СОДЕРЖАНИЕ

Том 87, № 3, 2022

Гибридные белки с короткими конформационными эпитопами рецептор-связывающего домена Spike-белка вируса SARS-CoV-2 способствуют выработке вируснейтрализующих антител при иммунизации
А.С. Карягина, А.В. Громов, Т.М. Грунина, А.М. Лящук, М.С. Попонова, Д.А. Клейменов, Н.В. Струкова, М.С. Генералова, А.В. Рязанова, З.М. Галушкина, О.Ю. Добрынина, Т.Н. Большакова, М.В. Сергеева, Е.А. Романовская-Романько, И.В. Красильников, М.Е. Субботина, В.Г. Лунин 307

Изучение взаимодействия ДНК-зависимых белков семейства PARP с нуклеосомными частицами, содержащими интермедиаты начальных стадий процесса BER
А.А. Украинцев, Е.А. Белоусова, М.М. Кутузов, О.И. Лаврик 321

Неапоптотическая роль апоптотических процессов (обзор)
М.А. Савицкая, И.И. Захаров, Г.Е. Онищенко 337

Роль гликопротеина муцин 2 и L-фукозы во взаимодействии иммунитета и микрофлоры на примере экспериментальной модели воспалительных заболеваний кишечника
В.Д. Бец, К.М. Ачасова, М.А. Борисова, Е.Н. Кожевникова, Е.А. Литвинова 356

Повышение уровня сывороточного програнулина у больных коронавирусной инфекцией (COVID-19): пилотное исследование
F.B. Özgeriş, Ö.F. Koçak, N. Kurt, E. Parlak, N. Yüce, M.S. Keleş 376

Препаративное получение и очистка рекомбинантного циклофилина А человека
А.А. Калинина, А.В. Колесников, А.В. Козырь, Н.Л. Куликова, М.А. Замкова, Д.Б. Казанский, Л.М. Хромых 387

Агрегация белков при катаракте: роль возрастных модификаций и мутаций α-кристаллинов (обзор)
P. Budnar, R. Tangirala, R. Bakthisaran, Ch. M. Rao 400

Влияние сорбитола на структуру и функцию альфа-кристаллина
Ch.U. Kumar, U. Suryavanshi, V. Sontake, P.Y. Reddy, R.S. Sankhala, M.J. Swamy, G.B. Reddy 419

Химерный агонист рецептора галанина GALR2 уменьшает повреждение сердца крыс при стрептозотоцин-индуцированном диабете
И.М. Студнева, О.М. Веселова, И.В. Доброхотов, Л.И. Серебрякова, М.Е. Палькеева, А.С. Молокоедов, А.А. Азьмуко, М.В. Овчинников, М.В. Сидорова, О.И. Писаренко 430

ДИСКУССИЯ

Вариабельность смертности: дополнительная информация о ходе кривых выживания в норме и при патологии (комментарий к статье А.Г. Малыгина, *Биохимия*, 86, вып. 12, с. 1798–1807)
Г.А. Шиловский 442

Правила для авторов 449

CONTENTS

Vol. 87, Issue 3, 2022

Hybrid Proteins with Short Conformational Epitopes of the Receptor-Binding Domain of the SARS-CoV-2 Spike Protein Promote the Production of Virus-Neutralizing Antibodies During Immunization
A. S. Karyagina, A. V. Gromov, T. M. Grunina, A. M. Lyaschuk, M. S. Poponova, D. A. Kleymenov, N. V. Strukova, M. S. Generalova, A. V. Ryazanova, Z. M. Galushkina, O. Yu. Dobrynina, T. N. Bolshakova, M. V. Sergeeva, E. A. Romanovskaya-Romanko, I. V. Krasilnikov, M. E. Subbotina, and V. G. Lunin 307

The Study of the Interaction PARP Family DNA-Dependent Proteins with Nucleosomes Containing DNA-Intermediates of the Initial Stages of the BER Process
A. A. Ukraintsev, E. A. Belousova, M. M. Kutuzov, and O. I. Lavrik 321

The Apoptotic Features in Non-Apoptotic Processes (review)
M. A. Savitskaya, I. I. Zakharov, and G. E. Onishchenko 337

The Role of Glycoprotein Mucin 2 and L-Fucosy in the Interaction of Immunity and Microflora of Experimental Model of Inflammatory Bowel Diseases
V. D. Betz, K. M. Achasova, M. A. Borisova, E. N. Kozhevnikova, and E. A. Litvinova 356

High Serum Progranulin Levels in Covid-19 Patients: A Pilot Study
F. B. Özgeriş, Ö. F. Koçak, N. Kurt, E. Parlak, N. Yüce, and M. S. Keleş 376

Preparative Production and Purification of Recombinant Human Cyclophilin A
A. A. Kalinina, A. V. Kolesnikov, A. V. Kozyr, N. L. Kulikova, M. A. Zamkova, D. B. Kazansky, and L. M. Khromykh 387

Protein Aggregation and Cataract: Role of Age-Related Modifications and Mutations in α-Crystallins (Review)
P. Budnar, R. Tangirala, R. Bakthisaran, and Ch. M. Rao 400

Effect of Sorbitol on Alpha-Crystallin Structure and Function
Ch. U. Kumar, U. Suryavanshi, V. Sontake, P. Y. Reddy, R. S. Sankhala, M. J. Swamy, and G. B. Reddy 419

Chimeric Agonist of Galanin Receptor GALR2 Reduces Heart Damage in Rats with Streptozotocin-Induced Diabetes
I. M. Studneva, O. M. Veselova, I. V. Dobrokhotov, L. I. Serebryakova, M. E. Palkeeva, A. S. Molokoedov, A. A. Azmuko, M. V. Ovchinnikov, M. V. Sidorova, and O. I. Pisarenko 430

DISCUSSION

Variability of Mortality: Additional Information on the Course of Mortality and Morbidity Curves [Commentary on the Article by A. G. Malygin Entitled "Programmed Risks of Death in Male Patients with Diabetes" Published in *Biokhimiya*, vol. 86, no. 12, pp. 1798-1807 (2021)]
G. A. Shilovsky 442

Instructions for Authors 449

EDN: YKROJP
БИОХИМИЯ, 2022, том 87, вып. 3, с. 307 – 320

УДК 577.112

ГИБРИДНЫЕ БЕЛКИ С КОРОТКИМИ КОНФОРМАЦИОННЫМИ ЭПИТОПАМИ РЕЦЕПТОР-СВЯЗЫВАЮЩЕГО ДОМЕНА Spike-БЕЛКА ВИРУСА SARS-CoV-2 СПОСОБСТВУЮТ ВЫРАБОТКЕ ВИРУСНЕЙТРАЛИЗУЮЩИХ АНТИТЕЛ ПРИ ИММУНИЗАЦИИ

