастущее, но метаболически активное” [32]. Показано, что такое состояние обусловлено экспрессией многих микобактериальных генов, например, *relA*, кодирующей (p)ppGpp-синтазу, контролирует многие синтетические процессы, включая синтез АТР и GTP, репликацию ДНК и синтез белка [16].

2. Экспрессия генов дормантности. Известно, что геном *Mtb* содержит 4173 гена, более четверти из которых отвечают за вход и выход из дормантного состояния [3, 33]. Проведен протеомный анализ клеток *Mtb* в дормантном состоянии и при выходе из него [34]. Функциональные аспекты генов, ассоциированных с дормантностью *Mtb*, подробнее рассмотрены в обзоре [35]. Например, регулон *DosR* (Dormancy survival regulator) состоит из 48 генов, экспрессия которых активируется в грануле в условиях недостатка кислорода и NO-стресса и способствует переходу активно реплицирующихся бактерий в дормантное состояние, чтобы справиться с этими стрессами и обеспечить долгосрочное выживание в хозяине и реактивацию в благоприятных условиях [35]. Показано также, что отличительной особенностью клеток, находящихся в дормантном состоянии очень длительное время (8 мес.), является накопление ферментов, обеспечивающих защиту клеток от окислительного стресса (супероксиддисмутазы, каталазы-пероксидазы), ДНК-связывающих белков HupB/Rv2986, IniB/Rv0341 и шаперонов, препятствующих агрегации белков [36].

3. Изменения метаболизма. В основном, все изменения метаболизма связаны с угнетением клеточных процессов и, в итоге, с арестом клеточного цикла и деления. Однако вместе с этим активируется синтез ферментов, не свойственных обычному состоянию. Например, активируется глиоксилатный путь, позволяющий *Mtb* использовать липиды как единственный источник углерода; энергетический обмен клеток меняется в сторону уменьшения содержания внутриклеточного АТР и увеличения соотношения

NADH/NAD, описаны изменения в липидном метаболизме и обмене азота [37].

4. Изменения в морфологии клетки. Эти изменения обычно сопровождают функциональную реорганизацию нереплицирующихся бацилл и касаются размера, формы и ультраструктуры. Наиболее яркий пример таких изменений — споруляция некоторых грамположительных бактерий, которую считают истинно дормантным состоянием [38]. Известно, что *Mtb* к споруляции неспособны, однако описаны изменения формы дормантных бацилл, включая овоидность [39]. Обнаружены формы *Mtb* с измененным окрашиванием и содержащие липидные тельца. Показано, что недостаток питательных веществ и кислорода также индуцирует постепенный переход непатогенных *M. smegmatis* из палочковидной формы в овоидную [40]. Применение сканирующей электронной микроскопии позволило обнаружить изменение внешнего вида дормантных *Mtb* и значительное уменьшение их длины, а при восстановлении аэрации клетки начинали приобретать исходную морфологию [41].

5. Толерантность к лекарственным средствам. Многие молекулярные и клеточные механизмы толерантности окончательно не установлены. Однако известно, что МСК, в которых скрываются дормантные формы *Mtb*, экспрессируют АВС-транспортер, что препятствует накоплению лекарственных препаратов в клетке [19]. Известно также, что в дормантных клетках не экспрессируется каталаза-пероксидаза, необходимая для активации действия протivotуберкулезного антибиотика изо니아зида [42]. Кроме того, возможно, что утолщение клеточной стенки, наблюдаемое у *Mtb* в состоянии дормантности в МСК, сопровождается структурными изменениями, также обуславливающими антибиотикорезистентность [23].

6. Обратимость. При моделировании состояния дормантности *Mtb in vitro* показано, что в этом процессе играют роль многие факторы — снижение содержания кислорода, повышение содержания оксида азота и оксида углерода, голодание по азоту, дефицит или избыток ионов металлов, дефицит калия, низкие значения рН, аскорбиновая кислота, дефицит фосфатов, липиды в качестве единственного источника углерода, антибактериальные препараты [5]. Исследование физиологии и общих транскриптомных профилей *Mtb* во время реактивации из нерепликативного состояния, вызванного гипоксией, выявило существование лаг-фазы, в ходе которой наблюдается восстановление физиологии и метаболизма, предшествующее началу клеточного деления. Показано, что при реэрации происходит репрессия регулонов, ассоциированных с дормантностью, включая *DosR*, *MprA*, *SigH*, *SigE* и *CigR*, и метаболических путей утилизации липидов. Идентифицированы регулоны и мета-

болические пути, экспрессия которых возрастает при выходе из нерепликативного состояния, включая транспорт ионов металлов, репарацию и рекомбинацию ДНК, синтез основных компонентов клеточной стенки [43]. Известно, что реактивации дормантных форм *Mtb* способствуют также факторы, снижающие иммунитет хозяина, — заражение ВИЧ, трансплантация органов с применением иммуносупрессоров, силикоз, тесный контакт с больными открытой формой туберкулеза, применение блокаторов провоспалительного TNF- α , хроническая почечная недостаточность и гемодиализ, прием кортикостероидов, табакокурение, а также нарушение обмена веществ — сахарный диабет, ревматоидный артрит [44].

ДОРМАНТНОСТЬ ОПУХОЛЕВЫХ КЛЕТОК

Понятие дормантности, или состояния покоя, опухоли предложено в качестве модели, в которой наблюдается баланс между увеличением числа клеток в опухоли в результате пролиферации и уменьшением их числа в результате гибели [45, 46].

Другой тип покоя опухоли — это дормантность отдельных рассеянных, или диссеминированных, ее клеток, вызываемая сигналами из окружения этих клеток, внеклеточного матрикса метастатических ниш, а также гипоксией и стрессом разной природы, запускающими программы остановки роста [47]. Клеточная дормантность характеризуется минимумом пролиферации, минимумом гибели и обратимостью. Состояние покоя (дормантный статус) наблюдается у стволовых клеток различных тканей растений и животных, и опухолевых стволовых клеток [48]. В настоящее время установлена непосредственная связь между рецидивами опухоли в форме метастазов и дормантностью опухолевых клеток [49].

В недавно опубликованном обзоре [50] кратко изложена история изучения дормантности опухолевых клеток с первого века нашей эры. В 2019 году был описан транскриптом дормантной клетки миеломы человека [51]. Приведена временная шкала, демонстрирующая развитие концепций покоя отдельных опухолевых клеток и покоя целой опухоли. Представление о том, что рак может рецидивировать, появилось уже в первом веке, когда греческий/римский философ Цельс (Кельс) впервые обратил внимание на то, что “после удаления опухоли, даже когда шрам уже сформировался, болезнь может возвращаться и вызывать смерть” [50]. Но лишь в 1934 году Rupert Willis отметил, что метастазы, найденные у пациентов без рецидивов в месте удаленной опухоли, указывают на то, что “опухолевые клетки, должно быть, дремали в тканях, в которых они были остановлены”, тогда же был введен термин дормантность, или покой [50].

Одним из убедительных доказательств того, что дормантные опухолевые клетки могут вызывать рецидив болезни после длительного периода покоя, служат случаи обнаружения опухолей у пациентов после трансплантации им донорских органов. Такая случайная передача опухолевых клеток через трансплантаты, взятые у, казалось бы, здоровых доноров, впервые описана при пересадке почки, когда у пациента обнаружили плоскоклеточный рак почки через 8 мес. после операции. Позже выяснилось, что донор страдал раком легких. В другом исследовании у донора сердца после смерти обнаружили опухоль предстательной железы, а через 10 мес. после трансплантации у реципиента диагностировали множественные метастазы в позвоночнике, крестцовой области и ребрах. В препаратах биопсии ребра (но не предстательной железы) реципиента гистохимическим методом с использованием антител против антигенов простаты обнаружены опухолевые клетки, характерные для метастазов, сформировавшихся из клеток опухоли предстательной железы [46, 52, 53].

СРАВНЕНИЕ ЭМБРИОНАЛЬНОЙ ДИАПАУЗЫ И ДОРМАНТНЫХ ОПУХОЛЕВЫХ КЛЕТОК

Покой опухолевых клеток и клеток *Mtb* не относится к уникальным явлениям. В этом, по-видимому, задействованы универсальные механизмы дормантности эмбриональных и стволовых клеток взрослых растений и животных [47, 54]. Например, в недавнем обзоре приведены современные представления о том, как сигналы окружающей среды (свет, температура, содержание нитратов) контролируют дормантность зародышевых клеток семян растений, изменяя уровни гормонов [55]. Регуляторные геновые сети, ответственные за дормантность стволовых клеток растений, рассмотрены и в нашем обзоре [56]. В нормальном эмбриональном развитии животных может существовать период покоя. У млекопитающих этот период называется эмбриональной диапаузой, у нематоды *Caenorhabditis elegans* – стадией дауэровской личинки, активация этого периода позволяет сохранить потомство при неблагоприятных внешних условиях [57–59]. Показано, что *C. elegans*, рыбы фундулы и даже мыши способны активировать механизмы диапаузы [60, 61]. Так, обнаружено, что в условиях стресса, вызванного кислородным голоданием, большинство клеток, выделенных из зародышей рыбы *Austrofundulus limnaeus*, остановлены на стадии G_1/G_0 клеточного цикла [60]. Профили экспрессии генов в мышечных эмбрионах в состоянии диапаузы выявляют активацию примерно 100 генов. Активация экспрессии некоторых из этих генов обнаруживается также и в дормантных опухолевых клетках

[58]. Например, в зародышевых клетках в диапаузе и в дормантных опухолевых клетках выявлена специфическая регуляция ингибиторов клеточного цикла и факторов ремоделирования хроматина. Показано, что переход бластоцист (зародышей млекопитающих на предимплантационной стадии) в состояние покоя требует поддержания экспрессии генов плюрипотентности и снижения уровня протоонкогена *c-Myc*, что связывает дормантные опухолевые клетки с дормантными бластоцистами. Полагают, что основная роль ДНК-связывающих факторов семейства *Myc* заключается не в поддержании плюрипотентности как таковой (в частности, эмбриональных стволовых клеток мыши), а в подавлении ранних стадий дифференцировки [59]. Экспрессия основных маркеров плюрипотентности Oct4 (octamer-binding transcription factor 4) и Nanog (названный в честь мифологической кельтской страны вечно молодых “*Tír na nÓg*”) в ходе дифференцировки постепенно снижается. И, по-видимому, на начальных стадиях дифференцировки эти факторы плюрипотентности коэкспрессируются с маркерами начальных стадий дифференцировки. Состояние покоя дормантных клеток, активно экспрессирующих факторы NANOG, OCT4, и SOX2 (SRX – sex determining region Y-box 2), совпадает с низким уровнем экспрессии *c-Myc* и общим снижением экспрессии генов клеточного цикла – мишеней *c-Myc* [62, 63]. Непосредственное микроокружение, с которым контактируют бластоцисты при имплантации, также может провоцировать гормональную реактивацию диапаузных клеток. Так, экспрессия гепаринсвязывающего EGF-подобного фактора роста HB-EGF в диапаузных зародышах была снижена, если же она повышалась, то происходило установление связи матка–зародыш, что способствовало имплантации и росту зародыша [58]. Интересно, что эмбриональную диапаузу, как эволюционно консервативное явление, можно вызвать у недиапаузных млекопитающих, например, у овец [61].

При использовании трехмерных культур *in vivo* [64] в некоторых опухолевых клетках, выживших после химиотерапии, обнаружена обратимая программа транскрипции, наблюдаемая в клетках зародышей в состоянии эмбриональной диапаузы, связанная с супрессией факторов *Myc*. Такие клетки биосинтетически и пролиферативно неактивны. При этом индуцированная активация *Myc*, напротив, усиливала действенность химиотерапии [64].

Диапаузоподобное состояние клеток опухолей молочной железы и колоректальных опухолей определяется снижением активностей mTOR (mammalian target of rapamycin), *Myc* и активации факторов аутофагии. Однако углубленный транскриптомный анализ показал, что состояние покоя опухолевых клеток отличается от диапаузы зароды-

шей, напоминая скорее покой эмбриональных стволовых клеток [65–67].

СРАВНЕНИЕ ЭМБРИОНАЛЬНЫХ И ОПУХОЛЕВЫХ КЛЕТОК

В процессе эмбрионального развития многие клетки образуются далеко от места их дальнейшего расположения и функционирования, и должны преодолевать большие расстояния. Чтобы начать движение эмбриональные эпителиальные клетки претерпевают эпителиально-мезенхимальный переход (ЭМП), обуславливающий нарушение межклеточных контактов и мобильность. Клеткам, прибывшим на место назначения, необходим обратный мезенхимально-эпителиальный переход (МЭП), чтобы размножиться и дифференцироваться в клетки определенных тканей [68, 69]. Наиболее изучены перемещения клеток нервного гребня [70]. Лучшим доказательством осуществления ЭМП в опухолевых клетках служит факт отслаивания отдельных клеток от первичной опухоли и то, что циркулирующие и диссеминированные опухолевые клетки обнаруживают признаки ЭМП и высокую степень эпителиально-мезенхимальной пластичности [71, 72].

Однако ЭМП не подразумевает переход по принципу все или ничего. Частичный ЭМП обнаружен при гастрюляции *Drosophila* и при ранней миграции групп клеток нервного гребня амфибий и рыб), когда клетки имеют черты и эпителиальных, и мезенхимальных клеток. В таких клетках уже запущена программа ЭМП — снижается транскрипция белка клеточной адгезии E-кадгерина, теряется апикально-базальная полярность, но клетки сохраняют контакты друг с другом и мигрируют группами. Показано, что опухолевые клетки с переходным фенотипом наиболее агрессивны [73, 74]. Такой гибридный фенотип позволяет опухолевым клеткам оторваться от первичной опухоли и быстро колонизировать новые области. Несмотря на то, что ЭМП в эмбриогенезе и при патологии имеют много общего, очевидны и различия. Существует классификация ЭМП. ЭМП типа 1 свойственен эмбриогенезу; типа 2 — заживлению ран, регенерации тканей и фиброзу органов; тип 3 характерен для онкогенеза. Эмбриональный ЭМП подразумевает переход эпителий—мезенхима, но не вызывает у зародышей воспалительной реакции, типичной для типов 2 и 3. При развитии опухоли ее клетки претерпевают ЭМП типа 3, который, помимо инвазивности и мобильности, обеспечивает проникновение отделившихся клеток в лимфатические и кровеносные сосуды и обратный выход. Эти явления интра- и экстравазации не наблюдаются ни при фиброзе, ни при миграциях эмбриональных клеток.

Интересно, что метастазы обычно имеют эпителиальный фенотип, и, следовательно, в разви-

тии опухоли важна эпителиально-мезенхимальная пластичность, иными словами — реверсия ЭМП, впервые предложенная [75] и обнаруженная при изучении эмбрионального развития [76].

Как и в зародышах, МЭП в опухолевых клетках совпадает со снижением экспрессии факторов транскрипции ЭМП. МЭП заключается не только в реверсии к эпителиальному фенотипу, но и в увеличении пролиферации, важной для роста и зародыша, и вторичной опухоли [68, 69, 77].

ЦИРКУЛИРУЮЩИЕ ОПУХОЛЕВЫЕ КЛЕТКИ

В растущих опухолях создаются условия нехватки кислорода и питательных веществ. Предполагается, что под действием этих факторов происходит формирование и отбор субпопуляции агрессивных инвазивных клеток [78–80]. В этих клетках быстро перестраивается метаболизм, они начинают использовать альтернативные источники энергии, такие как остатки некротизированных клеток или их липиды путем макропиноцитоза [81]. Хронический стресс приводит к трансформации доброкачественных опухолей с неинвазивными клетками в злокачественные [69]. В результате, в некоторых опухолевых клетках возникают генетические [82, 83] и эпигенетические изменения, делающие возможной миграцию и инвазию клеток в кровеносную и лимфатическую системы [79]. В этих клетках происходит процесс ЭМП, который характеризуется потерей межклеточных контактов и апикально-базальной полярности и приобретением свойств подвижности и инвазивности. Эти изменения сопровождаются радикальными изменениями в поведении таких клеток, обусловленными активацией экспрессии маркеров ЭМП — транскрипционных факторов разных семейств, включая SNAIL, TWIST, ZEB [68, 69, 77].

Отслоение опухолевых клеток и их диссеминация в лимфоузлы и печень может произойти и на ранних стадиях развития первичной опухоли, до ее резекции или даже обнаружения [74].

Так или иначе, клетки отрываются от первичной опухоли, внедряются в базальную мембрану, мигрируют к кровеносным сосудам, проникают внутрь и циркулируют в кровотоке, пока не достигнут пункта назначения, где могут образовать вторичные опухоли — метастазы [79, 85]. Хотя все клетки, в которых произошел ЭМП, обладают повышенной инвазивностью и миграционной активностью, однако выжить в кровотоке или лимфотоке смогут совсем не все они, а лишь небольшая специфическая субпопуляция — циркулирующие опухолевые клетки (ЦОК). ЦОК обладают устойчивостью к химио- и радиотерапии, обусловленной накоплением соматических мутаций, приводящих к нечувствительности к сигналам

программируемой гибели (аноикису), характерной для отделившихся от подложки нормальных клеток [86]. Аноикис – форма программируемой гибели клеток, не прикрепленных к внеклеточному матриксу (ВКМ) и соседним клеткам. Фактор PHD2 (или HIF-PH2 – hypoxia-inducible factor prolyl hydroxylase 2) – молекула, чувствительная к кислороду, которая в нормальных условиях ингибирует фактор HIF (hypoxia inducible factor). В условиях гипоксии в опухоли гидроксирование и деградация HIF невозможны, его быстрое накопление приводит к развитию адаптивного ответа, когда клетки становятся способными ремоделировать свой метаболизм, менять pH микроокружения и активировать экспрессию фактора роста эндотелия сосудов (VEGF) [79]. HIF активирует экспрессию фактора TWIST, инициирует ЭМП и экспрессию фактора SNAI1, что приводит к потере эпителиальных маркеров – E-кадгерина, молекул адгезии эпителиальных клеток (EPCAM) и обретению маркеров мезенхимы – виментина и N-кадгерина [69]. Далее клетки преодолевают базальную мембрану, попадают в кровеносные сосуды и становятся ЦОК.

Следует отметить, что подобная ситуация реализуется и при отслоении от нейроэпителиа клеток нервного гребня зародышей позвоночных. При этом клетки претерпевают ЭМП, теряют белки клеточной адгезии, что позволяет им начать миграцию [70, 87, 88].

Чтобы покинуть сосуды и занять новые ниши для колонизации и образования метастазов, ЦОК теряют мезенхимные черты и претерпевают обратный переход, МЭП. Предложены две модели, объясняющие, каким образом происходит процесс колонизации. В “ЭМП/МЭП-модели” происходит изменение фенотипа одиночных ЦОК и восстановление их эпителиальных свойств в месте колонизации. В “модели коллективной миграции” циркулирующие клетки передвигаются в больших кластерах с разной степенью ЭМП. В таких кластерах можно обнаружить не только эпителиальные, но и полностью мезенхимные клетки и клетки с гибридным фенотипом. В принципе, обе эти модели могут быть верными [73, 79].

ЦОК находятся в кровотоке только 1–2 дня, большинство из них гибнет. Показано, что в перемещениях ЦОК определенную роль играют клетки иммунной системы – привлеченные факторами роста и цитокинами лейкоциты, нейтрофилы и макрофаги. Тромбоциты во многом способствуют выживанию ЦОК в крови. Их прометастатический эффект проявляется на физическом и молекулярном уровнях. Физически тромбоциты быстро облепляют ЦОК в кровяном русле и защищают от механических повреждений. Опухолевые клетки связывают белки адгезии тромбоцитов (фибринектин и фактор Виллебранда) поверхностными

интегринами, вызывая их слипание. Кроме того, тромбоциты усиливают адгезию к эндотелию сосудов с помощью поверхностных молекул селективных. Тромбоциты также обеспечивают защиту от иммунной системы. А именно, выделяемый ими фактор TGF- β (transforming growth factor- β), инактивирует естественные киллерные клетки (НК-клетки), снижая экспрессию рецептора антигенов NKG2-D. Действие иммунной системы ослабляется еще и тем, что молекулы комплекса гистосовместимости переносятся с поверхности гранулированных тромбоцитов на ЦОК, обеспечивая им тромбоцитарную идентичность и дезориентируя НК-клетки [78].

КЛАСТЕРЫ ЦИРКУЛИРУЮЩИХ ОПУХОЛЕВЫХ КЛЕТОК

В крови пациентов обнаруживаются не только отдельные ЦОК, но и их кластеры [78], которые встречаются реже и могут содержать от двух до 50 клеток. Более крупные кластеры, названные опухолевыми микроэмболиями, обнаружены при опухолях легких и молочной железы [89, 90].

Показано, что в кластерах ЦОК наблюдается сдвиг в метаболизме, который придает им черты стволовых клеток, а при выращивании *in vitro* они образуют сфероиды [79]. Это обусловлено повышенной секрецией плакоглобина и трансмембранного гликопротеина CD44, защищающего стволовые опухолевые клетки (ОСК). “Выключение” гена плакоглобина снижало количество метастазов у мышей с опухолями молочной железы в 30–40 раз. Вероятность образования метастазов этими клетками повышалась в результате сверхэкспрессии кератина-14 [91]. Кроме того, сайты связывания факторов транскрипции OCT4, NANOG, SOX2 и SIN3A, характерных для стволовых клеток, в клетках кластеров гиперметилированы, что характерно для эмбриональных стволовых клеток [92].

Крупные кластеры могут проходить по микроканалам диаметром 50–300 мкм [93]. Оказалось, что они способны распрямляться, нарушая межклеточные связи, становясь цепочкой клеток, которая может протиснуться в капилляры, а попав на место назначения, вновь сформировать кластеры. Морфологические изменения при этом затрагивают и сами клетки. Во время сжатия клеток ядра могут деформироваться, теряя круглую форму и становясь эллипсоидными. По-видимому, именно эти свойства обеспечивают кластерам ЦОК высокий метастатический потенциал [94].

Таким образом, очевидно, что ЦОК должны рассматриваться не как единая общая популяция клеток, а как весьма гетерогенная субпопуляция. Индивидуальные ЦОК, кластеры циркулирующих клеток и циркулирующие клетки со свой-

ствами стволовых [94] — все это члены одного семейства агрессивных клеток, производных первичной опухоли [95].

Кластеры ЦОК могут застрять в мелких капиллярах, образуя небольшие тромбы. Благодаря этому активируется фибронектин, который взаимодействует с интегринами опухолевых клеток [96]. Резидентные клетки также взаимодействуют с интегринами ЦОК и активируют экспрессию гена *SI00*, регулирующего фосфорилирование белков, клеточный рост, дифференцировку и воспаление. Экспрессия этого гена играет важную роль в динамике цитоскелета, подготовке преметастатических ниш и вызывает закрепление ЦОК в метастатических нишах [78, 79, 97].

ДИССЕМИНИРОВАННЫЕ ОПУХОЛЕВЫЕ КЛЕТКИ

ЦОК могут покинуть кровяное русло в любом месте, однако установлено, что выжить и в дальнейшем начать пролиферацию они могут лишь в определенном органе, а в каком именно, зависит от происхождения и гистологического подтипа первичной опухоли [98, 99]. Известно, что только одна из 40 диссеминированных опухолевых клеток (ДОК) формирует микрометастазы, и только один из 100 микрометастазов прогрессирует в макроскопические опухоли [48, 50, 100]. Симптомы метастатических поражений могут проявляться через годы или десятилетия после удаления первичной опухоли. Эти клинические наблюдения говорят о том, что ДОК не всегда тотчас же начинают делиться, они могут находиться в спящем (дормантном) состоянии. Дормантные ДОК переживают сеансы химиотерапии, активно используя консервативные механизмы адаптации и выживания, действующие в эмбриональном развитии и во взрослых тканях [48, 54, 101].

Интересна способность дормантных клеток замедлять собственный метаболизм. Условия, в которых находятся ДОК, описаны как гипоксия, закисление и низкий уровень глюкозы [102]. Опухолевые клетки при быстром делении используют гликолиз для производства энергии даже при достаточном для работы митохондрий количестве кислорода. Это явление названо эффектом Варбурга [103]. Закисление среды блокирует гликолиз, метаболизм при этом перестраивается на окисление жирных кислот и замедляется, что приводит к остановке роста и позволяет пережить неблагоприятные условия.

ОПУХОЛЕВЫЕ СТВОЛОВЫЕ КЛЕТКИ

Концепция опухолевых стволовых клеток (ОСК) сформировалась на основании серии исследований тератокарцином, позволивших предположить, что раковые опухоли — это “смесь злокаче-

ственных стволовых клеток с выраженной способностью к пролиферации и ограниченной способностью к дифференцировке и дифференцированного, возможно доброкачественного, потомства этих злокачественных клеток” [104].

Стволовые клетки — это клетки, обладающие потенциалом к самообновлению и дифференцировке в различные типы клеток [105]. Способность к самообновлению объясняется экспрессией в стволовых клетках фермента теломеразы, не позволяющей укорачиваться теломерам при делении клеток и обуславливающей возможность бесконечной пролиферации [106]. Считалось, что, если эмбриональные стволовые клетки могут дифференцироваться в любые клетки взрослого организма, то стволовые клетки взрослых организмов могут давать начало и замещать полностью лишь дифференцированные клетки ткани, в которой они находятся, и обеспечивают таким образом поддержание структуры тканей и органов на протяжении всей жизни [107]. Эта модель одностороннего развития от плюрипотентного состояния к полной дифференцировке была оспорена. Предположили, что отдельные стволовые клетки при определенных условиях могут обрести фенотип, отличный от клеток ткани, в которой они располагались; более того, взрослые клетки могут дедифференцироваться в стволовые и давать начало клеткам различных тканей. Эта гипотеза подтверждена результатами, полученными Takahashi и Yamanaka [108], показавшими, что взрослые дифференцированные клетки могут быть репрограммированы в индуцированные плюрипотентные стволовые клетки, способные дифференцироваться в любые эндо-, экто- и мезодермальные клеточные линии. Такое репрограммирование стало возможным в результате сверхэкспрессии в дифференцированных клетках генов, ассоциированных со стволовыми клетками, известных как факторы Yamanaka: *c-MYC*, *Klf4*-подобный фактор 4 (*KLF4*), *Sox2* и *Oct-3/4* [109, 110]. Эти результаты подтвердили феномен дедифференцировки и транsdифференцировки, лежащий в основе современной теории ОСК. Впервые ОСК получили от больных острым миелоидным лейкозом в 1997 году [111]. Предполагается, что они образуются либо из МСК, расположенных в тканях взрослых организмов, либо из дифференцированных клеток, репрограммированных в плюрипотентные в процессе дедифференцировки. Нормальные стволовые клетки и ОСК обладают схожими свойствами, такими как способность к самообновлению, неограниченному росту, инвазивность и блок дифференцировки [112]. Все это позволяет ОСК иницировать и поддерживать рост опухолей. Факторы *SOX2*, *OCT4* и *NANOG* составляют основную регуляторную цепь, которая обеспечивает поддержание стволовыми клетками способности к самообновлению и плюрипотентность

[110]. Показано, что ОСК высоко пластичны, способны менять свой фенотипический и функциональный облик при изменениях микроокружения опухоли, вызванных лучевой терапией и химиотерапией.

Следует отметить, что поддержание свойств стволовых клеток и старение клеток регулируются пересекающимися сигнальными путями [113]. Ключевые сигнальные молекулы, регулирующие старение клеток, ингибиторы циклинзависимых киназ p16 (он же Ink4a, или Arf) и p21(Cip1) и супрессор опухолевого роста p53 (он же Trp53) играют важную роль и в поддержании клеток в состоянии стволовых [114]. Например, вызывающие старение p53, p16 и компонент активных центров Suv39h1 препятствуют переходу дифференцированных нормальных клеток в индуцированные плюрипотентные. Недавно показали, что стареющие клетки секретируют ингибитор циклинзависимой киназы p21, которая не только способствует остановке деления стареющих клеток, но также является ранним сигналом, запускающим иммунный надзор [115].

Процесс старения также может непосредственно способствовать пластичности ОСК, активируя экспрессию генов, характерных для стволовых клеток, в нестволовых опухолевых клетках [116]. Во многих типах опухолей ОСК претерпевают ЭМП, что приводит к формированию метастазов.

Часто считают, что ОСК и дормантные ДОК это одно и то же [50]. Вероятно, ДОК объединяют в себе популяции стволовых и не стволовых опухолевых клеток [117]. Действительно, анализ единичных клеток позволил обнаружить большую степень гетерогенности ДОК, включая группы стареющих, покоящихся и активно пролиферирующих клеток [118].

ОСК по механизмам регуляции поведения очень похожи на стволовые клетки: гемопоэтические, мышечные, нервные и клетки волосяных фолликул. Они используют схожие программы остановки роста, плюрипотентности и эпигенетической пластичности [48]. Показано, что активация путей mTOR способна увеличивать пул ОСК среди ДОК в метастатической нише (МН) костного мозга, способствуя высвобождению остеобластами фактора GAS6 (growth arrest specific 6) [119]. Обнаружено, что рост соотношения сигналов p38-MAPK (mitogen-activated protein kinase) к ERK (extracellular signal-regulated kinase) — MAPK индуцирует дормантность ДОК различных типов опухолей [120] и дормантность ОСК предстательной железы [121].

Показано также, что сигнальные пути Notch и Wntless (Wnt), осуществляющие контроль пула ОСК и баланс между покоем и пролиферацией дормантных ДОК, могут активировать рост метастазов, производных различных солидных опухо-

лей [46, 48, 100]. Очевидно, эти пути активируют клеточный цикл посредством протоонкогена c-Myc, тогда как их блокирование вызывает состояние покоя ОСК и дормантность опухоли. c-Myc также активирует экспрессию Bmi-1 (polycomb repressor complex 1 component Bmi-1), что регулирует способность к самообновлению стволовых клеток опухоли молочной железы и коррелирует с появлением рецидивов [122]. Другим примером сходства дормантных ДОК и ОСК служит каскад интерлейкина-6 (IL-6)—лейкоз-ингибирующего фактора (LIF)—рецептора LIF (LIFR), необходимый для поддержания и дормантности, и стволовых качеств ДОК опухоли молочной железы в КМ. И, наконец, механические свойства ВКМ и процесс ЭМП существенны для обретения стволовых качеств опухолевыми клетками и их метастатического роста [123]. Так, фактор ZEB1, ключевой регулятор ЭМП, обуславливающий ответ клеток на стимулы, идущие от микроокружения, такие как местное воспаление, и TGF- β , активируют программу транскрипции, выводящую ДОК из состояния дормантности, придавая им свойства стволовых и обеспечивая возможность пролиферации [124].

ПРЕМЕТАСТАТИЧЕСКИЕ НИШИ

В отличие от первичной опухоли, где опухолевые клетки составляют большинство, ДОК попадают в чуждую агрессивную среду. На этом основана известная гипотеза “о семенах и почве”, предложенная в 1889 году [125], согласно которой ДОК по аналогии с семенами могут прорасти только там, где имеется благоприятная почва. Эта классическая концепция подчеркивает важность для выживания ДОК не только собственных свойств ДОК (семян), но и свойств внешней среды (почвы). Понятие “ниши” (от французского *niche* или немецкого *Nische* — гнездо) впервые использовали в 1978 г. [126] при описании бессмертности гемопоэтических стволовых клеток (ГСК): “стволовая клетка должна рассматриваться в связи с окружающими клетками, которые определяют ее поведение, и эта ниша играет активную роль в удерживании стволовой клетки от взросления и пролиферации”. Согласно этой концепции, клеточные ниши определены как динамичные экосистемы, где определенные типы клеток взаимодействуют друг с другом, выполняя определенные функции. В случае с нишей ГСК, эта функция — поддержание свойств стволовых клеток. Действительно, показано, что злокачественный фенотип опухолевых клеток может быть обратимым и зависимым от их микроокружения [127].

Еще до распространения ДОК факторы, определяемые первичной опухолью, обеспечивают привлечение клеток иммунной системы в области, где они меняют условия таким образом, что в

результате формируется подготовленная к заселению ДОК преметастатическая ниша (ПМН) [128, 129]. А именно, подготавливается иммуносупрессорное микроокружение, состоящее из миелоидных супрессорных клеток, регуляторных Т-клеток (Treg), макрофагов, ассоциированных с опухолью (TAM), и нейтрофилов, ассоциированных с опухолью, не препятствующее колонизации ДОК [130–133]. Одним из таких факторов могут быть системно распространяющиеся экзосомы [134]. Установлено, что экспрессирующие VEGFR1 (рецептор 1 фактора роста сосудистого эндотелия) клетки, происходящие из КМ, поселялись в легких до “прибытия” опухолевых клеток. Эти клетки взаимодействуют со стромой и формируют сайты для клеток будущих метастазов [135]. Экзосомы, продуцируемые первичной опухолью, служат ключевыми медиаторами этого процесса. А именно, захваченные клетками КМ экзосомы меланомы, содержащие протонкоген *c-Met* (тирозиновую протеинкиназу), обеспечивали их инфильтрацию в легкие, где они участвовали в формировании ПМН, повышая проницаемость капилляров и способствуя процессу метастазирования [134]. Обнаружено, что помимо привлечения иммунных клеток в легкие и провоцирования повышенной проницаемости капилляров, экзосомы клеток опухоли молочной железы и меланомы, но не клеток эпителия легких, моделируют резидентные легочные фибробласты, индуцируя экспрессию гена *S100* и, как следствие, пролиферацию и миграцию [136, 137].

Несмотря на то что концепция органотропизма (“семена и почва”), описывающая склонность определенных опухолей формировать метастазы в определенных органах, предложена более 120 лет назад [125], механизм этого явления не установлен. Известно, что экзосомы опухолевого происхождения, содержащие определенные интегрин, а именно $\alpha\beta 1$, $\alpha\beta 4$, $\alpha\beta 5$, и $\alpha\beta 3$, ассоциированные с молекулами межклеточного матрикса ламинином и фибронектином, и клетками определенного типа в органах-мишенях, частично определяют положение ПМН в легких, печени и мозге [136]. Кроме того, молекулы адгезии и другие компоненты на поверхности экзосом также могут определять органотропизм ДОК различных опухолей. Именно изучение роли экзосом показало, что не все ниши одинаковы – свойства ПМН легких, кости, печени уникальны. Содержимое экзосом различных типов клеток и их вклад в формирование ПМН и органоспецифических метастазов обсуждается в обзоре [138].

Метастазы в печени встречаются чаще, чем первичные опухоли, они характерны для многих видов опухолей, особенно желудочно-кишечного тракта, молочной железы, легких и поджелудочной железы. Показано, что экзосомы, продуцируемые клетками опухоли поджелудочной железы,

экспрессирующей интегрин $\alpha\beta 5$, несущие фактор MIF (ингибирующий миграцию макрофагов), индуцируют секрецию фактора TGF- β клетками Купфера, что приводило к синтезу фибронектина звездчатыми клетками печени [139]. Кроме того, в легких малые ядерные РНК из экзосом активируют экспрессию металлопротеиназы-9 (MMP9), ремоделирующей ВКМ в месте будущей ниши, и фибронектина, что способствует привлечению нейтрофилов [136, 137].

Если при метастазировании в легкие и печень экзосомы влияют на иммунные клетки, то в костях они в основном моделируют клетки стромы, остеобласты и остеокласты.

Метастазы в мозге и роль экзосом в формировании там ПМН изучены слабо. Известно, что эндотелиальные клетки мозга захватывают экзосомы, содержащие только интегрин $\alpha\beta 3$, но никакой другой [136].

С использованием уникального метода совместного культивирования клеток опухоли и клеток органа-мишени недавно были изучены временные и пространственные аспекты миграции клеток опухоли молочной железы и их инвазии в ткани легкого. Изменения фибробластов органа-мишени, вызванные экзосомами опухолевых клеток, способствуют формированию ПМН, а ПМН, в свою очередь, привлекает ДОК при органотропном метастазировании [140].

Кроме того, обнаружено, что не только экзосомы первичной опухоли обеспечивают расселение ее клеток, но и экзосомы МСК при активации сигнального пути Wnt способствуют миграции клеток опухоли молочной железы [141].

МЕТАСТАТИЧЕСКИЕ НИШИ

Как только ДОК поселяются в ПМН, ниша становится метастатической (МН), она наследует пространственную архитектуру и функциональный статус ПМН, включая прорастающие сосуды, их проницаемость, и иммуносупрессорную обстановку. Это специфическое микроокружение во вторичных органах (КМ, лимфоузлы, легкие, печень и мозг), обеспечивающее условия для выживания ДОК с чертами стволовых клеток или без них [46, 101].

Изменения, происходящие в нишах, где располагаются ДОК и ОСК, диктуют клеткам, смогут ли они выжить, запустить программы длительного покоя или начать пролиферацию.

Костный мозг можно рассматривать как “святое место”, где долго скрываются ДОК/ОСК, образовавшиеся из опухолей молочной и предстательной железы. Интересно, что фактор Notch2, индуцирующий пролиферацию опухолевых клеток в первичном раке молочной железы [46, 142], оказывает противоположный эффект в МН кост-

ного мозга, вызывая покой и долговременное выживание диссеминированных ОСК молочной железы [143]. А сигнальный путь Wnt, в своем каноническом варианте являющийся регулятором пролиферации и стволовых свойств клеток, ассоциирован с дормантностью опухолевых клеток предстательной железы, заселившихся в ниши КМ, использующие неканонический путь ROR2/Siah E3-SIAH2, ингибирующий канонический путь Wnt/ β -катенин. Таким образом, очевидно, что такие противоположные эффекты можно объяснить лишь действием факторов микроокружения в МН. Так, обнаружено несколько репрессирующих сигналов – TGF- β 2, BMP7 (морфогенетический белок кости 7), GAS6 (белок 6, специфичный для задержки роста), LIF, Wnt5 α и CXCL12 (лиганд 12 хемокинов с мотивом C-X-C). Например, TGF- β 2, интенсивно экспрессирующийся в КМ, вызывает состояние покоя ОСК [144] и ДОК, приводя к понижению отношения киназ ERK/p38. Фактор транскрипции BMP7, секретлируемый стромальными клетками кости, вызывает дормантность клеток опухоли предстательной железы, похожих на стволовые, активируя экспрессию гена-супрессора метастазирования NRDG1 (N-myc downstream regulated 1) и сигналинг p38 [121].

Белок GAS6, секретлируемый остеобластами, способствует дормантности ДОК предстательной железы, активируя рецептор тирозинкиназ MER и mTOR [119]. Эта активация коррелирует с появлением у ДОК фенотипа стволовых клеток.

Фактор LIF также секретруется стромой КМ и способствует покою ОСК опухоли молочной железы в кости, а потеря рецептора LIF (LIFR) приводит к выходу из дормантности и прогрессии метастазов из-за супрессии генов, отвечающих за поддержание стволовых свойств. Полагают, что в КМ остеобласты индуцируют дормантность ДОК [145], а остеокласты участвуют в выходе из этого состояния и в процессе остеолитического метастазирования в кости [146]. Известно, что эти клетки физически взаимодействуют с остеогенными клетками, поэтому остеогенная ниша, включая остеобласты, служит резервуаром кальция для формирования микрометастазов. Известно, что клетки опухолей молочной и предстательной железы содержат кальций-чувствительные рецепторы, и ионы кальция активируют в этих клетках регуляторные каскады ингибирования апоптоза и активации пролиферации. Кроме того, ионы кальция индуцируют секрецию PTHrP (Parathyroid hormone-related protein), способствующего дальнейшему растворению костной ткани и высвобождению кальция. Ионы кальция также могут служить хемоаттрактантом для клеток опухоли молочной железы и обуславливать их локализацию в кости [147]. Изменение фенотипа остеобластов с возрастом и старение приводят к росту метастазов [148].

Вероятно, не случайно пунктом остановки ДОК в КМ служит ниша нормальных ГСК [119]. Установлена роль фактора Notch2, вызывающего покой ДОК молочной железы в КМ, имитируя внутренние клеточные механизмы, отвечающие за покой ГСК [143]. В многочисленных исследованиях показано, что специфические факторы BMP7, TGF- β 2, BMP4 и GAS6, обеспечивающие покой нормальных стволовых клеток, оказались индукторами дормантности ДОК в нишах легких и КМ [121, 149, 150]. Жесткий контроль дормантности ГСК в КМ предполагает сходство механизмов дормантности ГСК и ДОК [150–152]. Более того, дормантные ДОК опухоли молочной железы экспрессируют те же гены стволовых клеток, что и ГСК. Однако они обладают и характеристиками эмбриональных стволовых клеток, такими как повышенная экспрессия генов, ассоциированных с плюрипотентностью, *NR2F1*, *SOX9*, *SOX2*, *OCT4* (*POU5F1*) и *NANOG*, что обеспечивает ДОК большую пластичность и меньшую вероятность полной дифференцировки [54].

Метастазы в мозге чаще всего обнаруживаются в местах контактов серого и белого вещества и на границах территорий соседних кровеносных сосудов, где скорость кровотока снижается, что позволяет циркулирующим опухолевым клеткам успешно преодолеть гематоэнцефалический барьер и покинуть кровяное русло. Однако показано, что отдаление опухолевых клеток от стенок сосудов неизбежно приводило к их гибели. Действительно, метастазы злокачественных опухолей обнаруживались вдоль наружных стенок кровеносных сосудов мозга. Не случайно, именно в этом периваскулярном пространстве располагаются нейрональные стволовые клетки, поддержание и дифференцировка которых осуществляется в нормальном нейрогенезе факторами роста, например, VEGF (фактор роста эндотелия сосудов). Эти же факторы обеспечивают и рост опухолевых клеток. Интересно, что клетки опухоли не только восприимчивы к сигналингу нормальных нейрональных стволовых клеток, но и сами, выделяя фактор BMP-2, могут форсировать дифференцировку нейрональных стволовых клеток в астроциты для своих нужд, поскольку стволовые клетки в отличие от астроцитов могут сдерживать рост опухолей [154, 155].

Известно, что ниши нормальных стволовых клеток взрослых защищены от действия иммунной системы [156], что благоприятно для дормантных ДОК. И нормальным стволовым клеткам, и дормантным ДОК свойственна сниженная антигенность, что согласуется с предположением, согласно которому ускользание от иммунного контроля является их общей чертой. Другой общей чертой может быть экспрессия убиквитинлигазы FBXW7, ингибирование которой нарушает покой лимфомных стволовых клеток и клеток аденокар-

циномы легкого, и способствует пробуждению dormantных ДОК опухоли молочной железы, а, следовательно, их уничтожению при проведении химиотерапии [48, 157, 158].

Другим убежищем dormantных ДОК или ОСК многих опухолей служат **легкие**. Как и в КМ, BMP4 (член семейства TGF- β), секретируется резидентными клетками и препятствует самообновлению клеток опухоли молочной железы. Способность ДОК взаимодействовать с ВКМ через рецепторы интегрина при заселении в легкие также способствует их dormantности и выживанию [46, 159].