© 2022 А.С. Карягина[1,2,3]*, А.В. Громов[1], Т.М. Грунина[1,2], А.М. Лящук[1], М.С. Попонова[1], Д.А. Клейменов[1], Н.В. Струкова[1], М.С. Генералова[1], А.В. Рязанова[1], З.М. Галушкина[1], О.Ю. Добрынина[1], Т.Н. Большакова[1], М.В. Сергеева[4], Е.А. Романовская-Романько[4], И.В. Красильников[5], М.Е. Субботина[1,2]*, В.Г. Лунин[1,2]

[1] *Национальный исследовательский центр эпидемиологии и микробиологии им. Н.Ф. Гамалеи Минздрава России, 123098 Москва, Россия; электронная почта: akaryagina@gmail.com, subbotinam@gmail.com*

[2] *Всероссийский научно-исследовательский институт сельскохозяйственной биотехнологии, 127550 Москва, Россия*

[3] *НИИ физико-химической биологии им. А.Н. Белозерского, Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, 119991 Москва, Россия*

[4] *НИИ гриппа им. А.А. Смородинцева Минздрава России, 197376 Санкт-Петербург, Россия*

[5] *Санкт-Петербургский институт вакцин и сывороток ФМБА России, 198320 Санкт-Петербург, Россия*

Поступила в редакцию 31.01.2022
После доработки 16.02.2022
Принята к публикации 16.02.2022

На основе предложенного ранее подхода синтезом в клетках *Escherichia coli* получены гибридные рекомбинантные белки – потенциальные компоненты эпитопных вакцин, содержащие короткие конформационные эпитопы рецептор-связывающего домена Spike-белка вируса SARS-CoV-2 (144–153, 337–346, 414–425, 496–507 а.о.), реализующие большое количество белок-белковых взаимодействий в комплексах с нейтрализующими антителами и ACE2 (ангиотензин-превращающий фермент 2). Полученными белками трёхкратно с интервалом в 2 недели иммунизировали мышей и исследовали иммуногенность белковых антигенов и способность сывороток взаимодействовать с инактивированным вирусом SARS-CoV-2 и с рецептор-связывающим доменом (RBD) Spike-белка, полученным в эукариотическом продуценте. Все рекомбинантные белки демонстрировали высокую иммуногенность. Наиболее высокий титр при связывании с RBD Spike-белка продемонстрировала сыворотка, полученная при иммунизации белком на основе эпитопа 414–425. При этом титры сывороток при связывании с инактивированным вирусом и RBD в случае остальных белков оказались существенно ниже титров для полученных ранее четырёх белков на основе петлеобразных эпитопов 452–494 и 470–491, конформация которых дополнительно фиксировалась дисульфидной связью. Для всех белков – полученных ранее и в данной работе – проведено исследование активации клеточного иммунитета, детектируемой по уровню синтеза цитокинов спленоцитами иммунизированных мышей. Максимально выраженный уровень повышения синтеза цитокинов наблюдался в случае ответа на белки, включающие эпитопы с дисульфидными связями (452–494, 470–491), а также эпитопы 414–425 и 496–507. После оптимизации адъюванта для некоторых рекомбинантных белков с короткими конформационными эпитопами RBD Spike-белка были получены сыворотки мышей, демонстрирующие вируснейтрализующий эффект в реакции микронейтрализации с живым вирусом SARS-CoV-2 (hCoV-19/Russia/StPetersburg-3524/2020 EPI_ISL_415710 GISAID). Полученные результаты могут быть использованы для разработки эпитопных вакцин для профилактики COVID-19 и других вирусных инфекций.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: SARS-CoV-2, Spike-белок, RBD, RBM, эпитопная вакцина, эпитоп, альдолаза.

DOI: 10.31857/S0320972522030010

ВВЕДЕНИЕ

Разработка новых вариантов вакцин для профилактики COVID-19 и других вирусных инфекций является чрезвычайно актуальной задачей. Цельновирионные вакцины, субъединичные белковые вакцины, включающие полноразмерные белки, векторные вакцины и РНК-вак-

Принятые сокращения: ДТТ – дитиотреитол; СГТ – средний геометрический титр; ACE2 – ангиотензин-превращающий фермент 2; ALD – альдолаза; COVID-19 – коронавирусная инфекция 2019 г. (COronaVIrus Disease 2019); HBD – гепарин-связывающий домен; RBD – рецептор-связывающий домен; RBM – рецептор-связывающий мотив; TLR – Toll-подобные рецепторы; Tri – α-спираль, опосредующая тримеризацию Spike-белка SARS-CoV-2.

* Адресат для корреспонденции.

цины, которые способствуют выработке в организме вирусных белков, индуцируют образование широкого спектра антител, не все из которых являются протективными [1]. В ряде случаев могут образовываться антитела, способствующие антителозависимому усилению инфекции при заражении после вакцинирования [2–4]. Эпитопные вакцины, включающие отдельные небольшие белковые эпитопы инфекционного агента, позволяют избежать вышеперечисленных проблем и при этом характеризуются высокой степенью стандартности и слабой реактогенностью. Недостатками эпитопных вакцин может быть их низкая иммуногенность и неспособность вызывать образование вируснейтрализующих антител, а также возможность быстрого ухода новых штаммов вируса от иммунного ответа, вызванного такими вакцинами. Повысить иммуногенность и способствовать выработке вируснейтрализующих антител можно, используя такие подходы, как мультимеризация эпитопов [5] и оптимизация адъюванта [6]. Перспективным подходом при выборе эпитопов – участков поверхности белков, способных эффективно индуцировать образование антител – представляется выбор не линейных, а непрерывных конформационных эпитопов, обеспечивающих большее соответствие участку структуры вирусного белка. Основываясь на данных о контактах, реализуемых в комплексах Spike-белка с нейтрализующими антителами и ACE-2 (ангиотензин-превращающий фермент 2), на предыдущих этапах исследования нами были выбраны две детерминанты в области рецептор-связывающего мотива (RBM) – 452–494 и 470–491 а.о., реализующие большое количество контактов как с антителами, так и с ACE-2 [7]. Обе детерминанты характеризуются петлеобразной конформацией и включают два остатка цистеина, образующих дисульфидную связь в структуре Spike-белка. Для иммунизации были получены два варианта гибридных белков, содержащих антигенные детерминанты, включённые в место поворота в мотиве «спираль-поворот-спираль» Rop-подобного белка из *Methylococcus capsulatus* с целью сближения *N*- и *C*-концов и сохранения петлеобразной конформации эпитопов. Rop-подобный белок в данном случае выполняет функцию так называемого эпитопного каркаса. Показано, что при синтезе такого рода белков в *Escherichia coli* и последующей очистке дисульфидная связь образуется [7]. Гибридные белки содержат также либо альдолазу из *Thermotoga maritima*, либо α-спиральный участок, соответствующий 958–991 а.о. Spike-белка SARS-CoV-2, обеспечивающие тримеризацию, а также гепарин-связывающий участок, использующийся для очистки. Для всех четырёх вариантов гибридных белков показана высокая иммуногенность и способность антител, образующихся в ответ на иммунизацию этими белками, в высоком титре взаимодействовать как с рецептор-связывающим доменом (RBD) Spike-белка, так и с инактивированным SARS-CoV-2.

Целью данной работы было получение по ранее разработанной схеме ещё нескольких вариантов гибридных белков, несущих конформационные эпитопы Spike-белка коронавируса SARS-CoV-2, исследование иммуногенности полученных белков и способности индуцированных ими антител связываться с RBD Spike-белка и инактивированным SARS-CoV-2, характеристика цитокинового ответа спленоцитов после иммунизации белками, несущими весь спектр исследуемых эпитопов, исследование вируснейтрализации наиболее перспективными гибридными белками на модели микронейтрализации клинического изолята коронавируса SARS-CoV-2.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Штамм и векторы. В работе использовали бактериальный штамм *Escherichia coli* BL21 (DE3) (*E. coli* B F^- *dcm ompT hsdS*($r_B^- m_B^-$) *gal* λ(DE3), «Agilent Technologies», США), модифицированный плазмидный вектор pQE6 («Qiagen», США), содержащий вместо промотора T5 промотор T7, и плазмиду pRep4 из *E. coli* M15 [pRep4] («Qiagen»).

Получение генно-инженерных конструкций, кодирующих белки Rop-D2-Rop-Tri-HBD, Rop-D3-Rop-Tri-HBD, Rop-D2-Rop-ALD-HBD и Rop-D3-Rop-ALD-HBD детально описано в работе Karyagina et al. [7]. Последовательности этих белков содержат участки D2 (470–490 а.о.) и D3 (453–494 а.о.) Spike-белка вируса SARS-CoV-2 (UniProtKB: locus SPIKE_SARS2, accession P0DTC2), вставленные между аминокислотными последовательностями двух α-спиралей Rop-подобного белка из *M. capsulatus* (первая спираль Rop: 2–34 а.о., вторая спираль Rop: 34–65 а.о., PDB: 2JS5_A, RefSeq WP_010959602). Далее присоединена последовательность α-спирали, опосредующей тримеризацию Spike-белка SARS-CoV-2 (Tri) (958–991 а.о., UniProtKB: locus SPIKE_SARS2, accession P0DTC2), или последовательность альдолазы из *T. maritima* (2–201 а.о., PDB: 1WA3). На *C*-конце белков находится короткий участок гепарин-связывающего гемагглютинина HBHA из *Mycobacterium tuberculosis*, соответствующий гепарин-связывающему домену (HBD) (160–174 а.о., UniProtKB/

Swiss-Prot: A1KFU9.1). В составе конструкций также имеются дополнительные остатки, представляющие собой линкерные последовательности, и остатки, соответствующие нуклеотидным последовательностям с введёнными рестрикционными сайтами.

Получение генно-инженерных конструкций Rop-D4-Rop-Tri-HBD, Rop-D4-Rop-ALD-HBD, Rop-D6-Rop-Tri-HBD, Rop-D6-Rop-ALD-HBD, Rop-D8-Rop-Tri-HBD, Rop-D8-Rop-ALD-HBD, Rop-D13-Rop-Tri-HBD, Rop-D13-Rop-ALD-HBD, Rop-RBM-Rop-Tri-HBD проводили по схемам, аналогичным описанным в работе Karyagina et al. [7]. Получали синтетические последовательности, кодирующие участки Spike-белка коронавируса SARS-CoV-2: D4 (496–507 a.o.), D6 (144–153 a.o.), D8 (337–346 a.o.), D13 (414–425 a.o.), RBM (433–511 a.o.), оптимизированные с помощью программы JCat (http://www.jcat.de/) по кодонному составу и скорректированные для улучшения вторичной структуры транскрибируемой РНК с помощью веб-сервера DINAMelt (http://mfold.rna.albany.edu/?q=DINAMelt/Two-state-folding) с целью повышения экспрессии в *E. coli*. Синтетические последовательности клонировали в плазмиды pL1003, кодирующую белок Rop-D2-Rop-Tri-HBD и pL989, кодирующую белок Rop-D2-Rop-ALD-HBD, получение которых описано ранее [7], замещая детерминанту D2. Синтетические последовательности получали в компании «Евроген» (Россия).

Выращивание штаммов-продуцентов и разрушение клеток *E. coli* проводили по протоколам, описанным в работе Karyagina et al. [7]. При этом белки Rop-D4-Rop-Tri-HBD, Rop-D8-Rop-Tri-HBD, Rop-D13-Rop-Tri-HBD и Rop-RBM-Rop-Tri-HBD синтезировались в нерастворимой форме в виде телец включений, а белки Rop-D13-Rop-ALD-HBD, Rop-D4-Rop-ALD-HBD и Rop-D8-Rop-ALD-HBD – в растворимой форме. Синтеза белка Rop-D6-Rop-ALD-HBD не наблюдалось.