Поскольку ДОК покидают пределы первичной опухоли по кровеносным или лимфатическим сосудам, первой преградой, с которой они встречаются в новом месте, является сосудистый эндотелий [78]. И не удивительно, что в различных экспериментальных моделях опухолей молочной железы, легких и меланомы ДОК тесно ассоциированы с васкулярной базальной мембраной. Это микроокружение, названное **периваскулярной нишей** (ПВН), участвует в дифференцировке и развитии нормальных тканей. ПВН содержат кислород, питательные вещества и паракринные факторы, обеспечивающие условия для пролиферации ДОК и ОСК [46, 160]. Известно, что в различных органах стволовые клетки располагаются именно в ПВН на концах капилляров, где их рост регулируется и поддерживается факторами, продуцируемыми эндотелием сосудов. При этом в такой нише поддержание состояния стволовых клеток сочетается с индукцией и поддержанием dormantности ДОК. ПВН в КМ индуцирует долговременную dormantность ДОК и защищает от химиотерапии, обеспечивая взаимодействие ДОК с помощью интегринов с молекулами фактора Виллебранда и лигандом интегрина VCAM1 [161]. Нарушение этих контактов интегрин-связывающими антителами приводило к пробуждению ДОК и уничтожению их при проведении химиотерапии.

Интересно, что dormantные и пролиферирующие клетки опухоли молочной железы занимают разные локусы в периваскулярных областях. Так, делящиеся клетки в метастазах обнаруживаются ближе к поверхности кости, а dormantные клетки располагаются ближе к перисинусоидальным венулам. Эти венулы экспрессируют молекулы адгезии E-селектины, характерные для клеток сосудов при воспалении, что способствует проникновению опухолевых клеток в КМ, и фактор SDF-1 (stromal cell-derived factor 1), характерный для клеток стромы, который обеспечивает закрепление клеток в нише при взаимодействии с рецептором CXCR4 (C-X-C chemokine receptor type 4) [162].

Подробно МСК в различных органах человека и животных, в том числе МСК пуповины, их роль

в dormantности и реактивации ДОК рассмотрена в обзоре [163].

ФАКТОРЫ, ВЛИЯЮЩИЕ НА ПОДДЕРЖАНИЕ СОСТОЯНИЯ ДОРМАНТНОСТИ ДОК И ВЫХОД ИЗ НЕГО

Роль микроокружения

Концепция обратимости злокачественного фенотипа опухолевых клеток подразумевает, что в определенном микроокружении, например, в эмбриональном, опухолевые клетки могут ремоделировать свои эпигенетические программы [164]. Обнаружено, что экстракт зародышей аксолотля вызывает подавление роста клеток опухоли молочной железы и индукцию их dormantности, в частности, активацию экспрессии ингибитора клеточного цикла p27 и ингибирование фосфорилирования опухолевого супрессора — белка ретинобластомы RB и ключевых сигнальных путей клеточной пролиферации [165]. Так, показано, каким образом гомеостаз микроокружения во вторичных органах-мишенях может поддерживать состояние dormantности опухолевых клеток, очевидно, аналогично тому, как это происходит в нишах покоящихся стволовых клеток взрослых организмов.

Если в ПМН создаются условия для успешного закрепления ДОК и их выживания в dormantном состоянии, то любые изменения в МН приводят к запуску клеточного цикла покоящихся в них ДОК и росту метастазов [48, 54, 100]. Изучена способность различных компонентов МН переводить резидентные dormantные ДОК из состояния покоя (как у стволовых клеток) в состояние самообновления и пролиферации. Этот перевод во многих случаях обеспечивается индукцией ЭМП и обретением ДОК свойств стволовых [109, 166].

Внеклеточный матрикс (ВКМ), определяемый как неклеточный компонент ниши dormantных ДОК, — быстро меняющаяся и физиологически активная структура, окружающая клетки, он играет важную роль в межклеточных взаимодействиях. Высокоструктурированный в эмбриогенезе и тканевом гомеостазе, ВКМ становится разупорядоченным при метастазировании. ВКМ служит фоном, на котором физические и химические факторы создают dormantным клеткам условия покоя или пролиферации. Показано, что молекулярным переключателем dormantности клеток служит соотношение активности киназ ERK и p38MAPK при связывании с ВКМ — чем это соотношение больше, тем меньше dormantных клеток. Следовательно, ВКМ, влияя на выживаемость и пролиферацию ДОК, обуславливает их dormantность [47, 48, 167–170].

Показано, что в состоянии долговременной дормантности клетки прочно связаны с жестким матриксом с помощью интегрин $\alpha 5 \beta 1$ и вследствие напряжений в клетке, вызванных Rho-ассоциированной киназой (ROCK). Более того, вероятно, возможность выхода из дормантного состояния обусловлена способностью матриксных металлопротеиназ расщеплять фибронектин I ВКМ и ослаблением этих связей [118].

Обнаружено также, что рецептор урокиназы (uPAR), мембранный гликопротеин, обеспечивающий взаимодействие клеток с ВКМ, связывается с интегринами клеток плоскоклеточного рака головы и шеи, что приводит к дезактивации в них митогенных каскадов и, следовательно, к дормантности [168, 171].

Такие компоненты ВКМ ПВН, как остеопонтин и тенацин С, также служат регуляторами выживания ОСК, их самообновления и пробуждения, влияя на экспрессию факторов транскрипции Wnt, Nanog и Oct4 (POU5F1) [46].

Существенно, что помимо влияния клеточных структур МН на состояние ДОК, сами резидентные ДОК могут обеспечивать благоприятные условия для своего роста или покоя. Показано, что ДОК опухоли молочной железы, например, могут активировать стромальные клетки, расположенные в непосредственной близости, для высвобождения периостина и тенацина С. Те, в свою очередь, активируют в дормантных ДОК пролиферативные сигнальные пути Wnt, Nanog и Oct4 стволовых клеток, приводя к метастатическому росту [100, 172, 173]. Интересно, что периостин, секретируемый новыми прорастающими кровеносными капиллярами в ПВН, вместе с фактором TGF- $\beta 1$ вызывал пролиферацию дормантных клеток опухоли молочной железы, тогда как тромбоспондин 1, секретируемый уже существующей нормальной микроваскулатурой, приводил к дормантности этих клеток [174].

Роль аутофагии и апоптоза

Известно, что нарушение адгезии ДОК к ВКМ может индуцировать аутофагию. Этот эволюционно консервативный механизм, запускаемый клетками для поддержания энергетического баланса при метаболическом стрессе, заключается в деградации поломанных белков, органелл и части цитозоля. Действительно, показано, что аутофагия регулирует выживание ОСК [175]. Аутофагия тесно связана с сигналами стресса и метаболическими изменениями. Показано, что аутофагия более присуща дормантным опухолевым клеткам, чем их пролиферирующим собратьям, что позволяет переживать стресс в состоянии покоя [157], а ингибирование аутофагии приводило к выходу из дормантного состояния [120, 158, 176].

Типы аутофагии и тонкие механизмы этого явления подробно рассмотрены в обзоре [177].

Известно, что за регуляцию апоптоза отвечают белки семейства ингибиторов митохондриального апоптоза Bcl-2. Показано, что сверхэкспрессия Bcl-2 свойственна стволовым клеткам опухолей молочной железы и предстательной железы, в последнем случае это обусловлено повышением экспрессии Notch и морфогенетического фактора Hedgehog, ответственных за самообновление и дифференцировку ОСК [178]. Другой пример взаимосвязи между апоптозом и поддержанием ОСК — канонический сигнальный путь Wnt/ β -катенин, нарушение которого приводит к выходу клеток из дормантного состояния [179, 180].

Роль неоангиогенеза

В ремоделировании микроокружения дормантных ДОК вовлечены также процессы, связанные с формированием новых сосудов. Дормантные клетки находятся в ПВН благодаря взаимодействиям с ее эндотелиальными клетками с помощью тромбоспондина 1, а прорастание новых сосудов стимулирует реактивацию дормантных клеток и рост опухоли за счет выработки ими периостина и TGF- $\beta 1$ [174]. При этом реактивации дормантных клеток опухоли молочной железы в легких способствует также ингибитор пути BMP (членов семейства TGF- β) — мембранный фактор Cосо [149]. Очевидно, это можно рассматривать как универсальный, орган-независимый механизм реактивации дормантных клеток [50].

Известно несколько факторов, регулирующих ангиогенез, включая фактор роста фибробластов (FGF), PDGF, фактор роста сосудистого эндотелия VEGF и IL-8 [181].

Известно также, что изменяется в опухолевой клетке, претерпевающей так называемое ангиогенное включение [182]: снижается экспрессия тромбоспондина (ингибитор ангиогенеза) и возрастает активность генов, до сих пор не связанных с дормантностью опухоли, таких как *ESM1* (специфическая молекула 1 эндотелиальных клеток), *TIMP3* (5'-эктонуклеотидаза, тканевый ингибитор металлопротеиназы 3), *EGFR* (рецептор эпидермального фактора роста), *IGF1R* (рецептор инсулиноподобного фактора роста 1), *PI3K* (компонент сигнального пути фосфатидилинозитол-3-киназы), *EphA5* (рецептор A5 эфрина) и *H2BK* (гистон H2BK) [46, 183]. Баланс между ангиогенным включением и дормантностью тонко регулируется факторами микроокружения, включая проангиогенный фактор VEGF, фактор PDGF, антиангиогенный тромбоспондин 1, ангиостатин и эндостатин [184].

Роль воспалительной реакции и фиброза

Подробное описание процессов, происходящих при хроническом воспалении, и в том числе, способствующих активации роста метастазов, приведено в обзоре [185]. Хроническое воспаление приводит к иммуносупрессии в микроокружении dormantных опухолевых клеток в результате привлечения M2-макрофагов, Treg-клеток, миелоидных супрессорных и других клеток и цитокинов. При этом наблюдается активация онкогенов, активация пролиферации и метастазирование. Этому способствуют и такие эпигенетические альтерации, как метилирование ДНК, модификация гистонов, ремоделирование хроматина и синтез некодирующих РНК. Например, обнаружено, что развитие воспалительной реакции, индуцированное клетками опухоли почки, способствовало росту метастазов в легких. При этом эпигенетическое ремоделирование хроматина привело к активации на уровне транскрипции экспрессии генов, связанных с воспалением. Показано, что воспаление часто сопровождается привлечением ассоциированных с опухолью фибробластов, ответственных за накопление коллагена и различных компонентов ВКМ, облегчающих пролиферацию и ангиогенез. Кроме того, такие фибробласты продуцируют различные цитокины, хемокины, включая остеоопонтин, CXCL1, CXCL2, CXCL12, CXCL13, IL-6, IL-1 β , и CCL-5, изменяющие поведение окружающих эпителиальных клеток и способствующие пролиферации опухолевых клеток. Индукция воспалительной реакции бактериальными полисахаридами или табачным дымом в легких приводила к индукции ЭМП dormantных ДОК, экспрессии фактора ZEB1 и их реактивации [186]. Для понимания связи между повреждением здоровой ткани, воспалением и ростом опухоли проведено исследование, в котором показано, что нейтрофилы запускают Notch-зависимый сигнальный путь пролиферации клеток для регенерации поврежденной ткани. Таким образом, нейтрофилы ответственны и за создание благоприятных условий для появления у ДОК свойств стволовых клеток и последующего роста метастазов [187].

Нарушения в процессах заживления ран приводят к возникновению фиброза. Формирование фиброзоподобных очагов, обогащенных коллагеном типа I и фибронектином, создает среду, “разрешающую” реактивацию dormantных ДОК. Показано, что коллаген и фибронектин запускают сигнальный путь интегрин-1 β (Int β 1), активируя киназу фокальной адгезии FAK. Далее активируется киназа ERK, которая в свою очередь активирует киназу легких цепей миозина (MLCK), в результате образуются стресс-фибриллы F-актина и опухолевые клетки переходят из состояния покоя к пролиферации. Ингибирование активации ки-

назы MLCK или экспрессии Int β 1 предотвращало реактивацию ДОК *in vitro* и *in vivo* [53, 188].

Показано также, что индуцируемый гипоксией многофункциональный фактор LOXL2 (lysyl oxidase like-2 protein), вызывал в фиброзоподобных очагах легких образование посттрансляционных сшивок коллагена типа I, продуцируемого фибробластами, что приводило к увеличению механической жесткости ВКМ, создавало условия для колонизации опухолевыми клетками и последующего формирования метастазов. Ингибирование LOXL2 препятствовало колонизации и метастазированию [189]. Интересно, что помимо участия в образовании фиброзных очагов вне клетки, внутриклеточный LOXL2 индуцирует ЭМП и способствует инвазивности, а также придает клеткам стволовые свойства, что приводит к их переходу из dormantного состояния к пролиферации и росту метастазов [190]. Моделирование воспалительной реакции в легких мышей с использованием вдыхания табачного дыма или закапывания в нос раствора полисахаридов выявило образование в межклеточном пространстве внеклеточных нейтрофильных ловушек (NET) из участков хроматина, связанных с протеолитическими ферментами, нейтрализующих чужеродные вещества. При этом ассоциированные с хроматином протеазы так ремоделируют ламинин, накапливающийся при воспалении, что он становится активатором интегрин α 3 β 1 на мембране опухолевых клеток, который запускает в клетке каскад FAK/ERK/MLCK/YAP. Фактор транскрипции YAP (yes-associated protein) активирует экспрессию генов, ответственных за пролиферацию dormantных опухолевых клеток молочной железы и формирование метастазов в легких [191].

Иммунологически два недуга – рак и туберкулез – очень похожи, но при этом исследования в области туберкулеза направлены преимущественно на поиск способов предупредить болезнь, тогда как изучение онкогенеза нацелено на уничтожение уже существующей болезни с помощью активации иммунной системы пациента [192]. Применение популярной противотуберкулезной вакцины БЦЖ (BCG, от *Bacillus Calmette–Guérin*) считается одним из наиболее эффективных методов лечения рака мочевого пузыря на ранних стадиях. БЦЖ не только индуцирует иммунный ответ, но также стимулирует образование NET. Однако в этих экспериментах *in vitro* и на мышинной модели опухоли мочевого пузыря показано, что инкубация клеток опухоли с препаратами NET приводила к снижению их подвижности, остановке клеточного цикла и апоптозу, т.е. наблюдался дозозависимый цитотоксический эффект [193]. Можно предположить, что подобное несоответствие данных объясняется, по-видимому, различиями в механизмах действия NET в зависимости от концентрации и вида клеток. Вероятно,

в нишах дормантных опухолевых клеток концентрация NET невелика, а их активирующее действие опосредуется модификациями ВКМ. При обработке клеток первичной опухоли *in vitro* NET оказывают цитотоксическое действие.

Интересно, что системное воспаление, как результат хирургического вмешательства, вызывает пролиферацию дормантных иммуногенных ДОК в различных органах, тогда как предоперационная терапия нестероидными противовоспалительными препаратами препятствует реактивации ДОК в легких [194].

Роль иммунного контроля

Существуют два возможных механизма, обуславливающих дормантность опухолевых клеток. Первый — это “арест” пролиферации, когда клетка не может делиться. И второй — это баланс между цитотоксичностью Т-лимфоцитов и ангиогенезом в нишах опухолевых клеток с последующей их активацией [167]. Если активность иммунной системы преобладает, то такие клетки элиминируются. Если преобладает активный ангиогенез, то, напротив, опухолевые клетки будут пролиферировать. Следовательно, если между этими двумя процессами соблюдается баланс, опухолевые клетки останутся дормантными. О роли иммунной системы организма в формировании метастазов стали догадываться при анализе результатов трансплантации органов. Известно, что обычно метастазы обнаруживаются через 20–35 мес. после удаления первичной опухоли [195]. Время же между трансплантацией и возможным появлением у реципиента метастазов меньше — 3–36 мес. в зависимости от вида опухоли и пересаженного органа. Эти наблюдения предполагают иммунный контроль скрытых новообразований и активное разрастание опухолевых клеток в условиях медикаментозной иммуносупрессии, необходимой для исключения отторжения пересаженного органа, т.е. в отсутствие иммунного контроля [196]. Однако трансплантация органа — это травмирующая операция, которая вызывает развитие воспалительной реакции, что также может привести к активации дормантных опухолевых клеток.

Помимо того, что клетки иммунной системы способствуют заселению ЦОК в ПМН, они определяют судьбу дормантных ДОК — сохраняются они в дормантном состоянии или будут уничтожены при попытке реактивации [79, 197]. Показано, что регуляторные Treg-клетки способствуют дормантности ДОК. Они высвобождают аденозин, который защищает покоящиеся клетки от окислительного стресса [198]. Кроме того, дормантные клетки защищены от Т-клеток, тогда как пролиферирующие клетки подвергаются их цитотоксическому действию [197].

На мышинной модели показано избирательное увеличение количества НК-клеток в печени в ближайшем окружении дормантных клеток опухоли молочной железы [199]. Адьювантная иммунотерапия на основе IL-15 обеспечивала увеличение числа НК-клеток, что способствовало поддержанию дормантного состояния опухолевых клеток посредством сигналов интерферона- γ , и тем самым препятствовало развитию метастазов в печени и увеличивало срок жизни животных. Выход из состояния дормантности и рост метастазов обусловлен значительным сокращением области НК-клеток и конкурентным накоплением активированных звездчатых клеток. При этом оказалось, что секретируемый звездчатыми клетками хемокин CXCL12 блокировал активность НК-клеток, связываясь с их рецепторами CXCR4. Полученные данные доказывают роль соотношения НК и звездчатых клеток как главного переключателя покоя опухолевых клеток в печени [199].

Интересно, что факт сосуществования растущих опухолей и Т-клеток описан довольно давно [200]. В настоящее время известны внутриклеточные и внешние факторы, приводящие к неспособности Т-лимфоцитов элиминировать опухолевые клетки [201]. Это состояние, называемое истощением Т-клеток, характеризуется постепенно нарастающей потерей функций вплоть до полного исчезновения этих клеток. Подобное явление наблюдается при хронических вирусных и онкологических заболеваниях при длительном высоком уровне антигенной нагрузки. Секвенирование РНК единичных клеток из проб опухолей, околоопухолевых областей и крови 316 пациентов с 21 типом опухолей позволило сделать вывод, что программы транскрипции Т-клеток и их состояние в значительной степени зависят не только от типа опухолей, но и от их микроокружения, в частности от факторов TGF- β и TNF- α , интерферонов, интерлейкинов и Т-хелперных клеток и Treg [202].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Состояние дормантности — обратимого непролиферативного состояния покоя — свойственно многим клеткам животных, растений и микроорганизмов в неблагоприятных условиях, в том числе стволовым клеткам взрослых организмов, эмбриональным клеткам, ДОК, дающим отдаленные во времени и пространстве метастазы, и микобактериям туберкулеза при латентной форме инфекции. Опубликованы данные, свидетельствующие об универсальности основных регуляторных путей обретения дормантности. Так, в условиях гипоксии запускается экспрессия факторов транскрипции, останавливающих пролиферацию клеток, а недостаток питательных веществ способствует снижению клеточного метаболизма или переводу его с

использования глюкозы на нетрадиционные пути, например, использования липидов в качестве единственного источника углерода. Такие запрещающие сигналы свойственны нишам нормальных стволовых клеток. ПМН, формированию которых способствуют сигналы от первичных опухолей еще до заселения в них ДОК, располагаются вблизи или в нишах нормальных стволовых клеток в легких, печени, костном мозге. В таких нишах клетки невидимы для иммунной системы и защищены от цитотоксического действия химиотерапевтических препаратов. Степень активности микобактерий, как истинных внутриклеточных паразитов, регулируется сигналами, действующими в инфицируемых ими клетках. А именно, клетки *M. tuberculosis* становятся дормантными только в МСК. И в этом состоянии микобактерии также защищены от клеток иммунной системы и лекарственных средств. Существенно, что макрофаги, классические хозяева *M. tuberculosis*, не могут обеспечить им состояние дормантности, этим обусловлена успешность лекарственной терапии острой формы заболевания.

Нормальные стволовые клетки выходят из состояния покоя и начинают пролиферацию под действием разрешающих сигналов, обусловленных любыми изменениями в организме – например, нарушением целостности ткани в результате травмы. При этом высвобождаются ростовые факторы, развивается воспаление, прорастают новые кровеносные сосуды. Если принять, что среди ДОК находятся и ОСК, то естественно, их реактивация также произойдет в ответ на изменения в микроокружении, вызванные сходными факторами. Это также свидетельствует в пользу предположения об универсальности механизмов регуляции клеточной дормантности. Однако существуют некоторые особенности. *M. tuberculosis*, как внутриклеточный паразит, и опухолевые клетки, как внутриорганизменные патогены, могут сами ремоделировать свое микроокружение, запуская параллельные регуляторные пути собственной реактивации. Так, микобактерии индуцируют инфицированные ими МСК продуцировать экзосомы, которые захватываются макрофагами и индуцируют воспалительную реакцию и развитие болезни, а опухолевые клетки индуцируют стромальные клетки ниши высвободить матриксные факторы, активирующие регуляторные пути, обеспечивающие пролиферацию этих опухолевых клеток.

Написание настоящего обзора не потребовало специального финансирования.

В исследовании не использованы биологические материалы, полученные от людей или животных.

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Dillekås H., Rogers M.S., Straume O. (2019) Are 90% of deaths from cancer caused by metastases? *Cancer Med.* **8**, 5574–5576.
2. Global tuberculosis report 2021. Geneva: World Health Organization; 2021. Licence: CC BY-NC-SA 3.0 IGO.
3. Peterson E.J.R., Abidi A.A., Arrieta-Ortiz M.L., Aguilar B., Yurkovich J.T., Kaur A., Pan M., Srinivas V., Shmulevich I., Baliga N.S. (2020) Intricate genetic programs controlling dormancy in *Mycobacterium tuberculosis*. *Cell Rep.* **31**, 107577.
4. Khan A., Hunter R.L., Jagannath C. (2016) Emerging role of mesenchymal stem cells during tuberculosis: the fifth element in cell mediated immunity. **101**, 45–52.
5. Batyrshina Y.R., Schwartz Y.S. (2019) Modeling of *Mycobacterium tuberculosis* dormancy in bacterial cultures. *Tuberculosis (Edinb.)*. **117**, 7–17.
6. Jindani A., Aber V.R., Edwards E.A., Mitchison D.A. (1980) The early bactericidal activity of drugs in patients with pulmonary tuberculosis. *Am. Rev. Respiratory Dis.* **121**, 939–949.
7. Wayne L.G. (1994) Dormancy of *Mycobacterium tuberculosis* and latency of disease. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* **13**, 908–914.
8. Schubert O.T., Ludwig C., Kogadeeva M., Zimmermann M., Rosenberger G., Gengenbacher M., Gillet L.C., Collins B.C., Röst H.L., Kaufmann S.H., Sauer U., Aebbersold R. (2015) Absolute proteome composition and dynamics during dormancy and resuscitation of *Mycobacterium tuberculosis*. *Cell Host Microbe*. **18**, 96–108.
9. Gengenbacher M., Kaufmann S.H.E. (2012) *Mycobacterium tuberculosis*: success through dormancy. *FEMS Microbiol. Rev.* **36**, 514–532.
10. Davis J.M., Ramakrishnan L. (2009) The role of the granuloma in expansion and dissemination of early tuberculosis infection. *Cell*. **136**, 37–49.
11. Kundu M., Basu J. (2021) Applications of transcriptomics and proteomics for understanding dormancy and resuscitation in *Mycobacterium tuberculosis*. *Front Microbiol.* **12**, 642487.
12. Mayito J., Andia I., Belay M., Jolliffe D.A., Keteete D.P., Reece S.T., Martineau A.R. (2019) Anatomic and cellular niches for *Mycobacterium tuberculosis* in latent tuberculosis infection. *J. Infect. Dis.* **219**, 685–694.
13. Paige C., Bishai W.R. (2010) Penitentiary or penthouse condo: the *Tuberculous granuloma* from the microbe's point of view. *Cell. Microbiol.* **12**, 301–309.
14. Volkman H.E., Pozos T.C., Zheng J., Davis J.M., Rawls J.F., Ramakrishnan L. (2010) *Tuberculous granuloma* induction via interaction of a bacterial secreted protein with host epithelium. *Science*. **327**, 466–469.
15. Cumming B.M., Rahman M.A., Lamprecht D.A., Rohde K.H., Saini V., Adamson J.H., Russell D.G., Steyn A.J.C. (2017) *Mycobacterium tuberculosis* arrests host cycle at the G1/S transition to establish long term infection. *PLoS Pathog.* **13**, e1006389.
16. Dutta N.K., Mehra S., Martinez A.N., Alvarez X., Renner N.A., Morici L.A., Pahar B., Maclean A.G.,

- Lackner A.A., Kaushal D. (2012) The stress-response factor SigH modulates the interaction between *Mycobacterium tuberculosis* and host phagocytes. *PLoS One*. **7**, e28958.
17. Raghuvanshi S., Sharma P., Singh S., Van Kaer L., Das G. (2010) *Mycobacterium tuberculosis* evades host immunity by recruiting mesenchymal stem cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **107**, 21653–21658.
 18. Das B., Kashino S.S., Pulu I., Kalita D., Swami V., Yeger H., Felsher D.W., Campos-Neto A. (2013) CD271⁺ bone marrow mesenchymal stem cells may provide a niche for dormant *Mycobacterium tuberculosis*. *Sci. Transl. Med.* **5**, 170ra13.
 19. Khan A., Mann L., Papanna R., Lyu M., Singh C.R., Olson S., Eissa N.T., Cirillo J., Das G., Hunter R.L., Jagannath C. (2017) Mesenchymal stem cells internalize *Mycobacterium tuberculosis* through scavenger receptors and restrict bacterial growth through autophagy. *Sci. Rep.* **7**, 15010.
 20. Fatima S., Kamble S.S., Dwivedi V.P., Bhattacharya D., Kumar S., Ranganathan A., Van Kaer L., Mohanty S., Das G. (2020) *Mycobacterium tuberculosis* programs mesenchymal stem cells to establish dormancy and persistence. *J. Clin. Invest.* **130**, 655–661.
 21. Garhyan J., Bhuyan S., Pulu I., Kalita D., Das B., Bhatnagar R. (2015) Preclinical and clinical evidence of *Mycobacterium tuberculosis* persistence in the hypoxic niche of bone marrow mesenchymal stem cells after therapy. *Am. J. Pathol.* **185**, 1924–1934.
 22. Tornack J., Reece S.T., Bauer W.M., Vogelzang A., Bandermann S., Zedler U., Stingl G., Kaufmann S.H., Melchers F. (2017) Human and mouse hematopoietic stem cells are a depot for dormant *Mycobacterium tuberculosis*. *PLoS One*. **12**, e0169119.
 23. Singh V.K., Mishra A., Bark S., Mani A., Subbian S., Hunter R.L., Jagannath C., Khan A. (2020) Human mesenchymal stem cell based intracellular dormancy model of *Mycobacterium tuberculosis*. *Microbes Infect.* **22**, 423–431.
 24. Kim S., Kim T.M. (2019) Generation of mesenchymal stem-like cells for producing extracellular vesicles. *World J. Stem Cells*. **11**, 270–280.
 25. Wang L.T., Ting C.H., Yen M.L., Liu K.J., Sytwu H.K., Wu K.K., Yen B.L. (2016) Human mesenchymal stem cells (MSCs) for treatment towards immune- and inflammation-mediated diseases: review of current clinical trials. *J. Biomed. Sci.* **23**, 76.
 26. Chow L., Johnson V., Impastato R., Coy J., Strumpf A., Dow S. (2020) Antibacterial activity of human mesenchymal stem cells mediated directly by constitutively secreted factors and indirectly by activation of innate immune effector cells. *Stem Cells Transl. Med.* **9**, 235–249.
 27. Khan A., Jagannath C. (2019) Interactions of *Mycobacterium tuberculosis* with human mesenchymal stem cells. in: *Tuberculosis Host-Pathogen Interactions*. Eds Cirillo J., Kong Y. Springer, Cham. 95–111.
 28. Wortzel I., Dror S., Kenific C.M., Lyden D. (2019) Exosome-mediated metastasis: communication from a distance. *Dev. Cell*. **49**, 347–360.
 29. Mathieu M., Martin-Jaular L., Lavie G., Théry C. (2019) Specificities of secretion and uptake of exosomes and other extracellular vesicles for cell-to-cell communication. *Nat. Cell Biol.* **21**, 9–17.
 30. Liu M., Wang Z., Ren S., Zhao H. (2021) Exosomes derived from *Mycobacterium tuberculosis*-infected MSCs induce a pro-inflammatory response of macrophages. *Aging* (Albany NY). **13**, 11595–11609.
 31. Tyagi P., Pal V. K., Agrawal R., Singh S., Srinivasan S., Singh A. (2020) *Mycobacterium tuberculosis* reactivates HIV-1 via exosome-mediated resetting of cellular redox potential and bioenergetics. *mBio*. **11**, e03293-19.
 32. Li L., Mendis N., Trigui H., Oliver J.D., Faucher S.P. (2014) The importance of the viable but non-culturable state in human bacterial pathogens. *Front. Microbiol.* **5**, 258.
 33. Salina E.G., Mollenkopf H.J., Kaufmann S.H.E., Kaprelyants A.S. (2009) *M. tuberculosis* gene 749 expression during transition to the “non-culturable” state. *Acta Naturae*. **1**, 73–77.
 34. Gopinath V., Raghunandan S., Gomez R.L., Jose L., Surendran A., Ramachandran R., Pushparajan A.R., Mundayoor S., Jaleel A., Kumar R.A. (2015) Profiling the proteome of *Mycobacterium tuberculosis* during dormancy and reactivation. *Mol. Cell. Proteomics*. **14**, 2160–2176.
 35. Joshi H., Kandari D., Bhatnagar R. (2021) Insights into the molecular determinants involved in *Mycobacterium tuberculosis* persistence and their therapeutic implications. *Virulence*. **12**, 2721–2749.
 36. Trutneva K.A., Shleeva M.O., Demina G.R., Vostroknutova G.N., Kaprelyants A.S. (2020) One-year old dormant, “non-culturable” *Mycobacterium tuberculosis* preserves significantly diverse protein profile. *Front. Cell Infect. Microbiol.* **10**, 26.
 37. Chang D.P.S., Guan X.L. (2021) Metabolic versatility of *Mycobacterium tuberculosis* during infection and dormancy. *Metabolites*. **11**, 88.
 38. Rittershaus E.S.C., Baek S.H., Sasseti C.M. (2013) The normalcy of dormancy: common themes in microbial quiescence. *Cell Host Microbe*. **13**, 643–651.
 39. Shleeva M.O., Kudykina Y.K., Vostroknutova G.N., Suzina N.E., Mulyukin A.L., Kaprelyants A.S. (2011) Dormant ovoid cells of *Mycobacterium tuberculosis* are formed in response to gradual external acidification. *Tuberculosis*. **91**, 146–154.
 40. Anuchin A.M., Mulyukin A.L., Suzina N.E., Duda V.I., El-Registan G.I., Kaprelyants A.S. (2009) Dormant forms of *Mycobacterium smegmatis* with distinct morphology. *Microbiology*. **155**, 1071–1079.
 41. Raghunandan S., Jose L., Gopinath V., Kumar R.A. (2019) Comparative label-free lipidomic analysis of *Mycobacterium tuberculosis* during dormancy and reactivation. *Sci. Rep.* **9**, 3660.
 42. Karakousis P.C., Williams E.P., Bishai W.R. (2008) Altered expression of isoniazid-regulated genes in drug-treated dormant *Mycobacterium tuberculosis*. *J. Antimicrob. Chemother.* **61**, 323–331.
 43. Du P., Sohaskey C.D., Shi L. (2016) Transcriptional and physiological changes during *Mycobacterium tuberculosis* reactivation from non-replicating persistence. *Front. Microbiol.* **7**, 1346.
 44. Ai J.-W., Ruan Q.-L., Liu Q.-H., Zhang W.-H. (2016) Updates on the risk factors for latent tuberculosis reac-

- tivation and their managements. *Emerg. Microbes Infect.* **5**, e10.
45. Endo H., Inoue M. (2019) Dormancy in cancer. *Cancer Sci.* **110**, 474–480.
 46. Sistigu A., Musella M., Galassi C., Vitale I., De Maria R. (2020) Tuning cancer fate: tumor microenvironment's role in cancer stem cell quiescence and reawakening. *Front. Immunol.* **11**, 2166.
 47. Aguirre-Ghiso J.A. (2007) Models, mechanisms and clinical evidence for cancer dormancy. *Nat. Rev. Cancer.* **7**, 834–846.
 48. Risson E., Nobre A.R., Maguer-Satta V., Aguirre-Ghiso J.A. (2020) The current paradigm and challenges ahead for the dormancy of disseminated tumor cells. *Nat. Cancer.* **1**, 672–680.
 49. Boire A., Coffelt S.B., Quezada S.A., Vander Heiden M.G., Weeraratna A.T. (2019) Tumour dormancy and reawakening: opportunities and challenges. *Trends Cancer.* **5**, 762–765.
 50. Phan T.G., Croucher P.I. (2020) The dormant cancer cell life cycle. *Nat. Rev. Cancer.* **20**, 398–411.
 51. Khoo W.H., Ledergor G., Weiner A., Roden D.L., Terry R.L., McDonald M.M., Chai R.C., De Veirman K., Owen K.L., Opperman K.S., Vandyke K., Clark J.R., Seckinger A., Kovacic N., Nguyen A., Mohanty S.T., Pettitt J.A., Xiao Y., Corr A.P., Seeliger C., Novotny M., Lasken R.S., Nguyen T.V., Oyajobi B.O., Aftab D., Swarbrick A., Parker B., Hewett D.R., Hose D., Vanderkerken K., Zannettino A.C.W., Amit I., Phan T.G., Croucher P.I. (2019) A niche-dependent myeloid transcriptome signature defines dormant myeloma cells. *Blood.* **134**, 30–43.
 52. Loh E., Couch F.J., Hendricksen C., Farid L., Kelly P.F., Acker M.A., Tomaszewski J.E., Malkowicz S.B., Weber B.L. (1997) Development of donor-derived prostate cancer in a recipient following orthotopic heart transplantation. *JAMA.* **277**, 133–137.
 53. Sauer S., Reed D.R., Ihnat M., Hurst R.E., Warshawsky D., Barkan D. (2021) Innovative approaches in the battle against cancer recurrence: novel strategies to combat dormant disseminated tumor cells. *Front. Oncol.* **11**, 659963.
 54. Aguirre-Ghiso J.A., Sosa M.S. (2018) Emerging topics on disseminated cancer cell dormancy and the paradigm of metastasis. *Ann. Rev. Cancer Biol.* **2**, 377–393.
 55. Sano N., Marion-Poll A. (2021) ABA metabolism and homeostasis in seed dormancy and germination. *Int. J. Mol. Sci.* **22**, 5069.
 56. Воронина А.С., Пшенникова Е.С. (2020) Стволовые клетки растений. *Молекуляр. биология.* **54**, 187–203.
 57. Fukuyama M., Rougvie A.E., Rothman J.H. (2006) *C. elegans* DAF-18/PTEN mediates nutrient-dependent arrest of cell cycle and growth in the germline. *Curr. Biol.* **16**, 773–779.
 58. Hamatani T., Daikoku T., Wang H., Matsumoto H., Carter M.G., Ko M.S., Dey S.K. (2004) Global gene expression analysis identifies molecular pathways distinguishing blastocyst dormancy and activation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **101**, 10326–10331.
 59. Scognamiglio R., Cabezas-Wallscheid N., Thier M.C., Altamura S., Reyes A., Prendergast Á.M., Baumgärtner D., Carnevalli L.S., Atzberger A., Haas S., von Paleske L., Boroviak T., Wörsdörfer P., Essers M.A., Kloz U., Eisenman R.N., Edenhofer F., Bertone P., Huber W., van der Hoeven F., Smith A., Trumpp A. (2016) Myc depletion induces a pluripotent dormant state mimicking diapause. *Cell.* **164**, 668–680.
 60. Meller C.L., Meller R., Simon R.P., Culpepper K.M., Podrabsky J.E. (2012) Cell cycle arrest associated with anoxia-induced quiescence, anoxic preconditioning, and embryonic diapause in embryos of the annual killifish *Austrofundulus limnaeus*. *J. Comp. Physiol. B.* **182**, 909–920.
 61. Ptak G.E., Tacconi E., Czernik M., Toschi P., Modlinski J.A., Loi P. (2012) Embryonic diapause is conserved across mammals. *PLoS One.* **7**, e33027.
 62. Yoshida G.J. (2018) Emerging roles of Myc in stem cell biology and novel tumor therapies. *J. Exp. Clin. Cancer Res.* **37**, 173.
 63. Adam A.P., George A., Schewe D., Bragado P., Iglesias B.V., Ranganathan A.C., Kourtidis A., Conklin D.S., Aguirre-Ghiso J.A. (2009) Computational identification of a p38SAPK regulated transcription factor network required for tumor cell quiescence. *Cancer Res.* **69**, 5664–5672.
 64. Dhimolea E., de Matos Simoes R., Kansara D., Al'Khafaji A., Bouysson J, Weng X., Sharma S., Raja J., Awate P., Shirasaki R., Tang H., Glassner B.J. Liu Z., Gao D., Bryan J., Bender S., Roth J., Scheffer M., Jeselsohn R., Gray N.S., Georgakoudi I., Vazquez F., Tsherniak A., Chen Y., Welm A., Duy C., Melnick A., Bartholdy B., Brown M., Culhane A.C., Mitsiades C.S. (2021) An embryonic diapause-like adaptation with suppressed myc activity enables tumor treatment persistence. *Cancer Cell.* **39**, 240–256.
 65. Rehman S.K., Haynes J., Collignon E., Brown K.R., Wang Y., Nixon A.M.L., Bruce J.P., Wintersinger J.A., Singh Mer A., Lo E.B.L., Leung C., Lima-Fernandes E., Pedley N.M., Soares F., McGibbon S., He H.H., Pollet A., Pugh T.J., Haibe-Kains B., Morris Q., Ramalho-Santos M., Goyal S., Moffat J., O'Brien C.A. (2021) Colorectal cancer cells enter a diapause-like dtp state to survive chemotherapy. *Cell.* **184**, 226–242.
 66. Santos-de-Frutos K., Djouder N. (2021) When dormancy fuels tumour relapse. *Commun Biol.* **4**, 747.
 67. Orford K.W., Scadden D.T. (2008) Deconstructing stem cell self-renewal: genetic insights into cell-cycle regulation. *Nat. Rev. Genet.* **9**, 115–128.
 68. Nieto M.A. (2013) Epithelial plasticity: a common theme in embryonic and cancer cells. *Science.* **342**, 1234850.
 69. Lamouille S., Xu J., Derynck R. (2014) Molecular mechanisms of epithelial-mesenchymal transition. *Nat. Rev. Mol. Cell. Biol.* **15**, 178–196.
 70. Taneyhill L.A., Schiffracher A.T. (2017) Should I stay or should I go? Cadherin function and regulation in the neural crest. *Genesis.* **55**, e23028.
 71. Yu M., Bardia A., Wittner B.S., Stott S.L., Smas M.E., Ting D.T., Isakoff S.J., Ciciliano J.C., Wells M.N., Shah A.M., Concannon K.F., Donaldson M.C., Sequist L.V., Brachtel E., Sgroi D., Baselga J., Ra-

- maswamy S., Toner M., Haber D.A., Maheswaran S. (2013) Circulating breast tumor cells exhibit dynamic changes in epithelial and mesenchymal composition. *Science*. **339**, 580–584.
72. Raimondi C., Gradilone A., Naso G., Vincenzi B., Petracca A., Nicolazzo C., Palazzo A., Saltarelli R., Spremberg F., Cortesi E., Gazzaniga P. (2011) Epithelial-mesenchymal transition and stemness features in circulating tumor cells from breast cancer patients. *Breast Cancer Res. Treat.* **130**, 449–455.
 73. Jie X.X., Zhang X.Y., Xu C.J. (2017) Epithelial-to-mesenchymal transition, circulating tumor cells and cancer metastasis: mechanisms and clinical applications. *Oncotarget*. **8**, 81558–81571.
 74. Ryser M.D., Mallo D., Hall A., Hardman T., King L.M., Tatishchev S., Sorribes I.C., Maley C.C., Marks J.R., Hwang E.S., Shibata D. (2020). Minimal barriers to invasion during human colorectal tumor growth. *Nat. Commun.* **11**, 1280.
 75. Brabletz T., Jung A., Reu S., Porzner M., Hlubek F., Kunz-Schughart L.A., Knuechel R., Kirchner T. (2001) Variable b-catenin expression in colorectal cancers indicates tumor progression driven by the tumor environment. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **98**, 10356–10361.
 76. Hay E.D. (1991) Collagen and other matrix proteins in embryogenesis. In: *Cell Biology of the Extracellular Matrix*. Ed. Hay E.D. New York: Plenum Press.
 77. Ksiazkiewicz M., Markiewicz A., Zaczek A.J. (2012) Epithelial-mesenchymal transition, A hallmark in metastasis formation linking circulating tumor cells and cancer stem cells. *Pathobiology*. **79**, 195–208.
 78. Dasgupta A., Lim A.R., Ghajar C.M. (2017) Circulating and disseminated tumor cells: harbingers or initiators of metastasis? *Mol. Oncol.* **11**, 40–61.
 79. Tinganelli W., Durante M. (2020) Tumor hypoxia and circulating tumor cells. *Int. J. Mol. Sci.* **21**, 9592.
 80. Barrak N.H., Khajah A., Luqmani Y.A. (2020) Hypoxic environment may enhance migration/penetration of endocrine resistant MCF7- derived breast cancer cells through monolayers of other non-invasive cancer cells *in vitro*. *Sci. Rep.* **10**, 1127.
 81. Micalizzi D.S., Haber D.A., Maheswaran S. (2017) Cancer metastasis through the prism of epithelial-to-mesenchymal transition in circulating tumor cells. *Mol. Oncol.* **11**, 770–780.
 82. Fitzgerald D.M., Hastings P.J., Rosenberg S.M. (2017) Stress-induced mutagenesis: implications in cancer and drug resistance. *Annu. Rev. Cancer Biol.* **1**, 119–140.
 83. Sun H., Lu Z., Singh A., Zhou Y., Zheng E., Zhou M., Wang J., Wu X., Hu Z., Gu Z., Campbell J.L., Zheng L., Shen B. (2021) Error-prone, stress-induced 3' flap-based Okazaki fragment maturation supports cell survival. *Science*. **374**, 1252–1258.
 84. Vera-Ramirez L., Hunter K.W. (2017) Tumor cell dormancy as an adaptive cell stress response mechanism. *F1000Res*. **6**, 2134.
 85. Lambert A.W., Pattabiraman D.R., Weinberg R.A. (2017) Emerging biological principles of metastases. *Cell*. **168**, 670–691.
 86. Paoli P., Giannoni E., Chiarugi P. (2013) Anoikis molecular pathways and its role in cancer progression. *Biochim. Biophys. Acta*. **1833**, 3481–3498.
 87. Meulemans D., Bronner-Fraser M. (2004) Gene-regulatory interactions in neural crest evolution and development. *Dev. Cell*. **7**, 291–299.
 88. Пшенникова Е.С., Воронина А.С. (2019) Нервный гребень – своеобразная популяция эмбриональных клеток. *Молекуляр. биология*. **53**, 256–267.
 89. Aceto N., Toner M., Maheswaran S., Haber D.A. (2015) En route to metastasis: circulating tumor cell clusters and epithelial-to-mesenchymal transition. *Trends Cancer*. **1**, 44–52.
 90. Al-Mehdi A.B., Tozawa K., Fisher A.B., Shientag L., Lee A., Muschel R.J. (2000) Intravascular origin of metastasis from the proliferation of endothelium-attached tumor cells: a new model for metastasis. *Nat. Med.* **6**, 100–102.
 91. Goto W., Kashiwagi S., Asano Y., Takada K., Takahashi K., Hatano T., Takashima T., Tomita S., Motomura H., Ohsawa M., Hirakawa K., Ohira M. (2017) Circulating tumor cell clusters-associated gene ploglobin is a significant prognostic predictor in patients with breast cancer. *Biomark. Res.* **5**, 19.
 92. Gkoutela S., Castro-Giner F., Szczerba B.M., Vetter M., Landin J., Scherrer R., Krol I., Scheidmann M.C., Beisel C., Stirnimann C.U., Kurzeder C., Heinzelmann-Schwarz V., Rochlitz C., Weber W.P., Aceto N. (2019) Circulating tumor cell clustering shapes DNA methylation to enable metastasis seeding. *Cell*. **176**, 98–112.
 93. Au S.H., Storey B.D., Moore J.C., Tang Q., Chen Y.L., Javaid S., Sarioglu A.F., Sullivan R., Madden M.W., O'Keefe R., Haber D.A., Maheswaran S., Langenau D.M., Stott S.L., Toner M. (2016) Clusters of circulating tumor cells traverse capillary-sized vessels. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **113**, 4947–4952.
 94. Yang M.H., Imrali A., Heeschen C. (2015) Circulating cancer stem cells: the importance to select. *Chin. J. Cancer Res.* **27**, 437–449.
 95. Aceto N., Bardia A., Miyamoto D.T., Donaldson M.C., Wittner B.S., Spencer J.A., Yu M., Pely A., Engstrom A., Zhu H., Brannigan B.W., Kapur R., Stott S.L., Shioda T., Ramaswamy S., Ting D.T., Lin C.P., Toner M., Haber D.A., Maheswaran S. (2014) Circulating tumor cell clusters are oligoclonal precursors of breast cancer metastasis. *Cell*. **158**, 1110–1122.
 96. Hamidi H., Ivaska J. (2018) Every step of the way: Integrins in cancer progression and metastasis. *Nat. Rev. Cancer*. **18**, 533–548.
 97. Hoshino A., Costa-Silva B., Shen T.L., Rodrigues G., Hashimoto A., Tesic Mark M., Molina H., Kohsaka S., Di Giannatale A., Ceder S., Singh S., Williams C., Sotopon N., Uryu K., Pharmed L., King T., Bojmar L., Davies A.E., Ararso Y., Zhang T., Zhang H., Hernandez J., Weiss J.M., Dumont-Cole V.D., Kramer K., Wexler L.H., Narendran A., Schwartz G.K., Healey J.H., Sandstrom P., Labori K.J., Kure E.H., Grandgenett P.M., Hollingsworth M.A., de Sousa M., Kaur S., Jain M., Mallya K., Batra S.K., Jarnagin W.R., Brady M.S., Fodstad O., Muller V., Pantel K., Minn A.J., Bissell M.J., Garcia B.A., Kang Y., Rajasekhar V.K., Ghajar C.M., Matei I., Peinado H., Bromberg J.,

- Lyden D. (2015) Tumour exosome integrins determine organotropic metastasis. *Nature*. **527**, 329–335.
98. Nguyen D.X., Bos P.D., Massague J. (2009) Metastasis: from dissemination to organ-specific colonization. *Nat. Rev. Cancer*. **9**, 274–284.
99. Gao Y., Bado I., Wang H., Zhang W., Rosen J.M., Zhang X.H. (2019) Metastasis organotropism: redefining the congenial soil. *Dev. Cell*. **49**, 375–391.
100. Hen O., Barkan D. (2019) Dormant disseminated tumor cells and cancer stem/progenitor-like cells, similarities and opportunities. *Semin. Oncol.* **60**, 157–165.
101. Ghajar C.M. (2015) Metastasis prevention by targeting the dormant niche. *Nat. Rev. Cancer*. **15**, 238–247.
102. Guitart A.V., Hammoud M., Dello Sbarba P., Ivanovic Z., Praloran V. (2010) Slowcycling/quiescence balance of hematopoietic stem cells is related to physiological gradient of oxygen. *Exp. Hematol.* **38**, 847–851.
103. Liberti M.V., Locasale J.W. (2016) The Warburg effect: how does it benefit cancer cells? *Trends Biochem. Sci.* **41**, 211–218.
104. Pierce G.B., Speers W.C. (1988) Tumors as caricatures of the process of tissue renewal: prospects for therapy by directing differentiation. *Cancer Res.* **48**, 1996–2004.
105. Weissman I.L. (2000) Stem cells: units of development, units of regeneration, and units in evolution. *Cell*. **100**, 157–168.
106. Hannen R., Bartsch J.W. (2018) Essential roles of telomerase reverse transcriptase hTERT in cancer stemness and metastasis. *FEBS Lett.* **592**, 2023–2031.
107. Young H.E., Black A.C. (2004) Adult stem cells. *J. Anat. Rec. A Discov. Mol. Cell Evol. Biol.* **276**, 75–102.
108. Takahashi K., Yamanaka S. (2006) Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. *Cell*. **126**, 663–676.
109. Senga S.S., Grose R.P. (2021) Hallmarks of cancer—the new testament. *Open Biol.* **11**, 200358.
110. Stevanovic M., Kovacevic-Grujicic N., Mojsin M., Milivojevic M., Drakulic D. (2021) SOX transcription factors and glioma stem cells: choosing between stemness and differentiation. *World J. Stem Cells*. **13**, 1417–1445.
111. Bonnet D., Dick J.E. (1997) Human acute myeloid leukemia is organized as a hierarchy that originates from a primitive hematopoietic cell. *Nat. Med.* **3**, 730–737.
112. Carvalho J. (2020) Cell reversal from a differentiated to a stem-like state at cancer initiation. *Front. Oncol.* **10**, 541.
113. Milanovic M., Fan D.N.Y., Belenki D., Däbritz J.H.M., Zhao Z., Yu Y., Dörr J.R., Dimitrova L., Lenze D., Monteiro Barbosa I.A., Mendoza-Parra M.A., Kanashova T., Metzner M., Pardon K., Reimann M., Trumpp A., Dörken B., Zuber J., Gronemeyer H., Hummel M., Dittmar G., Lee S., Schmitt C.A. (2018) Senescence-associated reprogramming promotes cancer stemness. *Nature*. **553**, 96–100.
114. Zon L.I. (2008) Intrinsic and extrinsic control of haematopoietic stem-cell self-renewal. *Nature*. **453**, 306–313.
115. Sturmlechner I., Zhang C., Sine C.C., van Deursen E.J., Jegannathan K.B., Hamada N., Grasic J., Friedman D., Stutchman J.T., Can I., Hamada M., Lim D.Y., Lee J.H., Ordog T., Laberge R.M., Shapiro V., Baker D.J., Li H., van Deursen J.M. (2021) p21 produces a bioactive secretome that places stressed cells under immunosurveillance. *Science*. **374**, eabb3420.
116. Walcher L., Kistenmacher A.K., Suo H., Kitte R., Gluczek S., Strauß A., Blaudszun A.R., Yevsa T., Fricke S., Kossatz-Boehlert U. (2020) Cancer stem cells—origins and biomarkers: perspectives for targeted personalized therapies. *Front. Immunol.* **11**, 1280.
117. Crea F., Nur Saidy N.R., Collins C.C., Wang Y. (2015) The epigenetic/noncoding origin of tumor dormancy. *Trends Molec. Med.* **21**, 206–211.
118. Barney L.E., Hall C.L., Schwartz A.D., Parks A.N., Sparages C., Galarza S., Platt M.O., Mercurio A.M., Peyton S.R. (2020) Tumor cell-organized fibronectin maintenance of a dormant breast cancer population. *Sci. Adv.* **6**, eaaz4157.
119. Shiozawa Y., Berry J.E., Eber M.R., Jung Y., Yumoto K., Cackowski F.C., Yoon H.J., Parsana P., Mehra R., Wang J., McGee S., Lee E., Nagrath S., Pienta K.J., Taichman R.S. (2016) The marrow niche controls the cancer stem cell phenotype of disseminated prostate cancer. *Oncotarget*. **7**, 41217–41232.
120. Sosa M.S., Bragado P., Aguirre-Ghiso J.A. (2014) Mechanisms of disseminated cancer cell dormancy: an awakening field. *Nat. Rev. Cancer*. **14**, 611–622.
121. Kobayashi A., Okuda H., Xing F., Pandey P.R., Watabe M., Hirota S., Pai S.K., Liu W., Fukuda K., Chambers C., Wilber A., Watabe K. (2011) Bone morphogenetic protein 7 in dormancy and metastasis of prostate cancer stem-like cells in bone. *J. Exp. Med.* **208**, 2641–2655.
122. Yang A., Qin S., Schulte B.A., Ethier S.P., Tew K.D., Wang G.Y. (2017) MYC inhibition depletes cancer stem-like cells in triple-negative breast cancer. *Cancer Res.* **77**, 6641–6650.
123. Wei S.C., Yang J. (2016) Forcing through tumor metastasis: the interplay between tissue rigidity and epithelial-mesenchymal transition. *Trends Cell Biol.* **26**, 111–120.
124. De Cock J.M., Shibue T., Dongre A., Keckesova Z., Reinhardt F., Weinberg R.A. (2016) Inflammation triggers Zeb1-dependent escape from tumor latency. *Cancer Res.* **76**, 6778–6784.
125. Paget S. (1889) The distribution of secondary growths in cancer of the breast. *Cancer Metastasis Rev.* **8**, 98–101.
126. Schofield R. (1978) The relationship between the spleen colony-forming cell and the haemopoietic stem cell. *Blood Cell.* **4**, 7–25.
127. Ossowski L., Reich E. (1983) Changes in malignant phenotype of a human carcinoma conditioned by growth environment. *Cell*. **33**, 323–333.
128. Fu T., Dai L.J., Wu S.Y., Xiao Y., Ma D., Jiang Y.Z., Shao Z.M. (2021) Spatial architecture of the immune microenvironment orchestrates tumor immunity and therapeutic response. *J. Hematol. Oncol.* **14**, 98.

129. Korneva Yu.S., Ukrainets R.V. (2019) Principles of premetastatic niche formation. *J. Mod. Oncol.* **21**, 6–9.
130. Peinado H., Zhang H., Matei I.R., Costa-Silva B., Hoshino A., Rodrigues G., Psaila B., Kaplan R.N., Bromberg J.F., Kang Y., Bissell M.J., Cox T.R., Giaccia A.J., Ertel J.T., Hiratsuka S., Ghajar C.M., Lyden D. (2017) Pre-metastatic niches: organ-specific homes for metastases. *Nat. Rev. Cancer.* **17**, 302–317.
131. Ingangi V., Minopoli M., Ragone C., Motti M.L., Carriero M.V. (2019) Role of microenvironment on the fate of disseminating cancer stem cells. *Front. Oncol.* **9**, 82.
132. Giles A.J., Reid C.M., Evans J.D., Murgai M., Vicioso Y., Highfill S.L., Kasai M., Vahdat L., Mackall C.L., Lyden D., Wexler L., Kaplan R.N. (2016) Activation of hematopoietic stem/progenitor cells promotes immunosuppression within the pre-metastatic niche. *Cancer Res.* **76**, 1335–1347.
133. Liu Y., Cao X. (2016) Immunosuppressive cells in tumor immune escape and metastasis. *J. Mol. Med.* **94**, 509–522.
134. Peinado H., Aleckovic M., Lavotshkin S., Matei I., Costa-Silva B., Moreno-Bueno G., Hergueta-Redondo M., Williams C., Garcia-Santos G., Ghajar C., Nitadori-Hoshino A., Hoffman C., Badal K., Garcia B.A., Callahan M.K., Yuan J., Martins V.R., Skog J., Kaplan R.N., Brady M.S., Wolchok J.D., Chapman P.B., Kang Y., Bromberg J., Lyden D. (2012) Melanoma exosomes educate bone marrow progenitor cells toward a pro-metastatic phenotype through MET. *Nat. Med.* **18**, 883–891.
135. Kaplan R.N., Riba R.D., Zacharoulis S., Bramley A.H., Vincent L., Costa C., MacDonald D.D., Jin D.K., Shido K., Kerns S.A., Zhu Z., Hicklin D., Wu Y., Port J.L., Altorki N., Port E.R., Ruggero D., Shmelkov S.V., Jensen K.K., Rafii S., Lyden D. (2005) VEGFR1-positive haematopoietic bone marrow progenitors initiate the pre-metastatic niche. *Nature.* **438**, 820–827.
136. Hoshino A., Costa-Silva B., Shen T.L., Rodrigues G., Hashimoto A., Tesic Mark M., Molina H., Kohsaka S., Di Giannatale A., Ceder S., Singh S., Williams C., Sotgiu N., Uryu K., Pharmed L., King T., Bojmar L., Davies A.E., Ararso Y., Zhang T., Zhang H., Hernandez J., Weiss J.M., Dumont-Cole V.D., Kramer K., Wexler L.H., Narendran A., Schwartz G.K., Healey J.H., Sandstrom P., Labori K.J., Kure E.H., Grandgenett P.M., Hollingsworth M.A., de Sousa M., Kaur S., Jain M., Mallya K., Batra S.K., Jarnagin W.R., Brady M.S., Fodstad O., Muller V., Pantel K., Minn A.J., Bissell M.J., Garcia B.A., Kang Y., Rajasekhar V.K., Ghajar C.M., Matei I., Peinado H., Bromberg J., Lyden D. (2015) Tumour exosome integrins determine organotropic metastasis. *Nature.* **527**, 329–335.
137. Liu Y., Gu Y., Han Y., Zhang Q., Jiang Z., Zhang X., Huang B., Xu X., Zheng J., Cao X. (2016) Tumor exosomal RNAs promote lung pre-metastatic niche formation by activating alveolar epithelial TLR3 to recruit neutrophils. *Cancer Cell.* **30**, 243–256.
138. Akoto T., Saini S. (2021) Role of exosomes in prostate cancer metastasis. *Int. J. Molec. Sci.* **22**, 3528.
139. Costa-Silva B., Aiello N.M., Ocean A.J., Singh S., Zhang H., Thakur B.K., Becker A., Hoshino A., Mark M.T., Molina H., Xiang J., Zhang T., Theilens T.M., Garcia-Santos G., Williams C., Ararso Y., Huang Y., Rodrigues G., Shen T.L., Labori K.J., Lothe I.M., Kure E.H., Hernandez J., Doussot A., Ebbesen S.H., Grandgenett P.M., Hollingsworth M.A., Jain M., Mallya K., Batra S.K., Jarnagin W.R., Schwartz R.E., Matei I., Peinado H., Stanger B.Z., Bromberg J., Lyden D. (2015) Pancreatic cancer exosomes initiate pre-metastatic niche formation in the liver. *Nat. Cell. Biol.* **17**, 816–826.
140. Lin D., Chen X., Lin Z., Lin J., Liu Y., Liu D. (2021) Paper-supported co-culture system for dynamic investigations of the lung-tropic migration of breast cancer cells. *Biomed. Mater.* **16**, 025028.
141. Lin R., Wang S., Zhao R.C. (2013) Exosomes from human adipose-derived mesenchymal stem cells promote migration through Wnt signaling pathway in a breast cancer cell model. *Mol. Cell. Biochem.* **383**, 13–20.
142. Abravanel D.L., Belka G.K., Pan T.C., Pant D.K., Collins M.A., Sterner C.J., Chodosh L.A. (2015) Notch promotes recurrence of dormant tumor cells following HER2/neu-targeted therapy. *J. Clin. Invest.* **125**, 2484–2496.
143. Capulli M., Hristova D., Valbret Z., Carys K., Arjan R., Maurizi A., Masedu F., Cappariello A., Rucci N., Teti A. (2019) Notch2 pathway mediates breast cancer cellular dormancy and mobilisation in bone and contributes to haematopoietic stem cell mimicry. *Br. J. Cancer.* **121**, 157–171.
144. Yamazaki S., Iwama A., Takayanagi S., Eto K., Ema H., Nakauchi H. (2009) TGF-beta as a candidate bone marrow niche signal to induce hematopoietic stem cell hibernation. *Blood.* **113**, 1250–1256.
145. Lawson M.A., McDonald M.M., Kovacic N., Hua Khoo W., Terry R.L., Down J., Kaplan W., Paton-Hough J., Fellows C., Pettitt J.A., Neil Dear T., Van Valckenborgh E., Baldock P.A., Rogers M.J., Eaton C.L., Vanderkerken K., Pettit A.R., Quinn J.M., Zannettino A.C., Phan T.G., Croucher P.I. (2015) Osteoclasts control reactivation of dormant myeloma cells by remodelling the endosteal niche. *Nat. Commun.* **6**, 8983.
146. Lu X., Mu E., Wei Y., Riethdorf S., Yang Q., Yuan M., Yan J., Hua Y., Tiede B.J., Lu X., Haffty B.G., Pantel K., Massagué J., Kang Y. (2011) VCAM-1 promotes osteolytic expansion of indolent bone micrometastasis of breast cancer by engaging $\alpha 4 \beta 1$ -positive osteoclast progenitors. *Cancer Cell.* **20**, 701–714.
147. Weilbaecher K.N., Guise T.A., McCauley L.K. (2011) Cancer to bone: a fatal attraction. *Nat. Rev. Cancer.* **11**, 411–425.
148. Luo X., Fu Y., Loza A.J., Murali B., Leahy K.M., Ruhland M.K., Gang M., Su X., Zamani A., Shi Y., Lavine K.J., Ornitz D.M., Weilbaecher K.N., Long F., Novack D.V., Faccio R., Longmore G.D., Stewart S.A. (2016) Stromal-initiated changes in the bone promote metastatic niche development. *Cell Rep.* **14**, 82–92.
149. Gao H., Chakraborty G., Lee-Lim A.P., Mo Q., Decker M., Vonica A., Shen R., Brogi E., Brivanlou A.H., Giancotti F.G. (2012) The BMP inhibitor

- Coco reactivates breast cancer cells at lung metastatic sites. *Cell*. **150**, 764–779.
150. Ruppender N., Larson S., Lakely B., Kollath L., Brown L., Coleman I., Coleman R., Nguyen H., Nelson P.S., Corey E., Snyder L.A., Vessella R.L., Morrissey C., Lam H.M. (2015) Cellular adhesion promotes prostate cancer cells escape from dormancy. *PLoS One*. **10**, e0130565.
 151. Trumpp A., Essers M., Wilson A. (2010) Awakening dormant haematopoietic stem cells. *Nat. Rev. Immunol.* **10**, 201–209.
 152. Decker A.M., Jung Y., Cackowski F., Taichman R.S. (2016) The role of hematopoietic stem cell niche in prostate cancer bone metastasis. *J. Bone Oncol.* **5**, 117–120
 153. Kunisaki Y., Bruns I., Scheiermann C., Ahmed J., Pinho S., Zhang D., Mizoguchi T., Wei Q., Lucas D., Ito K., Mar J.C., Bergman A., Frenette P.S. (2013) Arteriolar niches maintain haematopoietic stem cell quiescence. *Nature*. **502**, 637–643.
 154. Hoshida R., Jandial R. (2017) The role of the neural niche in brain metastasis. *Clin. Exp. Metastasis*. **34**, 369–376.
 155. Zeng Q., Michael I.P., Zhang P., Saghafinia S., Knott G., Jiao W., McCabe B.D., Galván J.A., Robinson H.P.C., Zlobec I., Ciriello G., Hanahan D. (2019) Synaptic proximity enables NMDAR signalling to promote brain metastasis. *Nature*. **573**, 526–531.
 156. Agudo J., Park E.S., Rose S.A., Alibo E., Sweeney R., Dhainaut M., Kobayashi K.S., Sachidanandam R., Baccarini A., Merad M., Brown B.D. (2018) Quiescent tissue stem cells evade immune surveillance. *Immunity*. **48**, 271–285.
 157. Vera-Ramirez L., Vodnala S.K., Nini R., Hunter K.W., Green, J.E. (2018) Autophagy promotes the survival of dormant breast cancer cells and metastatic tumour recurrence. *Nat. Commun.* **9**, 1944.
 158. La Belle Flynn A., Calhoun B.C., Sharma A., Chang J.C., Almasan A., Schiemann W.P. (2019) Autophagy inhibition elicits emergence from metastatic dormancy by inducing and stabilizing Pfkfb3 expression. *Nat. Commun.* **10**, 3668.
 159. Aguirre-Ghiso J.A. (2018) How dormant cancer persists and reawakens. *Science*, **361**, 1314–1315.
 160. Fessler E., Dijkgraaf F.E., De Sousa E.M.F., Medema J.P. (2013) Cancer stem cell dynamics in tumor progression and metastasis: is the microenvironment to blame? *Cancer Lett.* **341**, 97–104.
 161. Carlson P., Dasgupta A., Grzelak C.A., Kim J., Barrett A., Coleman I.M., Shor R.E., Goddard E.T., Dai J., Schweitzer E.M., Lim A.R., Crist S.B., Cheresh D.A., Nelson P.S., Hansen K.C., Ghajar C.M. (2019) Targeting the perivascular niche sensitizes disseminated tumour cells to chemotherapy. *Nat. Cell. Biol.* **21**, 238–250.
 162. Price T.T., Burness M.L., Sivan A., Warner M.J., Cheng R., Lee C.H., Olivere L., Comatas K., Magnani J., Kim Lyerly H., Cheng Q., McCall C.M., Sipkins D.A. (2016) Dormant breast cancer micrometastases reside in specific bone marrow niches that regulate their transit to and from bone. *Sci. Transl. Med.* **8**, 340ra73.
 163. Zhao L., Zhang K., He H., Yang Y., Li W., Liu T., Li J. (2021) The relationship between mesenchymal stem cells and tumor dormancy. *Front. Cell. Dev. Biol.* **9**, 731393.
 164. Postovit L.M., Margaryan N.V., Seftor E.A., Kirschmann D.A., Lipavsky A., Wheaton W.W., Abbott D.E., Seftor R.E., Hendrix M.J. (2008) Human embryonic stem cell microenvironment suppresses the tumorigenic phenotype of aggressive cancer cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **105**, 4329–4934.
 165. Saad N., Alberio R., Johnson A.D., Emes R.D., Giles T.C., Clarke P., Grabowska A.M., Allegrucci C. (2018) Cancer reversion with oocyte extracts is mediated by cell cycle arrest and induction of tumour dormancy. *Oncotarget*. **9**, 16008–16027.
 166. Weidenfeld K., Barkan D. (2018) EMT and stemness in tumor dormancy and outgrowth: are they intertwined processes? *Front. Oncol.* **8**, 381.
 167. Hsu S.K., Chiu C.C., Dahms H.U., Chou C.K., Cheng C.M., Chang W.T., Cheng K.C., Wang H.D., Lin I.L. (2019) Unfolded protein response (upr) in survival, dormancy, immunosuppression, metastasis, and treatments of cancer cells. *Int. J. Mol. Sci.* **20**, 2518.
 168. Aguirre Ghiso J.A., Kovalski K., Ossowski L. (1999) Tumor dormancy induced by downregulation of urokinase receptor in human carcinoma involves integrin and MAPK signaling. *J. Cell. Biol.* **147**, 89–104.
 169. Walker C., Mojares E., Del Rio Hernandez A. (2018) Role of extracellular matrix in development and cancer progression. *Int. J. Mol. Sci.* **19**, 3028.
 170. Poltavets V., Kochetkova M., Pitson S.M., Samuel M.S. (2018) The role of the extracellular matrix and its molecular and cellular regulators in cancer cell plasticity. *Fron. Oncol.* **8**, 431.
 171. Talukdar S., Bhoopathi P., Emdad L., Das S., Sarkar D., Fisher P.B. (2019) Dormancy and cancer stem cells: an enigma for cancer therapeutic targeting. *Adv. Cancer Res.* **141**, 43–84.
 172. Malanchi I., Santamaria-Martínez A., Susanto E., Peng H., Lehr H.A., Delaloye J.F., Huelsken J. (2011) Interactions between cancer stem cells and their niche govern metastatic colonization. *Nature*. **481**, 85–89.
 173. Oskarsson T., Batlle E., Massague J. (2014) Metastatic stem cells: sources, niches, and vital pathways. *Cell Stem Cell*. **14**, 306–321.
 174. Ghajar C.M., Peinado H., Mori H., Matei I.R., Evason K.J., Brazier H., Almeida D., Koller A., Hajjar K.A., Stainier D.Y., Chen E.I., Lyden D., Bissell M.J. (2013) The perivascular niche regulates breast tumour dormancy. *Nat. Cell. Biol.* **15**, 807–817.
 175. Locatelli F., Nazio F., Bordi M., Cianfanelli V., Cecconi F. (2019) Autophagy and cancer stem cells: molecular mechanisms and therapeutic applications. *Cell. Death Differ.* **26**, 690–702.
 176. Sosa M.S., Bragado P., Debnath J., Aguirre-Ghiso J.A. (2013) Regulation of tumor cell dormancy by tissue

- microenvironments and autophagy. *Adv. Exp. Med. Biol.* **734**, 73–89.
177. Akkoc Y., Peker N., Akcay A., Gozuacik D. (2021) Autophagy and cancer dormancy. *Front. Oncol.* **11**, 627023.
 178. Domingo-Domenech J., Vidal S.J., Rodriguez-Bravo V., Castillo-Martin M., Quinn S.A., Rodriguez-Barreco R., Bonal D.M., Charytonowicz E., Gladoun N., de la Iglesia-Vicente J., Petrylak D.P., Benson M.C., Silva J.M., Cordon-Cardo C. (2012) Suppression of acquired docetaxel resistance in prostate cancer through depletion of notch- and hedgehog-dependent tumor-initiating cells. *Cancer Cell.* **22**, 373–388.
 179. Heidel F.H., Bullinger L., Feng Z., Wang Z., Neff T.A., Stein L., Kalaitzidis D., Lane S.W., Armstrong S.A. (2012) Genetic and pharmacologic inhibition of β -catenin targets imatinib-resistant leukemia stem cells in CML. *Cell Stem Cell.* **10**, 412–424
 180. Steinbichler T.B., Dudás J., Skvortsov S., Ganswindt U., Riechelmann H., Skvortsova I.I. (2018) Therapy resistance mediated by cancer stem cells. *Semin. Cancer Biol.* **53**, 156–167.
 181. Urra H., Hetz C. (2014) A novel ER stress-independent function of the UPR in angiogenesis. *Mol. Cell.* **54**, 542–544.
 182. Baeriswyl V., Christofori G. (2009) The angiogenic switch in carcinogenesis. *Semin. Cancer Biol.* **19**, 329–337.
 183. Almog N., Ma L., Raychowdhury R., Schwager C., Erber R., Short S., Hlatky L., Vajkoczy P., Huber P.E., Folkman J., Abdollahi A. (2009) Transcriptional switch of dormant tumors to fast-growing angiogenic phenotype. *Cancer Res.* **69**, 836–844.
 184. Naumov G.N., Folkman J., Straume O. (2009) Tumor dormancy due to failure of angiogenesis: role of the microenvironment. *Clin. Exp. Metastasis.* **26**, 51–60.
 185. Zhao H., Wu L., Yan G., Chen Y., Zhou M., Wu Y., Li Y. (2021) Inflammation and tumor progression: signaling pathways and targeted intervention. *Signal Transduct. Target Ther.* **6**, 263.
 186. Nishida J., Momoi Y., Miyakuni K., Tamura Y., Takahashi K., Koinuma D., Miyazono K., Ehata S. (2020) Epigenetic remodelling shapes inflammatory renal cancer and neutrophil-dependent metastasis. *Nat. Cell Biol.* **22**, 465–475.
 187. Nolan E., Bridgeman V.L., Ombrato L., Karoutas A., Rabas N., Sewneth C.A.N., Vasquez M., Rodrigues F.S., Horswell S., Faull P., Carter R., Malanchi I. (2022) Radiation exposure elicits a neutrophil-driven response in healthy lung tissue that enhances metastatic colonization. *Nat. Cancer.* **3**, 173–187.
 188. Barkan D., El Touny L.H., Michalowski A.M., Smith J.A., Chu I., Davis A.S., Webster J.D., Hoover S., Simpson R.M., Gauldie J., Green J.E. (2010) Metastatic growth from dormant cells induced by a col-I-enriched fibrotic environment. *Cancer Res.* **70**, 5706–5716.
 189. Cox T.R., Bird D., Baker A.M., Barker H.E., Ho M.W., Lang G., Erler J.T. (2013) LOX-mediated collagen crosslinking is responsible for fibrosis-enhanced metastasis. *Cancer Res.* **73**, 1721–1732.
 190. Weidenfeld K., Schiff-Zuck S., Abu-Tayeh H., Kang K., Kessler O., Weissmann M., Neufeld G., Barkan D. (2016) Dormant tumor cells expressing LOXL2 acquire a stem-like phenotype mediating their transition to proliferative growth. *Oncotarget.* **7**, 71362–71377.
 191. Albregues J., Shields M.A., Ng D., Park C.G., Ambrico A., Poindexter M.E., Upadhyay P., Uyemina-mi D.L., Pommier A., Küttner V., Bružas E., Maiorino L., Bautista C., Carmona E.M., Gimotty P.A., Fearon D.T., Chang K., Lyons S.K., Pinkerton K.E., Trotman L.C., Goldberg M.S., Yeh J.T., Egeblad M. (2018) Neutrophil extracellular traps produced during inflammation awaken dormant cancer cells in mice. *Science.* **361**, eaao4227.
 192. Bickett T.E., Karam S.D. (2020) Tuberculosis-cancer parallels in immune response regulation. *Int. J. Mol. Sci.* **21**, 6136.
 193. Liu K., Sun E., Lei M., Li L., Gao J., Nian X., Wang L. (2019) BCG-induced formation of neutrophil extracellular traps play an important role in bladder cancer treatment. *Clin. Immunol.* **201**, 4–14.
 194. Krall J.A., Reinhardt F., Mercury O.A., Pattabiraman D.R., Brooks M.W., Dougan M., Lambert A.W., Bierie B., Ploegh H.L., Dougan S.K., Weinberg R.A. (2018) The systemic response to surgery triggers the outgrowth of distant immune-controlled tumors in mouse models of dormancy. *Sci. Transl. Med.* **10**, eaan3464.
 195. Klein C.A. (2009) Parallel progression of primary tumours and metastases. *Nat. Rev. Cancer.* **9**, 302–312.
 196. Buell J.F., Beebe T.M., Trofe J., Gross T.G., Alloyd R.R., Hanaway M.J., Woodle E.S. (2004) Donor transmitted malignancies. *Ann. Transplant.* **9**, 53–56.
 197. Wang H.-F., Wang S.-S., Huang M.-C., Liang X.-H., Tang Y.-J., Tang Y.-L. (2019) Targeting immune-mediated dormancy: a promising treatment of cancer. *Front. Oncol.* **9**, 498.
 198. Sosa M.S., Valderas A.A., Bragado P., Wen H.C., Aguirre-Ghiso J.A. (2011) ERK1/2 and p38 α / β signaling in tumor cell quiescence: opportunities to control dormant residual disease. *Clin. Cancer Res.* **17**, 5850–5857.
 199. Correia A.L., Guimaraes J.C., Auf der Maur P., De Silva D., Trefny M.P., Okamoto R., Bruno S., Schmidt A., Mertz K., Volkmann K., Terracciano L., Zippelius A., Vetter M., Kurzeder C., Weber W.P., Bentires-Alj M. (2021) Hepatic stellate cells suppress NK cell-sustained breast cancer dormancy. *Nature.* **594**, 566–571.
 200. Yi J.S., Cox M.A., Zajac A.J. (2010) T-cell exhaustion: characteristics, causes and conversion. *Immunology.* **129**, 474–481
 201. Philip M., Schietinger A. (2022) CD8⁺ T cell differentiation and dysfunction in cancer. *Nat. Rev. Immunol.* **22**, 209–223. <https://doi.org/10.1038/s41577-021-00574-3>
 202. Zheng L., Qin S., Si W., Wang A., Xing B., Gao R., Ren X., Wang L., Wu X., Zhang J., Wu N., Zhang N., Zheng H., Ouyang H., Chen K., Bu Z., Hu X., Ji J., Zhang Z. (2021) Pan-cancer single-cell landscape of tumor-infiltrating T cells. *Science.* **374**, abe6474.

DORMANCY: THERE AND BACK AGAIN**E. S. Pshennikova¹, * and A. S. Voronina¹**

¹ *Bach Institute of Biochemistry, Research Center of Biotechnology, Russian Academy of Sciences, Moscow, 119071 Russia*
*e-mail: pshennikova57@mail.ru

Many cells are capable of maintaining viability in a non-dividing state with minimal metabolism under unfavorable conditions. These are germ cells, adult stem cells, microorganisms. Unfortunately, in such a state of repose or dormancy, there may occur tuberculosis bacilli in the latent form of the disease, and cancer cells that later form secondary tumors-metastases in different parts of the body. These cells are resistant to therapy that can destroy actively dividing cells, and to the host's immune system. The cascade of reactions providing entry and exit from the dormancy state is triggered by the activity of regulatory factors from the microenvironment in the niches, harboring such cells. It is the ratio of forbidding and permitting signals that dictates whether the cells become dormant or start proliferation. The only difference between the processes of cell dormancy regulation in norm and pathology is that pathogens, mycobacterial and cancer cells, themselves can influence their own fate by changing actively their microenvironment. Some mechanisms of these processes are presented in this review.

Keywords: tumor cells, *Mycobacterium tuberculosis*, dormancy, metastases, mesenchymal stem cells, metastatic niches

УДК 572.21857.052.6

ТРАНСКРИПЦИОННЫЙ ФАКТОР Sp1 В РЕГУЛЯЦИИ ЭКСПРЕССИИ ГЕНОВ, КОДИРУЮЩИХ КОМПОНЕНТЫ СИГНАЛЬНЫХ ПУТЕЙ MAPK, JAK/STAT И PI3K/Akt

© 2022 г. К. А. Иваненко^а, В. С. Прасолов^а, Э. Р. Хабушева^а, *^аИнститут молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта Российской академии наук, Москва, 119991 Россия

*e-mail: vr.elmira@gmail.com

Поступила в редакцию 18.03.2022 г.

После доработки 15.04.2022 г.

Принята к публикации 17.04.2022 г.

Транскрипционный фактор Sp1, входящий в семейство белков Sp/KLF, связывает GC-богатые участки регуляторных областей генов и участвует в регуляции пролиферации, апоптоза и дифференцировки клеток, а также ангиогенеза. Высокий уровень экспрессии гена *SP1* и нарушение транскрипционной активности кодируемого им белка, обусловленные посттрансляционными модификациями, обнаруживают при раке молочной, поджелудочной и щитовидной железы, раке легкого и желудка, в глиомах, а также при врожденном пороке сердца и нейродегенеративных заболеваниях, включая болезни Гентингтона и Паркинсона. Связываясь с GC-богатыми участками регуляторных областей генов, кодирующих компоненты сигнальных путей MAPK, p38, JAK/STAT, PI3K/Akt, Sp1 участвует в контроле пролиферации, дифференцировки и гибели клеток. Кроме того, киназы, входящие в состав этих сигнальных путей, способны влиять на транскрипционную активность Sp1 путем фосфорилирования определенных аминокислотных остатков, что приводит к изменению эффективности его связывания с кофакторами и регуляторными областями генов. В обзоре представлены данные о взаимосвязи фактора Sp1 с активностью сигнальных путей MAPK, p38, JAK/STAT и PI3K/Akt в норме и при различных патологиях, включая злокачественные заболевания.

Ключевые слова: транскрипционный фактор Sp1, злокачественные заболевания, сигнальные пути**DOI:** 10.31857/S0026898422050081

ВВЕДЕНИЕ

Белок Sp1 входит в семейство Sp-подобных белков/KLF (Krüppel-like factor) — факторов транскрипции с доменами типа “цинковых пальцев” Cys_2His_2 , которые связывают GC-богатые участки в регуляторных областях генов [1]. Белки Sp1, Sp3 и Sp4 содержат два трансактивационных домена, обогащенных остатками глутамина, что отличает их от белка Sp2, у которого такой домен всего один. Sp1 и Sp3 обнаружены во всех тканях человека, а Sp4 находится преимущественно в нейронных клетках. Sp1 человека состоит из 785 аминокислотных остатков и имеет молекулярную массу 81 кДа. Гомологи белка Sp1 и других белков этого семейства найдены в клетках большого числа организмов, включая нематод, мышей, крыс, полосатого данио (*Danio rerio*), кроликов.

Фактор Sp1 необходим для нормального эмбрионального [2] и постнатального развития; он регулирует процессы пролиферации и апоптоза [4, 5], ангиогенеза [5] и дифференцировки [7–9]. Кроме того, Sp1 вовлечен в развитие противовирусного клеточного ответа, в том числе посред-

ством связывания с вирусными промоторами [2, 10–12]. Обнаружено, что аномальная сверхэкспрессия гена *SP1*, а также нарушение транскрипционной активности кодируемого им белка связаны с развитием нейродегенеративных заболеваний, таких как болезни Гентингтона [11] и Паркинсона [12]; онкологических заболеваний, включая рак легкого [13], поджелудочной железы [14], молочной железы [15], желудка [16], щитовидной железы [17] и глиому [18]. На данный момент подавление транскрипционной активности Sp1 низкомолекулярными соединениями рассматривают как один из многообещающих подходов к терапии злокачественных заболеваний человека [19].

В обзоре представлены данные об участии Sp1 в регуляции экспрессии генов, кодирующих компоненты сигнальных путей MAPK, p38, JAK/STAT и PI3K/Akt, а также о том, как активность этих сигнальных каскадов связана с транскрипционной активностью белка Sp1 в клетках человека и животных в норме и при ряде патологий, включая злокачественные заболевания человека.

Sp1 И МАР-КИНАЗНЫЙ СИГНАЛЬНЫЙ ПУТЬ ERK

Сигнальные пути, включающие митоген-активируемые протеинкиназы (МАР-киназы, МАРК), регулируют такие клеточные процессы, как пролиферация, дифференцировка, апоптоз, ответ на стресс и выживание клеток [20]. Охарактеризованы четыре основных МАРК-пути: ERK, JNK/SAPK, ERK/BMK1 и p38 [21]. Активация сигнального пути ERK происходит в несколько этапов: сначала лиганд взаимодействует с рецепторной тирозинкиназой, которая активирует малый G-белок (RAS). Затем происходит последовательное фосфорилирование протеинкиназ RAF (серин/треониновая протеинкиназа), MEK (киназа МАРК), ERK1/2 (внеклеточные сигнал-регулируемые киназы 1 и 2) [22]. Киназы ERK1 и ERK2 активируют киназу рибосомного белка S6 (RSK), протеинкиназу, активируемую митогенами и стрессом (MSK), и взаимодействующую с МАРК киназу (MNK) [23]. В злокачественных клетках 30% пациентов с такими заболеваниями, как аденокарцинома поджелудочной железы, рак толстой кишки, легкого, щитовидной железы и миелоидный лейкоз, обнаруживают активирующие мутации в гене *RAS* [26, 27] и генах *RAF*, *MEK*, *ERK* [26]. Поэтому компоненты МАР-киназного пути рассматривают в качестве перспективных мишеней противоопухолевых препаратов [20]. Компоненты сигнального пути МАРК направляют ДНК-связывающую и транскрипционную активность Sp1 посредством фосфорилирования, гликозилирования и ацетилирования этого белка. Например, фосфорилирование Sp1 киназой ERK2 приводит к увеличению его ДНК-связывающей способности. Кроме того, фактор Sp1 участвует в регуляции экспрессии генов, кодирующих компоненты сигнального пути МАРК/ERK, влияя тем самым на его активность.

Сверхэкспрессия онкогена *Ha-ras* в фибробластах NIH-3T3 мыши приводит к снижению уровня экспрессии гена *Reck*, который кодирует одноименный цистеин-богатый белок с Kazal-мотивами, ингибирующий метастазирование опухоли за счет подавления активности металлопротеазы 9 (MMP9) [29, 30] (рис. 1). Показано, что в ходе RAS-зависимого фосфорилирования ретинобластома-связывающий белок 7 (RbAp46) формирует комплекс с гистоновой деацетилазой HDAC1 и белком Sp1 и подавляет экспрессию гена *Reck*. Одновременно в таких клетках повышается активность MMP9, что приводит к усилению метастазирования злокачественных клеток *in vivo*. Показано, что Sp1 и RAS с онкогенным потенциалом (*Ha-Ras^{Leu61}*) увеличивают экспрессию гена белка группы высокой подвижности A1 (*HMGAI*) в клетках рака толстой кишки человека HCT116,

но прямого взаимодействия Sp1 с RAS не обнаружено [29] (рис. 1).

В эпителиальных клетках молочной железы человека эффективность связывания Sp1 с промоторным участком гена интегрин 2 (*ITGA2*) снижается в ответ на сверхэкспрессию онкогена *v-RAS* и гена рецептора эпидермального фактора роста типа 2 (*ERBB2*), что приводит к снижению уровня мРНК гена *ITGA2* [30]. Показано, что нокаут генов *SP1*, *SP2* и *SP3* в перевиваемых клетках Panc28 и L3.6pL рака поджелудочной железы человека приводит к снижению в них доли активной киназы RAS за счет снижения уровня экспрессии генов рецепторных тирозинкиназ EGFR и IGF-1R, экспрессия которых регулируется белками Sp1–3 [31] (рис. 1).

Экспрессия гена, кодирующего белок-ингибитор киназы RAF (*PEBP1*), снижена в клетках злокачественных опухолей человека, таких как меланома [32], гепатоцеллюлярная карцинома [33] и рак молочной железы [34]. В этом процессе участвует фактор транскрипции Sp1, так как нокаут *SP1* приводит к снижению активности промотора *PEBP1* [35] (рис. 1).