Очистку белков проводили в соответствии с ранее опубликованными протоколами хроматографической очистки – для нерастворимых и для растворимых белков [7]. Хроматографию белков, синтезировавшихся в тельцах включений, растворенных в 8 М мочевине и 10 мМ Tris-HCl (pH 8,0), проводили на колонке с WorkBeads 40S («Bio-Works», Швеция), уравновешенной раствором 8 М мочевины и 10 мМ Tris-HCl (pH 8,0), с элюцией линейным градиентом NaCl с концентрацией 0–1 М в том же буферном растворе и последующим диализом против раствора 4 М мочевины в 25 мМ Tris-HCl-буфере (pH 8,0) в течение 24 ч при 4 °C и центрифугированием в течение 30 мин при 9000 *g*. Затем проводили аффинную хроматографию на Heparin Sepharose CL-6B («GE Healthcare», США), уравновешенной раствором 4 М мочевины в 20 мМ Tris-HCl-буфере (pH 8,0), с элюцией линейным градиентом NaCl с концентрацией 0–1 М в растворе 4 М мочевины в 25 мМ Tris-HCl-буфере (pH 8,0) и последующим диализом против буфера 25 мМ Tris-HCl (pH 6,8), постепенно снижая концентрацию мочевины в диализном буфере до нуля (ступенями по 0,5 М) в течение 24 ч при 4 °C.

Хроматографию растворимых белков проводили на сорбенте WorkBeads 40S, уравновешенном 20 мМ Tris-HCl (pH 8,0), с элюцией раствором NaCl (линейным градиентом концентрации 0–1 М) в том же буферном растворе, диализовали против 20 мМ Tris-HCl (pH 8,0) в течение 24 ч и центрифугировали в течение 30 мин при 9000 *g*. Затем проводили аффинную хроматографию на гепарин-сефарозе, уравновешенной 20 мМ Tris-HCl-буфером (pH 8,0), с элюцией градиентом концентрации NaCl 0–1 М в 20 мМ Tris-HCl (pH 8,0). Полученные фракции белков диализовали против 20 мМ Tris-HCl (pH 8,0), 50 мМ NaCl в течение 24 ч при температуре 4 °C с трёхкратной сменой буфера.

Концентрацию и общее количество белков определяли по поглощению раствора при 280 нм с использованием бицинхониновой кислоты. Полученные препараты белков лиофильно высушивали и использовали для дальнейших исследований.

Молекулярную массу и теоретические значения некоторых параметров рекомбинантных белков рассчитывали с использованием интернет-ресурса https://web.expasy.org/protparam/.

Иммуногенные композиции и эксперименты по иммунизации. На основе полученных рекомбинантных белков, содержащих конформационные эпитопы Spike-белка SARS-CoV-2 (включая четыре белка, полученных ранее), были подготовлены иммуногенные композиции, содержащие в одной дозе (объёмом 150 мкл) 1 нмоль рекомбинантного белка и соответствующий адъювант. В первом эксперименте по иммунизации мышей использовали семь рекомбинантных белков (белки в строках 5–11 в табл. 1), в иммуногенные композиции вводили адъювант 1: диэтиламиноэтиловый (ДЭАЭ)-декстран 500 – 1 мг, монтанид ISA 201 («Seppic SA», Франция) – 75 мкл (50%), ретинола пальмитат (100 000 МЕ/мл) (АО «Ретиноиды», Россия) – 1,5 мкл (1%). Сыворотки, полученные после этой иммунизации, использовали для оценки иммуногенности рекомбинантных белков, способности взаимодействовать с RBD и инактиви-

рованным вирусом SARS-CoV-2, постановки первой реакции микронейтрализации, спленоциты – для исследования клеточного иммунитета. Во втором эксперименте по иммунизации использовали те же рекомбинантные белки, ранее полученные рекомбинантные белки [7] (строки 1–4 в табл. 1), а также белки Rop-RBM-Rop-Tri-HBD и RBD («Mount Sinai», США), в иммуногенные композиции вводили адъювант 2: ДЭАЭ-декстран 500 – 1 мг, липополисахарид (LPS) из *E. coli* O55:B5 («Sigma», США) – 0,1 мкг, олигодезоксинуклеотиды CpG (ODN 1826) (ЗАО «Евроген», Россия) – 30 мкг. Полученные сыворотки использовали для постановки второй реакции микронейтрализации.

Детальный протокол иммунизации лабораторных животных описан ранее [7]. Для иммунизации использовали самок мышей сингенной инбредной линии BALB/c в возрасте 5–6 недель весом 18–20 г (НИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи Минздрава России). Мышам опытных групп (n = 7) трёхкратно вводили по 150 мкл иммуногенных композиций, содержащих рекомбинантные белки, с интервалом в 2 недели. Животным контрольной группы (n = 7) вводили физиологический раствор (150 мкл). Через 2 недели после последней инъекции лабораторных животных опытных и контрольной групп вводили в наркоз ингаляцией изофлурана («Piramal Enterprises», Индия) и проводили сбор крови из сердечной полости (в случае первого эксперимента по иммунизации также проводили извлечение селезёнки, см. подраздел про оценку активации клеточного иммунитета). Вакуумные пробирки с кровью выдерживали при комнатной температуре 20 мин и центрифугировали 30 мин при 1500 *g* без охлаждения. Надосадочную жидкость (сыворотку крови) переносили в стерильные пробирки объёмом 1,5 мл и замораживали при –80 °C.

Иммуноферментный анализ. В качестве антигенов на планшеты сорбировали белки, использованные для иммунизации, вирус SARS-CoV-2, инактивированный формалином, и RBD Spike-белка вируса SARS-CoV-2. Получение инактивированного SARS-CoV-2 и RBD Spike-белка вируса SARS-CoV-2, а также детальный протокол ИФА описаны ранее [7]. Кратко, в 96-луночных планшетах Maxisorp («Thermo Scientific», Дания) в течение ночи при 4 °C проводили сорбцию антигенов, после отмывки планшеты инкубировали в течение 2 ч с блокирующим буфером (PBS, содержащий 5% сухого молока; «ТФ Дитол», Россия), повторно отмывали и вносили се-

Таблица 1. Характеристика полученных рекомбинантных белков

№	Белок	Молекулярная масса, Да	Локализация белка после разрушения биомассы	Теоретическая изоэлектрическая точка (p*I*)	Поглощение водного раствора белка (1 мг/мл) при 280 нм для полностью окисленной формы	Поглощение водного раствора белка (1 мг/мл) при 280 нм для восстановленной формы
1	Rop-D2-Rop-Tri-HBD	18 714	тельца включения	8,83	0,325	0,318
2	Rop-D3-Rop-Tri-HBD	21 359	тельца включения	9,39	0,355	0,349
3	Rop-D2-Rop-ALD-HBD	36 102	растворимая фракция	8,58	0,486	0,483
4	Rop-D3-Rop-ALD-HBD	38 747	растворимая фракция	9,10	0,491	0,488
5	Rop-D4-Rop-Tri-HBD	17 491	тельца включения	9,45	0,256	-
6	Rop-D8-Rop-Tri-HBD	17 627	тельца включения	9,49	0,169	-
7	Rop-D4-Rop-ALD-HBD	34 878	растворимая фракция	9,06	0,457	-
8	Rop-D8-Rop-ALD-HBD	35 014	растворимая фракция	9,07	0,412	-
9	Rop-D6-Rop-Tri-HBD	34 966	тельца включения	9,05	0,456	-
10	Rop-D13-Rop-ALD-HBD	35 215	растворимая фракция	9,13	0,495	-
11	Rop-D13-Rop-Tri-HBD	17 827	тельца включения	9,29	0,334	-
12	Rop-RBM-Rop-Tri-HBD	245 628	тельца включения	8,43	0,836	0,831

Примечание. Для белков, не образующих дисульфидную связь, поглощение водного раствора белка при 280 нм для восстановленной формы не исследовали. Данные для белков в строках 1–4 получены ранее [7] и приведены для удобства сравнения.

рии десятикратных разведений сывороток мышей. В качестве вторичных антител использовали меченые пероксидазой хрена Goat anti mouse IgG (H+L) HRP («Invitrogen», США) в разведении 1 : 1200 (вносили по 100 мкл в лунку). В качестве цветного субстрата использовали раствор TMB («Биосервис», Россия), реакцию останавливали добавлением 1 N H_2SO_4. Поглощение при длине волны 450 нм измеряли на мультипланшетном ридере с LVF монохроматорами CLARIOstar («BMG Labtech», США).

Оценку активации клеточного иммунитета проводили по уровню синтеза цитокинов спленоцитами иммунизированных мышей методом мультиплексного иммунологического анализа. При этом использовали панель MILLIPLEX MAP Mouse Cytokine/Chemokine Magnetic Bead Panel («Merck-Millipore», США), основанную на измерении уровня 32 регуляторных, про- и противовоспалительных цитокинов, хемокинов и факторов роста (G-CSF, GM-CSF, IFN-γ, IL-1α, IL-1β, IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-9, IL-10, IL-12 (p40), IL-12 (p70), IL-13, IL-15, IL-17, IP-10, KC, LIF, LIX, MCP-1, M-CSF, MIG, MIP-1α, MIP-1β, MIP-2, RANTES, TNF-α, VEGF, эотаксин/CCL11). Все анализы проводили в соответствии с протоколом производителя, используя рекомендуемые разведения образцов и концентрации стандартной кривой. Измерения проводили на приборе MAGPIX с программным обеспечением xPONENT версии 4.2 («Luminex Corp.», США).

Спленоциты (макрофаги, дендритные клетки, Т- и В-лимфоциты) выделяли из селезёнки мышей через 2 недели после первого эксперимента по иммунизации. Эвтаназированных мышей обмывали 96%-ным спиртом, после чего в асептических условиях проводили вскрытие брюшной полости, извлекали селезёнки и помещали их в стерильную холодную среду DMEM («ПанЭко», Россия). Для выделения культуры спленоцитов использовали набор для разрушения тканей Tissue Grinder Homogenizer Kit («Sigma», США). Стерилизацию инструментов проводили путём промывания в 96%-ном спирте и прожигания в пламени спиртовки. Стерильно собирали инструмент для разрушения тканей, использовали сетки 100 mesh и 200 mesh («Sigma»). Селезёнки нарезали на фрагменты и протирали через сито в 9-см чашки Петри с ледяной средой DMEM, после чего суспензию переносили в стерильные центрифужные пробирки объёмом 15 мл. Суспензию центрифугировали при 200 *g* 15 мин, после чего супернатант удаляли. Клеточный осадок ресуспендировали в буфере для лизиса эритроцитов (150 мМ NH_4Cl, 10 мМ $KHCO_3$, 1 мМ EDTA, pH 7,0–7,6) и инкубировали 40 с в темноте во льду, после чего разбавляли ледяной средой DMEM и центрифугировали при 200 *g* 15 мин. Супернатант полностью удаляли, а белый клеточный осадок ресуспендировали в полной ростовой культуральной среде RPMI-1640, включающей 10% FBS («HyClone»), 2 мМ L-глутамина («ПанЭко»), антибиотик-антимикотик («Sigma»), 0,05 мМ 2-меркаптоэтанола («Sigma»), среду RPMI-1640 без глутамина («ПанЭко»). Затем проводили подсчёт клеток в суспензии с помощью камеры Горяева. Клеточную суспензию разводили до концентрации 5×10^6–10^7 кл./мл и вносили по 100 мкл в каждую лунку планшета. Клетки инкубировали в течение 1–1,5 ч в CO_2-инкубаторе, после чего вносили разведения антигенов и контролей. Планшет инкубировали в течение 18–24 ч в CO_2-инкубаторе, после чего переносили культуральную среду в микропробирки, замораживали при –80 °C и хранили до проведения анализа.

Анализ спленоцитов, полученных после первого эксперимента по иммунизации (белки 5–11 в табл. 1 с адъювантом 1), проводили одновременно с анализом спленоцитов, выделенных ранее после иммунизации белками 1–4 из табл. 1 с адъювантом 1 [7] (планшеты хранили при –80 °C до проведения анализа).

Реакция микронейтрализации. Для обнаружения нейтрализующих антител использовали реакцию микронейтрализации на основе TCID50 (Median Tissue Culture Infectious Dose) [8]. Сыворотки мышей, полученные после трёхкратной иммунизации с двухнедельными интервалами, прогревали 60 мин при 56 °C, чтобы избежать связанного с комплементом снижения вирусной активности. Затем готовили серию двукратных разведений сыворотки на среде MEM с добавлением 2% HI-FBS в объёме 60 мкл, начиная с 1 : 10 (в пересчёте на цельную сыворотку). Каждое разведение сыворотки смешивали в равном объёме (60 мкл) с живым вирусом SARS-CoV-2 (hCoV-19/Russia/StPetersburg-3524/2020 EPI_ISL_415710 GISAID), содержащим 25 TCID50/50 мкл, и инкубировали 1 ч при 37 °C. Затем 100 мкл разведений переносили в 96-луночные планшеты с монослоем клеток Vero (ATCC CCL-81). Планшеты инкубировали при 37 °C в атмосфере 5% CO_2 в течение 4 сут., после чего проверяли на наличие ЦПД (цитопатическое действие). Нейтрализацию регистрировали, если 100% клеток в лунке сохранялись без видимых бляшек или цитопатического эффекта. Нейтрализующий титр сыворотки выражали как значение, обратное самому высокому разведению сыворотки, в котором была показана нейтрализующая активность [9].