Известно, что главными мишенями киназы ERK являются транскрипционные факторы Elk-1 (ETS-подобный белок 1) и SAP-1 (SRF-вспомогательный белок 1) [36]. Киназа ERK2 фосфорилирует Sp1, что приводит к увеличению эффективности связывания этого транскрипционного фактора с целевыми участками ДНК [37]. Показано, что в опухолевых клетках с мутациями в генах киназы RAF (*B-RAF^{V600E}*) и опухолевого супрессора p53 (*TP53*) Sp1 может запускать экспрессию гена ингибитора циклинзависимой киназы 1 p21^{CIP1} (*CDKN1A*). Снижение количества морталина (шаперона семейства белков теплового шока Hsp70), вызывает гиперактивацию MEK/ERK в опухолевых клетках с этими мутациями, что приводит к увеличению экспрессии *CDKN1A* за счет белка p53. Активатором транскрипции *CDKN1A* в клетках с мутацией *TP53* является Sp1 [38]. Компоненты МАР-киназного пути могут фосфорилировать белок Sp1, что приводит к Sp1-зависимой активации транскрипции: в клетках HeLa (рак шейки матки) и LNCaP (аденокарцинома предстательной железы) активированный Sp1 участвует в транскрипции гена урокиназы человека (*PLAU*) [39]. В клетках тератокарциномы ATDC5, обработанных интерлейкином 1 (IL-1), Sp1 вовлечен в транскрипцию гена морфогенетического белка кости 2 (*BMP-2*) [40]; в клетках острого миелоидного лейкоза Kgl Sp1 регулирует экспрессию гена сурвивина (*BIRC5*), связанного с устойчивостью раковых клеток к противоопухолевым препаратам [41]. Также МАР-киназный путь ингибирует транскрипцию гена белка тепло-

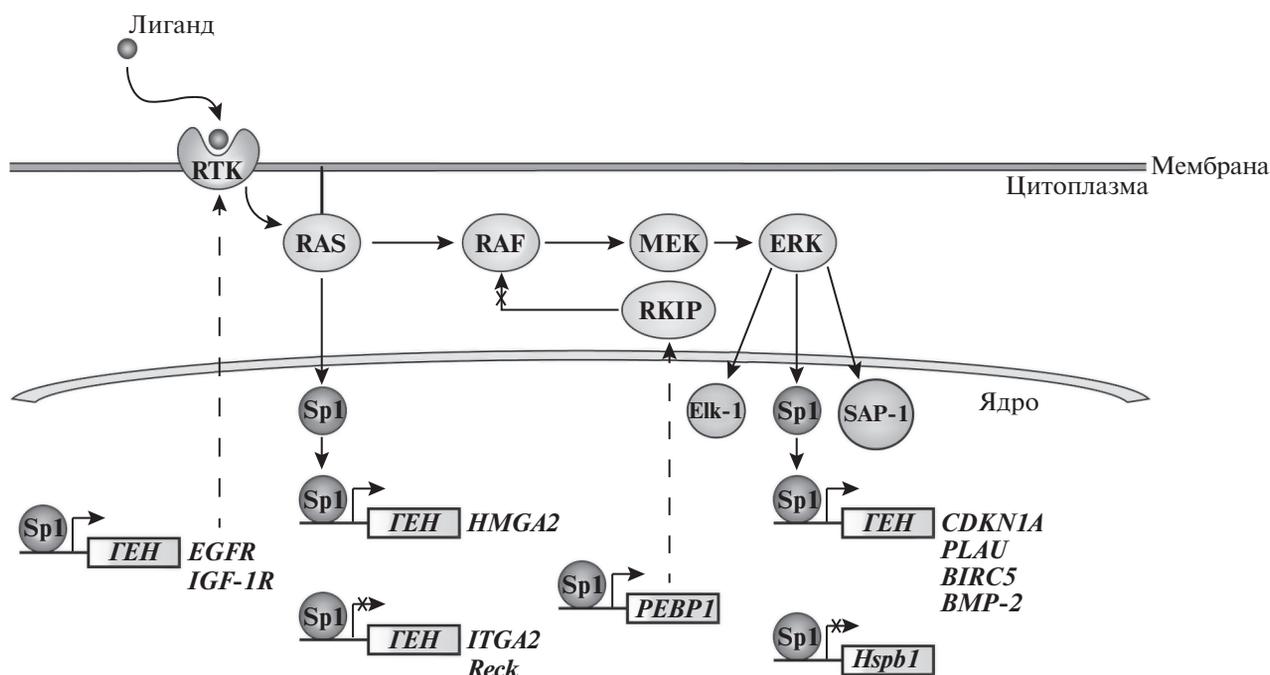


Рис. 1. Влияние MAP-киназного сигнального пути на транскрипционную активность Sp1. РТК – рецепторные тирозинкиназы; RAS – малый G-белок, RAF – серин/треониновая протеинкиназа; MEK – киназа митоген-активируемой протеинкиназы; ERK – внеклеточная сигнал-регулируемая киназа; RKIP – белок-ингибитор киназы RAF; Elk-1 (ETS-подобный белок 1) и SAP-1 (SRF-вспомогательный белок 1) – транскрипционные факторы; *HMG2* – ген белка группы высокой подвижности А1, *EGFR* – ген рецептора эпидермального фактора роста; *IGF-1R* – ген рецептора инсулиноподобного фактора роста 1; *ITGA2* – ген интегрин 2; *Reck* – ген цистеин-богатого белка, содержащего Kazal-мотивы и индуцирующего обратные мутации; *PEBP1* – ген белка RKIP; *CDKN1A* – ген ингибитора циклинзависимой киназы 1; *PLAU* – ген урокиназы; *BIRC5* – ген сурвивина; *BMP-2* – ген морфогенетического белка кости 2; *Hspb1* – ген белка теплового шока В1. Пунктирными линиями показан процесс выхода мРНК из ядра для синтеза белков.

вого шока В1 (*Hspb1*) в астроцитах мыши вследствие фосфорилирования белка Sp1 [42] (рис. 1).

Sp1 И MAP-СИГНАЛЬНЫЙ ПУТЬ P38

К MAP-киназным путям относится сигнальный каскад, включающий митоген-активируемые протеинкиназы p38. Активность этих киназ изменяется в условиях теплового и осмотического шока, взаимодействия клетки с провоспалительными цитокинами (фактор некроза опухоли- β (TNF) и IL-1), факторами роста (макрофагальный колониестимулирующий фактор (CSF-1)) и при воздействии ультрафиолета. Киназы p38 участвуют в регуляции клеточного цикла, дифференцировки клеток, апоптоза, аутофагии, супрессии опухолей и гипертрофии кардиомиоцитов [21]. Активировать киназы MAPK (МКК) могут различные белки: киназа 1, регулирующая сигналы апоптоза (ASK1) [43], белок DLK1 [44], активируемая трансформирующим фактором роста (TGF) киназа 1 (ТАК1) [45]. Три МКК фосфорилируют p38: МКК6 фосфорилирует все четыре изоформы p38, МКК3 – все изоформы, кроме p38 β и МКК4 – p38 α [46]. Нарушение активности сигнального пути p38 связывают с развитием нейродегенера-

тивных заболеваний (болезни Альцгеймера [47], Гентингтона [48] и Паркинсона [49], боковой амиотрофический склероз [50], рассеянный склероз [51]), аутоиммунных заболеваний (ревматоидный артрит [52], болезнь Крона [53], псориаз [54]), бронхиальной астмы [55], сахарного диабета типа 2 [56]) и онкозаболеваний. Ингибиторы p38, такие как BIRB796 и ARRY-614, проходят клинические испытания в качестве средств для лечения болезни Крона, хронической обструктивной болезни легких, миелодиспластического синдрома, сердечно-сосудистых и других заболеваний [57].

Протеинкиназа p38 фосфорилирует белок Sp1, активируя его в клетках различного происхождения, таких как клетки моноцитарного лейкоза человека THP-1 [58], нейробластомы человека SH-SY5Y и кортикальные нейроны крысы [59], эпителиальные клетки бронхов человека [60], эндотелиальные клетки пуповины человека [61], клетки аденокарциномы протоков поджелудочной железы человека [62] (рис. 2a).

Фосфорилирование фактора Sp1 киназой p38 приводит к повышению его ДНК-связывающей и транскрипционной активности и, как следствие,

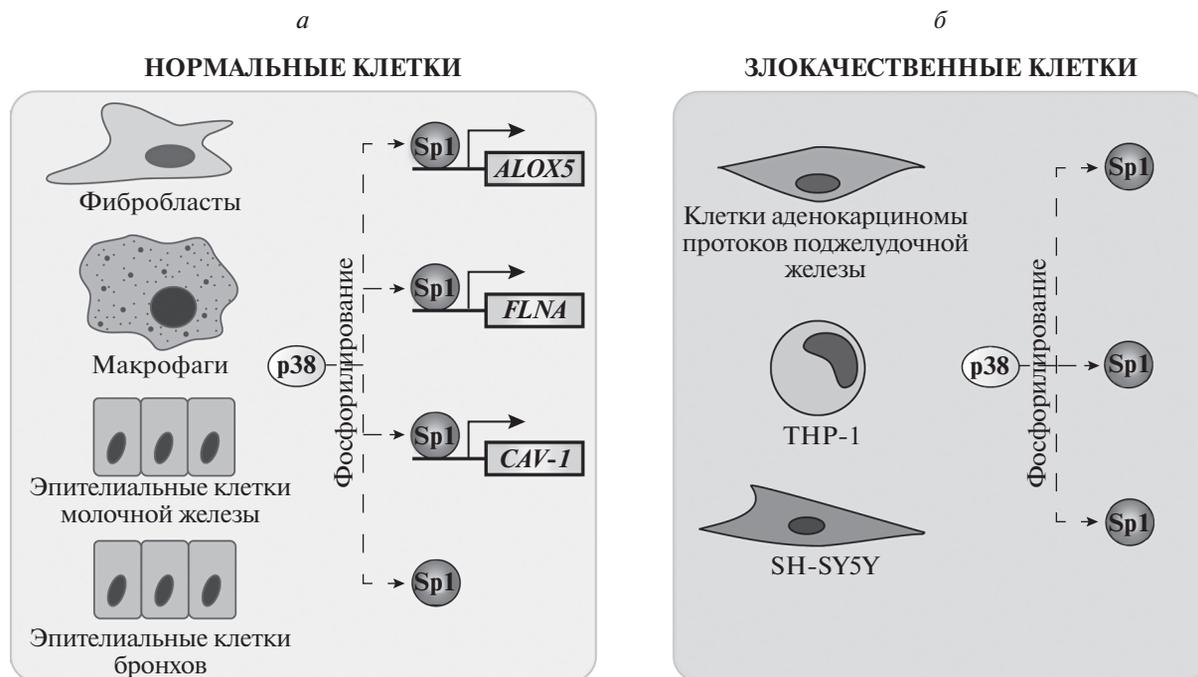


Рис. 2. p38-зависимое фосфорилирование белка Sp1 и транскрипция контролируемых Sp1 генов в клетках человека. *а* – Активация белка Sp1 и транскрипция Sp1-контролируемых генов в нормальных клетках человека. *б* – Активация белка Sp1 в злокачественных клетках человека. Экспрессию указанных генов (*FLNA* – ген филамина А, *ALOX5* – ген 5-липоксигеназы, *CAV-1* – ген кавеолина-1) регулирует фосфорилированный белком p38 транскрипционный фактор Sp1.

к увеличению экспрессии Sp1-зависимых генов: в фибробластах активируется транскрипция гена филамина А (*FLNA*) [63], в макрофагах – гена 5-липоксигеназы (*ALOX5*) [64], в клетках эпителия молочной железы человека – гена кавеолина-1 (*CAV-1*) [65] (рис. 2*а*). Фосфорилирование киназы MAPK-киназы (МККК) в результате связывания нейротропного фактора мозга (BDNF) с его рецептором TrkB в клетках хондросаркомы приводит к увеличению эффективности связывания Sp1 с промотором гена *MMP-1*, вовлеченного в регуляцию инвазии клеток [66].

Sp1 И СИГНАЛЬНЫЙ ПУТЬ JAK/STAT

Интерлейкины, интерфероны, фактор роста макрофагов CSF1, адапторные сигнальные молекулы STAM1 и STAM2, белок StIP, взаимодействующий со STAT, и семейство белков SH2B/Lnk/APS вовлечены в активацию сигнального пути JAK/STAT [69, 70]. Известны негативные регуляторы активности сигнального пути JAK/STAT – супрессоры цитокиновых сигналов (SOCS), белки-ингибиторы активированных STAT (PIAS) и протеин-тирозин-фосфатазы (PTP) [67]. Сигнальный путь JAK/STAT играет важную роль в гемопоэзе, образовании стволовых клеток, развитии иммунной системы, а также в пролиферации, дифференцировке, миграции клеток и регуляции апоптоза [71, 72].

Главными компонентами этого сигнального пути являются два семейства белков: JAK и STAT. В семейство JAK входят тирозинкиназы JAK1, JAK2, JAK3 и TYK2; к семейству STAT относятся факторы транскрипции STAT1, STAT2, STAT3, STAT4, STAT5 (имеет две изоформы а и б) и STAT6 [67]. В настоящее время ингибиторы киназ JAK/STAT-пути применяют при таких заболеваниях, как миелодиспластический синдром [71], ревматоидный артрит [72]; они проходят клинические испытания в качестве средств против рака молочной железы [73], острого лимфобластного лейкоза [74] и немелкоклеточного рака легкого [77, 78].

Взаимодействие лигандов с рецепторами, такими как FLT3 (Feline McDonough Sarcoma-Like Tyrosine kinase 3), рецепторами факторов роста и интерлейкинов, с рецептором эритропоэтина (EpoR), а также конститутивная активность химерного белка BCR-ABL приводят к активации сигнального пути JAK/STAT. Компоненты этого пути могут, в свою очередь, взаимодействовать с компонентами MAP-киназного каскада и сигнального пути PI3K/Akt в клетках острого и хронического миелоидного лейкоза и лимфобластных лейкозов, что опосредует перемещение транскрипционных факторов STAT, с-Мус и Sp1 в ядро, где они связывают регуляторные области промотора гена теломеразной обратной тран-

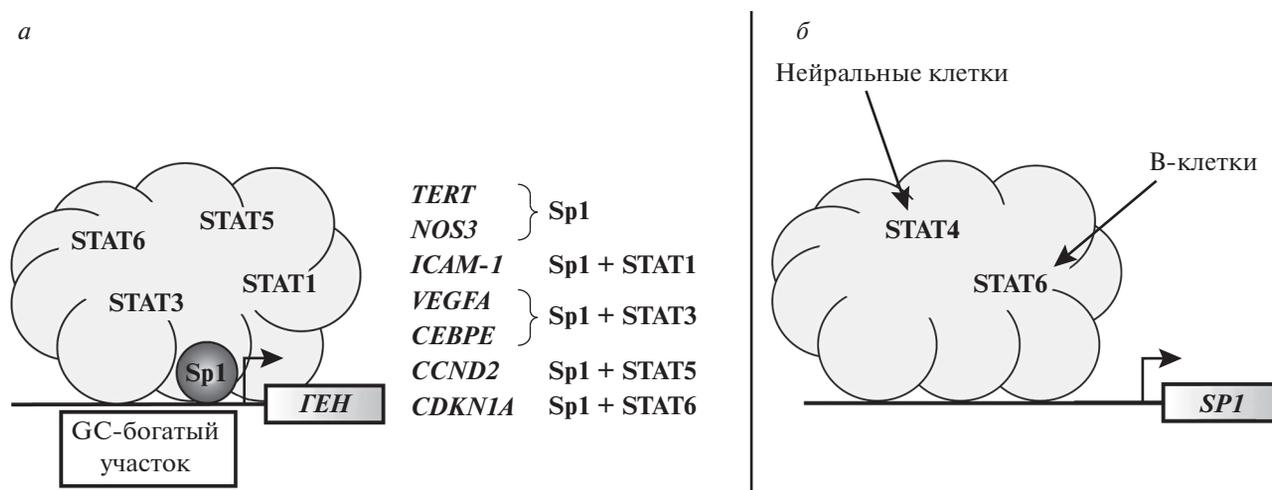


Рис. 3. Влияние факторов семейства STAT на транскрипционную активность белка Sp1 и уровень экспрессии его гена в клетках человека. *а* – Совместная активация экспрессии генов факторами семейства STAT и Sp1. *б* – Активация транскрипции гена *SP1* белками семейства STAT в различных клетках. STAT – переносчики сигнала и активаторы транскрипции, *TERT* – ген обратной транскриптазы теломеразы, *NOS3* – ген эндотелиальной NO-синтазы, *ICAM-1* – ген молекулы клеточной адгезии 1, *VEGFA* – ген фактора роста эндотелия сосудов, *CEBPE* – ген ССААТ/связывающего белка-энхансера, *CCND2* – ген циклина D2, *CDKN1A* – ген ингибитора циклинзависимой киназы 1.

скриптазы (*TERT*) [77]. Активация киназы JAK2 в результате стимуляции эндотелиальных клеток человека (линии ECV304 и EAhy926) лизофосфатидилхолином (LPC) приводит к увеличению эффективности связывания Sp1 с промотором гена *eNOS*, кодирующего эндотелиальную NO-синтазу [78] (рис. 3а).

Показано, что одновременное связывание Sp1 и STAT с регуляторными областями необходимо для активации экспрессии ряда генов [79]. Например, связывание белков STAT1 и Sp1 необходимо для активации гена молекулы клеточной адгезии 1 (*ICAM-1*) в клетках бронхотрахеального эпителия [82, 83]. STAT3 и Sp1 инициируют транскрипцию генов фактора роста эндотелия сосудов (*VEGFA*) в астроцитах *in vivo* и в клетках глиобластомы U87MG *in vitro* [82]. Комплекс STAT3/Sp1 увеличивает экспрессию гена ССААТ/связывающего белка-энхансера (*CEBPE*) в клетках гепатоцеллюлярной карциномы в ответ на связывание IL-6 с рецепторами [83] (рис. 3а). Прямое связывание Sp1 и STAT6 стимулирует транскрипцию *CDKN1A* в клетках рака молочной железы [86, 87]. STAT4 может инициировать транскрипцию *SP1* в нейральных клетках [86]. Рецептор IL-2 регулирует экспрессию циклина D2 (*CCND2*) в цитотоксических Т-клетках через энхансерный комплекс STAT5 и Sp1 [87]. STAT6 регулирует транскрипцию *SP1* в лимфоцитах и В-клетках для остановки пролиферации, индуцированной интерфероном IFN первого типа (рис. 3б). В этом случае важную роль играет STAT2, активирующий STAT6 [88].

Sp1 И СИГНАЛЬНЫЙ ПУТЬ PI3K/АКТ

Главными компонентами сигнального пути PI3K/Akt являются фосфоинозитид-3-киназа (PI3K) и протеинкиназа В (Akt). Сигнальный путь PI3K/Akt участвует в регуляции многих клеточных процессов, включая синтез белков, выживание клеток, регуляцию апоптоза и клеточный цикл. На первом этапе этого пути происходит активация рецепторов, сопряженных с G-белками, интегринов, факторов роста, цитокинов и В-клеточных рецепторов. В число основных белков-мишеней Akt входят транскрипционный фактор FOX1 [89], киназа гликогенсинтазы 3 (GSK-3) [90], киназа mTOR [91] и фосфатаза PTEN с двойной субстратной специфичностью – ингибитор превращения фосфатидилинозит-(4,5)-бифосфата (PIP2) в фосфатидилинозит-(3,4,5)-трифосфат (PIP3) [92].

Нарушение активности сигнального пути PI3K/Akt может быть причиной развития аутоиммунных и нейродегенеративных заболеваний, таких как ревматоидный артрит, болезни Альцгеймера, Паркинсона и Гентингтона, а также может приводить к образованию и прогрессии злокачественных заболеваний, таких как глиома, плоскоклеточный рак головы и шеи, колоректальный рак, рак молочной железы, яичников, поджелудочной и предстательной железы, а также меланома [93–95].

Взаимосвязь Sp1 с сигнальным путем PI3K/Akt выявлена в фибробластах кролика *in vitro* и *in vivo*: микроРНК miR-29b связывается с 3'-нетранслируемой областью мРНК Sp1 и снижает таким образом количество этого белка в клетках. При этом

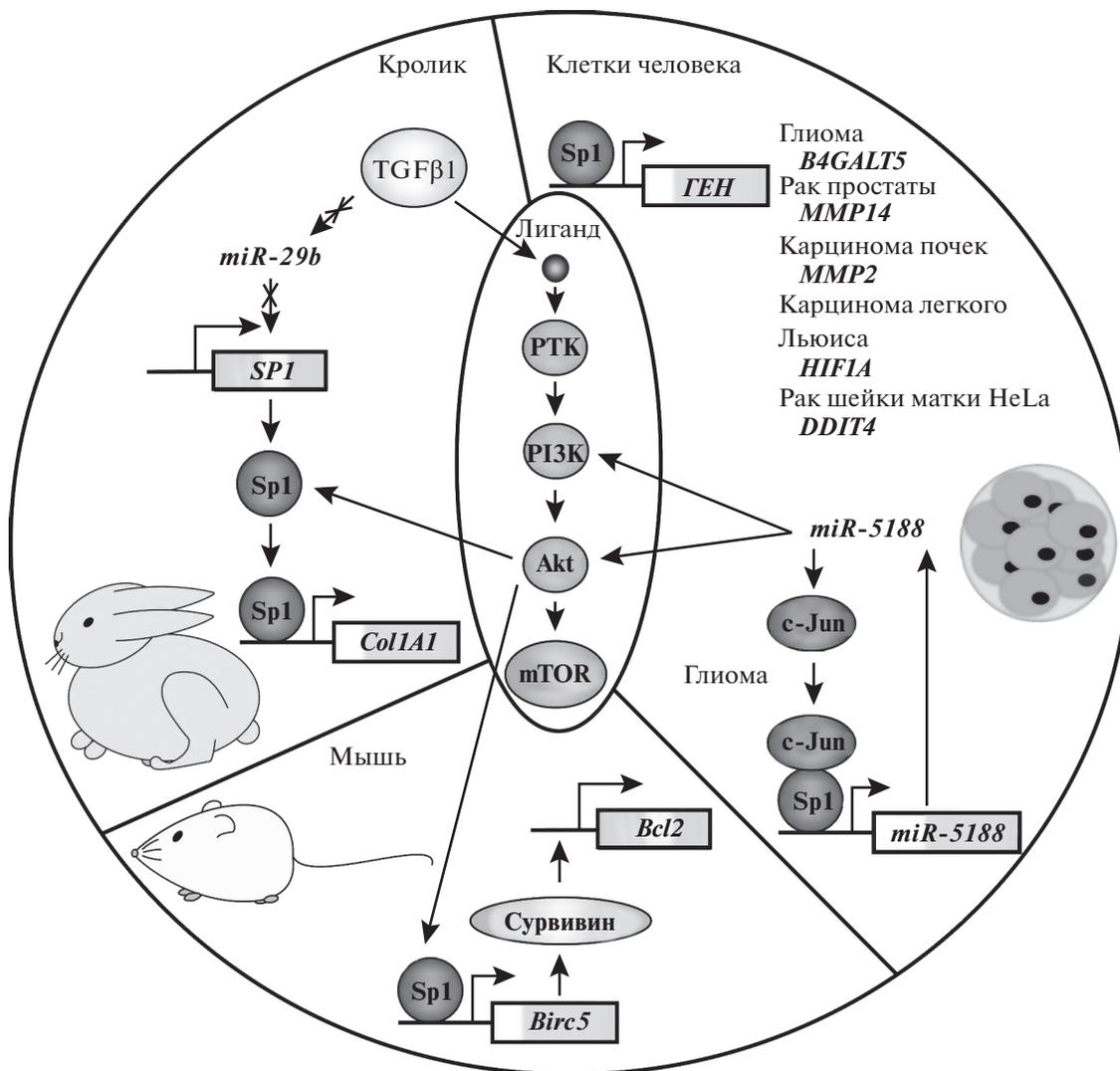


Рис. 4. Участие транскрипционного фактора Sp1 в экспрессии генов в клетках кролика, мыши и человека, сопряженное с активностью сигнального пути PI3K/Akt. PTK – рецепторные тирозинкиназы, PI3K – фосфоинозитид-3-киназа, Akt – протеинкиназа B, mTOR – серин-треониновая протеинкиназа, TGFβ1 – трансформирующий фактор роста β1, c-Jun – транскрипционный фактор, Col1A1 – ген коллагена первого типа, Birc5 – ген сурвивина, Bcl2 – ген антиапоптотического белка Bcl2, B4GALT5 – ген 1.4-галактозилтрансферазы V, MMP14 – ген матричной металлопротеазы 14, MMP2 – ген матричной металлопротеазы 2, HIF1A – ген фактора 1, индуцируемого гипоксией, DDIT4 – ген, регулируемый при развитии и повреждении ДНК, miR – микроРНК.

белок Sp1 необходим для экспрессии гена *Col1A1*, кодирующего коллаген первого типа [96, 97] (рис. 4a). Таким образом, введение miR-29b в фибробласты приводит к подавлению экспрессии гена *Col1A1* и, как следствие, к снижению скорости роста этих клеток. Следует отметить, что TGFβ1 способен ингибировать miR-29b с последующей активацией киназ PI3K и Akt, которые фосфорилируют белок Sp1, увеличивая тем самым эффективность его связывания с промотором гена *Col1A1*.

Обработка культуры клеток миелоидных предшественников новорожденных крыс противоопухолевым антибиотиком доксорубицином вы-

зывает значительное снижение уровня фосфорилирования Akt, что приводит к одновременному снижению количества белка Sp1 и повышению р53. Sp1 – это регулятор экспрессии гена сурвивина (*Birc5*), который активирует экспрессию гена антиапоптотического белка Bcl2. Обработка клеток доксорубицином приводит к снижению уровня экспрессии генов *Bcl2* и *Birc5* с последующей гибелью клеток и развитием кардиомиопатии у модельных мышей. Добавление к кардиомиоцитам внеклеточных везикул мезенхимальных стволовых клеток С3Н/10Т1/2 мыши, содержащих микроРНК miR-199a-3p, приводит к восстановлению уровня белков Bcl2 и сурвивина за счет

увеличения доли фосфорилированного Akt по сравнению с клетками, обработанными доксорубицином, предотвращая тем самым гибель клеток [98] (рис. 4б). Сходным образом miR-199a-3p защищает кардиомиоциты мышей от гибели *in vivo*.

На перевиваемых клетках линий U251 и U87 и первичных клетках глиомы человека показано, что сверхэкспрессия микроРНК miR-5188 повышает уровень фосфорилирования PI3K, Akt, а также содержания транскрипционного фактора c-Jun [99]. c-Jun в свою очередь связывает Sp1 и активирует экспрессию miR-5188. При этом повышенный уровень микроРНК miR-5188 в клетках глиомы связан с неблагоприятным прогнозом заболевания. Обработка первичных нейронов мышцы ингибитором mTOR темсиролимусом приводит к снижению уровня экспрессии генов, кодирующих компоненты сигнального пути биосинтеза холестерина, таких как *Ldlr*, *Sqle* и *Dhcr7* [100]. Аналогичный эффект в клетках коры мозга мышцы вызывает ингибитор mTOR рапамицин. В промоторах большинства генов, экспрессия которых зависит от mTOR, обнаружены сайты связывания Sp1 и еще двух транскрипционных факторов — SREBP и NF-Y, что указывает на их вовлеченность в mTOR-зависимый контроль экспрессии генов биосинтеза холестерина у животных.

В клетках сердца мышей показана совместная регуляция экспрессии генов-мишеней mTOR белками Sp1 и сиртуин-6. Обнаружено одновременное снижение количества ядерной гистон-ацетилазы SIRT6, повышение активности синтеза белков и фосфорилирования mTOR в клетках сердца при сердечной гипертрофии, вызванной неселективным бета-адреномиметиком — изопреналином [101]. При этом установлено, что нокаут *SIRT6* приводит к увеличению связывания Sp1 с промоторными областями генов, кодирующих mTOR и GTPазу Rheb. mTOR и Rheb, в свою очередь, фосфорилируют p70S6K и 4EBP1, которые направляют синтез большого числа белков [106, 107]. Таким образом, у мышей с нокаутом гена *SIRT6* спонтанно развивается сердечная гипертрофия, обусловленная сверхактивацией mTOR при участии Sp1, при этом ингибирование mTOR приводит к частичному восстановлению функции сердца. Sp1 ингибирует фосфорилирование киназы p70S6K, которая служит мишенью mTOR.

Показано, что нокаут и нокдаун *SP1* приводят к увеличению количества центросом, снижению нуклеации микротрубочек, образованию мультиполярных митотических веретен и микроядер, а также к повышению частоты анеуплоидии в эмбриональных фибробластах мышши и перевиваемых злокачественных клетках человека (U2OS, HeLa) [104].

Направленное подавление экспрессии генов транскрипционных факторов Sp1, Sp2 и Sp3 при-

водит к снижению уровня экспрессии генов рецепторных тирозинкиназ EGFR и IGF-1R в клетках рака поджелудочной железы человека Panc28 и L3.6pL, вследствие чего в этих клетках уменьшается фосфорилирование киназ mTOR и Ras [31]. Сходный эффект вызывает воздействие метформина, обладающего химиотерапевтической активностью.

Показана вовлеченность транскрипционного фактора Sp1 и сигнального пути PI3K/Akt в злокачественную трансформацию клеток и прогрессивную гепатоцеллюлярную карциному, рака молочной и предстательной железы, рака почки и шейки матки, а также глиомы [105–113]. Добавление к клеткам рака молочной железы линии MCF7 рекомбинантного белка IGF-1 приводит к повышению уровня мРНК гена, кодирующего белок, связывающий инсулиноподобный фактор роста 2 (IGFBP-2), маркер агрессивного течения заболевания [106]. Блокирование активности PI3K ингибитором LY294002 или mTOR рапамицином вызывает снижение уровня мРНК гена *IGFBP-2*, а повышение активности киназы PI3K рекомбинантным белком IGF-1 усиливает экспрессию *IGFBP-2*. Кроме того, изменение уровня мРНК этого гена коррелирует с внутриядерным количеством Sp1 и долей белка с фосфорилированными остатками серина. При этом воздействие на клетки белком IGF-1 увеличивает долю ядерного Sp1, а ингибитором PI3K — снижает. Таким образом, эти данные свидетельствуют о том, что Sp1 вместе с киназами PI3K и mTOR участвует в регуляции экспрессии гена *IGFBP-2* в клетках рака молочной железы.

Установлено, что Sp1 и сигнальный путь PI3K/Akt вовлечены в регуляцию гена *CTH*, кодирующего цистатионин-лиазу, необходимую для усиленной пролиферации клеток гепатоцеллюлярной карциномы человека под действием H₂S [105]. Показано, что Sp1 связывается с промотором гена *CTH*. Sp1 также направляет экспрессию гена рецептора фактора роста сосудистого эндотелия VEGFR, участвующего в неоангиогенезе опухоли, в клетках различной природы [111, 112]. Транскрипционный фактор Sp1 индуцирует экспрессию ряда генов, кодирующих регуляторы пролиферации, апоптоза, инвазии и метастазирования, такие как матриксные металлопротеазы (MMP14 — в клетках инвазивного рака предстательной железы человека [109] и MMP2 — в клетках рака почки [110]); 1,4-галактозилтрансфераза V (B4GALT5) в клетках глиомы [111]; фактор, индуцируемый гипоксией 1, HIF1A, в клетках рака легкого [112] и DDIT4 в клетках рака шейки матки HeLa [113] (рис. 4в).

Таким образом, белок Sp1 — это один из ключевых регуляторов экспрессии генов, кодирующих компоненты сигнального пути PI3K/Akt в

Таблица 1. Связь белка Sp1 с активностью сигнальных путей ERK, p38, PI3K/Акт при различных патологиях

Сигнальный путь	Киназа	Наблюдаемый эффект	Механизм	Клетки	Патология
ERK	RAS	Снижение экспрессии гена <i>Reck</i>	Ha-Ras фосфорилирует RbAp46, который формирует комплекс с Sp1 и Reck	NIH-3T3	Онкозаболевания
		Повышение экспрессии гена <i>HGM1</i>	Ha-Ras ^{Leu61} и Sp1 увеличивают экспрессию гена <i>HMG1</i>	HC116	
		Снижение активности киназы RAS	Нокаун гена <i>SP1</i> приводит к снижению экспрессии <i>EGFR</i> и <i>IGF1-R</i> , которые регулируют активность RAS	Rapc28, L3.6pL	
		Снижение экспрессии гена <i>TGA2</i>	v-RAS и ERBB2 фосфорилируют белок Sp1 и уменьшают эффективность его связывания с промотором гена <i>TGA2</i>	Клетки эпителия молочной железы	
	RAF	Увеличение активности RAF-киназы	Нокаун гена <i>SP1</i> приводит к уменьшению экспрессии гена <i>PEBP1</i> , кодирующего ингибитор RAF	Клетки меланомы, гепатоцеллюлярной карциномы, рака молочной железы	Онкозаболевания
		Запуск экспрессии гена <i>CDKN1A</i>	Уменьшение количества морталины в клетках с мутантными генами <i>RAF</i> и <i>p53</i> вызывает гиперактивацию MEK/ERK, что приводит к повышению экспрессии гена <i>CDKN1A</i> фактором транскрипции Sp1	SK-MEL28	
	MEK/ERK	Повышение экспрессии гена <i>PLAU</i>	Фосфорилирование Sp1 MAP-киназами приводит к увеличению эффективности его связывания с промотором гена <i>PLAU</i>	HeLa, LNCaP	Остеоартрит
		Повышение экспрессии гена <i>BMP-2</i>	Фосфорилирование Sp1 MAP-киназами приводит к увеличению эффективности его связывания с промотором гена <i>BMP-2</i> после обработки клеток интерлейкином-1	ATDC5	
	ERK1/2	Повышение экспрессии гена <i>BIRC5</i>	Фосфорилирование Sp1 MAP-киназами приводит к увеличению эффективности его связывания с промотором гена <i>BIRC5</i>	Kg1	Онкозаболевания
		Снижение экспрессии гена <i>Hspb1</i>	Фосфорилирование Sp1 киназами ERK1/2 приводит к ингибированию транскрипции <i>Hspb1</i>	Астроциты мышей	

Таблица 1. Продолжение

Сигнальный путь	Киназа	Наблюдаемый эффект	Механизм	Клетки	Патология
p38		Активация Sp1	p38 фосфорилирует Sp1, что приводит к его активации	THP-1, SH-SY5Y, клетки аденокарциномы протоков поджелудочной железы человека, кортикальные нейроны крысы, клетки эпителия бронхов человека, эндотелиальные клетки пуповины человека	Онкозаболевания
		Повышение экспрессии гена <i>FLNA</i>	Активация p38 в результате механического воздействия приводит к фосфорилированию Sp1, который запускает экспрессию <i>FLNA</i>	Фибробласты человека	—
		Повышение экспрессии гена <i>ALOX5</i>	Промотор <i>ALOX5</i> имеет сайт связывания Sp1, активность которого уменьшается при обработке клеток ингибитором p38	Макрофаги мышей	Атеросклероз
JAK/STAT		Повышение экспрессии гена <i>CAV-1</i>	Фосфорилирование Sp1 протеинкиназой p38 приводит к увеличению эффективности его связывания с промотором гена <i>CAV-1</i>	Клетки эпителия молочной железы человека	Онкозаболевания
	МККК	Повышение экспрессии гена <i>ММР-1</i>	Связывание нейротропного фактора мозга BDNF с его рецептором TrkB приводит к фосфорилированию киназ МККК, что приводит к увеличению эффективности связывания Sp1 с промотором гена <i>ММР-1</i>	Клетки хондросаркомы	Онкозаболевания
	Компоненты сигнального пути JAK/STAT	Повышение экспрессии гена <i>TERT</i>	Взаимодействие с компонентами других сигнальных путей (МАРК и PI3K/Акт) опосредует перемещение фактора Sp1 в ядро, где он связывает регуляторные области промотора <i>TERT</i>	Клетки острого и хронического миелоидных лейкозов, лимфобластных лейкозов	—
	JAK2	Повышение экспрессии гена <i>NOS3</i>	Стимуляция LPS приводит к активации JAK2, что увеличивает эффективность связывания с промотором гена <i>NOS3</i>	ECV304, EAhy926	—

Таблица 1. Продолжение

Сигнальный путь	Киназа	Наблюдаемый эффект	Механизм	Клетки	Патология
Р13К/Акт	Р13К, Акт	Повышение экспрессии гена <i>Col1A1</i>	Последовательная активация киназ Р13К и Акт приводит к фосфорилированию Sp1, что увеличивает эффективность его связывания с промотором гена <i>Col1A1</i>	Фибробласты кролика	Глаукома
	Акт	Снижение экспрессии генов <i>Birc5</i> и <i>Bcl2</i>	Снижение уровня фосфорилирования Акт уменьшает уровень фосфорилирования Sp1, транскрипционным регулятором экспрессии гена <i>Birc5</i> . Продукт гена <i>Birc5</i> (сурвивин) является активатором экспрессии гена <i>Bcl2</i>	Кардиомиоциты мыши	Кардиомиопатия
	Р13К, Акт	Связывание Sp1 с с-Jun для активации экспрессии miR-5188	miR-5188 повышает уровень фосфорилирования Р13К, Акт, и уровень с-Jun, который связывается с Sp1 и инициирует транскрипцию miR-5188	U251, U87, первичные клетки глиомы человека	Онкозаболевания
	mTOR	Снижение экспрессии генов <i>Ldlr</i> , <i>Sqle</i> , <i>Dhcr7</i> , снижение продукции холестерина	Ингибиторы mTOR (темсиrolimus и рапамацин) приводят к снижению уровня экспрессии mTOR-зависимых генов биосинтеза холестерина, в промоторах которых есть сайты связывания Sp1	Первичные нейроны мыши, клетки коры мозга мыши	Неврологические расстройства
		Активация mTOR	Нокаут гена <i>SIRT6</i> приводит к увеличению связывания Sp1 с промотором гена <i>mTOR</i>	Клетки сердечной ткани мышей	Сердечная гипертрофия
		Уменьшение фосфорилирования mTOR	Подавление экспрессии гена <i>SP1</i> снижает уровень экспрессии генов рецепторных тирозинкиназ EGFR и IGF-1R, которые регулируют активность mTOR	Rapc28, L3.6pL	
	Акт	Повышение экспрессии гена <i>CTH</i>	В результате фосфорилирования Акт Sp1 напрямую связывается с промотором гена <i>CTH</i>	Клетки гепатоцеллюлярной карциномы человека	
	Р13К, mTOR	Повышение экспрессии гена <i>MMP2</i>	Ингибиторы Р13К и Акт вызывают уменьшение эффективности связывания Sp1 с промотором <i>MMP2</i>	Клетки рака почки	Онкозаболевания
	Р13К/Акт	Повышение экспрессии гена <i>B4GALT5</i>	Продукт гена <i>B4GALT5</i> , транскрипцию которого контролирует Sp1, регулирует сигнальный путь Р13К/Акт	Клетки глиомы	
		Повышение экспрессии гена <i>DDIT4</i>	Ингибиторы Р13К и Акт уменьшают экспрессию гена <i>DDIT4</i> , которую контролирует Sp1	HeLa	

клетках человека, крысы и кролика. Установлено, что транскрипционная активность Sp1 регулируется киназами этого сигнального пути. Нарушение активности Sp1 и сигнального пути PI3K/Akt приводит к потере целостности и стабильности генома, повышению способности клеток к инвазии, стимуляции прорастания сосудов в опухоль, блокированию апоптоза и активации пролиферации злокачественных клеток, что в совокупности способствует злокачественному перерождению клеток и прогрессии ряда злокачественных заболеваний.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Sp1 – фактор транскрипции, который связывает GC-богатые участки в промоторах генов. Sp1 регулирует процессы дифференцировки, пролиферации, апоптоза в нормальных клетках, он вовлечен в регуляцию клеточного цикла, репарации ДНК, миграции и инвазии злокачественных клеток. Sp1 взаимодействует с широким спектром белков, формируя транскрипционные комплексы, для регуляции экспрессии генов, в том числе кодирующих компоненты сигнальных путей MAPK/ERK, MAPK/p38, JAK/STAT и PI3K/Akt. Киназы, входящие в эти сигнальные каскады, участвуют в посттрансляционной модификации белка Sp1, регулируя таким образом его транскрипционную активность (табл. 1).

Поскольку транскрипционный фактор Sp1 участвует в регуляции процессов, связанных со злокачественной трансформацией клеток, а повышенный уровень экспрессии гена *SP1* характерен для злокачественных клеток различного происхождения, подавление активности Sp1 рассматривают в качестве перспективного подхода к противоопухолевой терапии.

Исследование выполнено за счет гранта Российского научного фонда (проект № 22-14-00353).