Эксперименты с использованием реакции микронейтрализации проводили дважды. В первой реакции микронейтрализации анализировали сыворотки, полученные в данной работе и ранее [7], после иммунизации белками Rop-D2-Rop-Tri-HBD, Rop-D3-Rop-Tri-HBD, Rop-D2-Rop-ALD-HBD, Rop-D3-Rop-ALD-HBD, Rop-D4-Rop-Tri-HBD, Rop-D4-Rop-ALD-HBD и Rop-D13-Rop-Tri-HBD с адъювантом 1, во второй реакции – сыворотки, полученные после иммунизации теми же белками, а также белками Rop-RBM-Rop-Tri-HBD и RBD («Mount Sinai») с адъювантом 2. Все эксперименты проводили в лаборатории BSL3.

Статистический анализ. Статистический анализ проводили с использованием программ пакета Statistica 12.0 («Statsoft», США). Нормальность распределения проверяли с помощью теста Колмогорова–Смирнова. Данные представляли как среднее ± стандартное отклонение (SD) или как среднее геометрическое ± стандартное геометрическое отклонение логарифма по основанию 2 титра сывороток антител. Статистическую значимость различий оценивали с помощью двухстороннего дисперсионного анализа (one-way ANOVA) с апостериорным анализом по Тьюки. Различия считали значимыми при $p < 0{,}05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

Дизайн рекомбинантных белков. На основе анализа структур Spike-белка коронавируса SARS-CoV-2 в комплексе с ACE-2 и нейтрализующими антителами в дополнение к ранее выбранным двум эпитопам Spike-белка вируса SARS-CoV-2 – D2 (470–490 а.о.) и D3 (453–494 а.о.) [7] – было выбрано ещё четыре поверхностных эпитопа: D4 (496–507 а.о.), D6 (144–153 а.о.), D8 (337–346 а.о.), D13 (414–425 а.о.) (рис. 1). Все детерминанты, за исключением D8, имеющей α-спиральную конформацию, имеют петлеобразную конформацию со сближенными *N*- и *C*-концами. Рекомбинантные белки, несущие эпитопы D4, D6, D8 и D13, организованы аналогично ранее полученным белкам с эпитопами D2 и D3 [7]. Для дополнительной фиксации *N*- и *C*-концов эпитопов и обеспечения их конформационной стабильности аминокислотная последовательность всех эпитопов фланкирована взаимодействующими между собой α-спиралями Rop-подобного белка из *M. capsulatus*. При этом петлеобразные детерминанты вставлены в поворот между спиралями непосредственно, а в случае эпитопа D8 – между эпитопом и α-спиралями Rop-подобного белка введены гибкие глицин-содержащие спейсеры. В качестве доменов, обеспечивающих мультимеризацию (в данном случае – тримеризацию) эпитопов, выбраны либо α-спираль, участвующая в тримеризации Spike-белка SARS-CoV-2 (Tri), либо альдолаза из *T. maritima* (ALD). Кроме того, в состав гибридных белков включен фрагмент гемагглютинина HBHA из *M. tuberculosis*, соответствующий гепарин-связывающему домену (HBD).

Молекулярные массы мономерных белков находятся в пределах 17–19 кДа для белков на основе тримеризатора из коронавируса и 35–39 кДа – для белков на основе альдолазы, что с учётом тримеризации должно быть достаточно для эффективной выработки антител.

В качестве одного из контрольных белков для исследования вируснейтрализующей активности сывороток на основе тех же белковых компонентов был сконструирован гибридный белок Rop-RBM-Rop-Tri-HBD, в котором в поворот между двумя спиралями Rop-подобного белка был вставлен фрагмент Spike-белка SARS-CoV-2 с 433 по 511 а.о., включающий последовательности детерминант D2, D3 и D4.

Получение и очистка рекомбинантных белков. Клонирование генов рекомбинантных белков проводили на основе ранее полученных конструкций [7], как описано в разделе «Материалы и методы». Все генно-инженерные конструкции обеспечивали высокий уровень экспрессии генов, за исключением гена белка Rop-D6-Rop-ALD-HBD, который по этой причине не использовали в работе. Белки на основе тримеризационного домена из коронавируса нарабатывались в виде телец включений, а белки на основе альдолазы синтезировались в растворимой форме. Соответственно, схемы выделения этих белков различались: белки с тримеризатором из SARS-CoV-2 выделяли в денатурирующих условиях в присутствии мочевины, а белки с альдолазой – в неденатурирующих условиях. При этом на первой стадии очистки для всех белков использовали хроматографию на сорбенте WorkBeads 40S, на второй – на гепарин-сефарозе, что обеспечивалось присутствием гепарин-связывающего домена в белках.

Молекулярные массы, вычисленные на основании аминокислотных последовательностей, и теоретические значения некоторых параметров рекомбинантных белков представлены в табл. 1 (в табл. 1 включены также данные для ранее полученных белков с эпитопами D2 и D3 [7] для удобства сравнения).