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

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Suske G. (2017) NF-Y and SP transcription factors – New insights in a long-standing liaison. *Biochim. Biophys. Acta – Gene Regul. Mech.* **1860**, 590–597.
- Marin M., Karis A., Visser P., Grosveld F., Philipsen S. (1997) Transcription factor Sp1 is essential for early embryonic development but dispensable for cell growth and differentiation. *Cell.* **89**, 619–628.
- Vellingiri B., Iyer M., Subramaniam M.D., Jayaramayya K., Siama Z., Giridharan B., Narayanasamy A., Dayem A.A., Cho S.G. (2020) Understanding the role of the transcription factor sp1 in ovarian cancer: from theory to practice. *Int. J. Mol. Sci.* **21**, 1153.
- Torabi B., Flashner S., Beishline K., Sowash A., Donovan K., Bassett G., Azizkhan-Clifford J. (2018) Caspase cleavage of transcription factor Sp1 enhances apoptosis. *Apoptosis.* **23**, 65–78.
- Ding A., Bian Y.Y., Zhang Z.H. (2020) SP1/TGF- β 1/SMAD2 pathway is involved in angiogenesis during osteogenesis. *Mol. Med. Rep.* **21**, 1581–1589.
- Soleimani T., Falsafi N., Fallahi H. (2017) Dissection of regulatory elements during direct conversion of somatic cells into neurons. *J. Cell. Biochem.* **118**, 3158–3170.
- Gong L., Ji W.-K., Hu X.-H., Hu W.-F., Tang X.-C., Huang Z.-X., Li L., Liu M., Xiang S.-H., Wu E., Woodward Z., Liu Y.Z., Nguyen Q. D., Li D.W.C. (2014) Sumoylation differentially regulates Sp1 to control cell differentiation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **111**, 5574–5579.
- Hotter D., Bosso M., Jönsson K.L., Krapp C., Stürzel C.M., Das A., Littwitz-Salomon E., Berkhout B., Russ A., Wittmann S., Dittmer U., Sauter D., Kirchhoff F. (2019) IFI16 targets the transcription factor Sp1 to suppress HIV-1 transcription and latency reactivation. *Cell Host Microbe.* **25**, 858–872.e13.
- Dynan W.S., Tjian R. (1983) The promoter-specific transcription factor Sp1 binds to upstream sequences in the SV40 early promoter. *Cell.* **35**, 79–87.
- Iwahori S., Shirata N., Kawaguchi Y., Weller S.K., Sato Y., Kudoh A., Nakayama S., Isomura H., Tsurumi T. (2007) Enhanced phosphorylation of transcription factor Sp1 in response to herpes simplex virus type 1 infection is dependent on the ataxia telangiectasia-mutated protein. *J. Virol.* **81**, 9653–9664.
- Chen-Plotkin A.S., Sadri-Vakili G., Yohrling G.J., Braveman M.W., Benn C.L., Glajch K.E., DiRocco D.P., Farrell L.A., Krainc D., Gines S., MacDonald M.E., Cha J.J. (2006) Decreased association of the transcription factor Sp1 with genes downregulated in Huntington's disease. *Neurobiol. Dis.* **22**, 233–241.
- Yao L., Dai X., Sun Y., Wang Y., Yang Q., Chen X., Liu Y., Zhang L., Xie W., Liu J. (2018) Inhibition of transcription factor SP1 produces neuroprotective effects through decreasing MAO B activity in MPTP/MPP+ Parkinson's disease models. *J. Neurosci. Res.* **96**, 1663–1676.
- Hsu T.I., Wang M.C., Chen S.Y., Yeh Y.M., Su W.C., Chang W.C., Hung J.J. (2012) Sp1 expression regulates lung tumor progression. *Oncogene.* **31**, 3973–3988.
- Jiang N.Y., Woda B.A., Banner B.F., Whalen G.F., Dresser K.A., Lu D. (2008) Sp1, a new biomarker that identifies a subset of aggressive pancreatic ductal adenocarcinoma. *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.* **17**, 1648–1652.
- Wang X.B., Peng W.Q., Yi Z.J., Zhu S.L., Gan Q.H. (2007) Expression and prognostic value of transcrip-

- tional factor sp1 in breast cancer. *Chinese J. Cancer.* **26**, 996–1000.
16. Zhang J., Zhu Z.G., Ji J., Yuan F., Yu Y.Y., Liu B.Y., Lin Y.Z. (2005) Transcription factor Sp1 expression in gastric cancer and its relationship to long-term prognosis. *World J. Gastroenterol.* **11**, 2213–2217.
 17. Chiefari E., Brunetti A., Arturi F., Bidart J.-M., Russo D., Schlumberger M., Filetti S. (2002) Increased expression of AP2 and Sp1 transcription factors in human thyroid tumors: a role in NIS expression regulation? *BMC Cancer.* **2**, 35.
 18. Guan H., Cai J., Zhang N., Wu J., Yuan J., Li J., Li M. (2012) Sp1 is upregulated in human glioma, promotes MMP-2-mediated cell invasion and predicts poor clinical outcome. *Int. J. Cancer.* **130**, 593–601.
 19. Вагапова Э.Р., Лебедев Т.Д., Тихонова А.Д., Гойхман Б.В., Иваненко К.А., Спиринов П.В., Прасолов В.С. (2020) Высокая экспрессия SP1, CSF1R и RAK1 коррелирует с повышенной чувствительностью лейкозных клеток к антибиотику митрамицину. *Молекуляр. биология.* **54**, 522–528.
 20. Guo Y., Pan W., Liu S., Shen Z., Xu Y., Hu L. (2020) ERK/MAPK signalling pathway and tumorigenesis (review). *Exp. Ther. Med.* **19**, 1997–2007.
 21. Zarubin T., Han J. (2005) Activation and signaling of the p38 MAP kinase pathway. *Cell Res.* **15**, 11–18.
 22. McCain J. (2013) The MAPK (ERK) pathway: investigational combinations for the treatment of BRAF-mutated metastatic melanoma. *Pharmacy Therapeutics (P&T).* **38**(2), 96–108.
 23. Lavoie H., Gagnon J., Therrien M. (2020) ERK signalling: a master regulator of cell behaviour, life and fate. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **21**, 607–632.
 24. Khan A.Q., Kuttikrishnan S., Siveen K.S., Prabhu K.S., Shanmugakonar M., Al-Naemi H.A., Haris M., Dermime S., Uddin S. (2019) RAS-mediated oncogenic signaling pathways in human malignancies. *Semin. Cancer Biol.* **54**, 1–13.
 25. Bos J.L. (1989) Ras oncogenes in human cancer: a review. *Cancer Res.* **49**, 4682–4689.
 26. Sanchez-Vega F., Mina M., Armenia J., Chatila W.K., Luna A., La K.C., Dimitriadou S., Liu D.L., Kantheti H.S., Saghafein S., Chakravarty D., Daian F., Gao Q., Bailey M.H., Liang W.W., Foltz S.M., Shmulevich I., Ding L., Heins Z., Ochoa A., Gross B., Gao J., Zhang H., Kundra R., Kandoth C., Bahceci I., Dervishi L., Dogrusoz U., Zhou W., Shen H., Laird P.W., Way G.P., Greene C.S., Liang H., Xiao Y., Wang C., Iavarone A., Berger A.H., Bivona T.G., Lazar A.J., Hammer G.D., Giordano T., Kwong L.N., McArthur G., Huang C., Tward A.D., Frederick M.J., McCormick F., Meyerson M.; Cancer Genome Atlas Research Network, Van Allen E.M., Cherniack A.D., Ciriello G., Sander C., Schultz N. (2019) Pathways, oncogenic signaling cancer, the atlas, genome. *Cell.* **173**, 321–337.
 27. Yeh H.H., Tseng Y.F., Hsu Y.C., Lan S.H., Wu S.Y., Raghavaraju G., Cheng D.E., Lee Y.R., Chang T.Y., Chow N.H., Hung W.C., Liu H.S. (2015) Ras induces experimental lung metastasis through up-regulation of RbAp46 to suppress RECK promoter activity. *BMC Cancer.* **15**, 1–14.
 28. Sasahara R.M., Takahashi C., Noda M. (1999) Involvement of the Sp1 site in Ras-mediated downregulation of the RECK metastasis suppressor gene. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **264**, 668–675.
 29. Cleynen I., Huysmans C., Sasazuki T., Shirasawa S., Van De Ven W., Peeters K. (2007) Transcriptional control of the human high mobility group A1 gene: basal and oncogenic Ras-regulated expression. *Cancer Res.* **67**, 4620–4629.
 30. Ye J., Xu R.H., Taylor-Papadimitriou J., Pitha P.M. (1996) Sp1 binding plays a critical role in Erb-B2- and v-ras-mediated downregulation of alpha2-integrin expression in human mammary epithelial cells. *Mol. Cell. Biol.* **16**, 6178–6189.
 31. Nair V., Sreevalsan S., Basha R., Abdelrahman M., Abudayyeh A., Hoffman A.R., Safe S. (2014) Mechanism of metformin-dependent inhibition of mammalian target of rapamycin (mTOR) and Ras activity in pancreatic cancer. *J. Biol. Chem.* **289**, 27692–27701.
 32. Park S., Yeung M.L., Beach S., Shields J.M., Yeung K.C. (2005) RKIP downregulates B-Raf kinase activity in melanoma cancer cells. *Oncogene.* **24**, 3535–3540.
 33. Lee H.C., Tian B., Sedivy J.M., Wands J.R., Kim M. (2006) Loss of Raf kinase inhibitor protein promotes cell proliferation and migration of human hepatoma cells. *Gastroenterology.* **131**, 1208–1217.
 34. Hagan S., Al-Mulla F., Mallon E., Oien K., Ferrier R., Gusterson B., Curto Garcia J.J., Kolch W. (2005) Reduction of Raf-1 kinase inhibitor protein expression correlates with breast cancer metastasis. *Clin. Cancer Res.* **11**, 7392–7397.
 35. Zhang B., Wang O., Qin J., Liu S., Sun S., Liu H., Kuang J., Jiang G., Zhang W. (2013) Cis-acting elements and trans-acting factors in the transcriptional regulation of Raf kinase inhibitory protein expression. *PLoS One.* **8**, 1–10.
 36. Hill C.S., Treisman R. (1995) Transcriptional regulation by extracellular signals: mechanisms and specificity. *Cell.* **80**, 199–211.
 37. Merchant J.L., Du M., Todisco A. (1999) Sp1 phosphorylation by Erk 2 stimulates DNA binding. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **254**, 454–461.
 38. Karkhanis M., Park J.I. (2015) Sp1 regulates Raf/MEK/ERK-induced p21CIP1 transcription in TP53-mutated cancer cells. *Cell Signal.* **27**, 479–486.
 39. Benasciutti E., Pagès G., Kenzior O., Folk W., Blasi F., Crippa M.P. (2004) MAPK and JNK transduction pathways can phosphorylate Sp1 to activate the uPA minimal promoter element and endogenous gene transcription. *Blood.* **104**, 256–262.
 40. Chien S.Y., Tsai C.H., Liu S.C., Huang C.C., Lin T.H., Yang Y.Z., Tang C.H. (2020) Noggin inhibits IL-1 β and BMP-2 expression, and attenuates cartilage de-

- generation and subchondral bone destruction in experimental osteoarthritis. *Cells*. **9**, 1–21.
41. Zhang Y., Chen H., Zhou S., Wang S., Zheng K., Xu D., Liu Y., Wang X., Wang X., Yan H., Zhang L., Liu Q., Chen W., Wang Y. (2015) Sp1 and c-Myc modulate drug resistance of leukemia stem cells by regulating survivin expression through the ERK-MSK MAPK signaling pathway. *Mol. Cancer*. **14**, 56.
 42. Kim J.E., Ko A.R., Hyun H.W., Min S.J., Kang T.C. (2018) P2RX7-MAPK1/2-SP1 axis inhibits mTOR independent HSPB1-mediated astroglial autophagy article. *Cell Death Dis.* **9**, 1–16.
 43. Tobiume K., Matsuzawa A., Takahashi T., Nishitoh H., Morita K.-I., Takeda K., Minowa O., Miyazono K., Noda T., Ichijo H. (2001) ASK1 is required for sustained activations of JNK/p38 MAP kinases and apoptosis. *EMBO Rep.* **2**, 222–228.
 44. Tedeschi A., Bradke F. (2013) The DLK signalling pathway – a double-edged sword in neural development and regeneration. *EMBO Rep.* **14**, 605–614.
 45. Sorrentino A., Thakur N., Grimsby S., Marcusson A., von Bulow V., Schuster N., Zhang S., Heldin C.H., Landström M. (2008) The type I TGF- β receptor engages TRAF6 to activate TAK1 in a receptor kinase-independent manner. *Nat. Cell Biol.* **10**, 1199–1207.
 46. Cuadrado A., Nebreda A.R. (2010) Mechanisms and functions of p38 MAPK signalling. *Biochem. J.* **429**, 403–417.
 47. Johnson G.V.W., Bailey C.D.C. (2003) The p38 MAP kinase signaling pathway in Alzheimer's disease. *Exp. Neurol.* **183**, 263–268.
 48. Huang Z.N., Chen J.M., Huang L.C., Fang Y.H., Her L.S. (2021) Inhibition of p38 mitogen-activated protein kinase ameliorates HAP40 depletion-induced toxicity and proteasomal defect in Huntington's disease model. *Mol. Neurobiol.* **58**, 2704–2723.
 49. He J., Zhong W., Zhang M., Zhang R., Hu W. (2018) P38 mitogen-activated protein kinase and Parkinson's disease. *Transl. Neurosci.* **9**, 147–153.
 50. Gibbs K.L., Kalmar B., Rhymes E.R., Fellows A.D., Ahmed M., Whiting P., Davies C.H., Greensmith L., Schiavo G. (2018) Inhibiting p38 MAPK alpha rescues axonal retrograde transport defects in a mouse model of ALS. *Cell Death Dis.* **9**, 596.
 51. Kremontsov D.N., Thornton T.M., Teuscher C., Rincon M. (2013) The emerging role of p38 mitogen-activated protein kinase in multiple sclerosis and its models. *Mol. Cell. Biol.* **33**, 3728–3734.
 52. Korb A., Tohidast-Akrad M., Cetin E., Axmann R., Smolen J., Schett G. (2006) Differential tissue expression and activation of p38 MAPK and isoforms in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum.* **54**, 2745–2756.
 53. Whittall T., Wang Y., Kelly C.G., Thompson R., Sanderson J., Lomer M., Soon S.Y., Bergmeier L.A., Singh M., Lehner T. (2006) Tumour necrosis factor- α production stimulated by heat shock protein 70 and its inhibition in circulating dendritic cells and cells eluted from mucosal tissues in Crohn's disease. *Clin. Exp. Immunol.* **143**, 550–559.
 54. Yu X.J., Li C.Y., Dai H.Y., Cai D.X., Wang K.Y., Xu Y.H., Chen L.M., Zhou C.L. (2007) Expression and localization of the activated mitogen-activated protein kinase in lesional psoriatic skin. *Exp. Mol. Pathol.* **83**, 413–418.
 55. Lam C.W.K., Ip W.K., Wong C.K., Lam C.W.K. (2006) Interleukin (IL)-4 and IL-13 up-regulate monocyte chemoattractant protein-1 expression in human bronchial epithelial cells: involvement of p38 mitogen-activated protein kinase, extracellular signal-regulated kinase 1/2 and Janus kinase-2 but not c-Jun. *Clin. Exp. Immunol.* **145**, 162–172.
 56. Lim A.K.H., Nikolic-Paterson D.J., Ma F.Y., Ozols E., Thomas M.C., Flavell R.A., Davis R.J., Tesch G.H. (2009) Role of MKK3-p38 MAPK signalling in the development of type 2 diabetes and renal injury in obese db/db mice. *Diabetologia.* **52**, 347–358.
 57. Coulthard L.R., White D.E., Jones D.L., Mcdermott M.F. (2009) Europe PMC Funders Group p38 MAPK: stress responses from molecular mechanisms to therapeutics. *Trends Mol. Med.* **15**, 369–379.
 58. Ma W., Lim W., Gee K., Aucoin S., Nandan D., Kozlowski M., Diaz-Mitoma F., Kumar A. (2001) The p38 mitogen-activated kinase pathway regulates the human interleukin-10 promoter via the activation of Sp1 transcription factor in lipopolysaccharide-stimulated human macrophages. *J. Biol. Chem.* **276**, 13664–13674.
 59. Guida N., Laudati G., Mascolo L., Valsecchi V., Sirebello R., Selleri C., Di Renzo G., Canzoniero L.M.T., Formisano L. (2017) p38/Sp1/Sp4/HDAC4/BDNF axis is a novel molecular pathway of the neurotoxic effect of the methylmercury. *Front. Neurosci.* **11**, 1–10.
 60. Lee Y.C., Oslund K.L., Thai P., Velichko S., Fujisawa T., Duong T., Denison M.S., Wu R. (2011) 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin-induced MUC5AC expression: aryl hydrocarbon receptor-independent/EGFR/ERK/p38-dependent SP1-based transcription. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* **45**, 270–276.
 61. Pan W., Chang M.J., Booyse F.M., Grenett H.E., Bradley K.M., Wolkowicz P.E., Shang Q., Tabengwa E.M. (2008) Quercetin induced tissue-type plasminogen activator expression is mediated through Sp1 and p38 mitogen-activated protein kinase in human endothelial cells. *J. Thromb. Haemost.* **6**, 976–985.
 62. Hu H., Han T., Zhuo M., Wu L.L., Yuan C., Wu L., Lei W., Jiao F., Wang L.W. (2017) Elevated COX-2 expression promotes angiogenesis through EGFR/p38-MAPK/Sp1-dependent signalling in pancreatic cancer. *Sci. Rep.* **7**, 1–10.
 63. D'Addario M., Arora P.D., McCulloch C.A. (2006) Role of p38 in stress activation of Sp1. *Gene.* **379**, 51–61.
 64. Lee S.J., Kim C.E., Seo K.W., Kim C.D. (2010) HNE-induced 5-LO expression is regulated by NF- κ B/ERK and Sp1/p38 MAPK pathways via EGF re-

- ceptor in murine macrophages. *Cardiovasc. Res.* **88**, 352–359.
65. Dasari A., Bartholomew J.N., Volonte D., Galbiati F. (2006) Oxidative stress induces premature senescence by stimulating caveolin-1 gene transcription through p38 mitogen-activated protein kinase/Sp1-mediated activation of two GC-rich promoter elements. *Cancer Res.* **66**, 10805–10814.
66. Lin C.Y., Chang S.L.Y., Fong Y.C., Hsu C.J., Tang C.H. (2013) Apoptosis signal-regulating kinase 1 is involved in brain-derived neurotrophic factor (bDNF)-enhanced cell motility and matrix metalloproteinase 1 expression in human chondrosarcoma cells. *Int. J. Mol. Sci.* **14**, 15459–15478.
67. Hou S.X., Zheng Z., Chen X., Perrimon N. (2002) The JAK/STAT pathway in model organisms: emerging roles in cell movement. *Dev. Cell.* **3**, 765–778.
68. Bousoik E., Montazeri Aliabadi H. (2018) “Do we know Jack” about JAK? A closer look at JAK/STAT signaling pathway. *Front. Oncol.* **8**, 1–20.
69. Harrison D.A. (2012) The JAK / STAT pathway. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* **4**, 1–3.
70. Kamran G., Arian L. O’Shea J.J. (2009) Janus kinases in immune cell signaling. *Immunol. Rev.* **228**, 273–287.
71. Daw S., Chatterjee R., Law A., Law S. (2016) Analysis of hematopathology and alteration of JAK1/STAT3/STAT5 signaling axis in experimental myelodysplastic syndrome. *Chem. Biol. Interact.* **260**, 176–185.
72. Simon L.S., Taylor P.C., Choy E.H., Sebba A., Quebe A., Knopp K.L., Porreca F. (2021) The Jak/STAT pathway: a focus on pain in rheumatoid arthritis. *Semin. Arthritis Rheum.* **51**, 278–284.
73. Shao F., Pang X., Baeg G.H. (2021) Targeting the JAK/STAT signaling pathway for breast cancer. *Curr. Med. Chem.* **28**, 5137–5151.
74. Akahane K., Li Z., Etchin J., Berezovskaya A., Gjini E., Masse C.E., Miao W., Rocnik J., Kapeller R., Greenwood J.R., Tiv H., Sanda T., Weinstock D.M., Look A.T. (2017) Anti-leukaemic activity of the TYK2 selective inhibitor NDI-031301 in T-cell acute lymphoblastic leukaemia. *Br. J. Haematol.* **177**, 271–282.
75. Hong D., Kurzrock R., Kim Y., Woessner R., Younes A., Nemunaitis J., Fowler N., Zhou T., Schmidt J., Jo M., Lee S.J., Yamashita M., Hughes S.G., Fayad L., Piha-Paul S., Nadella M.V.P., Mohseni M., Lawson D., Reimer C., Blakey D.C., Xiao X., Hsu J., Revenko A., Monia B.P., MacLeod A.R. (2015) AZD9150, a next-generation antisense oligonucleotide inhibitor of STAT3 with early evidence of clinical activity in lymphoma and lung cancer. *Sci. Transl. Med.* **7**, 1–13.
76. Takeuchi T., Tanaka Y., Iwasaki M., Ishikura H., Sasaki S., Kaneko Y. (2016) Efficacy and safety of the oral Janus kinase inhibitor peficitinib (ASP015K) monotherapy in patients with moderate to severe rheumatoid arthritis in Japan: a 12-week, randomised, double-blind, placebo-controlled phase IIb study. *Ann. Rheum. Dis.* **75**, 1057–1064.
77. Yamada O., Kawachi K. (2013) The role of the JAK-STAT pathway and related signal cascades in telomerase activation during the development of hematologic malignancies. *Jak-Stat.* **2**, e25256.
78. Cieslik K., Abrams C.S., Wu K.K. (2001) Up-regulation of endothelial nitric-oxide synthase promoter by the phosphatidylinositol 3-kinase γ /Janus kinase 2/MEK-1-dependent pathway. *J. Biol. Chem.* **276**, 1211–1219.
79. Shuai K. (2000) Modulation of STAT signaling by STAT-interacting proteins. *Oncogene.* **19**, 2638–2644.
80. Look D.C., Pelletier M.B., Tidwell R.M., Roswit W.T., Holtzman M.J. (1995) Stat1 depends on transcriptional synergy with Sp1. *J. Biol. Chem.* **270**, 30264–30267.
81. Yang X.P., Irani K., Mattagajasingh S., Dipaula A., Khanday F., Ozaki M., Fox-Talbot K., Baldwin W.M., Becker L.C. (2005) Signal transducer and activator of transcription 3 α and specificity protein 1 interact to upregulate intercellular adhesion molecule-1 in ischemic-reperfused myocardium and vascular endothelium. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **25**, 1395–1400.
82. Loeffler S., Fayard B., Weis J., Weissenberger J. (2005) Interleukin-6 induces transcriptional activation of vascular endothelial growth factor (VEGF) in astrocytes *in vivo* and regulates VEGF promoter activity in glioblastoma cells via direct interaction between STAT3 and Sp1. *Int. J. Cancer.* **115**, 202–213.
83. Cantwell C.A., Sterneck E., Johnson P.F. (1998) Interleukin-6-specific activation of the C/EBP δ gene in hepatocytes is mediated by Stat3 and Sp1. *Mol. Cell. Biol.* **18**, 2108–2117.
84. Wei M., Liu B., Gu Q., Su L., Yu Y., Zhu Z. (2013) Stat6 cooperates with Sp1 in controlling breast cancer cell proliferation by modulating the expression of p21Cip1/WAF1 and p27Kip1. *Cell. Oncol.* **36**, 79–93.
85. Wei M., He Q., Yang Z., Wang Z., Zhang Q., Liu B., Gu Q., Su L., Yu Y., Zhu Z., Zhang G. (2014) Integrity of the LXXLL motif in Stat6 is required for the inhibition of breast cancer cell growth and enhancement of differentiation in the context of progesterone. *BMC Cancer.* **14**, 1–17.
86. Qiu L., Ge L., Hu Q. (2020) Dexmedetomidine protects SK-N-SH nerve cells from oxidative injury by maintaining iron homeostasis. *Biol. Pharm. Bull.* **43**, 424–431.
87. Martino A., Holmes J.H., Lord J.D., Moon J.J., Nelson B.H. (2001) Stat5 and Sp1 regulate transcription of the cyclin D2 gene in response to IL-2. *J. Immunol.* **166**, 1723–1729.
88. Hsu Y.A., Huang C.C., Kung Y.J., Lin H.J., Chang C.Y., Lee K.R., Wan L. (2016) The anti-proliferative effects of type I IFN involve STAT6-mediated regulation of Sp1 and BCL6. *Cancer Lett.* **375**, 303–312.
89. Cabrera-Ortega A.A., Feinberg D., Liang Y., Rossa C., Graves D.T. (2017) The role of forkhead box 1 (FOXO1) in the immune system: dendritic cells, T

- cells, B cells, and hematopoietic stem cells. *Crit. Rev. Immunol.* **37**, 1–13.
90. Pandey M.K., DeGrado T.R. (2016) Glycogen synthase kinase-3 (GSK-3)-targeted therapy and imaging. *Theranostics.* **6**, 571–593.
 91. Wei X., Luo L., Chen J. (2019) Roles of mTOR signaling in tissue regeneration. *Cells.* **8**, 1–23.
 92. Cretella D., Digiacoimo G., Giovannetti E., Cavazzone A. (2019) PTEN alterations as a potential mechanism for tumor. *Cancers (Basel).* **11**, 1–17.
 93. Chalhoub N., Baker S.J. (2009) PTEN and the PI3-kinase pathway in cancer. *Annu. Rev. Pathol. Mech. Dis.* **4**, 127–150.
 94. Nakatani K., Thompson D.A., Barthel A., Sakaue H., Liu W., Weigel R.J., Roth R.A. (1999) Up-regulation of Akt3 in estrogen receptor-deficient breast cancers and androgen-independent prostate cancer lines. *J. Biol. Chem.* **274**, 21528–21532.
 95. Madhunapantula S.R. V., Mosca P.J., Robertson G.P. (2011) The Akt signaling pathway: an emerging therapeutic target in malignant melanoma. *Cancer Biol. Ther.* **12**, 1032–1049.
 96. Yu J., Luo H., Li N., Duan X. (2015) Suppression of type I collagen expression by miR-29b via PI3K, Akt, and Sp1 pathway, part II: an *in vivo* investigation. *Investig. Ophthalmol. Vis. Sci.* **56**, 6019–6028.
 97. Li N., Cui J., Duan X., Chen H., Fan F. (2012) Suppression of type I collagen expression by miR-29b via PI3K, Akt, and Sp1 pathway in human Tenon's fibroblasts. *Investig. Ophthalmol. Vis. Sci.* **53**, 1670–1678.
 98. Lee J.Y., Chung J., Byun Y., Kim K.H., An S.H., Kwon K. (2021) Molecular sciences mesenchymal stem cell-derived small extracellular vesicles protect cardiomyocytes from doxorubicin-induced cardiomyopathy by upregulating survivin expression via the miR-199a-3p-Akt-Sp1/p53 signaling pathway. *Int. J. Mol. Sci.* **22**, 7102.
 99. Yi R., Yang S., Lin X., Zhong L., Liao Y., Hu Z., Huang T., Long H., Lin J., Wu Z., Xie C., Ding S., Luo J., Luo Q., Song Y. (2020) miR-5188 augments glioma growth, migration and invasion through an SP1-modulated FOXO1-PI3K/AKT-c-JUN-positive feedback circuit. *J. Cell. Mol. Med.* **24**, 11800–11813.
 100. Schüle M., Butto T., Dewi S., Schlichtholz L., Strand S., Gerber S., Endres K., Schweiger S., Winter J. (2021) mTOR driven gene transcription is required for cholesterol production in neurons of the developing cerebral cortex. *Int. J. Mol. Sci.* **22**, 1–18.
 101. Ravi V., Jain A., Khan D., Ahamed F., Mishra S., Giri M., Inbaraj M., Krishna S., Sarikhani M., Maity S., Kumar S., Shah R.A., Dave P., Pandit A.S., Rajendran R., Desingu, P.A., Varshney U., Das S., Kolthur-Seetharam U., Rajakumari S., Singh M., Sundaresan N.R. (2019) SIRT6 transcriptionally regulates global protein synthesis through transcription factor Sp1 independent of its deacetylase activity. *Nucl. Acids Res.* **47**, 9115–9131.
 102. Saxton R.A., Sabatini D.M. (2017) mTOR signaling in growth, metabolism, and disease. *Cell.* **168**, 960–976.
 103. Morita M., Gravel S.P., Hulea L., Larsson O., Pollak M., St-Pierre J., Topisirovic I. (2015) mTOR coordinates protein synthesis, mitochondrial activity. *Cell Cycle.* **14**, 473–480.
 104. Astrinidis A., Kim J., Crystal M.K., Olofsson B.A., Torabi B., Sorokina E.M., Azizkhan-Clifford J. (2010) The transcription factor Sp1 regulates centriole function and chromosomal stability through a functional interaction with the mammalian target of rapamycin/raptor complex. *Genes. Chromosomes Cancer.* **49**, 282–297.
 105. Yin P., Zhao C., Li Z., Mei C., Yao W., Liu Y., Li N., Qi J., Wang L., Shi Y., Qiu S., Fan J., Zha X. (2012) Sp1 is involved in regulation of cystathionine γ -lyase gene expression and biological function by PI3K/Akt pathway in human hepatocellular carcinoma cell lines. *Cell. Signal.* **24**, 1229–1240.
 106. Mireuta M., Darnel A., Pollak M. (2010) IGF1R expression in MCF-7 cells is regulated by the PI3K/AKT/mTOR pathway through Sp1-induced increase in transcription. *Growth Factors.* **28**, 243–255.
 107. Reisinger K., Kaufmann R., Gille J. (2003) Increased Sp1 phosphorylation as a mechanism of hepatocyte growth factor (HGF/SF)-induced vascular endothelial growth factor (VEGF/VPF) transcription. *J. Cell Sci.* **116**, 225–238.
 108. Brunet S., Sardon T., Zimmerman T., Wittmann T., Pepperkok R., Karsenti E., Vernos I. (2004) Characterization of the TPX2 domains involved in microtubule nucleation and spindle assembly in *Xenopus* nucleation around chromatin and functions in a network of other molecules, some of which also are regulated by. *Mol. Biol. Cell.* **15**, 5318–5328.
 109. Beishline K., Azizkhan-Clifford J. (2015) Sp1 and the “hallmarks of cancer.” *FEBS J.* **282**, 224–258.
 110. Tang S.W., Yang T.C., Lin W.C., Chang W.H., Wang C.C., Lai M.K., Lin J.Y. (2011) Nicotinamide N-methyltransferase induces cellular invasion through activating matrix metalloproteinase-2 expression in clear cell renal cell carcinoma cells. *Carcinogenesis.* **32**, 138–145.
 111. Jiang J., Gu J. (2010) β 1,4-Galactosyltransferase V: a growth regulator in glioma. *Methods Enzymol.* **479**, 3–23.
 112. Koshikawa N., Hayashi J.I., Nakagawara A., Takenaga K. (2009) Reactive oxygen species-generating mitochondrial DNA mutation up-regulates hypoxia-inducible factor-1 α gene transcription via phosphatidylinositol 3-kinase-Akt/protein kinase C/histone deacetylase pathway. *J. Biol. Chem.* **284**, 33185–33194.
 113. Jin H.O., An S., Lee H.C., Woo S.H., Seo S.K., Choe T.B., Yoo D.H., Lee S.B., Um H.D., Lee S.J., Park M.J., Kim J.I., Hong S.I., Rhee C.H., Park I.C. (2007) Hypoxic condition- and high cell density-induced expression of Redd1 is regulated by activation of hypoxia-inducible factor-1 α and Sp1 through the phosphatidylinositol 3-kinase/Akt signaling pathway. *Cell. Signal.* **19**, 1393–1403.

TRANSCRIPTION FACTOR Sp1 IN THE EXPRESSION OF GENES ENCODING COMPONENTS OF MAPK, JAK/STAT, AND PI3K/Akt SIGNALING PATHWAYS

K. A. Ivanenko¹, V. S. Prassolov¹, and E. R. Khabusheva¹, *

¹ Engelhardt Institute of Molecular Biology, Russian Academy of Sciences, Moscow, 119991 Russia

*e-mail: vr.elmira@gmail.com

Sp1 is a transcription factor of the Sp/KLF family that binds to GC-rich motifs in regulatory regions of genes. Sp1 is involved in the regulation of cell proliferation, apoptosis and differentiation, and angiogenesis. A high level of *SP1* expression, as well as its aberrant transcriptional activity due to the post-translational modifications, is found in cells in oncological diseases, such as lung, breast, pancreatic, thyroid, gastric cancer, and glioma; congenital heart disease, as well as neurodegenerative disorders, including Huntington's and Parkinson's diseases. Binding of Sp1 to GC-rich motifs of the regulatory regions of the genes encoding components of the MAPK, p38, JAK/STAT, PI3K/Akt signaling pathways, is involved in the control of cell proliferation, differentiation, and death. In addition, kinases of these signaling pathways are able to change the transcriptional activity of Sp1 by phosphorylation of certain amino acid residues, which leads to a change in the efficiency of its binding to cofactors and DNA regulatory regions. The review presents data on the relationship between the Sp1 transcription factor and the activity of the MAPK, p38, JAK/STAT, and PI3K/Akt signaling pathways in normal tissues and in various pathologies, including malignant diseases.

Keywords: transcription factor Sp1, malignant diseases, signaling pathways

УДК 612.017.1:576.314

ПОЛУЧЕНИЕ “УСИЛЕННЫХ” ЕСТЕСТВЕННЫХ КИЛЛЕРНЫХ КЛЕТОК С НОКАУТОМ ГЕНОВ *CISH* И *B2M* И ОЦЕНКА ИХ ЦИТОТОКСИЧНОСТИ НА КУЛЬТУРАХ ПЕРВИЧНОЙ ГЛИБЛАСТОМЫ¹

© 2022 г. Г. М. Юсубалиева^{a, b}, Э. Б. Дашинимаев^c, А. А. Горчаков^d,
С. В. Кулемзин^d, О. А. Бровкина^a, А. А. Калинин^a, А. Г. Винокуров^a,
М. В. Ширманова^e, А. В. Таранин^d, В. П. Баклаушев^{a, b, *}

^aФедеральный научно-клинический центр специализированных видов медицинской помощи и медицинских технологий
Федерального медико-биологического агентства России, Москва, 115682 Россия

^bИнститут молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта Российской академии наук, Москва, 119991 Россия

^cРоссийский национальный исследовательский медицинский университет им. Н.И. Пирогова, Москва, 117437 Россия

^dИнститут молекулярной и клеточной биологии Сибирского отделения Российской академии наук,
Новосибирск, 630090 Россия

^eПриволжский национальный исследовательский медицинский университет, Н. Новгород, 603005 Россия

*e-mail: Baklaushev.vp@fnkc-fmba.ru

Поступила в редакцию 14.11.2021 г.

После доработки 30.03.2022 г.

Принята к публикации 30.03.2022 г.

В экспериментальном исследовании с помощью системы CRISPR/Cas9 на основе линии естественных киллерных клеток человека YT и созданной ранее линии YT-VAV1⁺, сверхэкспрессирующей белок VAV1, поддерживающий цитотоксичность, получены две “усиленные” линии клеток с нокаутом гена белка CIS, негативного регулятора цитотоксичности НК-клеток, понижающего чувствительность этих клеток к IL-15. Получены также линии с нокаутом гена β2-микроглобулина, обеспечивающего экспонирование МНС класса I на мембране НК-клеток. Эффективность нокаута определяли методом ПЦР в реальном времени; отсутствие β2-микроглобулина подтверждали с помощью проточной цитометрии со специфическими антителами. Цитотоксичность линий клеток с нокаутом *CISH*^{-/-} или *B2M*^{-/-} тестировали на первичных монослойных культурах клеток мультиформной глиобластомы человека. Цитотоксичность полученных линий оценивали с помощью клеточно-го анализатора, регистрирующего клеточный индекс на основе импеданса клеток. Показано, что YT-CISH^{-/-} эффективнее, чем YT дикого типа элиминируют клетки первичной глиобластомы в условиях эксперимента *in vitro* с клеточным монослоем. Цитотоксичность линий YT-VAV1⁺-CISH^{-/-} и YT-VAV1⁺B2M^{-/-} в отношении клеток глиобластомы была наиболее выраженной, но не отличалась значимо от исходно повышенной цитотоксичности линии YT-VAV1⁺. Полученные линии НК-подобных клеток могут служить прототипом для создания аллогенных и аутологичных “усиленных” НК- и CAR-НК-клеток для иммунотерапии мультиформной глиобластомы.

Ключевые слова: мультиформная глиобластома, НК-клетки, YT, *CISH*, β2-микроглобулин, адоптивная иммунотерапия

DOI: 10.31857/S0026898422050159

ВВЕДЕНИЕ

Естественные киллерные клетки (НК) — это лимфоциты, способные уничтожить инфицированные вирусом или трансформированные клетки путем прямой цитотоксической атаки. НК-клетки служат первой линией системы врожденной иммунной защиты, они находятся в периферическом кровотоке и лимфоидных структурах. Рассматри-

вается возможность использования НК-клеток при проведении адоптивной иммунотерапии солидных опухолей [1]. Изучается возможность применения как нативных аутологичных и аллогенных НК-клеток из пуповинной крови, так и подвергнутых генно-инженерным модификациям (CAR-НК), нацеленным на различные опухоль-специфические антигены [2].

Главную проблему для адоптивной иммунотерапии любых солидных опухолей представляет их иммуносупрессивное микроокружение, инакти-

¹ Дополнительная информация для этой статьи доступна по doi 10.31857/S0026898422050159 для авторизованных пользователей.

вирующее любые цитотоксические противоопухолевые клетки, включая НК [3–5]. Попытки усилить цитотоксичность НК-клеток заключаются, например, в модификации генов сигнальных путей, участвующих в прямой или опосредованной цитокинами активации НК-клеток [6–10]. Одной из потенциальных мишеней для опосредованной цитокинами активации НК-клеток считается CIS – SH2-содержащий индуцируемый цитокинами белок, кодируемый геном *CISH*. CIS снижает восприимчивость НК-клеток к IL-15 и таким образом является мощной контрольной точкой инактивации их цитотоксичности. Делеция гена *CISH* многократно уменьшает порог чувствительности НК-клеток к IL-15, вследствие чего эти клетки могут активироваться на фоне очень низкой концентрации IL-15 в тканях, что приводит к значительному усилению их противоопухолевой цитотоксичности [11]. В экспериментальных исследованиях показано, что НК-клетки с нокаутом *CISH* эффективно элиминируют солидные опухолевые очаги, включая множественные отдаленные метастазы.

Еще один подход к увеличению противоопухолевой активности НК-клеток – повышение экспрессии белков, усиливающих цитотоксичность. Один из таких белков – VAV1 – входит в семейство факторов обмена гуаниновых нуклеотидов (GEF). Ранее нами было показано, что НК-клетки, сверхэкспрессирующие VAV1, проявляют значимо большую цитотоксическую активность в отношении различных опухолевых мишеней [12].

Одним из возможных ограничений на пути к широкому клиническому применению аллогенных НК-клеток может быть их элиминация Т-лимфоцитами хозяина в результате реакции хозяин против трансплантата [13]. Чтобы исключить возможность этого процесса мы предлагаем получить и исследовать НК-клеточные линии, лишённые HLA. Известно, что молекулы HLA-I экспонируются на мембране иммунных клеток в виде гетеродимерного мембранного комплекса, состоящего из кодируемой МНС тяжелой цепи класса I, легкой цепи β_2 -микроглобулина (B2M) и короткого пептида длиной 8–10 аминокислотных остатков. Делеция гена *B2M* приводит к тому, что структура HLA-I нарушается и становится нефункциональной. Таким образом, с помощью нокаута *B2M* можно создать универсальные НК-клетки, не экспонирующие HLA-I.

Цель нашей работы состояла в том, чтобы объединить модификации НК-клеток путем нокаута гена *CISH* в полученных ранее сверхэкспрессирующих VAV1 НК-клетках, а также нокаута *B2M* в VAV1⁺ НК-клетках и оценить цитотоксические свойства полученных клеточных линий на опухолевом монослое клеток мультиформной глиобластомы человека.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Клеточные линии и их культивирование. Создание биобанка первичных линий мультиформной глиобластомы одобрено Локальным этическим комитетом ФНКЦ ФМБА России (Протокол № 16 от 30 сентября 2017, дополнение Протокол № 10 от 6 октября 2020). Забор биоматериала проводили в соответствии с Хельсинкской декларацией и более поздними поправками к ней [14]. В исследование включены пациенты с супратенториальной глиомой, подтвержденной МРТ и гистологически верифицированной как мультиформная глиобластома. Все пациенты дали письменное информированное согласие на участие в исследовании. Образцы интраоперационного материала собраны в период с 2018 по 2020 годы, диагностику опухолей проводили в соответствии с четвертым изданием классификации опухолей центральной нервной системы Всемирной организации здравоохранения [15]. Все доноры биоматериала прошли тестирование на гемотрансмиссивные инфекции.

Опухолевую ткань глиобластомы собирали во время хирургического вмешательства в условиях операционной в стерильные пробирки с раствором для хранения тканей Macs Tissue Storage Solution (“Milteny Biotech”, США). Опухолевую ткань промывали в стерильных условиях в PBS (фосфатно-солевой буфер, “ThermoFisher Scientific”, США) с добавлением антибиотика-антимикотика ($\times 100$) (“ThermoFisher Scientific”), измельчали с помощью скальпеля, а затем подвергали ферментативной диссоциации смесью коллагеназы типа I (“Sigma-Aldrich”, США), диспазы (“Sigma-Aldrich”) и ДНКазы I (“Sigma Aldrich”) в PBS (“ThermoFisher Scientific”). Ферментативную диссоциацию проводили в инкубаторе (37°C, 5% CO₂) при постоянном покачивании (30 мин–1 ч). Клетки центрифугировали при 300 g в течение 5 мин при 4°C, ресуспендировали в DMEM с добавлением 10% фетальной сыворотки крупного рогатого скота (FBS, “ThermoFisher Scientific”) и высевали в матрас (25 см²). В дальнейших экспериментах *in vitro* использовали пять перевиваемых линий, полученных из первичной культуры глиомы, прошедших более 20 пассажей и сохранивших экспрессию маркеров глиобластомы.

Клеточные линии YT и NK92 любезно предоставлены А.В. Филатовым (лаборатория иммунохимии, Институт иммунологии, Москва). Клетки YT культивировали в среде Iscove’s Modified Dulbecco’s Medium (IMDM, “Gibco”, США) с добавлением 10% FBS, 100 Ед./мл пенициллина и 100 мкг/мл стрептомицина в CO₂-инкубаторе в атмосфере 5% CO₂ при 37°C.

Создание VAV1-сверхэкспрессирующей линии НК-клеток человека. Ранее нами был сконструирован лентивирусный вектор, содержащий кассету с Vav1-IRES-copGFP под конститутивным про-

мотором EF1a. С использованием этого вектора получены лентивирусные частицы, проведена трансдукция линии YТ и получена линия YТ-VAV1⁺, обладающая более выраженной цитотоксичностью в отношении метастазирующих карцином и некоторых других опухолей [12].

Конструирование векторов для нокаута *B2M* и *CISH* в YТ-клетках дикого типа и YТ-VAV1⁺. Для конструирования протоспейсеров в качестве гидовых РНК использовали последовательности, описанные ранее для *B2M* [16] и *CISH* [11] (табл. 1). Последовательности переменных участков гидовых РНК для *B2M* длиной 20 нуклеотидов, выбранные согласно программам онлайн ресурсов BLAST (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) и СНОРСНОР (<http://chopchop.cbu.uib.no/>), комплементарны последовательностям нуклеотидов в первом экзоне гена *B2M*. Точки разрыва при использовании обеих гидовых РНК создают делецию 32 нуклеотидов, что позволяет вызвать сдвиг рамки считывания и нокаут гена (рис. 1).

Последовательности переменных участков гидовой РНК для гена *CISH* (20 нуклеотидов), выбранные согласно программам онлайн-ресурса CRISPR.tefor.net, комплементарны последовательностям нуклеотидов во втором и третьем экзонах гена *CISH*. Точки разрыва, полученные при использовании обеих гидовых РНК, создают делецию 259 нуклеотидов, включающую короткий интрон между экзонами 2 и 3. При этом пропадают также небольшие участки белоккодирующей последовательности, что в итоге приводит к делеции 29 нуклеотидов в обеих известных изоформах мРНК гена *CISH* и к сдвигу рамки считывания с последующим нокаутом (рис. 2).

Последовательности гидовых РНК были клонированы в плазмидный вектор pU6-gRNA для экспрессии под U6-промотором. Этот вектор любезно предоставлен Б. Скрыбиным (университет г. Мюнстера, Германия). Работоспособность полученных конструкций *pU6-gRNA_B2M1*, *pU6-gRNA_B2M2*, *pU6-gRNA_CISH-3* и *pU6-gRNA_CISH-4* оценили на клеточной линии иммортализованных фибробластов кожи человека 1608hT-Cas9 с конститутивной экспрессией белка spCas9. Данная клеточная линия приобретена в клеточном банке ИБР РАН (Москва, Россия). С этой целью клетки 1608hT-Cas9 трансфицировали

Таблица 1. Гидовые РНК, использованные для нокаута генов *B2M* и *CISH*

Гидовая РНК	Нуклеотидная последовательность
gRNA_B2M1	CGCGAGCACAGCTAAGGCCA
gRNA_B2M2	GCTACTCTCTCTTTCTGGCC
gRNA_CISH3	TCGGGCCTCGCTGGCCGTA
gRNA_CISH4	CAGACTCACCAGATTCCCGA

плазмидами (по 5 мкг каждой) при помощи электропорации на приборе Bio-Rad Gene Pulser Xcell по следующей программе: три прямоугольных импульса амплитудой 255 В с шириной 5 мс, расстояние между пульсами 0.1 с в буфере для электропорации Gene Pulser Electroporation Buffer (“Bio-Rad”, #1652677). Через 7 дней из клеток стандартным методом выделяли геномную ДНК с использованием очистки смесью фенол–хлороформ. Возникающие делеции на данном этапе анализировали с помощью стандартного T7E1-анализа (с использованием T7-эндонуклеазы 1) после проведения ПЦР с праймерами, фланкирующими целевые области делеции генов *B2M* и *CISH* (табл. 2).

Продукты ПЦР перед обработкой T7E1 подвергали процедуре переотжига (реаннилинг) при 95°C, а затем охлаждали до 25°C с образованием гетеродуплексов исследуемых фрагментов ДНК. В протоколе использовали нуклеазу T7E1 (“New England Biolabs”, Великобритания). На одну реакцию объемом 20 мкл добавляли 1 ед. акт. фермента. Смесью гетеродуплексов и нуклеазы перемешивали и инкубировали при 37°C в течение 30 мин. Далее с помощью гель-электрофореза без предварительной очистки продуктов определяли присутствие делеции в клетках.

Для нокаута генов *B2M* и *CISH* в линии NK-клеток YТ проведена котрансфекция клеток плазмидами *pU6-gRNA_B2M1*, *pU6-gRNA_B2M2* и *pU6-gRNA_CISH-3*, *pU6-gRNA_CISH-4* и плазмидой pCas9-IRES2-EGFP, экспрессирующей под CMV-промотором spCas9 и ген флуоресцентного белка EGFP через IRES2-переход (соотношение плазмид 5/5/10 мкг соответственно). Плазмида pCas9-IRES2-EGFP синтезирована в компании “Евроген” (карта плазмиды pCas9-IRES2-EGFP

CGGGCCTTGTCTGATTGGCTGGGCACGCGTTTAATATAAGTGGAGGCGTTCGCGCTG
GCGGGCATTTCCTGAAGCTGACAGCATTCGGGCCGAGATGTCTCGCTCCGTGGCCT
TAGCTGTGCTCGCGCTACTCTCTCTTTCTGGCCTGGAGGCTATCCAGCGTGGAGTCTC
TCCTACC

Рис. 1. Положение гидовых РНК для нокаута гена *B2M* на последовательности первого экзона гена *B2M* (подчеркнуто). Старт-кодон рамки считывания белоккодирующей последовательности выделен зеленым. Точки разрезания геномной ДНК выделены красным цветом, ожидаемая делеция находится между двумя красными участками.

GCTGTGCATAGCCAAGACCTTCTCCTACCTTCGGGAATCTG GTGAGTCTGAGGGGGG
 AGGCAGGCCTTTTCTGAGTAGTCTGGTGGGAGAAGCTTAGTTCTGCCTTTGAGTCTGAT
 TTGGGAGGCATAGCCCGGCCAGGAGAGTCTGATGGGAGAGGCACAGCCCTCTCTAGG
 GAAGCGTGAAGCTGGAGGCACTGCCTTGACTTGCCTGATTGGTTACCCAGCTAATT
 TCCACTATGTCCTTGGCCCCCTCTGCACTTGCCTAGGCTGGTATTGGGGTTCCA TTAC
 GGCCAGCGAGGCCCGA CAACACCTGCAGAAGATGCCAGAAGGCACGTTCTTAGTA
 CGTGACAGCACGCACCCAGCTACCTGTTACGCTGTGAGTGAACCACTCGTGG
 CCCCACCAATGTACGCATTGAGTATGCCGACTCCAGCTTCCGTCTGGACTCCAAC
 GCTTGTCCAGGCCACGCATCCTGGCCTTCCGGATGTGGTTCAGCCTTGTGCAGCAC
 TATGTGGCCTCCTGCACTGCTGATACCCGAAGCGACAGCCCCGATCCTGCTCCCAC
 CCCGGCCCTGCCTATGCCTAAGGAGGATGCGCCTAGTGACCCAGCACTGCCTGCT
 CCTCCACCAGCCACTGCTGTACACCTAAACTGGTGCAGCCCTTTGTACGCAGAAG
 CAGTGCCCGCAGCCTGCAACACCTGTGCCGCTTGTATCAACCGTCTGGTGGCCG
 ACGTGGACTGCCTGCCACTGCCCGGCGCATGGCCGACTACCTCCGACAGTACCC
 CTTCCAGCTCTGA CTGTACGGGGCAA

Рис. 2. Положение гидовых РНК для нокаута гена *CISH* на последовательности второго и третьего экзонов гена *CISH* (подчеркнуто). Стоп-кодон рамки считывания белоккодирующей последовательности выделен синим цветом. Точки разрезания геномной ДНК показаны красным, ожидаемая делеция находится между двумя красными участками.

представлена в Дополнительных материалах, см. на сайте http://www.molecbio.ru/downloads/2022/5/supp_Yusubalieva_rus.pdf). Трансфекция проведена при помощи электропорации на приборе Bio-Rad Gene Pulser Xcell. Параметры электропорации: три прямоугольных импульса амплитудой 220 В с шириной 5 мс, расстояние между импульсами 0.1 с, буфер для электропорации Gene Pulser Electroporation Buffer (“Bio-Rad”, #1652677). После электропорации клетки помещали в полную ростовую среду (RPMI1540, 10% FBS, 3300 МЕ/мл IL-2, 50 Ед./мл пенициллина, 50 мкг/мл стрептомицина) на 3 суток. Эффективность трансфекции и выживаемость клеток оценивали с использованием проточной цитометрии с функцией сортировки Bio-Rad S3.

НК-клеточные линии. На основе библиотечной линии YT дикого типа (YTwt) и линии YT-VAV1⁺, сверхэкспрессирующей белок VAV1 [12], нами получены четыре модифицированные НК-клеточные линии с повышенной цитотоксичностью (табл. 3).

Иммуноцитохимические методы. В культивируемых клетках первичной глиобластомы с помощью проточной цитометрии и конфокальной микроскопии оценивали экспрессию фибриллярного кислого белка (GFAP), нестина (Ne), Cx43, CD133, CD44, CD70.

Клетки глиомы выращивали в чашках Петри диаметром 30 мм до образования монослоя. Готовые клетки после удаления среды и промывки PBS фиксировали 4%-ным параформальдегидом (10 мин, +4°C). После трехкратной промывки в PBS блокировали неспецифическое связывание (инкубация при комнатной температуре с 5%-ной сывороткой козы в течение 30 мин). Затем в чашки Петри с клетками последовательно вносили коктейли первичных антител (анти-Ne/GFAP, IgG мыши; + анти-CD133/Ki67, IgG кролика) в концентрации 1–5 мкг/мл, инкубировали в течение 1 ч при +37°C, промывали 3 раза и вносили коктейль вторичных антител (антимышинные антитела козы Alexa Fluor 488, антикроличьи антитела козы Alexa Fluor 633, “Invitrogen”, 1 мкг/мл). После инкубации в течение 1 ч при 37°C и трехкрат-

Таблица 2. Нуклеотидные последовательности праймеров, фланкирующих таргетные области делеции генов *B2M* и *CISH*

Праймер	Нуклеотидная последовательность	$T_{отж}$, °C	Ампликон, размер, п.н.
B2M-F	CCTTCTTAAACATCACGAGAC	62.3	183
B2M-R	GAGGGTAGGAGAGACTCA	62.2	
CISH-F	GAGGATCTGCTGTGCATA	62.7	137
CISH-R	GTGCTGTACGTAATAAG	61.2	

Примечание. Условия ПЦР: 1 цикл – 95°C, 1 мин; 40 циклов – 95°C, 10 с и 62°C, 15 с; 1 цикл – 72°C, 1 мин.

Таблица 3. Характеристика модифицированных НК-клеточных линий

Исходная линия	Модифицированная линия	Вид модификации
YTwt (wild type)	YT CISH ^{-/-}	Нокаут гена <i>CISH</i>
YTwt	YT B2M ^{-/-}	Нокаут гена <i>B2M</i>
YT VAV1 ⁺	YT VAV1 ⁺ CISH ^{-/-}	Сверхэкспрессия белка VAV1 в комбинации с нокаутом гена <i>CISH</i>
YT VAV1 ⁺	YT VAV1 ⁺ B2M ^{-/-}	Сверхэкспрессия белка VAV1 в комбинации с нокаутом гена <i>B2M</i>

ной промывки ядра клеток окрашивали Hoechst (“Invitrogen”) по протоколу изготовителя, препараты заключали в 50%-ный забуференный глицерин и микроскопировали (конфокальный микроскоп Nikon A1, Япония).

Исследуемые белки выявляли методом проточной цитометрии с использованием первично меченных антител. При анализе клеток глиомы экспрессию маркеров стволовости оценивали с помощью антител: CD133-PE, CD44-PE, CD70-APC-Vio770. Для прижизненной окраски суспензии YT-клеток после нокаута *B2M* и *CISH* использовали антитела фирмы “Biolegend” против β 2-микроглобулина (#316304, clone 2M2) конъюгированные с красителем PE, и антитела к CIS (D4C10, #8431, “Cell Signaling Technology”, США) соответственно. Окрашивание проводили по стандартному протоколу с инкубацией в течение 30 мин в минимальном объеме раствора первично меченных антител (5 мкг/мл) в DPBS (“ПанЭко”, Россия) с последующей трехкратной отмывкой в DPBS, с осаждением центрифугированием на каждом этапе. Окрашенные клетки анализировали с помощью проточного цитометра MACSQuant (“Miltenyi Biotec”). Результаты обрабатывали с использованием программного обеспечения FlowJo (“Tree Star”).

Анализ цитотоксичности в реальном времени. Платформа RTCA iCelligence (ACEA “Biosciences, Inc.”, США) позволяет проводить динамическое исследование пролиферации и цитотоксической активности. Метод основан на измерении импеданса клеточного монослоя с помощью золотых микроэлектродов. Адгезионные клетки (клетки первичной глиобластомы) действуют как изолятор на поверхности электрода, увеличивая импеданс. Чем выше скорость пролиферации и адгезии клеток, тем круче кривая роста импеданса. На основании этих параметров определяют клеточный индекс (CI), характеризующий уровень пролиферации или клеточной гибели.

Все эксперименты проводили при 37°C в атмосфере с 5% CO₂. Е-планшеты (культуральные планшеты для системы iCELLigence), содержащие 200 мкл культуральной среды в каждой лунке, уравнивали до 37°C в течение 30 мин и устанавливали нулевой уровень CI. С помощью реагента Tri-

pLE Express (“ThermoFisher”) клетки первичной глиобластомы снимали с матраса, отмывали в среде RPMI и подсчитывали. По 10³ клеток ресуспендировали в 200 мкл среды RPMI с 3%-ной аллогенной сывороткой человека группы AB(IV) (“Inc. Innovance”, США) и вносили в лунки планшета iCelligence. Планшет устанавливали в анализатор и оставляли в инкубаторе на 24–48 ч до выхода кривой клеточного индекса на плато.

Важно отметить, что клетки первичной глиобластомы имеют различные индексы пролиферации вследствие выраженной генетической гетерогенности. На первых пассажах почти все первичные культуры содержат несколько различных клонов с разными уровнями пloidности. Поэтому для получения воспроизводимых результатов мы анализировали цитотоксичность модифицированных киллерных клеток на пяти независимо полученных культурах, прошедших не менее 20 пассажей и сохраняющих стабильную экспрессию маркеров глиобластомы и высокую пролиферативную активность.

В качестве контроля использовали лунки с глиомными клетками без последующего внесения клеток-эффекторов, лунки с внесенными клетками-эффекторами без клеток мишеней и лунки со средой для культивирования без клеток. Все исследования проводили в двух повторах. Клетки-эффекторы вносили в соотношении мишень: эффектор 1 : 1 и регистрировали динамику клеточного индекса в течение 144 ч. Среду в лунках с клетками глиомы перед внесением клеток-эффекторов заменяли на свежую, вносили клетки-эффекторы в среде RPMI с 3%-ной аллогенной сывороткой человека.

Статистический анализ выполнен в программе Prism software (GraphPad version 8.0) с помощью однофакторного дисперсионного анализа (one-way ANOVA). Данные представлены как среднее \pm стандартная ошибка среднего.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Создание и иммунофенотипирование первичных перевиваемых культур глиобластомы

На первом этапе была создана коллекция из 20 первичных перевиваемых культур глиобластомы

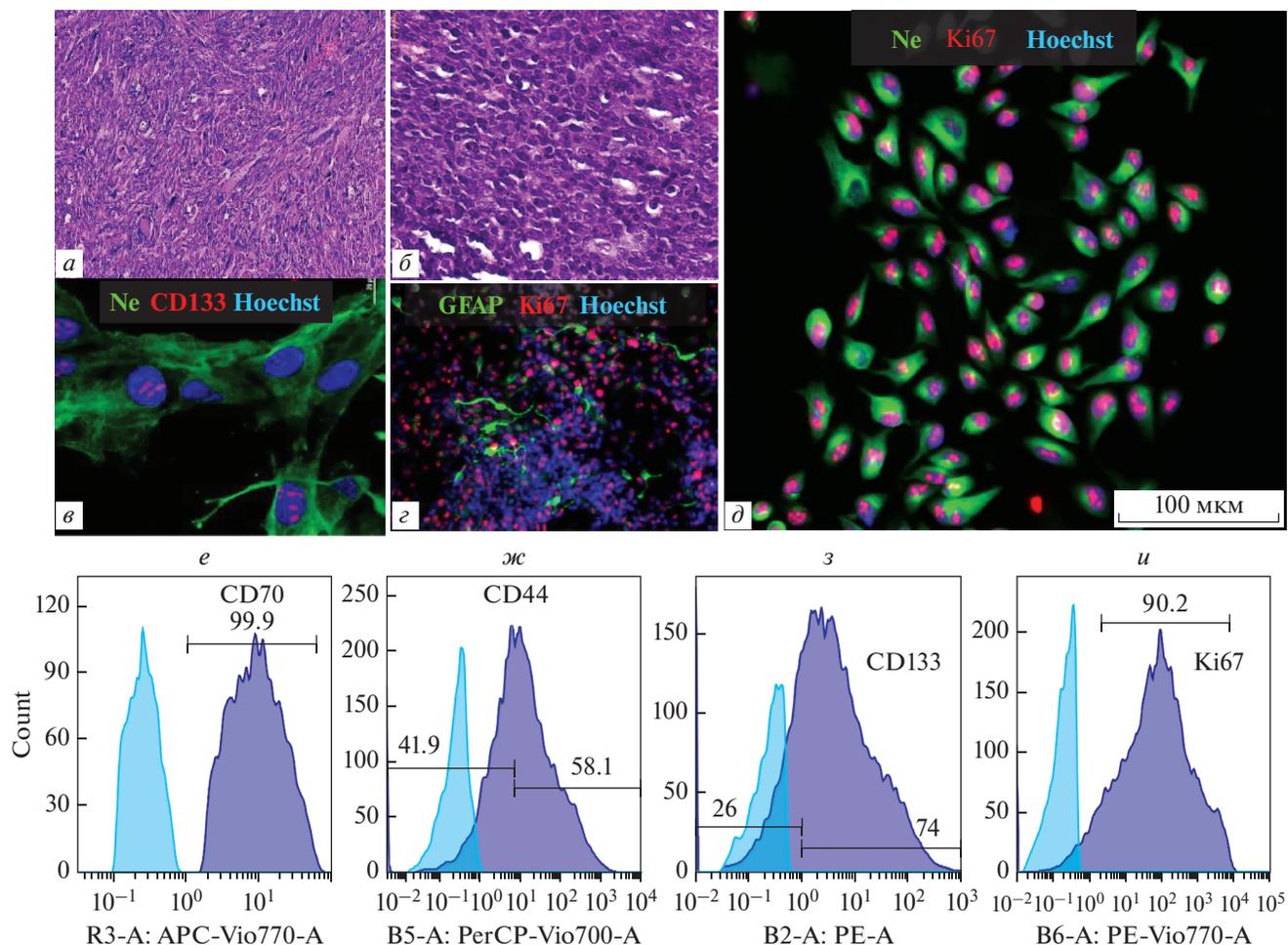


Рис. 3. Гистологический анализ и иммунофенотипирование перевиваемых линий первичной мультиформной глиобластомы. *a, б* – Парафиновые срезы образцов интраоперационного материала, окрашенные гематоксилином-эозином, увеличение $\times 50$ (*a*) и $\times 200$ (*б*). *в–д* – Иммунофлуоресценция первичных культур глиобластомы. *в* – Ne, CD133, увеличение $\times 1000$. *з* – GFAP, Ki67, увеличение $\times 200$. *д* – Ne, Ki67. Масштабная линейка – 100 мкм. Вторичные антимышинные антитела козы (Alexa Fluor 488) и антикроличьи антитела козы (Alexa Fluor 633). *е–и* – Результаты проточной цитометрии CD70 (*е*), CD44 (*ж*), CD133 (*з*), Ki67 (*и*). Ne – нестин.

человека, полученных из образцов интраоперационно удаленного биоматериала от пациентов, оперированных в нейрохирургических отделениях Федерального научно-клинического центра ФМБА России и Приволжского исследовательского медицинского университета Минздрава России. При гистологическом исследовании образцов интраоперационного материала наблюдалась картина ядерной атипии, клеточного полиморфизма, выраженной митотической активности, тромбозы сосудов, микроваскулярная пролиферация, некротические участки (рис. 3*а, б*).

Из операционного биоматериала, содержащего жизнеспособные глиомные клетки IV степени злокачественности, в 100% случаев удалось получить перевиваемые первичные культуры, пассируемые не менее 3–5 раз и хорошо переносящие криоконсервацию. Полученные

нами линейаризованные глиомные клетки сохраняли в процессе многократного пассирования гомогенную морфологию, высокую пролиферативную активность по маркеру пролиферации Ki67 и были положительными по основным маркерам глиальных опухолей: GFAP, Ne и маркерам стволовости, таким как CD133, CD44, CD70, CD15 (рис. 3*в–и*).

Получение нокаутных линий YTw1-CISH^{-/-}, YTw1-B2M^{-/-}, YT-VAV⁺-CISH^{-/-}, YT-VAV⁺-B2M^{-/-}

Предварительная проверка функциональности подобранных гидовых РНК для нокаута генов *B2M* и *CISH*, проведенная на клеточной линии иммортализованных фибробластов кожи человека 1608hT-Cas9, конститутивно экспрессирующих белок spCas9, показала, что трансфекция конструкциями, содержащими последовательности гидо-

вых РНК, приводит к образованию делеций в таргетных генах (рис. 4а).

При получении линии клеток УТ с нокаутом *B2M* мы сначала провели сортировку клеток, эффективно экспрессирующих EGFP после трансфекции плазмидой pCas9-IRES2-EGFP. В результате отобрали клетки (1.7%) с наиболее интенсивной зеленой флуоресценцией (рис. 4б). Далее эти клетки наращивали и окрашивали антителами к *B2M*. С помощью проточной цитометрии показано, что эффективность нокаута *B2M* в полученном клеточном препарате составляет 65.6% (рис. 4в). На последнем этапе с помощью флуоресцентного клеточного сортирования отобрано по 40×10^4 клеток с нулевым сигналом окрашивания на *B2M* в линиях УТ-VAV1⁺ и УТwt. Клетки были размножены и криоконсервированы.

В предварительных параллельных экспериментах при помощи прижизненного иммуноцитохимического окрашивания на CIS обнаружено, что экспрессия мембранного белка CIS (в отличие от *B2M*), не является облигатной, в каждый момент времени примерно 70% клеток остаются CIS-негативными. Таким образом, сортировка мутантных клеток по окрашиванию на CIS теряет смысл. Поэтому мы использовали стратегию, в которой клонирование полученной трансфицированной популяции проводили методом предельного разведения, с последующим анализом единичных клонов.

После котрансфекции УТ-клеток плазмидами pU6-CISH-3, pU6-CISH-4 и плазмидой pCas9-IRES2-EGFP, экспрессирующей под CMV-промотором spCas9 и ген флуоресцентного белка EGFP через IRES2-переход, с помощью проточного цитофлуориметра с функцией сортировки BioRad S3 проанализировали экспрессию флуоресцентного маркера EGFP и отобрали порядка 20000 клеток с интенсивным зеленым сигналом (0.5% от общей популяции, рис. 4б), которые затем подвергли клональной селекции. В результате получено 18 клонов, из которых лишь два (№ 2 и № 4) признаны гомозиготными мутантными линиями клеток УТ с нокаутом гена *CISH* (рис. 4г). Эффективность нокаута *CISH* в полученных клонах в итоге составила примерно 30% (11 аллелей из 36). Для подтверждения возникновения делеции проведен более детальный анализ данного локуса при помощи секвенирования по Сэнгеру.

Применяя стратегию, аналогичную описанной, мы получили также линии клеток УТ, несущих трансген *VAV1*, с нокаутом генов *B2M* и *CISH* (УТ-VAV1⁺CISH^{-/-} и УТ-VAV1⁺-*B2M*^{-/-}).

Изучение цитотоксической активности НК-клеток с нокаутом генов B2M и CISH на культурах первичной глиобластомы

Сравнительный анализ цитотоксичности полученных НК-клеток показал, что как сама линия УТ-VAV1⁺, так и все ее производные обладают гораздо более высокой цитотоксической активностью, чем УТ дикого типа, клетки которых практически не проявляли цитотоксичности в отношении глиобластомы. Эти данные хорошо согласуются с полученными ранее результатами, согласно которым УТ-VAV1⁺ обладает более высокой цитотоксичностью в отношении различных типов злокачественных опухолевых клеток [12]. Нокаут *B2M*, который должен сопровождаться нарушением экспонирования МНС на мембране НК-клеток, не повлиял существенно на цитотоксическую активность полученных линий.

В связи с тем, что линия УТwt почти не проявляла цитотоксичности в отношении исследованных глиомных линий, для исключения влияния индивидуальных особенностей линии УТ в качестве дополнительного контроля цитотоксичности линейных НК-клеток в отношении мультиформной глиобластомы мы применили еще одну линию — NK92, полученную из НК-клеточной лимфомы человека. В проведенной серии экспериментов ни одна из немодифицированных линий НК-клеток, как и линий с нокаутом гена *B2M* УТwt, не проявляла цитотоксичности по отношению к клеткам глиобластомы. Модифицированные УТwt-CISH^{-/-}, УТ-VAV1⁺CISH^{-/-}, как и УТ-VAV1⁺-*B2M*^{-/-} показали выраженную цитотоксичность. Наибольший видимый цитотоксический эффект, сопровождающийся почти 100%-ной гибелью опухолевого монослоя и приближением значения импеданса к его значениям в бесклеточной среде через 100 ч после коинкубации, наблюдали при применении УТ-VAV1⁺-CISH^{-/-} (рис. 5а). Статистический анализ данных всех серий экспериментов показал, что цитотоксичность “нокаутированной” линии УТwt-CISH^{-/-} была значимо ниже, чем у клеток исходной линии УТwt ($p < 0.05$ при сравнении с использованием параметрических методов). Цитотоксичность УТ-VAV1⁺-*B2M*^{-/-} не отличалась от цитотоксичности исходной линии УТ-VAV1⁺. Цитотоксичность УТ-VAV1⁺-CISH^{-/-}, хотя и имела тенденцию к повышению по сравнению с цитотоксичностью исходной линии УТ-VAV1⁺, однако не отличалась статистически значимо от цитотоксичности материнской линии, как показывает анализ интегральных данных (рис. 5б).

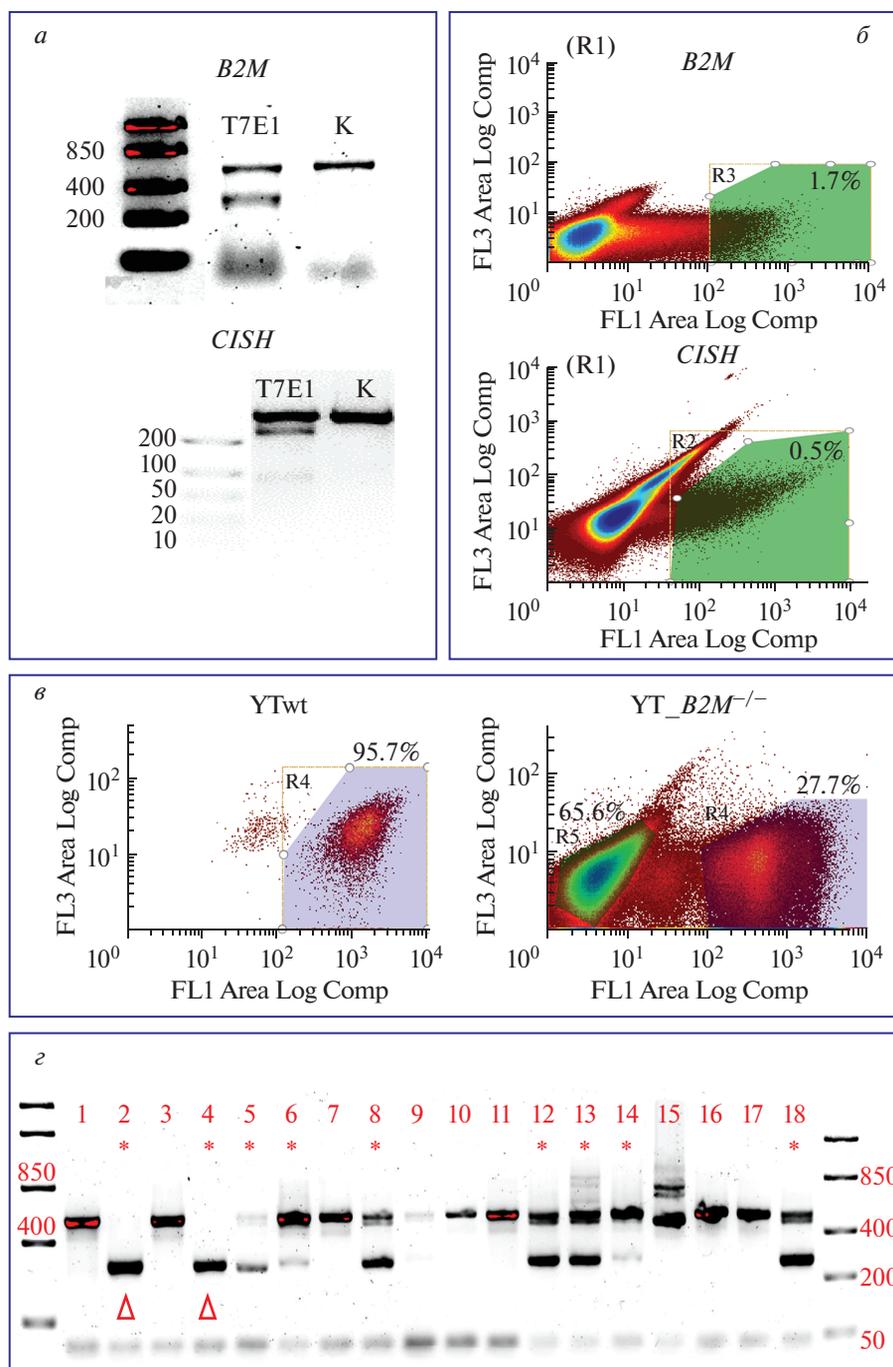


Рис. 4. Получение линий Yt-VAV1⁺ и Ytwt с нокаутом генов *B2M* и *CISH*. *a* – T7E1-анализ эффективности гидовых РНК для получения делеций генов *B2M* и *CISH* в линии клеток 1608hT-Cas9. Появление дополнительных полос в дорожке T7E1 указывает на присутствие значимых мутаций (делеций), что подтверждает эффективность гидовых РНК. *б* – Сортинг клеток Yt после трансфекции плазмидой pCas9-IRES2-EGFP. *г* – Иммуноцитохимическое исследование клеток Yt дикого типа (Ytwt) и Yt с нокаутом гена *B2M* (Yt-B2M^{-/-}) методом проточной цитометрии с антителами к *B2M*. *з* – T7E1-анализ клонов Yt с нокаутом гена *CISH*.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Применение CAR-T-клеточной терапии серьезно ограничивается необходимостью использования аутологичных клеток для производства трансгенного продукта. Аллогенные Т-клетки с интакт-

ным Т-клеточным рецептором могут атаковать организм реципиента, вызывая реакцию трансплантат-против-хозяина. Существуют пилотные работы, в которых нокаут Т-клеточного рецептора делает Т-клетки пригодными к использованию в

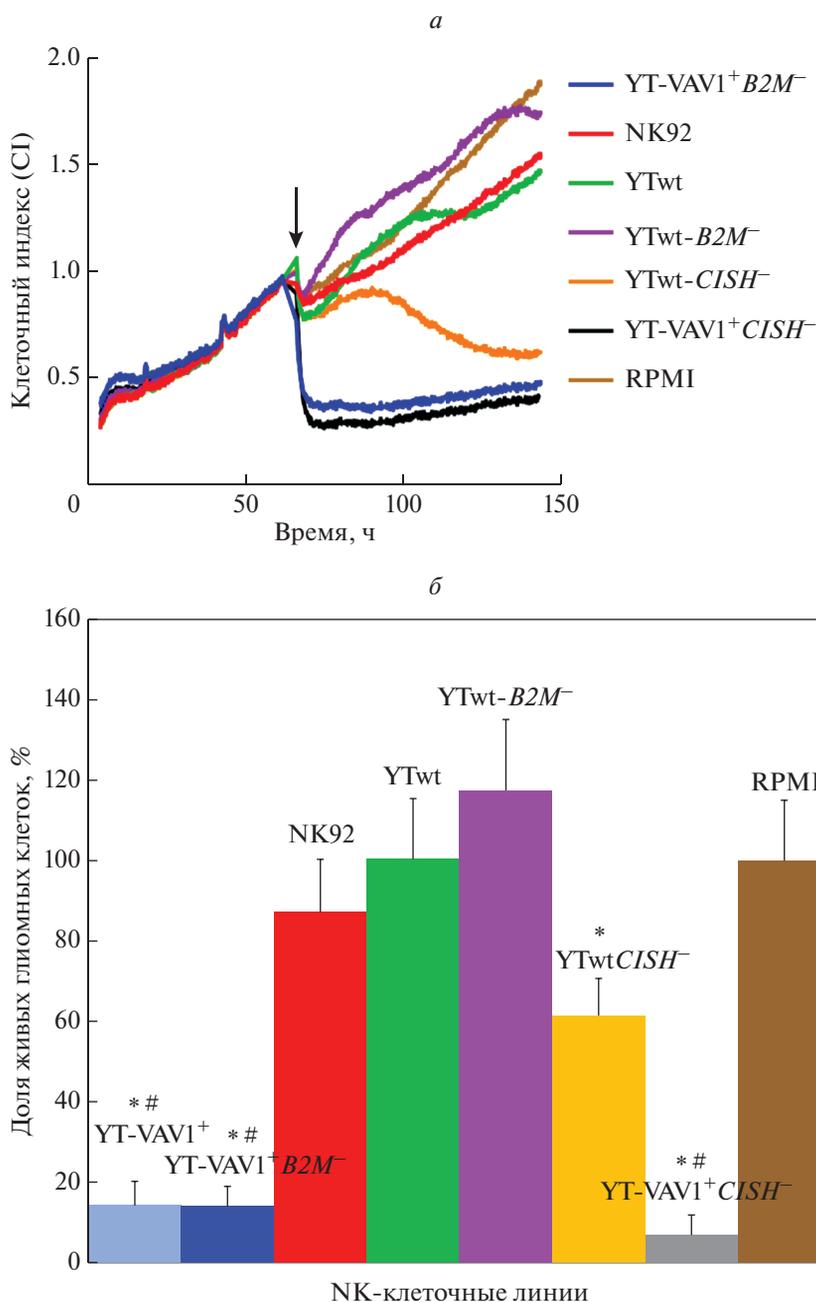


Рис. 5. Цитотоксичность линий НК-клеток YTwt и YT-VAV1⁺ с нокаутом генов *B2M* и *CISH* в отношении монослойных культур клеток мультиформной глиобластомы человека. *а* – Кривые клеточного индекса, рассчитанного на основе импеданса в анализаторе RTCA iCelligence. По оси ординат отложены значения клеточного индекса, нормированные по значению на момент добавления НК-клеток; по оси абсцисс – время. Момент внесения НК-клеток отмечен стрелкой. *б* – Результирующие показатели цитотоксичности в пяти экспериментах на независимо полученных линиях мультиформной глиобластомы через 100 ч после начала эксперимента (30 ч после внесения НК-клеток) по сравнению с контролем. Цветовые обозначения линий НК-клеток такие же, как на панели *а*. * $p < 0.05$ при сравнении с YTwt; # $p < 0.05$ при сравнении с NK92.

аллогенном формате, однако этот подход не получил широкого распространения из-за технических сложностей (необходимо обязательно избавляться от немодифицированных клеток в окончательном продукте). В то же время, НК-

клетки не экспрессируют Т-клеточный рецептор и практически не вызывают реакции трансплантат-против-хозяина при аллогенном использовании. В связи с этим для производства CAR-НК-клеточных продуктов можно применять пуповинные НК-

клетки без дополнительных модификаций [17]. Пока не вполне понятно, насколько долгим может быть персистенция аллогенных НК-клеток в организме пациента, однако мы предполагаем, что Т-клетки реципиента могут со временем элиминировать НК-клетки донора. Один из вариантов решения проблемы иммунного ответа на аллогенные клетки – нокаут гена *B2M*, нарушающего функционирование мембранного комплекса МНС-I, как в случае аллогенных CAR-T-клеток [16]. МНС-негативные НК-клетки должны стать неуязвимыми для Т-клеток реципиента, что, вероятнее всего, увеличит время их персистенции в организме пациента и повысит эффективность терапии, однако этот подход нуждается в дальнейшем изучении.

В связи с низкой эффективностью иммунотерапии немодифицированными лимфоцитами и НК-клетками, сегодняшние тренды клеточной иммунотерапии солидных опухолей предполагают не только создание CAR-NK, но и разработку подходов к модификации НК-клеток, повышению их цитотоксической активности, в частности, путем воздействия на ингибиторный белок CIS [11, 18]. В исследованиях, проведенных ранее на мышах, показано, что делеция гена *Cish* делает НК-клетки гиперчувствительными к IL-15, о чем свидетельствует усиленная пролиферация, выживаемость, продукция IFN- γ и повышенная цитотоксичность по отношению к солидным опухолям. Один из молекулярных механизмов активации клеток с нокаутом *Cis* – усиление передачи сигналов JAK-STAT, поскольку *Cis* взаимодействует с тирозинкиназой JAK1, ингибируя ее ферментативную активность и направляя JAK на протеасомную деградацию [18]. Очень убедительны данные экспериментов *in vivo*, проведенных Delconte и соавт., которые показали, что мыши с нокаутом гена *Cish* устойчивы к формированию метастазов меланомы, рака предстательной и молочной железы [11]. Новизна нашего исследования заключалась в попытке комбинирования нокаута ингибитора иммунных контрольных точек CIS в НК-клетках человека, сверхэкспрессирующей другой белок, ассоциированный с повышенной цитотоксичностью – VAV1 [12].

Для решения задачи по созданию универсальных “усиленных” киллерных клеток, обладающих высокой цитотоксичностью по отношению к опухолевым клеткам, была выбрана иммортализованная перевиваемая линия YT с НК-подобным фенотипом, поскольку эти клетки, обладающие способностью к перфорин-опосредованному лизису мишеней, не зависят от присутствия IL-2 в среде при культивировании и не экспрессируют Fc-рецепторы [19–21]. Вместе с тем, важно отметить, что линейные иммортализованные клетки YT могут отличаться от нормальных НК-клеток, поэтому модификации этой линии, выполненные на-

ми, это лишь модельная система для исследования влияния сверхэкспрессии VAV1 и нокаута генов *B2M* и *CISH* на функции НК-клеток.

В данном исследовании нами показано, что нокаут *B2M* в линии YT, сверхэкспрессирующей VAV1, не влияет на цитотоксическую активность этих клеток в отношении клеток мультиформной глиобластомы, а нокаут белка CIS статистически значимо увеличивает цитотоксичность YT дикого типа, но не влияет существенно на цитотоксические свойства модифицированных клеток YT-VAV1⁺. Отсутствие значимого усиления цитотоксичности YT-VAV1⁺ после нокаута в них CIS можно объяснить с помощью двух гипотез: во-первых, сверхэкспрессия VAV1⁺ может вызывать настолько мощную активацию цитотоксичности НК-клеток и их дегрануляцию, что повышение их чувствительности к IL-15 просто незаметно на этом фоне. Во-вторых, IL-2-независимая линия YT-VAV1⁺ может быть в высокой степени и IL-15-независимой, поэтому нокаут CIS никак не влияет на ее цитотоксичность. Вместе с тем, для изучения молекулярных механизмов, задействованных в активации цитотоксичности линии YT-VAV1⁺CIS^{-/-}, требуются дальнейшие исследования, с применением ингибиторов сигнальных путей активации НК-клеток. Кроме того, следует иметь в виду, что цитотоксичность созданных нами линий может существенно варьировать при переходе на 3D модель солидных опухолей – опухолевые сфероиды, а также при постановке экспериментов *in vivo*.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

На основе НК-подобной клеточной линии YT и ее модифицированного варианта YT-VAV1⁺, сверхэкспрессирующего белок VAV1, активирующий цитотоксические свойства, с помощью системы CRISPR/Cas9 созданы линии YT-B2M^{-/-}, YT-VAV1-B2M^{-/-} и YT-CISH^{-/-}, YT-VAV⁺CISH^{-/-} с нокаутом генов *B2M* и *CISH* соответственно. В экспериментах на монослойных культурах первичной глиобластомы показано, что нокаут *B2M* не влияет на цитотоксические свойства YT и YT-VAV⁺, а нокаут *CISH* статистически значимо повышает цитотоксичность YT и не влияет на цитотоксичность YT-VAV1⁺. Полученные линии могут стать платформой для создания универсальных усиленных CAR-NK-клеток для эффективной иммунотерапии мультиформной глиобластомы человека.

Коллектив авторов благодарит Центр высокоточного редактирования генома и генетических технологий для биомедицины, Российский национальный исследовательский медицинский университет имени Н.И. Пирогова за помощь в ра-

боте с генетическими конструкциями системы CRISPR/Cas9.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда (грант № 21-74-20110) и Российского фонда фундаментальных исследований (грант № 18-29-01022).

Все процедуры, выполненные в данной работе, соответствуют этическим стандартам институционального комитета по исследовательской этике и Хельсинкской декларации 1964 года и ее последующим изменениям или сопоставимым нормам этики. У всех пациентов получено письменное информированное согласие.

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Myers J.A., Miller J.S. (2021) Exploring the NK cell platform for cancer immunotherapy. *Nat. Rev. Clin. Oncol.* **18**(2), 85–100. <https://doi.org/10.1038/s41571-020-0426-7>
2. Rezvani K., Rouse R., Liu E., Shpall E. (2017) Engineering natural killer cells for cancer immunotherapy. *Mol. Ther.* **25**(8), 1769–1781. <https://doi.org/10.1016/j.ymthe.2017.06.012>
3. Mamessier E., Sylvain A., Thibault M.L., Houvenaghel G., Jacquemier J., Castellano R., Gonçalves A., André P., Romagné F., Thibault G., Viens P., Birnbaum D., Bertucci F., Moretta A., Olive D. (2011) Human breast cancer cells enhance self tolerance by promoting evasion from NK cell antitumor immunity. *J. Clin. Invest.* **121**(9), 3609–3622. <https://doi.org/10.1172/JCI45816>
4. Pasero C., Gravis G., Guerin M., Granjeaud S., Thomassin-Piana J., Rocchi P., Paciencia-Gros M., Poizat F., Bentobji M., Azario-Cheillan F., Walz J., Salem N., Brunelle S., Moretta A., Olive D. (2016) Inherent and tumor-driven immune tolerance in the prostate microenvironment impairs natural killer cell antitumor activity. *Cancer Res.* **76**(8), 2153–2165. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-15-1965>
5. Suen W.C., Lee W.Y., Leung K.T., Pan X.H., Li G. (2018) Natural killer cell-based cancer immunotherapy: a review on 10 years completed clinical trials. *Cancer Invest.* **36**(8), 431–457. <https://doi.org/10.1080/07357907.2018.1515315>
6. Igarashi T., Wynberg J., Srinivasan R., Becknell B., McCoy J.P. Jr, Takahashi Y., Suffredini D.A., Linehan W.M., Caligiuri M.A., Childs R.W. (2004) Enhanced cytotoxicity of allogeneic NK cells with killer immunoglobulin-like receptor ligand incompatibility against melanoma and renal cell carcinoma cells. *Blood.* **104**(1), 170–177. <https://doi.org/10.1182/blood-2003-12-4438>
7. Carlsten M., Childs R.W. (2015) Genetic manipulation of NK cells for cancer immunotherapy: techniques and clinical implications. *Front. Immunol.* **6**, 266. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2015.00266>
8. Yang L., Shen M., Xu L.J., Yang X., Tsai Y., Keng P.C., Chen Y., Lee S.O. (2017) Enhancing NK cell-mediated cytotoxicity to cisplatin-resistant lung cancer cells via MEK/Erk signaling inhibition. *Sci. Rep.* **7**(1), 7958. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-08483-z>
9. Freund-Brown J., Chirino L., Kambayashi T. (2018) Strategies to enhance NK cell function for the treatment of tumors and infections. *Crit. Rev. Immunol.* **38**(2), 105–130. <https://doi.org/10.1615/CritRevImmunol.2018025248>
10. Nayyar G., Chu Y., Cairo M.S. (2019) Overcoming resistance to natural killer cell based immunotherapies for solid tumors. *Front. Oncol.* **9**, 51. <https://doi.org/10.3389/fonc.2019.00051>
11. Delconte R.B., Kolesnik T.B., Dagley L.F., Rautela J., Shi W., Putz E.M., Stannard K., Zhang J.-G., Teh C., Firth M., Ushiki T., Andoniou C.E., Degli-Esposti M.A., Sharp P.P., Sanvitali C.E., Infusini G., Liao N.P.D., Linossi E.M., Burns C.J., Carotta S., Gray D.H.D., Seillet C., Hutchinson D.S., Belz G.T., Webb A.I., Alexander W.S., Li S.S., Bullock A.N., Babon J.J., Smyth M.J., Nicholson S.E., Huntington N.D. (2016) CIS is a potent checkpoint in NK cell-mediated tumor immunity. *Nat. Immunol.* **17**(7), 816–824. <https://doi.org/10.1038/ni.3470>
12. Smagina A.S., Kulemzin S.V., Yusubaliev G.M., Kedrova A.G., Sanzharov A.E., Ivanov Y.V., Matvienko D.A., Kalsin V.A., Gorchakov A.A., Baklaushev V.P., Tarantin A.V. (2021) VAV1-overexpressing YT cells display improved cytotoxicity against malignant cells. *Bio-technol. Appl. Biochem.* **68**(4), 849–855. <https://doi.org/10.1002/bab.2001>
13. Paul S., Lal G. (2017) The molecular mechanism of natural killer cells function and its importance in cancer immunotherapy. *Front. Immunol.* **8**, 1124. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2017.01124>
14. (2013) World Medical Association Declaration of Helsinki: ethical principles for medical research involving human subjects. *JAMA.* **310**(20), 2191–2194.
15. Louis D.N., Ohgaki H., Wiestler O.D., Cavenee W.K., Burger P.C., Jouvet A., Scheithauer B.W., Kleihues P. (2007) The 2007 WHO classification of tumors of the central nervous system. *Acta Neuropathol.* **114**(2), 97–109.
16. Ren J., Zhang X., Liu X., Fang C., Jiang S., June C.H., Zhao Y. (2017) A versatile system for rapid multiplex genome-edited CAR T cell generation. *Oncotarget.* **8**(10), 17002–17011. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.15218>
17. Daher M., Rezvani K. (2021) Outlook for new CAR-based therapies with a focus on CAR NK cells: what lies beyond CAR-engineered T cells in the race against cancer. *Cancer Discov.* **11**(1), 45–58. <https://doi.org/10.1158/2159-8290.CD-20-0556>
18. Daher M., Basar R., Gokdemir E., Baran N., Rezvani K. (2021) Targeting a cytokine checkpoint enhances the fitness of armored cord blood CAR-NK cells. *Blood.* **137**(5), 624–636. <https://doi.org/10.1182/blood.2020007748>

19. Yodoi J., Teshigawara K., Nikaido T., Fukui K., Noma T., Honjo T., Takigawa M., Sasaki M., Minato N., Tsudo M. (1985) TCGF (IL 2)-receptor inducing factor(s). I. Regulation of IL 2 receptor on a natural killer-like cell line (YT cells). *J. Immunol.* **134**(3), 1623–1630.
20. Deaglio S., Zubiatur M., Gregorini A., Bottarel F., Ausiello C.M., Dianzani U., Sancho J., Malavasi F. (2002) Human CD38 and CD16 are functionally dependent and physically associated in natural killer cells. *Blood.* **99**(7), 2490–2498.
<https://doi.org/10.1182/blood.v99.7.2490>
21. Edsparr K., Speetjens F.M., Mulder-Stapel A., Goldfarb R.H., Basse P.H., Lennernäs B., Kuppen P.J.K., Albertsson P. (2010) Effects of IL-2 on MMP expression in freshly isolated human NK cells and the IL-2-independent NK cell line YT. *J. Immunother.* **33**(5), 475–481.
<https://doi.org/10.1097/CJI.0b013e3181d372a0>

ENHANCED NATURAL KILLERS WITH CISH AND B2M GENE KNOCKOUTS REVEAL INCREASED CYTOTOXICITY IN GLIOBLASTOMA PRIMARY CULTURES

G. M. Yusubalieva^{1, 2}, E. B. Dashinimaev³, A. A. Gorchakov⁴, S. V. Kulemzin⁴,
 O. A. Brovkina¹, A. A. Kalinkin¹, A. G. Vinokurov¹, M. V. Shirmanova⁵,
 A. V. Taranin⁴, and V. P. Baklaushev^{1, 2, *}

¹ Federal Research and Clinical Center, Federal Medical and Biological Agency of Russia, Moscow, 115682 Russia

² Engelhardt Institute of Molecular Biology, Russian Academy of Sciences, Moscow, 119991 Russia

³ Pirogov Russian National Research Medical University, Moscow, 117437 Russia

⁴ Institute of Molecular and Cellular Biology, Siberian Branch, Russian Academy of Sciences, Novosibirsk, 630090 Russia

⁵ Volga National Research Medical University, Nizhny Novgorod, 603005 Russia

*e-mail: Baklaushev.vp@fnkc-fmba.ru

In an experimental study using the CRISPR/Cas9 system, the “enhanced” NK cell lines with a knockout of CISH, e.g., the gene for the CIS protein, which is a negative regulator of NK cytotoxicity, as well as two lines with a knocked-out $\beta 2$ -microglobulin gene which provides membrane exposure of MHC class I, were obtained from two parental lines of human natural killers, i.e., YT wild type, and YT-VAV1⁺, which overexpresses the VAV1 cytotoxicity enhancing protein. The knockout efficiency was determined by real-time PCR as well as by flow cytometry with specific antibodies. The resulting CISH^{-/-} or B2M^{-/-} knockout lines were tested for cytotoxicity in primary monolayer cultures of human glioblastoma multiforme. The cytotoxicity of the obtained lines was assessed using a cell analyzer that records the cell index based on the cell impedance. YT-CISH^{-/-} has been shown to be significantly more effective than wild-type YT in eliminating primary glioblastoma cells in an *in vitro* cell monolayer experiment. The cytotoxicity of the YT-VAV1⁺-CISH^{-/-} and YT-VAV1⁺B2M^{-/-} lines against glioblastoma cells was the highest, but overall, it did not significantly differ from the initially increased cytotoxicity of the YT-VAV1⁺ line. The obtained lines of NK-like cells may serve as a prototype for the creation of “enhanced” allogeneic and autologous NK- and CAR-NK cells for the immunotherapy of glioblastoma multiforme.