Электрофоретическое разделение очищенных белков показано на рис. 2. Различная

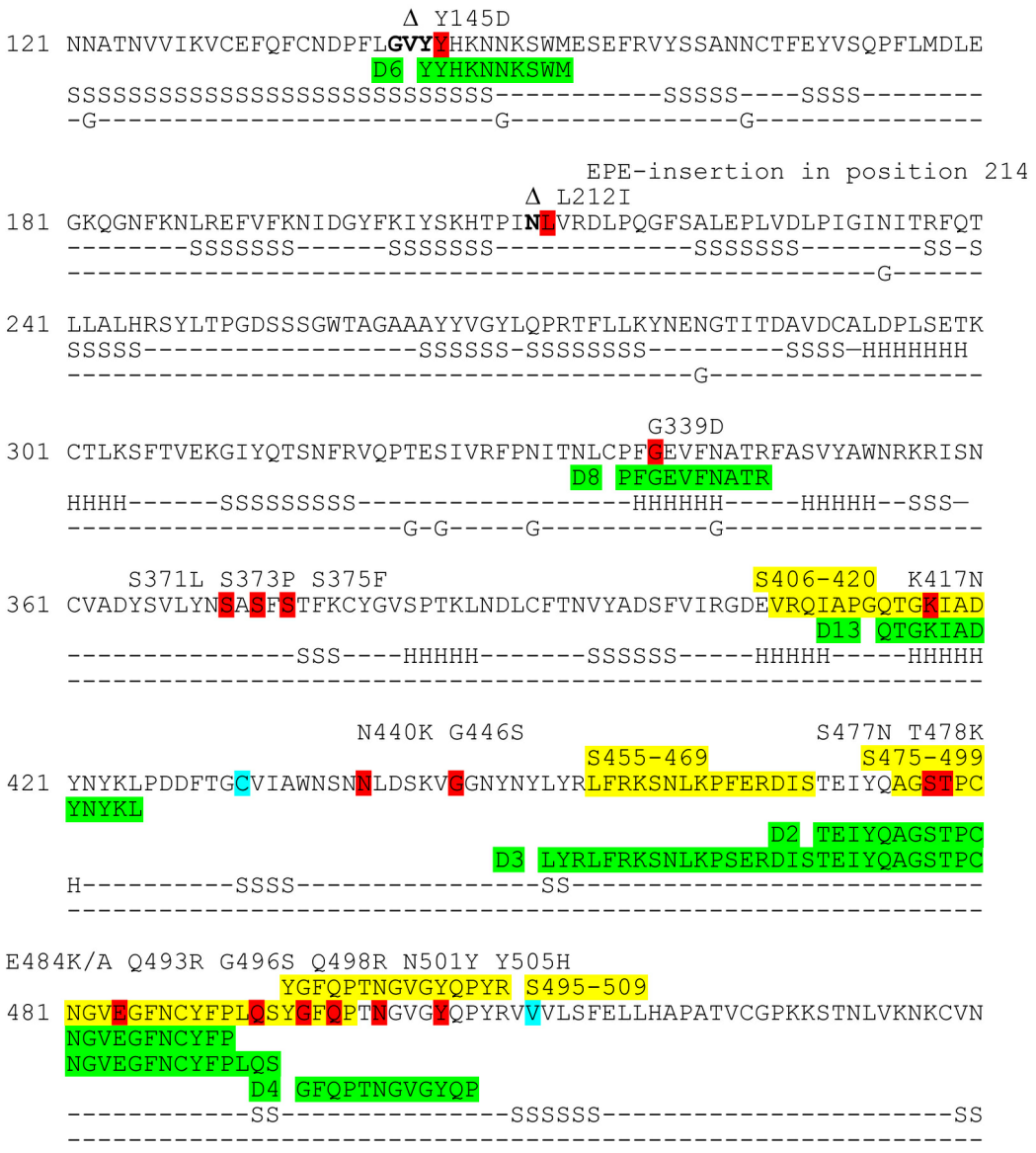


Рис. 1. Участок последовательности Spike-белка вируса SARS-CoV-2 и последовательности эпитопов, используемые в работе (выделены зелёным цветом). Жёлтым цветом выделены а.о., входящие в линейные эпитопы S406–420, S455–469, S475–499 и S495–509 (из статьи Lu et al. [5]), последовательности которых перекрываются с последовательностями исследуемых конформационных эпитопов. Красным цветом выделены вариабельные а.о. в различных вариантах SARS-CoV-2. Полужирным шрифтом и значком Δ выделены а.о., делетированные в Spike-белке варианта SARS-CoV-2 Омикрон (B.1.1.529). Бирюзовым цветом выделены начальный и концевой а.о. фрагмента, входящего в состав конструкции Rop-RBM-Rop-Tri-HBD. Элементы вторичной структуры (α-спиральные участки (H), β-тяжи (S)) и сайты гликозилирования (G) отмечены в строках ниже аминокислотной последовательности напротив соответствующих остатков в соответствии с данными из комплекса Spike-белка SARS-CoV-2 с нейтрализующим антителом (цепь A, PDB: 7C2L)

электрофоретическая подвижность белков с эпитопами D2 и D3, содержащими в аминокислотных последовательностях по два цистеина, в присутствии и при отсутствии восстанавливающего агента дитиотреитола (ДТТ), свидетельствует о том, что очищенные белки формируют дисульфидную связь. Наличие дисульфидной связи в белке, содержащем последовательность с детерминантами D2/D3, показано ранее масс-спектрометрическим анализом триптических пептидов [7].

Иммуногенные композиции, иммунизация мышей. На основе семи рекомбинантных белков с петлеобразными эпитопами (их характеристика приведена в строках 5–11 табл. 1) и адъюванта 1 были получены композиции для иммунизации мышей инбредной линии BALB/C. Наличие специфических иммуноглобулинов класса G