Keywords: glioblastoma multiforme, NK cells, YT, CISH, $\beta 2$ -microglobulin, adoptive immunotherapy

УДК 577.29

БИОЧИП ДЛЯ ГЕНОТИПИРОВАНИЯ ПОЛИМОРФИЗМОВ, АССОЦИИРОВАННЫХ С ЦВЕТОМ ГЛАЗ, ВОЛОС, КОЖИ, ГРУППОЙ КРОВИ, ПОЛОВОЙ ПРИНАДЛЕЖНОСТЬЮ, ОСНОВНОЙ ГАПЛОГРУППОЙ Y-ХРОМОСОМЫ, И ЕГО ИСПОЛЬЗОВАНИЕ ДЛЯ ИССЛЕДОВАНИЯ СЛАВЯНСКОЙ ПОПУЛЯЦИИ

© 2022 г. Д. О. Фесенко^а*, И. Д. Ивановский^б, П. Л. Иванов^с, Е. Ю. Земскова^с, А. С. Агапитова^б, С. А. Поляков^а, О. Е. Фесенко^д, М. А. Филиппова^а, А. С. Заседателев^а

^аИнститут молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта Российской академии наук, Москва, 119991 Россия

^бООО «Центр исследования ДНК», Химки, Московская обл., 141402 Россия

^сРоссийский центр судебно-медицинской экспертизы Министерства здравоохранения Российской Федерации, Москва, 125284 Россия

^дНаучно-исследовательский институт физики Южного федерального университета, Ростов-на-Дону, 344090 Россия

*e-mail: deferos@yandex.ru

Поступила в редакцию 04.04.2022 г.

После доработки 20.04.2022 г.

Принята к публикации 20.04.2022 г.

В работе представлен метод генотипирования панели из 60 однонуклеотидных полиморфизмов (SNP) с помощью одностадийной ПЦР с последующей гибридизацией на гидрогелевом биочипе. Пул анализируемых полиморфизмов состоит из 41 SNP, входящих в панель HIrisPlex-S, 4 SNP гена *ABO* (261G>Del, 297A>G, 657C>T, 681G>A), маркеров генов *AMELX* и *AMELY* и 14 SNP-маркеров гаплогрупп Y-хромосомы: В (M60), С (M130), D (CTS3946), Е (M5388), G (P257), H (M2920), I (U179), J (M304), L (M185), N (M231), O (M175), Q (M1105), R (P224) и T (M272). Получаемые генетические данные позволяют прогнозировать фенотип искомого лица по признакам цвета глаз, волос, кожи, группе крови АВ0, половой принадлежности, географического происхождения по мужской линии. Протокол постановки максимально упрощен для облегчения внедрения метода в практику. Установлено распределение частот аллелей исследуемых полиморфизмов, а также групп крови АВ0 среди славян ($N = 482$), происхождением преимущественно из центральной России.

Ключевые слова: ДНК-фенотипирование, биочип, криминалистика, цвет глаз, цвет волос, цвет кожи, группа крови АВ0, гаплогруппа Y-хромосомы, пол

DOI: 10.31857/S0026898422050056

Преступность сопровождает человечество на протяжении всей его истории и поимка преступника всегда будет оставаться актуальной задачей для общества. Именно поэтому криминалистика — одна из первых областей, в которой достижения молекулярной биологии нашли практическое применение [1]. Запрос экспертов-криминалистов стимулирует исследования, направленные на поиск

любой полезной для следствия информации, которая может быть извлечена из генома. В настоящее время можно разделить получаемую информацию на два типа: идентифицирующая и поисковая.

Идентифицирующая информация представляет собой уникальный, в масштабе популяции, генетический профиль человека. Пионерские работы в области молекулярно-генетической экспертизы были посвящены идентификации, или *геномной дактилоскопии*. Наибольшее практическое развитие геномная дактилоскопия получила на своей родине, в Великобритании: на июнь 2021 года национальная база этой страны (The United Kingdom National DNA Database; NDNAD) содержала 5.7 млн генетических профилей (для

Сокращения: AFR (African) — африканская популяция; AMR (Ad Mixed American) — смешанная американская популяция; EAS (East Asian) — восточноазиатская популяция; EUR (European) — европейская популяция; SAS (South Asian) — южноазиатская популяция; SBE (single-base extension) — реакция однонуклеотидной пролонгации; SNP (single nucleotide polymorphism) — однонуклеотидный полиморфизм; STR (short tandem repeat) — короткий tandemный повтор.

сравнения, в национальной базе биометрической информации IDENT1 находится немногим больше — всего 7.1 млн человек). Учитывая, что по данным NDNAD более 15% профилей задублировано, в базе оказалось не более 7.3% всего населения страны. Несмотря на то, что в NDNAD попадают наименее законопослушные граждане, вероятность идентификации преступника по совпадению с профилем в базе, как можно видеть, невелика даже в наиболее развитых в этом отношении странах.

В случае отсутствия профиля разыскиваемого лица в базе данных на первый план выходят методы получения поисковой информации, позволяющие сформировать круг подозреваемых лиц. Свидетельские показания относительно внешности преступника субъективны и не всегда достоверны вследствие стресса, плохого зрения и зрительной памяти, слабой освещенности. В последние годы, благодаря развитию генетики, в криминалистике появился новый термин “genetic witness” — генетический свидетель. Это ДНК преступника, содержащая объективную информацию о нем. Подход, направленный на извлечение этой информации, получил название ДНК-фенотипирования. К настоящему моменту установлены генетические ассоциации для многих фенотипических признаков: пола [2], пигментации (цвет глаз волос и кожи) [3], наличия веснушек [4], склонности к раннему поседению [5] и облысению [6], морфологии волос (прямые/вьющиеся) [7], роста [8], индекса массы тела [9], возраста [10], биогеографического происхождения [11], черт лица [12]. Большинство из этих признаков относится к полигенным и не для всех обнаруженные детерминанты позволяют прогнозировать фенотип с достаточной для следствия достоверностью. В связи с этим мы отобрали только те признаки, для которых ассоциация надежно подтверждена. В последнее десятилетие наиболее исследуемые поисковые признаки связаны с пигментацией: цвет глаз, волос и кожи. Из нескольких сотен опубликованных работ наиболее достоверно этот признак прогнозирует панель *HirisPlex-S*, предложенная Манфредом Кайзером и Сюзан Уолш [3], поэтому 41 полиморфизм (SNP)¹, входящий в их панель, мы включили в нашу работу.

Группа крови АВ0, несмотря на то, что не является фенотипическим признаком внешности, исторически входит в круг поисковых характеристик, значимых для следствия. Ранее нами опубликован протокол определения группы крови и пола методом генотипирования на биочипах [13], который уже успешно внедрен в экспертную практику [14]. В представленной здесь работе мы

использовали те же полиморфизмы, однако существенно улучшили методику их генотипирования.

Половая принадлежность, как один из наиболее важных фенотипических признаков, входит во все наборы для геномной дактилоскопии по локусам коротких tandemных повторов (STR-локусам). В качестве маркера чаще всего используется ген *AMEL*, распложенный на обеих половых хромосомах, но отличающийся по последовательности на X- и Y-хромосомах. Мы сочли целесообразным также включить его в свою панель.

Последняя группа признаков, внесенная в это исследование — основные, или коровые (от англ. core), гаплогруппы Y-хромосомы. В связи с неоднородностью распределения гаплогрупп внутри разных этносов знание гаплогруппы в образце в ряде случаев может дать информацию о географическом происхождении человека. При формировании перечня гаплогрупп, которые будут включены в исследование, мы опирались на разработанную YCC (Y Chromosome Consortium) филогенетическую структуру Y-хромосомы, состоящую из 20 основных гаплогрупп, обозначаемых латинскими буквами от А до Т [15, 16]. Мы исключили 6 гаплогрупп, так как определение четырех из них не будет давать дополнительной информации (А — предковая для всех современных мужчин, F — предковая для гаплогрупп G–T, K — для L–T, P — для Q и R), а S и M встречаются только на островах Юго-Восточной Азии и Океании и не актуальны для Евразийского континента. В итоге, в панель вошло 14 из 20 основных гаплогрупп, образующих, согласно классификации YCC, самостоятельные стволы эволюционного древа Y-хромосомы: В, С, D, Е, G, H, I, J, L, N, О, Q, R и Т.

Как уже было сказано, большинство фенотипических признаков, формирующих поисковую информацию, являются полигенными. Это означает, что для их определения с приемлемой для практического применения точностью требуется генотипирование большого числа полиморфизмов. В современном молекулярно-биологическом арсенале можно найти достаточно методов мультиплексного генотипирования: это и секвенирование нового поколения (NGS), и микрочипы высокой плотности (например, *Identitas* [17]), и другие подходы. Однако все они успешно работают только на высоких концентрациях ДНК хорошей сохранности [18]. В экспертной практике типичный образец ДНК — это 10–100 пкг/мкл, причем нередко в деградированном состоянии, поэтому, при разработке метода генотипирования на первом месте находится его применимость для таких сложных образцов.

Перспектива внедрения любого метода в широкую практику зависит от его сложности, поэтому еще одна важная задача разработчика — макси-

¹ Для краткости здесь и далее под SNP мы подразумеваем не только однонуклеотидные, но и малые инсерционно-делеционные полиморфизмы.

мальное упрощение протокола постановки и снижение требований к квалификации эксперта. Возвращаясь к панели HGrIPlex-S, следует отметить, что предлагаемый ее авторами способ генотипирования основан на технологии SNaPshot с регистрацией результатов капиллярным электрофорезом. Несмотря на то, что это удобно, так как необходимое оборудование уже имеется во многих современных экспертных генетических лабораториях, недостаток кроется в громоздком протоколе исследования образца. В него включено семь стадий: две мультиплексные ПЦР на 17 и 24 SNP, очистка ПЦР-продукта на колонках, две мультиплексные реакции однонуклеотидной пролонгации (SBE), обработка щелочной фосфатазой, проведение капиллярного электрофореза. Некоторые из этих стадий предполагают открытие пробирки с образцом, что создает риск контаминации. Такой метод может быть освоен в крупных центрах для резонансных преступлений, но для повседневных экспертиз в рядовых региональных лабораториях он явно не предназначен. Резюмируя, можно сказать, что перед нами стояла задача создания простого в постановке, чувствительного метода с высокой мультиплексностью реакции и максимальной невосприимчивостью к деградации исследуемой ДНК.

Ранее нами описаны отдельные методы получения фенотипической информации о группе крови и половой принадлежности [13] и основных гаплогруппах Y-хромосомы [19]. Их недостатком была малая информативность и использование гнездовой ПЦР, усложняющей постановку и создающей риск контаминации. Теперь мы предлагаем метод, лишенный вышеуказанных недостатков, созданный с учетом сложности исследуемых образцов ДНК и позволяющий одновременно генотипировать панель из 60 полиморфизмов, которую мы назвали *Phenotype Expert* и включили в нее маркеры пигментации (41 SNP), основные гаплогруппы Y-хромосомы (14 SNP), пол (*AMELX/Y*) и группу крови AB0 (4 SNP). Метод имеет максимально упрощенный протокол проведения и представляет собой одностадийную 52-плексную ПЦР с последующей гибридизацией на биологических микрочипах. Для оценки распределения аллелей в популяции мы провели генотипирование 482 образцов ДНК, полученных от славян, рожденных в городах преимущественно Центральной России и проживающих в Москве, Московской области и Санкт-Петербурге.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Образцы ДНК. В работе использованы образцы ДНК 482 взрослых доноров (254 мужчин и 228 женщин). Для повышения однородности выборки в исследование были включены только доноры, идентифицирующие себя русскими или

славянами. Образцы биологического материала были собраны в Москве и Санкт-Петербурге. По месту рождения доноры распределились следующим образом: Центральный федеральный округ – 304 (из них 187 – Москва, 65 – Московская область), Северо-Западный федеральный округ – 75 (из них 59 – Санкт-Петербург и Ленинградская область), Приволжский федеральный округ – 28, Южный и Северо-Кавказский федеральные округа – 21, Уральский, Сибирский и Дальневосточный федеральные округа – 20, Украина – 8, Казахстан – 7, Азербайджан – 4, Беларусь – 3, Узбекистан – 3, Киргизия – 2, Туркменистан – 1, Польша – 1, Германия – 1, Литва – 1, Чехия – 1, не указано – 1.

Выбор полиморфных локусов. Перечень и ряд характеристик полиморфизмов, включенных в исследование, приведены в табл. 1. Слева указана группа фенотипических признаков, к которой относятся соответствующие SNP. Также в таблице приведены координаты SNP в геноме, ген, в котором он расположен (либо гаплогруппа Y-хромосомы, к которой он относится), аллельные варианты и длины ПЦР-продуктов, содержащих исследуемые SNP. Полиморфизмы №№ 1–41 объединены в общую группу “Пигментация радужной оболочки, волос и кожи”, так как часть из них влияет перекрестно на несколько признаков (более подробно см. в работе [3]). Для определения группы крови использованы четыре позиции в гене *ABO*: 261 (C>del), 297 (A>G), 657 (G>A) и 681 (C>T) [20], – для определения пола – различающиеся фрагменты гена *AMEL* на X- и Y-хромосомах [13]. При выборе SNP, ассоциированных с гаплогруппами Y-хромосомы, мы руководствовались данными ISOGG (Y-DNA Haplogroup Tree 2019–2020, ver. 15.73). Для гаплогрупп, имеющих несколько синонимичных биаллельных маркеров, были выбраны наиболее подходящие с точки зрения конструирования зондов и подбора праймеров и обеспечивающие наиболее короткие ампликоны.

Мультиплекс. На стадии подбора ПЦР-праймеров основной задачей была минимизация размера ампликона. В табл. 1 приведены значения для каждого локуса. Средняя длина ампликонов составила 79 п.н. В ходе экспериментальной оценки работоспособности праймеров и подбора условий ПЦР использовали несколько образцов свежeweделенной ДНК в концентрации 5, 0.5 и 0.05 нг/мкл каждый. После достижения стабильной работы мультиплексной ПЦР исследовали 482 образца ДНК коллекции. В ходе генотипирования мы сталкивались с эпизодическим выпадением ряда локусов. Для обеспечения их более стабильной амплификации концентрации соответствующих пар праймеров в смеси корректировали. Повторно образцы с неполным профилем не генотипировали, поэтому объем данных для отдельных полиморфизмов мо-

Таблица 1. Полиморфизмы, входящие в панель *Phenotype Expert*

Признак	№	SNP	Хромосома, позиция	Ген, гаплогруппа	Аллели ^a	Длина продукта, п.н.
Пигментация радужной оболочки, волос и кожи	1	rs312262906	16:89919343	<i>MC1R</i>	A/Del	76
	2	rs11547464	16:89919683	<i>MC1R</i>	G/A	130 ^b
	3	rs885479	16:89919746	<i>MC1R</i>	G/A ^a	130 ^b
	4	rs1805008	16:89919736	<i>MC1R</i>	C/T	130 ^b
	5	rs1805005	16:89919436	<i>MC1R</i>	G/T	58
	6	rs1805006	16:89919510	<i>MC1R</i>	C/A	92 ^c
	7	rs1805007	16:89919709	<i>MC1R</i>	C/T	130 ^b
	8	rs1805009	16:89920138	<i>MC1R</i>	G/C	103
	9	rs201326893	16:89919714	<i>MC1R</i>	C/A	130 ^b
	10	rs2228479	16:89919532	<i>MC1R</i>	G/A	92 ^c
	11	rs1110400	16:89919722	<i>MC1R</i>	T/C	130 ^b
	12	rs28777	5:33958854	<i>SLC45A2</i>	A/C	77
	13	rs16891982	5:33951588	<i>SLC45A2</i>	G/C	57
	14	rs12821256	12:88934558	<i>KITLG</i>	T/C ^a	98
	15	rs4959270	6:457748	<i>LOC105374875</i>	C/A	85
	16	rs12203592	6:396321	<i>IRF4</i>	C/T	90
	17	rs1042602	11:89178528	<i>TYR</i>	C/A ^a	73
	18	rs1800407	15:27985172	<i>OCA2</i>	C/T ^a	79
	19	rs2402130	14:92334859	<i>SLC24A4</i>	A/G	66
	20	rs12913832	15:28120472	<i>HERC2</i>	G/A ^a	59
	21	rs2378249	20:34630286	<i>PIGU</i>	A/G ^a	60
	22	rs12896399	14:92307319	<i>LOC105370627</i>	G/T	70
	23	rs1393350	11:89277878	<i>TYR</i>	G/A ^a	85
	24	rs683	9:12709305	<i>TYRP1</i>	A/C ^a	97
	25	rs3114908	16:89317317	<i>ANKRD11</i>	C/T	49
	26	rs1800414	15:27951891	<i>OCA2</i>	T/C	53
	27	rs10756819	9:16858086	<i>BNC2</i>	A/G	87
	28	rs2238289	15:28208069	<i>HERC2</i>	A/G ^a	105
	29	rs17128291	14:92416482	<i>SLC24A4</i>	A/G ^a	78
	30	rs6497292	15:28251049	<i>HERC2</i>	A/G ^a	58
	31	rs1129038	15:28111713	<i>HERC2</i>	T/C ^a	74
	32	rs1667394	15:28285036	<i>HERC2</i>	T/C	65
	33	rs1126809	11:89284793	<i>TYR</i>	G/A	76
	34	rs1470608	15:28042975	<i>OCA2</i>	C/T ^a	90
	35	rs1426654	15:48134287	<i>SLC24A5</i>	A/G	70
	36	rs6119471	20:34197406	<i>ASIP</i>	C/G	76
	37	rs1545397	15:27942626	<i>OCA2</i>	A/T	138
	38	rs6059655	20:34077942	<i>RALY</i>	G/A ^a	61
	39	rs12441727	15:28026629	<i>OCA2</i>	G/A	63
	40	rs3212355	16:89917970	<i>MC1R</i>	C/T ^a	63
	41	rs8051733	16:89957798	<i>DEF8</i>	A/G ^a	68

Таблица 1. Окончание

Признак	№	SNP	Хромосома, позиция	Ген, гаплогруппа	Аллели ^a	Длина продукта, п.н.
Группа крови	42	rs8176719	9:133257521	<i>ABO (6 ex)</i>	G/Del	130
	43	rs8176720	9:133257486	<i>ABO (6 ex)</i>	A/G	
	44	rs8176742	9:133256050	<i>ABO (7 ex)</i>	G/A	83
	45	rs8176741	9:133256074	<i>ABO (7 ex)</i>	C/T	
Пол	46	–	Y:68687721 X:11298267	<i>AMELX/Y</i>	–	66/70
Гаплогруппы Y-хромосомы	47	rs2032623	Y:19716186	B (M60)	Del/T	74
	48	rs35284970	Y:2866813	C (M130)	C/T	83
	49	rs202084622	Y:13170094	D (CTS3946)	G/A	71
	50	rs9786534	Y:7184761	E (M5388)	A/T	86
	51	rs2740980	Y:12312201	G (P257)	G/A	68
	52	rs576940616	Y:15364331	H (M2920)	G/T	84
	53	rs2319818	Y:14242828	I (U179)	G/A	117
	54	rs13447352	Y:20587967	J (M304)	A/C	73
	55	rs2032607	Y:12792926	L (M185)	C/T	85
	56	rs9341278	Y:13357844	N (M231)	G/A	86
	57	rs2032678	Y:13396820	O (M175)	In/Del	83
	58	rs563604826	Y:13022263	Q (M1105)	G/A	69
	59	rs17307398	Y:15174113	R (P224)	C/T	65
60	rs9341308	Y:20576889	T (M272)	A/G	60	

^a Так обозначены аллели, номенклатура которых в оригинальной панели HirisPlex-S, соответствует противоположной цепи ДНК.

^b Эти шесть позиций амплифицируются с общей пары праймеров и находятся внутри одного ПЦР-продукта длиной 130 п.н.

^c Эти две позиции амплифицируются с общей пары праймеров и находятся внутри одного ПЦР-продукта длиной 92 п.н.

жет быть меньше 482. Последовательности праймеров доступны по запросу.

Схема биочипа. Биочип наносили по схеме, приведенной на рис. 1а. В него входит четыре блока, соответствующих группе определяемых признаков: пигментация, группа крови АВ0, пол и гаплогруппа Y-хромосомы. Для всех полиморфизмов было подобрано по паре олигонуклеотидов, комплементарных соответствующим аллельным вариантам. ПЦР-праймеры и ДНК-зонды произведены компанией “Lumiprobe” (Россия). Изготовление гидрогелевых биочипов проводили по оригинальной технологии Института молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта Российской академии наук (ИМБ РАН), в беспылевых помещениях, с использованием пинового робота Qarray2 (“Genetix”, Великобритания), согласно ранее описанной методике [19].

Протокол генотипирования. Для сокращения протокола постановки мы применили модификацию полимеразной цепной реакции, впервые опи-

санную под названием LATE-PCR (linear-after-the-exponential PCR) [21], или ЛПЭ-ПЦР, – линейная после экспоненциальной ПЦР. Все обратные праймеры по 5'-концу содержат универсальную вставку, с которой при понижении температуры отжига на линейной стадии ЛПЭ-ПЦР связывается флуоресцентно меченный универсальный праймер. На этом этапе происходит асимметричная амплификация с накоплением меченой, преимущественно одноцепочечной ДНК, необходимой для последующей гибридизации. Данный вариант ЛПЭ-ПЦР упрощен в сравнении с ранее опубликованным [22] за счет исключения универсальной вставки в прямом праймере. Ход экспериментального подбора условий амплификации мы не приводим в данной работе, ниже указана уже оптимизированная программа и состав реакционной смеси.

ПЦР проводили на амплификаторе SpeedCycler (“Analytik Jena”, Германия) в объеме 25 мкл реакционной смеси: ПЦР-буфер с полимеразой

HotTag Multi, 4 е.а. (“Асфоген”, Россия), 5 мМ MgSO₄, 0.2 мМ каждого из dNTP (“Сибэнзим”, Россия), смесь праймеров; 200 пкмоль универсального праймера Cy5-TCAATGGATCTCATTA, 0.1–500 нг геномной ДНК. Полимеразу активировали 2 мин при 95°C и на первом этапе проводили 50 циклов амплификации (94°C – 30 с, 65°C – 40 с, 72°C – 30 с), затем на втором этапе – 50 циклов амплификации (94°C – 20 с, 52°C – 30 с, 72°C – 30 с).

Гибридизация. Гибридизационную камеру биочипа заполняли смесью следующего состава: 25% формамид, 5× SSPE, 50 об% ПЦР-продукта. После инкубации (10 ч, 37°C) и отмывки (10 мин в SSPE при комнатной температуре) биочипы промывали дистиллированной водой, высушивали сжатым воздухом, помещали в портативный анализатор (ООО “БИОЧИП-ИМБ”, Россия) и регистрировали с экспозицией 0.5–2 с флуоресценцию в формате SPE. На рис. 1 приведены примеры таких флуоресцентных изображений для женского (рис. 1б) и мужских (рис. 1 в–д) образцов ДНК. Анализ изображения проводили с использованием программ ImaGel 2.0 и ImaGel Studio (ИМБ РАН). Результатом автоматической обработки каждого биочипа был текстовый файл с генотипом образца. Равновесие Харди–Вайнберга рассчитывали общеизвестным способом.

Чувствительность. Для оценки чувствительности метода провели генотипирование трех образцов ДНК, каждый из которых был взят в следующих концентрациях: 500, 250, 100, 50, 25 и 10 пг на реакцию.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

При составлении перечня определяемых признаков мы исходили из их практической значимости для следственной работы и потенциальной возможности установления этих признаков по генотипу. В результате нами были сформированы четыре кластера: пигментация, группа крови АВ0, пол и гаплогруппа Y-хромосомы.

Пигментация

Информация о пигментации глаз, волос и кожи, безусловно, представляет поисковую ценность. Сотни научных работ, посвященных обнаружению и верификации генетических детерминант этих признаков, вышли в свет за последние два десятилетия. Мы остановили свой выбор на панели HirisPlex-S, так как на данный момент она наиболее точно прогнозирует фенотип пигментации. Для этой панели авторы не только опубликовали математическую модель прогнозирования фенотипа, но и оформили ее в виде удобного онлайн-ресурса (<https://hirisplex.erasmusmc.nl>) на сайте Де-

партаменты генетической идентификации Erasmus MC (Нидерланды). Интерфейс ресурса позволяет внести результаты генотипирования образца и получить вероятностный результат по трем признакам пигментации. Для цвета глаз предлагается три категории: серо-голубой, карий и смешанный (зеленые, болотные). Цвет волос оценивается в категориях светлые/темные, а также в четырех градациях: блондин, шатен, брюнет, рыжий. Цвет кожи подразделяется на пять оттенков: очень бледная, светлая, смуглая, темная, черная. В ряде исследований показана высокая степень достоверности прогнозирования фенотипа по данной модели не только в западноевропейских и североамериканских [23], но и в более актуальных для нас восточноевропейских популяциях [24].

Из опубликованных исследований народов, населяющих Россию, помимо вышеуказанной работы на белорусской популяции [24], еще одна была выполнена на выборке из 144 образцов 14 народностей (в том числе 8 образцов русских) по 29 маркерам из 41 [25] и другая – на выборке из 286 образцов 38 народностей (в том числе 50 образцов русских) по 24 маркерам [26], хотя данные по частотам аллелей в этих работах не представлены.

Здесь мы приводим результаты генотипирования 482 образцов (табл. 2). Как видно из правой части табл. 2, аллельные частоты ряда полиморфизмов проявляют геногеографическую специфичность. Для более наглядного представления результатов мы сопоставили на графике (рис. 2) частоту минорного аллеля каждого полиморфизма, полученную нами в ходе исследования (RU), с частотами в трех наиболее близких к ней макропопуляциях: европейской (EUR), восточноазиатской (EAS) и южноазиатской (SAS). Из рис. 2 видно, что частоты аллелей для четверти полиморфизмов существенно отличаются для европейской (EUR) и азиатских (EAS и SAS) популяций. Принимая во внимание этот факт, а также то, что российская популяция занимает промежуточное положение между европейскими и азиатскими народами, для получения осмысленных данных необходимо было уделить особое внимание составлению однородной выборки. Первичные результаты генотипирования, которые мы здесь не приводим, были получены для 555 жителей Москвы и Санкт-Петербурга без учета их этнической принадлежности. При их обработке мы получили существенное отклонение от равновесия Харди–Вайнберга для полиморфизмов, имеющих геногеографическую этносpezifичность. После исключения из выборки всех доноров с неславянской самоидентификацией нам удалось получить данные, характерные для более однородной популяции.

Тем не менее сочетание таких факторов, как различающееся для ряда полиморфизмов аллельное

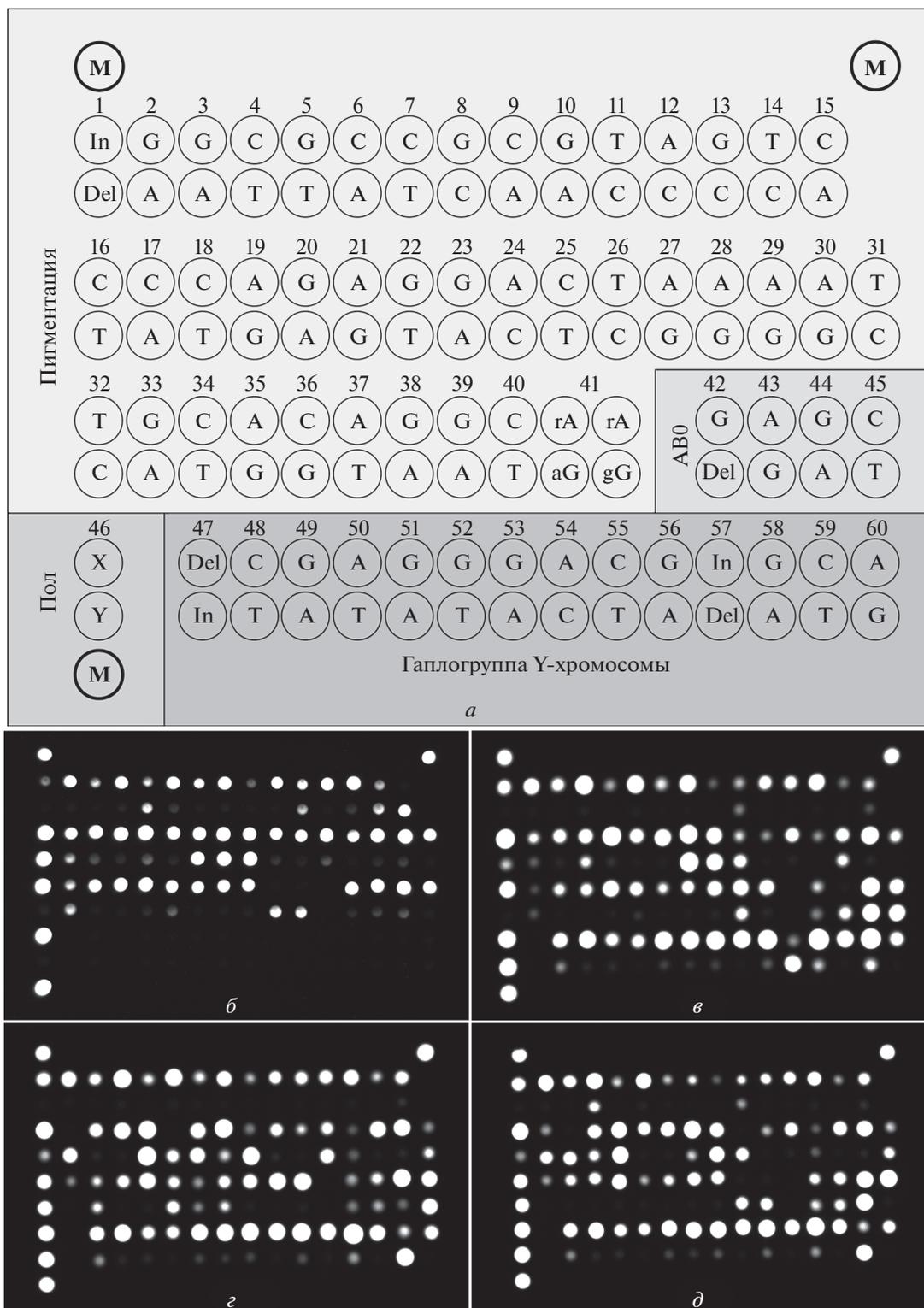


Рис. 1. Биологический микрочип *Phenotype Expert* и примеры его использования для генотипирования образцов ДНК человека. Схема расположения ДНК-зондов на биочипе *Phenotype Expert* (а). Цифры над каждой парой ячеек, соответствуют номеру полиморфизма из табл. 1. Обозначения внутри ячеек соответствуют аллелям полиморфизмов. Три ячейки “М” необходимы для контроля работы портативного анализатора, содержат флуорофор Су5 и позволяют корректно позиционировать матрицу для обседа сигналов ячеек. В нижней части рисунка приведены примеры флуоресцентного изображения биочипа, полученные в результате генотипирования женского (б) и трех мужских (в–д) образцов ДНК.

Таблица 2. Частоты аллелей и генетическое разнообразие полиморфизмов панели *Rhepotype Expert* в российской популяции (по результатам исследования) и в пяти основных популяциях (по данным 1000 Genomes Project)

№	Ген, полиморфизм	Генотип и минорный аллель	Частоты и генетическое разнообразие в российской популяции ^a					F_0 в других популяциях					
			N_0	N_E	F_0	χ^2	AFR ^b	AMR ^c	EAS ^d	EUR ^e	SAS ^f		
1	<i>MCIR</i> rs312262906 Del>A	del del	462	462.001	0.998	0.001	1	0.097	1	0.994	1		
		del A	1	0.999	0.002		0	0.003	0	0.006	0		
		AA	0	0.001	0.000		0	0	0	0	0		
		A			0.001		0	0.001	0	0.003	0		
2	<i>MCIR</i> rs11547464 G>A	GG	423	423.058	0.977	0.059	0.998	0.988	1	0.982	1		
		GA	10	9.885	0.023		0.002	0.012	0	0.018	0		
		AA	0	0.058	0.000		0	0	0	0	0		
		A			0.012		0.001	0.006	0	0.009	0		
3	<i>MCIR</i> rs885479 C>T	CC	345	344.669	0.845	0.049	0.988	0.516	0.125	0.871	0.926		
		CT	60	60.662	0.149		0.011	0.337	0.518	0.119	0.067		
		TT	3	2.669	0.007		0.002	0.147	0.357	0.01	0.006		
		T			0.081		0.007	0.316	0.616	0.07	0.04		
4	<i>MCIR</i> rs1805008 C>T	CC	392	390.271	0.839	1.089	0.992	0.994	1	0.881	0.992		
		CT	68	71.458	0.154		0.008	0.006	0	0.115	0.008		
		TT	5	3.271	0.007		0	0	0	0.004	0		
		T			0.084		0.004	0.003	0	0.062	0.004		
5	<i>MCIR</i> rs1805005 G>T	GG	383	382.916	0.872	0.004	0.989	0.856	1	0.793	0.986		
		GT	54	54.169	0.123		0.011	0.144	0	0.189	0.014		
		TT	2	1.916	0.004		0	0	0	0.018	0		
		T			0.066		0.005	0.072	0	0.112	0.007		
6	<i>MCIR</i> rs1805006 C>A	CC	481	481.000	1.000	-	0.998	0.997	1	0.98	0.998		
		CA	0	0.000	0.000		0.002	0.003	0	0.02	0.002		
		AA	0	0.000	0.000		0	0	0	0	0		
		A			0.000		0.001	0.001	0	0.01	0.001		
7	<i>MCIR</i> rs1805007 C>T	CC	393	391.569	0.928	3.875	0.994	0.968	0.998	0.865	0.99		
		CT	27	29.861	0.071		0.006	0.032	0.002	0.127	0.01		
		TT	2	0.569	0.001		0	0	0	0.008	0		
		T			0.037		0.003	0.016	0.001	0.072	0.005		

Таблица 2. Продолжение

№	Ген, полиморфизм	Генотип и минорный аллель	Частоты и генетическое разнообразие в российской популяции ^a				χ^2	AFR ^b	AMR ^c	EAS ^d	EUR ^e	SAS ^f
			N_O	N_E	F_O	F_O в других популяциях						
8	<i>TUBB3</i> rs1805009 G>C	GG	463	463.001	0.998	0.001	0.997	0.98	1	0.984	1	
		GC	1	0.999	0.002		0.003	0.02	0	0.016	0	
		CC	0	0.001	0.000		0	0	0	0	0	
		C		0.001			0.002	0.1	0	0.008	0	
9	<i>MC1R</i> rs201326893 C>A	CC	482	482.000	1.000	-	1	0.997	1	1	1	
		CA	0	0.000	0.000		0	0.003	0	0	0	
		AA	0	0.000	0.000		0	0	0	0	0	
		A		0.000			0	0.005	0	0	0	
10	<i>MC1R</i> rs2228479 G>A	GG	396	397.771	0.830	1.001	0.992	0.954	0.498	0.869	0.963	
		GA	81	77.458	0.162		0.008	0.046	0.427	0.125	0.037	
		AA	2	3.771	0.008		0	0	0.075	0.006	0	
		A		0.089			0.004	0.023	0.289	0.069	0.018	
11	<i>MC1R</i> rs1110400 T>C	TT	429	429.069	0.975	0.071	1	0.983	1	0.984	0.996	
		TC	11	10.863	0.025		0	0.017	0	0.016	0.004	
		CC	0	0.069	0.000		0	0	0	0	0	
		C		0.013			0	0.009	0	0.008	0.002	
12	<i>SLC45A2</i> rs28777 A>C	AA	429	429.512	0.891	0.195	0.047	0.305	0.012	0.917	0.051	
		AC	52	50.975	0.106		0.297	0.375	0.21	0.08	0.344	
		CC	1	1.512	0.003		0.657	0.32	0.778	0.004	0.605	
		C		0.056			0.805	0.507	0.883	0.044	0.777	
13	<i>SLC45A2</i> rs16891982 G>C	GG	411	410.919	0.876	0.004	0.005	0.282	0	0.885	0.006	
		GC	56	56.162	0.120		0.062	0.363	0.012	0.107	0.106	
		CC	2	1.919	0.004		0.933	0.354	0.988	0.008	0.888	
		C		0.064			0.964	0.536	0.994	0.062	0.941	
14	<i>KITLG</i> rs12821256 A>G	AA	370	367.560	0.810	1.613	0.995	0.948	1	0.771	0.967	
		AG	77	81.880	0.180		0.005	0.052	0	0.215	0.033	
		GG	7	4.560	0.010		0	0	0	0.014	0	
		G		0.100			0.002	0.026	0	0.121	0.016	

Таблица 2. Продолжение

№	Ген, полиморфизм	Генотип и минорный аллель	Частоты и генетическое разнообразие в российской популяции ^a				χ^2	F_{O} в других популяциях				
			N_O	N_E	F_O	F_{O}		AFR ^b	AMR ^c	EAS ^d	EUR ^e	SAS ^f
15	<i>LOC105374875</i> rs4959270 C>A	CC	150	152.576	0.330	0.240	0.648	0.277	0.433	0.282	0.515	
		CA	231	225.847	0.489		0.303	0.507	0.454	0.483	0.405	
		AA	81	83.576	0.181		0.05	0.216	0.113	0.235	0.08	
		A		0.425	0.201		0.47	0.34	0.476	0.282		
16	<i>IRF4</i> rs12203592 C>T	CC	403	405.094	0.846	1.676	0.985	0.862	1	0.785	0.988	
		CT	75	70.811	0.148		0.014	0.133	0	0.197	0.012	
		TT	1	3.094	0.006		0.002	0.006	0	0.018	0	
		T		0.080	0.008		0.072	0	0.116	0.006		
17	<i>TYR</i> rs1042602 G>T	GG	262	259.167	0.697	1.133	0.976	0.597	0.998	0.417	0.877	
		GT	97	102.665	0.276		0.024	0.331	0.002	0.421	0.119	
		TT	13	10.167	0.027		0	0.072	0	0.161	0.004	
		T		0.165	0.012		0.238	0.001	0.372	0.063		
18	<i>OCA2</i> rs1800407 G>A	GG	426	424.423	0.894	1.955	0.997	0.937	0.998	0.859	0.947	
		GA	46	49.154	0.103		0.003	0.063	0.002	0.131	0.053	
		AA	3	1.423	0.003		0	0	0	0.01	0	
		A		0.055	0.002		0.032	0.001	0.076	0.027		
19	<i>SLC24A4</i> rs2402130 A>G	AA	340	343.539	0.714	1.520	0.179	0.648	0.881	0.626	0.748	
		AG	133	125.922	0.262		0.443	0.288	0.117	0.322	0.227	
		GG	8	11.539	0.024		0.378	0.063	0.002	0.052	0.025	
		G		0.155	0.6		0.207	0.061	0.213	0.138		
20	<i>HERC2</i> rs12913832 C>T	CC	290	281.955	0.589	4.237	0.003	0.058	0	0.451	0.004	
		CT	155	171.091	0.357		0.05	0.288	0.004	0.37	0.133	
		TT	34	25.955	0.054		0.947	0.654	0.996	0.179	0.863	
		T		0.233	0.972		0.798	0.998	0.364	0.929		
21	<i>PIGU</i> rs2378249 T>C	TT	340	341.388	0.736	0.279	0.714	0.89	0.677	0.777	0.378	
		TC	116	113.224	0.244		0.259	0.098	0.292	0.211	0.479	
		CC	8	9.388	0.020		0.027	0.012	0.032	0.012	0.143	
		C		0.142	0.157		0.061	0.178	0.117	0.382		

Таблица 2. Продолжение

№	Ген, полиморфизм	Генотип и минорный аллель	Частоты и генетическое разнообразие в российской популяции ^a				χ^2	F_O в других популяциях				
			N_O	N_E	F_O	N_E		AFR ^b	AMR ^c	EAS ^d	EUR ^e	SAS ^f
22	<i>LOC105370627</i> rs12896399 G>T	GG	172	174.619	0.368	0.253	0.958	0.559	0.44	0.342	0.454	
		GT	232	226.762	0.477		0.042	0.378	0.425	0.455	0.438	
		TT	71	73.619	0.155		0	0.063	0.135	0.203	0.108	
		T		0.394	0.021		0.252	0.347	0.43	0.327		
23	<i>TYR</i> rs1393350 C>T	CC	293	293.921	0.611	0.061	0.853	0.767	0.994	0.559	0.894	
		CT	166	164.158	0.341		0.135	0.222	0.006	0.396	0.104	
		TT	22	22.921	0.048		0.012	0.012	0	0.046	0.002	
		T		0.218	0.008		0.122	0.003	0.244	0.054		
24	<i>TYRP1</i> rs683 T>G	GG	172	166.160	0.345	1.204	0.787	0.378	0.978	0.159	0.642	
		TG	222	233.680	0.485		0.203	0.476	0.022	0.427	0.297	
		TT	88	82.160	0.170		0.011	0.147	0	0.414	0.061	
		T		0.413	0.112		0.385	0.011	0.627	0.21		
25	<i>ANKRD11</i> rs3114908 C>T	CC	201	205.632	0.462	1.018	0.439	0.438	0.552	0.473	0.468	
		CT	203	193.736	0.435		0.46	0.435	0.397	0.431	0.413	
		TT	41	45.632	0.103		0.101	0.127	0.052	0.095	0.119	
		T		0.320	0.331		0.344	0.25	0.311	0.325		
26	<i>OCA2</i> rs1800414 T>C	TT	451	451.027	0.985	0.027	0.998	1	0.149	1	0.992	
		TC	7	6.947	0.015		0.002	0	0.51	0	0.008	
		CC	0	0.027	0.000		0	0	0.341	0	0	
		C		0.008	0.001		0	0	0.596	0	0.004	
27	<i>BNC2</i> rs10756819 A>G	GG	130	134.907	0.280	0.805	0.847	0.184	0.192	0.099	0.202	
		AG	250	240.187	0.498		0.144	0.501	0.502	0.449	0.495	
		AA	102	106.907	0.222		0.009	0.314	0.306	0.451	0.303	
		A		0.471	0.081		0.565	0.557	0.676	0.55		
28	<i>HERC2</i> rs2238289 T>C	TT	362	358.685	0.749	1.689	0.101	0.401	0.089	0.672	0.337	
		TC	105	111.629	0.233		0.393	0.47	0.438	0.258	0.487	
		CC	12	8.685	0.018		0.505	0.13	0.472	0.07	0.176	
		C		0.135	0.702		0.365	0.691	0.199	0.419		

Таблица 2. Продолжение

№	Ген, полиморфизм	Генотип и минорный аллель	Частоты и генетическое разнообразие в российской популяции ^a				χ^2	F_0 в других популяциях					
			N_0	N_E	F_0	N_E		AFR ^b	AMR ^c	EAS ^d	EUR ^e	SAS ^f	
29	<i>SLC24A4</i> rs17128291 T>C	TT	362	363.252	0.755		0.982	0.795	0.825	0.708	0.83		
		TC	112	109.497	0.228	0.251	0.018	0.19	0.169	0.268	0.16		
		CC	7	8.252	0.017		0	0.014	0.006	0.024	0.01		
		C			0.131		0.009	0.11	0.09	0.158	0.09		
30	<i>HERC2</i> rs6497292 T>C	TT	427	424.805	0.881		0.145	0.755	0.379	0.835	0.607		
		TC	51	55.389	0.115	3.026	0.433	0.228	0.466	0.149	0.325		
		CC	4	1.805	0.004		0.422	0.017	0.155	0.016	0.067		
		C			0.061		0.638	0.131	0.388	0.09	0.23		
31	<i>HERC2</i> rs1129038 A>G	AA	289	279.706	0.589		0.003	0.058	0	0.447	0.004		
		AG	151	169.588	0.357	5.707	0.05	0.291	0.002	0.376	0.131		
		GG	35	25.706	0.054		0.947	0.651	0.998	0.177	0.865		
		G			0.233		0.972	0.797	0.999	0.365	0.93		
32	<i>HERC2</i> rs1667394 T>C	TT	336	329.028	0.696		0.011	0.32	0.071	0.6	0.143		
		TC	117	130.944	0.277	5.364	0.153	0.49	0.399	0.312	0.45		
		CC	20	13.028	0.028		0.837	0.19	0.53	0.087	0.407		
		C			0.166		0.913	0.435	0.729	0.244	0.632		
33	<i>TYR</i> rs1126809 G>A	GG	281	282.722	0.590		0.985	0.761	0.998	0.545	0.896		
		GA	174	170.555	0.356	0.195	0.012	0.228	0.002	0.406	0.1		
		AA	24	25.722	0.054		0.003	0.012	0	0.05	0.004		
		A			0.232		0.009	0.125	0.001	0.252	0.054		
34	<i>OCA2</i> rs1470608 C>A	CC	331	327.669	0.681		0.006	0.441	0.024	0.692	0.358		
		CA	132	138.661	0.288	1.110	0.091	0.467	0.187	0.278	0.46		
		AA	18	14.669	0.030		0.903	0.092	0.79	0.03	0.182		
		A			0.175		0.949	0.326	0.883	0.169	0.412		
35	<i>SLC24A5</i> rs1426654 A>G	AA	480	479.002	0.996		0.008	0.401	0	0.994	0.507		
		AG	0	1.996	0.004	481.0	0.133	0.378	0.024	0.006	0.356		
		GG	1	0.002	0.000		0.859	0.222	0.976	0	0.137		
		G			0.002		0.926	0.411	0.988	0.003	0.315		

Таблица 2. Продолжение

№	Ген, полиморфизм	Генотип и минорный аллель	Частоты и генетическое разнообразие в российской популяции ^a				AFR ^b	AMR ^c	EAS ^d	EUR ^e	SAS ^f
			N _O	N _E	F _O	χ ²					
36	<i>ASIP</i> rs6119471 G>C	CC	480	480.001	0.998	0.001	0.097	0.873	1	0.998	1
		GC	1	0.999	0.002		0.434	0.115	0	0.002	0
		GG	0	0.001	0.000		0.469	0.012	0	0	0
		G			0.001		0.686	0.069	0	0.001	0
37	<i>OCA2</i> rs1545397 A>T	AA	381	375.901	0.790	5.578	0.971	0.53	0.01	0.851	0.783
		AT	84	94.197	0.198		0.027	0.343	0.214	0.143	0.198
		TT	11	5.901	0.012		0.002	0.127	0.776	0.006	0.018
		T			0.111		0.015	0.298	0.883	0.078	0.118
38	<i>RALY</i> rs6059655 C>T	CC	458	458.299	0.951	0.314	0.994	0.986	1	0.92	0.975
		CT	24	23.402	0.049		0.006	0.014	0	0.076	0.025
		TT	0	0.299	0.001		0	0	0	0.004	0
		T			0.025		0.003	0.007	0	0.042	0.012
39	<i>OCA2</i> rs12441727 G>A	GG	353	353.780	0.786	0.134	0.985	0.617	0.601	0.767	0.654
		GA	92	90.440	0.201		0.014	0.346	0.353	0.213	0.307
		AA	5	5.780	0.013		0.002	0.037	0.046	0.02	0.039
		A			0.113		0.008	0.21	0.222	0.126	0.192
40	<i>MC1R</i> rs3212355 G>A	GG	469	469.000	1.000	-	0.811	0.98	1	1	1
		GA	0	0.000	0.000		0.179	0.02	0	0	0
		AA	0	0.000	0.000		0.011	0	0	0	0
		A			0.000		0.1	0.01	0	0	0
41	<i>DEF8</i> rs8051733 T>C	TT	183	185.440	0.497	0.369	0.431	0.683	0.518	0.527	0.564
		TC	160	155.121	0.416		0.44	0.288	0.409	0.396	0.366
		CC	30	32.440	0.087		0.129	0.029	0.073	0.078	0.07
		C			0.295		0.349	0.173	0.278	0.275	0.253

Таблица 2. Продолжение

№	Ген, полиморфизм	Генотип и минорный аллель	Частоты и генетическое разнообразие в российской популяции ^a				χ^2	AFR ^b	AMR ^c	EAS ^d	EUR ^e	SAS ^f
			N_O	N_E	F_O	F_O в других популяциях						
42	AB0 (6 exon) rs8176719 C>del	CC	129	133.163	0.280	0.588	0.098	0.075	0.145	0.167	0.143	
		C del	245	236.675	0.498		0.392	0.314	0.47	0.455	0.515	
		del del	101	105.163	0.221		0.51	0.611	0.385	0.378	0.342	
		Del			0.471		0.706	0.768	0.62	0.605	0.599	
43	AB0 (6 exon) rs8176720 T>C	TT	183	180.451	0.377	0.241	0.263	0.248	0.264	0.453	0.313	
		TC	222	227.098	0.474		0.495	0.516	0.506	0.419	0.446	
		CC	74	71.451	0.149		0.242	0.236	0.23	0.127	0.241	
		C			0.386		0.489	0.494	0.483	0.337	0.464	
44	AB0 (7 exon) rs8176742 T>C	TT	310	315.758	0.661	2.995	0.015	0.184	0.073	0.054	0.057	
		TC	157	145.484	0.304		0.242	0.473	0.431	0.332	0.323	
		CC	11	16.758	0.035		0.743	0.343	0.496	0.614	0.62	
		C			0.187		0.864	0.579	0.711	0.78	0.781	
45	AB0 (7 exon) rs8176741 A>G	GG	326	327.814	0.680	0.327	0.705	0.908	0.647	0.843	0.597	
		AG	143	139.372	0.289		0.251	0.089	0.317	0.145	0.339	
		AA	13	14.814	0.031		0.044	0.003	0.036	0.012	0.063	
		A			0.175		0.169	0.048	0.194	0.084	0.233	
46	B (M60) rs2032623 del>T	del	254	1	–	0.98	0.998	1	1	1	1	
		T	0	0.000	–	0.02	0.002	0	0	0	0	
47	C (M130) rs35284970 C>T	C	252	0.992	–	1	1	0.951	1	0.931	1	
		T	2	0.008	–	0	0	0.049	0	0.069	0	
48	D (CTS3946) rs202084622 G>A	G	254	1.000	–	1	1	0.918	1	1	1	
		A	0	0.000	–	0	0	0.082	0	0	0	

Таблица 2. Окончание

№	Ген, полиморфизм	Генотип и минорный аллель	Частоты и генетическое разнообразие в российской популяции ^a					F_{O} в других популяциях			
			N_{O}	N_{E}	F_{O}	χ^2	AFR ^b	AMR ^c	EAS ^d	EUR ^e	SAS ^f
49	E (M5388) rs9786534 A>T	A	244	0.961	–	–	0.103	0.824	1	0.975	1
		T	10	0.039	–	–	0.897	0.176	0	0.025	0
50	G (P257) rs2740980 G>A	G	246	0.969	–	–	0.995	0.948	1	0.967	0.973
		A	8	0.031	–	–	0.005	0.052	0	0.033	0.027
51	H (M2920) rs576940616 G>T	G	254	1.000	–	–	1	0.999	1	0.999	0.836
		T	0	0.000	–	–	0	0.001	0	0.001	0.164
52	I (U179) rs2319818 G>A	G	206	0.811	–	–	0.972	0.965	1	0.862	1
		A	48	0.189	–	–	0.028	0.035	0	0.138	0
53	J (M304) rs13447352 A>C	A	240	0.945	–	–	1	0.918	1	0.887	0.865
		C	14	0.055	–	–	0	0.082	0	0.113	0.135
54	L (M185) rs2032607 C>T	C	254	1.000	–	–	1	1	1	1	0.896
		T	0	0.000	–	–	0	0	0	0	0.104
55	N (M231) rs9341278 G>A	G	223	0.878	–	–	1	1	0.967	0.904	0.996
		A	31	0.122	–	–	0	0	0.033	0.096	0.004
56	O (M175) rs2032678 in>del	In	254	1.000	–	–	1	1	0.184	1	0.985
		del	0	0.000	–	–	0	0	0.816	0	0.015
57	Q (M1105) rs563604826 G>A	G	252	0.992	–	–	0.995	0.895	0.995	0.989	0.975
		A	2	0.008	–	–	0.005	0.105	0.005	0.011	0.025
58	R (P224) rs17307398 C>T	C	118	0.465	–	–	0.962	0.565	0.996	0.417	0.612
		T	136	0.535	–	–	0.038	0.435	0.004	0.583	0.388
59	T (M272) rs9341308 A>G	A	251	0.988	–	–	1	0.976	1	0.983	1
		G	3	0.012	–	–	0	0.024	0	0.017	0

^a N_{O} – наблюдаемое число генотипов, N_{E} – ожидаемое число генотипов, F_{O} – ожидаемая частота аллеля или генотипа, ^b AFR (African) – африканская популяция; ^c AMR (Ad Mixed American) – смешанная американская популяция; ^d EAS (East Asian) – восточноазиатская популяция; ^e EUR (European) – европейская популяция; ^f SAS (South Asian) – южноазиатская популяция.

распределение в EUR- и EAS- популяциях, условность понятия “этническая принадлежность”, а также метисация лиц, самоопределяющих себя *славянами* или *русскими*, усложняет формирование однородной выборки в исторически гетерогенных популяциях типа российской. Мы полагаем, что повышенные значения χ^2 для некоторых полиморфизмов обусловлены этой неоднородностью.

Кроме того, идентифицировать себя *славянами* или *русскими* могут лица любого этногеографического происхождения. Ярким подтверждением этого служит следующий эпизод: полиморфизм rs1426654 (№ 35 в табл. 2) имеет полярное распределение частот аллеля G в популяциях EUR (0.003) и EAS (0.988). В нашем исследовании распределение частот его аллелей значительно отклоняется от равновесия Харди–Вайнберга: AA – 480, AG – 0, GG – 1, $\chi^2 = 481$. Очевидной причиной этого стал единственный образец с генотипом G/G, наиболее характерным для восточноазиатских популяций. И действительно, на фотографии донора этого образца (часть коллекции охарактеризована фотографически) мы обнаружили девушку с типичными восточноазиатскими чертами лица; при этом она идентифицирует себя *русской* и имеет славянские фамилию, имя и отчество. Нельзя исключить, что она приемный ребенок в русской семье. Этот случай подчеркивает неравнозначность происхождения и этнической самоидентификации. Поисковая ценность в такой ситуации зависит от того, какие методы использует следствие: при работе с паспортными данными такой индивид был бы пропущен, а при поиске по базе фотографий подозреваемых или при поквартирном обходе типичная внешность привлекла бы внимание.

К настоящему времени опубликованы десятки работ по определению биогеографического происхождения по аутосомным маркерам. Методы, описанные в этих работах, позволяют не только выявить принадлежность к макропопуляции (европейская, азиатская, африканская), но и установить степень метисации индивида [27–29]. Мы полагаем возможным и целесообразным в дальнейшем расширить панель *Phenotype Expert* за счет актуальных для Евразии аутосомных маркеров биогеографического происхождения, которые дополняют получаемую поисковую информацию.

Группа крови ABO

Серологическое определение группы крови ABO очень часто дает ошибочные результаты на экспертных образцах, что связано с их бактериальным загрязнением и деградацией агглютиногенов. Кроме того, не все биологические объекты пригодны для серологического анализа. Гораздо более достоверно группу крови определяют гено-

типированием полиморфизмов в 6 и 7 экзонах гена ABO [30], причем объектом исследования может быть любой материал, содержащий геномную ДНК.

В табл. 3 приведены сочетания аллелей по четырем полиморфизмам в гене ABO, образующих (благодаря выделению трех вариантов нулевого аллеля: O¹, O^{1v} и O²) 15 генетических групп и 4 серологические. Это позволяет различать шесть I(0) групп, четыре II(A), четыре III(B) и одну IV(AB). В результате генотипирования определены частоты аллелей, генетических и серологических групп в исследуемой выборке (табл. 4), что не только дает возможность делать вероятностные расчеты при вынесении экспертного заключения, но и пополняет знания в области популяционной генетики.

Определение гаплогруппы Y-хромосомы

Значимость генетической информации, расположенной на Y-хромосоме, для практической криминалистики подтверждается не только множеством научных публикаций, но и наличием широкого спектра коммерческих наборов, таких, как Yfiler® Plus PCR Amplification Kit (“Applied Biosystems”, США), PowerPlex® Y23 System (“Promega”, США), AmpFLSTR® Yfiler™ PCR Amplification Kit (“Applied Biosystems”), COrDIS Ystr (ООО “Гордиз”, Россия) и других. Эти наборы, в первую очередь, предназначены для идентификации личности по аллелям STR-локусов, расположенных на Y-хромосоме, однако они применяются и для определения гаплогруппы непрямым методом – с помощью программ-предикторов.

Для определения гаплогруппы Y-хромосомы STR- и SNP-маркеры имеют свои преимущества и недостатки. С точки зрения однозначности установления гаплогруппы более достоверными считаются SNP, так как имеют частоту спонтанных мутаций существенно ниже (2.5×10^{-8} [31]), чем STR (10^{-2} – 10^{-3} [32, 33]). С одной стороны, высокая частота мутаций в STR-локусах служит причиной гомоплазии, которая, в свою очередь, может приводить к ошибкам определения гаплогрупп с помощью предикторов. С другой стороны, при верной предикции STR-гаплотип обладает большей информативностью, так как для получения столь же детальной информации по SNP-маркерам потребуется анализ существенно большего числа полиморфизмов. С позиции криминалистической практики предпочтение находится на стороне SNP-маркеров, так как небольшая протяженность амплифицируемого для их определения фрагмента обеспечивает преимущества при исследовании деградированной ДНК в сравнении с более длинными фрагментами при анализе STR-маркеров.

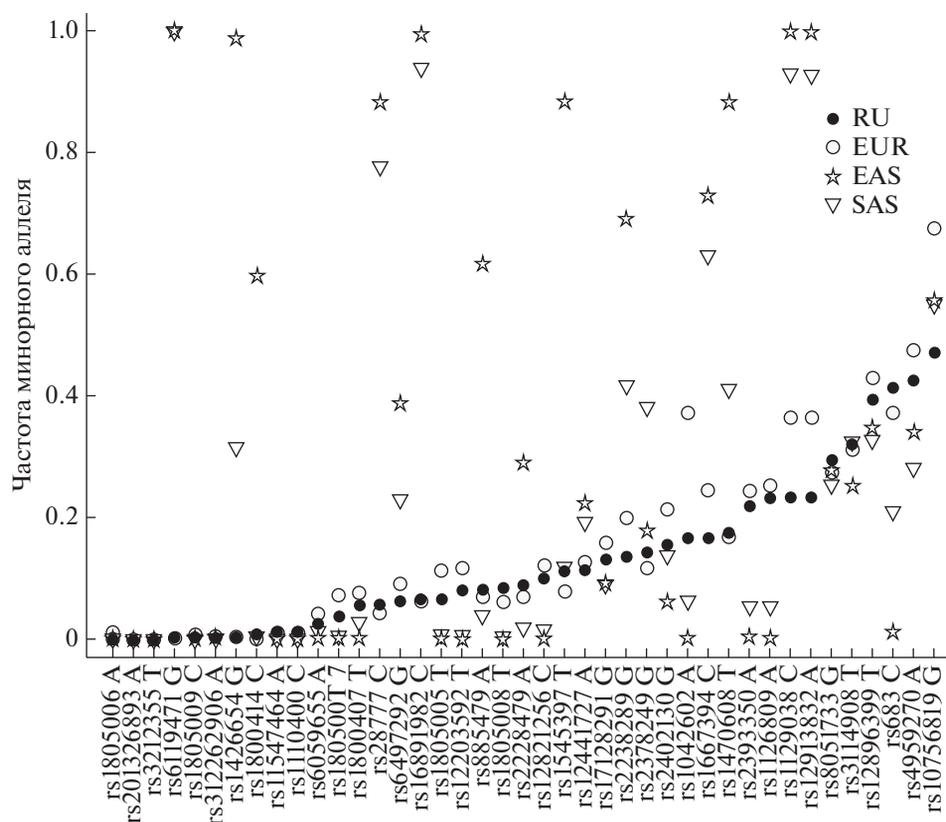


Рис. 2. График частот минорных аллелей 41 полиморфизма, относящегося к панели пигментации. Полиморфизмы расположены по мере возрастания частоты минорного аллеля в исследованной нами выборке (RU). Также для каждого полиморфизма приведены частоты в европейской (EUR), восточноазиатской (EAS) и южноазиатской (SAS) популяциях, согласно данным 1000 Genome Project.

Данные о распределении гаплогрупп в различных этносах позволяют выполнить вероятностную оценку этногеографического происхождения носителя ДНК. Особая ценность информации о гаплогруппе Y-хромосомы связана с традицией передачи фамилии по мужской линии. Можно сказать, что гаплогруппа и фамилия — это два сцепленных между собой признака с разным способом наследования: генетическим и культурным соответственно. Заметим, что даже при значительном нивелировании в смешанных браках характерных антропологических признаков предка по мужской линии его фамилия будет передана искомому носителю ДНК. Учитывая наличие этнической специфичности фамилий, мы можем говорить о возможности использования информации о гаплогруппе в образце с места преступления для ранжирования подозреваемых по их фамилиям. Фокусировка дальнейшей экспертизы на наиболее вероятных подозреваемых позволит сократить сроки и затраты на расследование.

Ярким примером, демонстрирующим поисковые возможности этого подхода, может послужить наш опыт — когда при генотипировании коллекции был обнаружен единственный обра-

зец с гаплогруппой O, практически не встречающейся у европейцев, но распространенной в странах Восточной Азии. Этот образец принадлежал донору с характерной корейской фамилией Югай. Несмотря на то, что такие контрастные примеры на практике встречаются нечасто, они наглядно демонстрируют возможности метода. Для расширенного внедрения этого поискового подхода требуется его глубокая проработка в тесном сотрудничестве с ономатологами.

Как отмечено в вводной части, нами проанализированы все базовые гаплогруппы, представляющие самостоятельные стволы древа Y-хромосомы, за исключением M и S, которые практически не встречаются за пределами островов Юго-Восточной Азии и Океании. Тем не менее предлагаемый метод позволяет косвенно установить наличие M- или S-гаплогрупп в образце: в этом крайне маловероятном случае по всем 14 Y-маркерам будет наблюдаться гибридизация только верхнего ряда ячеек, содержащих ДНК-зонды к аллелям предкового типа.

Более полно раскрыть потенциал Y-хромосомы как источника географической информации позволит дальнейшая детализация каждой из

Таблица 3. Аллельспецифичные полиморфные позиции в экзонах 6 и 7 гена *ABO*, используемые для генотипирования в тест-системе *Phenotype Expert*

Позиция SNP, аллель ^a	Экзон 6		Экзон 7	
	261	297	681	657
A	G	A	G	C
B		G		T
O ¹	del			
O ^{1v}	del	G	A	
O ²		G		

^a Генотип аллеля A (выделен жирным шрифтом) по договоренности считается предковым.

гаплогрупп до нескольких десятков субкладов (субгаплогрупп). Существующий научно-технический уровень не позволяет создать метод для одновременного генотипирования сотен маркер-

ров, который при этом характеризуется высокой чувствительностью и практической простотой. В этой ситуации оптимальным подходом может быть двухэтапное исследование, в котором поиск на начальном этапе сужается до одной базовой гаплогруппы, а на втором расширяется до исследования ее субкладов. Для развития этого направления ведется работа по созданию отдельных биочипов, идентифицирующих субклады каждой из базовых гаплогрупп.

Оценка метода генотипирования

Как сказано выше, к методам генотипирования в криминалистике предъявляются повышенные требования, связанные с низким качеством и другими особенностями исследуемого материала. Наиболее полно они изложены в “Руководстве по валидации методов анализа ДНК” Международной рабочей группы судебных экспертов в SWGDAM (Scientific Working Group

Таблица 4. Частоты аллелей, генотипов и групп крови *ABO* по результатам генотипирования коллекции образцов славянской популяции ($N = 482$) в тест-системе *Phenotype Expert*

Группа	Аллель	Генотип	Частота, (N) ^a	Частота группы крови, (N) ^a
	A		0.263 (254)	
	B		0.174 (168)	
	O ¹		0.348 (335)	
	O ^{1v}		0.193 (186)	
	O ²		0.022 (21)	
I(O)		O ¹ /O ¹	0.112 (54)	0.307 (148)
		O ¹ /O ^{1v}	0.149 (72)	
		O ^{1v} /O ^{1v}	0.290 (14)	
		O ² /O ¹	0.010 (5)	
		O ² /O ^{1v}	0.004 (2)	
		O ² /O ²	0.002 (1)	
II(A)		A/A	0.075 (36)	0.371 (179)
		A/O ¹	0.191 (92)	
		A/O ^{1v}	0.093 (45)	
		A/O ²	0.012 (6)	
III(B)		B/O ¹	0.120 (58)	0.241 (116)
		B/O ^{1v}	0.081 (39)	
		B/O ²	0.012 (6)	
		B/B	0.027 (13)	
IV(AB)		A/B	0.081 (39)	0.81 (39)

^a (N) – число аллелей, генотипов либо образцов с соответствующей группой крови.

on DNA Analysis Methods; https://www.swgdam.org/files/ugd/4344b0_813b241e8944497e99b9c45b163b76bd.pdf). Мы учитывали требования SWGDAM в ходе создания инструмента генотипирования, однако его экспериментальная валидация по всему перечню SWGDAM — это объемное исследование, составляющее предмет отдельной публикации.

Для увеличения шансов успешного генотипирования фрагментированной ДНК при дизайне праймеров стояла задача получения максимально коротких ампликонов. В рамках метода ПЦР с последующей гибридизацией минимальная длина фрагмента, который можно получить, зависит от нуклеотидного состава локуса и в идеальном случае (при соотношении АТ/ГС ≈ 1) составляет около 50 п.н. Для большинства SNP были подобраны индивидуальные праймеры, однако в генах *MC1R* и *ABO* часть анализируемых полиморфизмов оказалась расположена достаточно компактно и их целесообразно было амплифицировать в пределах одного ПЦР-продукта: №№ 2, 3, 4, 7, 9, 11 — 130 п.н.; №№ 6, 10 — 92 п.н.; №№ 42, 43 — 130 п.н. и №№ 44, 45 — 83 п.н. (табл. 1). Это увеличило среднюю длину ампликонов, однако снизило мультиплексность ПЦР с 60 до 52. В итоге нам удалось добиться средней длины ПЦР-продукта 79 п.н., что не только существенно меньше, чем в ближайшем аналоге (133 п.н. [3]), но и приближается к пределу возможностей метода гибридизационного анализа.

Для понимания границ применимости метода в криминалистической практике требуется оценка его чувствительности. Снижение концентрации ДНК в анализируемом образце повышает вероятность выпадения одного из аллелей либо всего локуса. Выпадение одного из аллелей при гомозиготном генотипе не визуализируется на гибридизационной картине и не влияет на результат интерпретации. В случае же гетерозиготного генотипа выпадение аллеля создает ложную гомозиготность и может повлиять на прогнозируемый фенотип.

Мы провели предварительную оценку чувствительности разработанного метода на трех образцах, содержание ДНК которых составляло 10, 25, 50, 100, 250 и 500 пг в реакционной смеси. Для образцов 50–500 пг на реакцию был получен полноценный профиль по всем локусам; при 25 пг выпадения аллелей наблюдали в двух локусах одного из образцов; при 10 пг в двух образцах было потеряно по одному аллелю и в третьем образце выпали аллели в пяти локусах. Учитывая, что 10 пг ДНК соответствует менее чем двум полным геномам человека, можно предположить, что выпадение связано с физическим отсутствием в реакции хромосомы или ее фрагмента, содержащего второй аллель некорректно прогенотипированных полиморфизмов.

Характерный уровень чувствительности большинства мультиплексных наборов для криминалистики составляет 50–100 пг геномной ДНК на ПЦР, а для наиболее близкого к разработанному нами набору для генотипирования — панели HIrisPlex-S методом SNaPShot [34] — она составляет 63 пкг для каждой из двух мультиплексных реакций, то есть для получения полного профиля по 41 маркеру потребуется 125 пкг ДНК, что и следует считать истинной чувствительностью этого метода. Полученные предварительные результаты позволяют нам удовлетворительно оценить инструмент *Phenotype Expert* по параметру чувствительности.

Подводя итог, можно сказать, что представленная в работе панель маркеров для ДНК-фенотипирования превосходит имеющиеся аналоги по объему получаемой поисковой информации, а разработанный метод ориентирован на исследование деградированных объектов и позволяет получать весь заявленный объем генетических данных из образцов с низкой концентрацией ДНК, характерной для экспертной практики. Предельно простой протокол генотипирования позволяет обеспечить успешное внедрение метода в широкую практику, а полученные новые данные о распределении частот аллелей используемых полиморфизмов впервые установлены для российской популяции и использованы для валидации метода.

Написание настоящей статьи не потребовало специального финансирования.

Все процедуры, выполненные в исследовании с участием людей, соответствуют этическим стандартам институционального и/или национального комитета по исследовательской этике и Хельсинкской декларации 1964 года и ее последующим изменениям или сопоставимым нормам этики. От каждого из включенных в исследование участников было получено информированное добровольное согласие.

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Jeffreys A.J., Wilson V., Thein S.L. (1985) Hypervariable 'minisatellite' regions in human DNA. *Nature*. **314**(6006), 67–73.
2. Mannucci A., Sullivan K.M., Ivanov P.L., Gill P. (1994) Forensic application of a rapid and quantitative DNA sex test by amplification of the X-Y homologous gene amelogenin. *Int. J. Legal Med.* **106**(4), 190–193.
3. Chaitanya L., Breslin K., Zuñiga S., Wirken L., Pošpiech E., Kukla-Bartoszek M., Sijen T., Knijff P., Liu F., Branicki W., Kayser M., Walsh S. (2018) The HIrisPlex-S system for eye, hair and skin colour prediction from DNA: introduction and forensic developmental validation. *Forensic Sci. Int. Genet.* **35**, 123–135.

4. Kukla-Bartoszek M., Pośpiech E., Woźniak A., Boroń M., Karłowska-Pik J., Teisseyre P., Zubańska M., Bronikowska A., Grzybowski T., Płoski R., Spólnicka M., Branicki W. (2019) DNA-based predictive models for the presence of freckles. *Forensic Sci. Int. Genet.* **42**, 252–259
5. Pośpiech E., Kukla-Bartoszek M., Karłowska-Pik J., Zieliński P., Woźniak A., Boroń M., Dąbrowski M., Zubańska M., Jarosz A., Grzybowski T., Płoski R., Spólnicka M., Branicki W. (2020) Exploring the possibility of predicting human head hair greying from DNA using whole-exome and targeted NGS data. *BMC Genomics.* **21**(1), 538.
6. Marcińska M., Pośpiech E., Abidi S., Andersen J. D., van den Berge M., Carracedo Á., Eduardoff M., Marczakiewicz-Lustig A., Morling N., Sijen T., Skowron M., Söchtig J., Syndercombe-Court D., Weiler N., EUROFORGEN-NoE Consortium, Schneider P.M., Ballard D., Børsting C., Parson W., Phillips C., Branicki W. (2015) Evaluation of DNA variants associated with androgenetic alopecia and their potential to predict male pattern baldness. *PLoS One.* **10**(5), e0127852.
7. Pośpiech E., Karłowska-Pik J., Marcińska M., Abidi S., Andersen J.D., Berge M., Carracedo Á., Eduardoff M., Freire-Aradas A., Morling N., Sijen T., Skowron M., Söchtig J., Syndercombe-Court D., Weiler N., Schneider P. M., Ballard D., Børsting C., Parson W., Phillips C., EUROFORGEN-NoE Consortium (2015) Evaluation of the predictive capacity of DNA variants associated with straight hair in Europeans. *Forensic Sci. Int. Genet.* **19**, 280–288.
8. Aulchenko Y.S., Struchalin M.V., Belonogova N.M., Axenovich T.I., Weedon M.N., Hofman A., Uitterlinden A.G., Kayser M., Oostra B.A., van Duijn C.M., Janssens A.C., Borodin P.M. (2009) Predicting human height by Victorian and genomic methods. *Eur. J. Hum. Genet.* **17**(8), 1070–1075.
9. Cho S., Lee E. H., Kim H., Lee J.M., So M.H., Ahn J.J., Lee H.Y. (2021) Validation of BMI genetic risk score and DNA methylation in a Korean population. *Int. J. Legal Med.* **135**(4), 1201–1212.
10. Vidaki A., Ballard D., Aliferi A., Miller T.H., Barron L.P., Syndercombe Court D. (2017) DNA methylation-based forensic age prediction using artificial neural networks and next generation sequencing. *Forensic Sci. Int. Genet.* **28**, 225–236.
11. Frudakis T.N. (2010) *Molecular Photofitting: Predicting Ancestry and Phenotype Using DNA*. Elsevier.
12. Claes P., Hill H., Shriver M.D. (2014) Toward DNA-based facial composites: preliminary results and validation. *Forensic Sci. Int. Genet.* **13**, 208–216.
13. Фесенко Д.О., Митяева О.Н., Наседкина Т.В., Рубцов П.М., Лысов Ю.П., Заседателев А.С. (2010) Генотипирование биологического материала по локусам *HLA-DQA1*, *ABO*, *AMEL* с помощью биочипов. *Молекуляр. биология*, **44**(3), 456–462.
14. Фесенко Д.О., Иванов П.Л., Корниенко А.Е., Земскова Е.Ю., Заседателев А.С., Наседкина Т.В. (2011) Оптимизация биологического микрочипа для генотипирования локуса *ABO*: аналитические аспекты. *Судебно-медицинская экспертиза*. **54**, 30–33.
15. Y Chromosome Consortium. (2002) A nomenclature system for the tree of human Y-chromosomal binary haplogroups. *Genome Res.* **12**(2), 339–348.
16. Karafet T.M., Mendez F.L., Meilerman M.B., Underhill P.A., Zegura S.L., Hammer M.F. (2008) New binary polymorphisms reshape and increase resolution of the human Y chromosomal haplogroup tree. *Genome Res.* **18**(5), 830–838.
17. Keating B., Bansal A.T., Walsh S., Millman J., Newman J., Kidd K., Budowle B., Eisenberg A., Donfack J., Gasparini P., Budimlija Z., Henders A.K., Chandrupatla H., Duffy D.L., Gordon S.D., Hysi P., Liu F., Medland S.E., Rubin L., Martin N.G., International Visible Trait Genetics (VisiGen) Consortium. (2013) First all-in-one diagnostic tool for DNA intelligence: genome-wide inference of biogeographic ancestry, appearance, relatedness, and sex with the Identitas v1 Forensic Chip. *Int. J. Legal Med.* **127**(3), 559–572.
18. Alvarez-Cubero M.J., Saiz M., Martínez-García B., Sayalero S.M., Entrala C., Lorente J.A., Martínez-Gonzalez L.J. (2017) Next generation sequencing: an application in forensic sciences? *Ann. Hum. Biol.* **44**(7), 581–592.
19. Fesenko D.O., Chudinov A.V., Surzhikov S.A., Zasedatelev A.S. (2014) Biochip for genotyping SNPs defining core Y-chromosome haplogroups in Russian population groups. *BioChip J.* **8**, 171–178.
20. Yip S.P. (2000) Single-tube multiplex PCR-SSCP analysis distinguishes 7 common *ABO* alleles and readily identifies new alleles. *Blood.* **95**(4), 1487–1492.
21. Sanchez J.A., Pierce K.E., Rice J.E., Wang L.J. (2004) Linear-After-The-Exponential (LATE)-PCR: an advanced method of asymmetric PCR and its uses in quantitative real-time analysis. *Proc. Natl. Acad. USA.* **101**(7), 1933–1938.
22. Фесенко Д.О., Корниенко А.Е., Чуудинов А.В., Наседкина Т.В. (2011) Получение одноцепочечной ДНК в одноэтапной ПЦР с легкоплавким избыточным праймером для гибридизации на биочипах. *Молекуляр. биология*. **45**(2), 267–271.
23. Chen Y., Branicki W., Walsh S., Nothnagel M., Kayser M., Liu F. (2021) The impact of correlations between pigmentation phenotypes and underlying genotypes on genetic prediction of pigmentation traits. *Forensic Sci. Int. Genet.* **50**, 102395.
24. Середенко (Шинкевич) М.В., Вакула С.И., Шаптуренко М.Н., Кондратюк А.В., Боровко С.Р., Луговнев А.В., Гудиевская И.Г., Скрыпник О.В., Марченко Л.Н., Кильчевский А.В. (2021) Прогностическая способность системы генетического фенотипирования HirisPlex в белорусской популяции. *Экологическая генетика*. **19**(1), 67–76.
25. Балановский О.П., Петрушенко В.С., Горин И.О., Кагазежева Ж.А., Маркина Н.В., Кострюкова Е.С., Лейбова Н.А., Маурер А.М., Балановская Е.В. (2019) Точность предикции пигментации волос и глаз по генетическим маркерам для популяций России. *Вестник РГМУ*. **5**, 25–41.
26. Balanovska E., Lukianova E., Kagazheva J., Maurer A., Leybova N., Agdzhoian A., Gorin I., Petrusenko V., Zhabagin M., Pylev V., Kostryukova E., Balanovsky O. (2020) Optimizing the genetic prediction of the eye and

- hair color for North Eurasian populations. *BMC Genomics*. **21**(1), 527.
27. Halder I., Shriver M., Thomas M., Fernandez J. R., Frudakis T. (2008) A panel of ancestry informative markers for estimating individual biogeographical ancestry and admixture from four continents: utility and applications. *Hum. Mutat.* **29**(5), 648–658.
28. Phillips C., Santos C., Fondevila M., Carracedo Á., Lareu M.V. (2016) Inference of ancestry in forensic analysis I: autosomal ancestry-informative marker sets. *Methods Mol. Biol.* **1420**, 233–253.
29. Setser C.H., Planz J.V., Barber R.C., Phillips N.R., Chakraborty R., Cross D.S. (2020) Differentiation of Hispanic biogeographic ancestry with 80 ancestry informative markers. *Sci. Rep.* **10**(1), 7745.
30. Doi Y., Yamamoto Y., Inagaki S., Shigeta Y., Miyaishi S., Ishizu H. (2004) A new method for *ABO* genotyping using a multiplex single-base primer extension reaction and its application to forensic casework samples. *Legal Med.* **6**(4), 213–223.
31. Reich D.E., Schaffner S.F., Daly M.J., McVean G., Mullikin J.C., Higgins J.M., Richter D.J., Lander E.S., Altshuler D. (2002) Human genome sequence variation and the influence of gene history, mutation and recombination. *Nat. Genet.* **32**(1), 135–142.
32. Aşicioglu F., Oguz-Savran F., Ozbek U. (2004) Mutation rate at commonly used forensic STR loci: paternity testing experience. *Dis. Markers*. **20**(6), 313–315.
33. Hohoff C., Dewa K., Sibbing U., Hoppe K., Forster P., Brinkmann B. (2007) Y-chromosomal microsatellite mutation rates in a population sample from northwestern Germany. *Int. J. Legal Med.* **121**(5), 359–363.
34. Walsh S., Liu F., Wollstein A., Kovatsi L., Ralf A., Kosiniak-Kamysz A., Branicki W., Kayser M. (2013) The HIrisPlex system for simultaneous prediction of hair and eye colour from DNA. *Forensic Sci. Int. Genet.* **7**(1), 98–115.

BIOCHIP FOR GENOTYPING POLYMORPHISMS ASSOCIATED WITH EYE, HAIR, SKIN COLOR, ABO BLOOD GROUPE, SEX, CORE Y-CHROMOSOME HAPLOGROUPS, AND ITS USING FOR A STUDY OF THE SLAVIC POPULATION

D. O. Fesenko¹*, I. D. Ivanovsky², P. L. Ivanov³, E. Yu. Zemskova³, A. S. Agapitova², S. A. Polyakov¹, O. E. Fesenko⁴, M. A. Filippova¹, and A. S. Zasedatelev¹

¹ Engelhardt Institute of Molecular Biology, Russian Academy of Sciences, Moscow, 119991 Russia

² DNA Research Center, LLC, Khimki, Moscow Region, 141402 Russia

³ Russian Center of Forensic Medical Expertise, Ministry of Health of the Russian Federation, Moscow, 125284 Russia

⁴ Research Institute of Physics, Southern Federal University, Rostov-on-Don, 344090 Russia

*e-mail: deferos@yandex.ru

Here, a method for genotyping a panel of 60 polymorphisms using one-step PCR followed by hybridization on a hydrogel biochip is presented. The pool of analyzed polymorphisms consists of 41 SNPs included in the HIrisPlex-S panel, 4 SNPs of the *ABO* gene (261G>Del, 297A>G, 657C>T, 681G>A), markers of the *AMELX* and *AMELY* genes, and 14 SNP markers of the Y-chromosome haplogroups: B (M60), C (M130), D (CTS3946), E (M5388), G (P257), H (M2920), I (U179), J (M304), L (M185), N (M231), O (M175), Q (M1105), R (P224) and T (M272). The obtained genetic data make it possible to predict the phenotype of the desired person according to the characteristics of eye, hair, skin color, ABO blood group, sex, and geogeographic origin in the male line. The setting protocol is simplified as much as possible to facilitate the introduction of the method into practice. The distribution of allele frequencies of the studied polymorphisms, as well as the ABO blood groups among Slavs originating, mainly from central Russia ($N = 482$) was established.

Keywords: DNA-phenotyping, microarray, forensics, eye color, hair color, skin color, ABO blood group, Y-chromosome haplogroup, sex