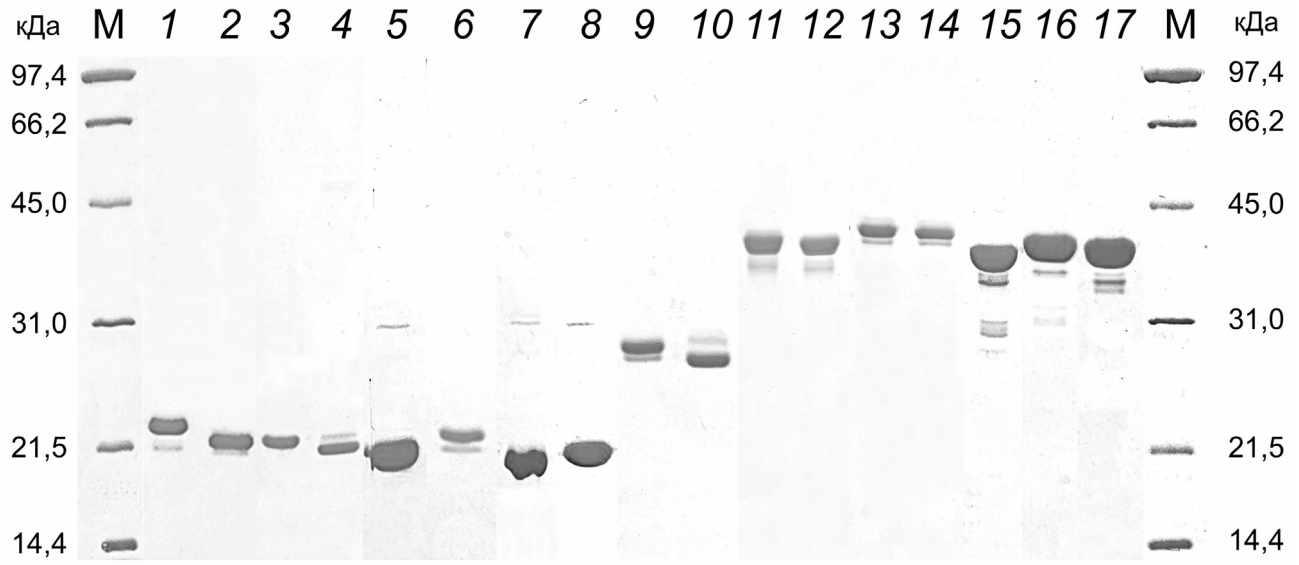


Рис. 2. Электрофореграммы разделения препаратов рекомбинантных белков в 12%-ном ПААГ. М – маркер молекулярной массы 14,4–97,4 кДа («Bio-Rad», США); *1* – белок Rop-D2-Rop-Tri-HBD в присутствии ДТТ; *2* – белок Rop-D2-Rop-Tri-HBD без ДТТ; *3* – белок Rop-D3-Rop-Tri-HBD в присутствии ДТТ; *4* – белок Rop-D3-Rop-Tri-HBD без ДТТ; *5* – белок Rop-D4-Rop-Tri-HBD; *6* – белок Rop-D8-Rop-Tri-HBD; *7* – белок Rop-D6-Rop-Tri-HBD; *8* – белок Rop-D13-Rop-Tri-HBD; *9* – белок Rop-RBM-Rop-Tri-HBD в присутствии ДТТ; *10* – белок Rop-RBM-Rop-Tri-HBD без ДТТ; *11* – белок Rop-D2-Rop-ALD-HBD в присутствии ДТТ; *12* – белок Rop-D2-Rop-ALD-HBD без ДТТ; *13* – белок Rop-D3-Rop-ALD-HBD в присутствии ДТТ; *14* – белок Rop-D3-Rop-ALD-HBD без ДТТ; *15* – белок Rop-D4-Rop-ALD-HBD; *16* – белок Rop-D8-Rop-ALD-HBD; *17* – белок Rop-D13-Rop-ALD-HBD

(IgG) в образцах сывороток мышей определяли через 2 недели после трёхкратной иммунизации с интервалом в 2 недели. В качестве антигенов использовали те же белки, которые применяли для иммунизации, вирус SARS-CoV-2, инактивированный формалином, и RBD Spike-белка вируса SARS-CoV-2. Результаты анализа, а также ранее полученные данные для белков, содержащих эпитопы D2 и D3, представлены в табл. 2. Все гибридные белки вызывали у мышей образование антител класса IgG, в высоком титре взаимодействующих с использованным для иммунизации антигеном. Белки, содержащие детерминанты D2 и D3, как было показано ранее [7], с достаточно высоким титром взаимодействовали также и с инактивированным вирусом, и с RBD. Также с RBD взаимодействовал белок Rop-D13-Rop-Tri-HBD. Наиболее иммуногенными являются все белки с альдолазным доменом и белки Rop-D13-Rop-Tri-HBD и Rop-D4-Rop-Tri-HBD. Наиболее выраженный ответ к RBD наблюдался в случае белка Rop-D3-Rop-ALD-HBD. Наиболее выраженный ответ к инактивированному вирусу SARS-CoV-2 наблюдался в группе животных, иммунизированных белком Rop-D2-Rop-ALD-HBD.

Исследование клеточного иммунитета. Исследование активации клеточного иммунитета проводили, измеряя уровень синтеза цитокинов спленоцитами иммунизированных мышей. При этом спленоциты (макрофаги, дендритные клетки, Т- и В-лимфоциты), выделенные из селезёнок мышей через 2 недели после трёхкратной (с двухнедельными перерывами) иммунизации с адъювантом 1, подвергали суточному воздействию теми же антигенами, после чего измеряли степень их ответа на стимуляцию путём определения уровней цитокинов, хемокинов и факторов роста в среде, где проходил этот процесс. Панель, используемая для оценки иммунного ответа, основана на измерении уровня 32 регуляторных, про- и противовоспалительных цитокинов, хемокинов и факторов роста. Результаты эксперимента представлены на рис. 3. Максимально выраженный уровень повышения цитокинов наблюдался в случае ответа на белок Rop-D3-Rop-ALD-HBD, несколько менее выраженный – в случае белков Rop-D2-Rop-Tri-HBD, Rop-D3-Rop-Tri-HBD, Rop-D2-Rop-ALD-HBD, Rop-D4-Rop-Tri-HBD, Rop-D4-Rop-ALD-HBD и Rop-D13-Rop-Tri-HBD.

Максимальный ответ на белок Rop-D3-Rop-ALD-HBD (рис. 3) совпадает с максимальным титром антител, специфичных к RBD Spike-белка SARS-CoV-2, характерным для данного белка (табл. 2).

Таким образом, максимально выраженный клеточный ответ вызывали гибридные белки Rop-D2-Rop-Tri-HBD, Rop-D3-Rop-Tri-HBD, Rop-D2-Rop-ALD-HBD, Rop-D3-Rop-ALD-HBD, Rop-D4-Rop-Tri-HBD, Rop-D4-Rop-ALD-HBD и Rop-D13-Rop-Tri-HBD. Далее интересно было выяснить, обладают ли антитела, образующиеся у мышей после иммунизации этими белками, вируснейтрализующей активностью.

Реакция микронейтрализации. Для обнаружения нейтрализующих антител проводили реакцию микронейтрализации на основе TCID50 с сыворотками иммунизированных мышей.

В первой реакции микронейтрализации анализировали сыворотки мышей, полученные после первого эксперимента по иммунизации (трёхкратная иммунизация с двухнедельными интервалами с адъювантом 1), а также сыворотки, полученные ранее при иммунизации белками с эпитопами D2 и D3 и адъювантом 1 [7]. Ни одна из сывороток в условиях реакции микронейтрализации (см. «Материалы и методы») не оказалась способной нейтрализовать вирус SARS-CoV-2.

Во второй реакции микронейтрализации анализировали сыворотки, полученные после второго эксперимента по иммунизации (трёхкратная иммунизация через 2 недели, но с использованием адъюванта 2). Помимо отобранных рекомбинантных белков, содержащих исследуемые эпитопы, для иммунизации также использовали ранее выделенные рекомбинантные белки с эпитопами D2 и D3 [7], полученный в данной работе белок Rop-RBM-Rop-Tri-HBD и коммерческий препарат RBD («Mount Sinai»). Данные по реакции микронейтрализации приведены в табл. 2. В результате модификации адъюванта в случае ряда разведений сывороток было показано отсутствие цитопатического действия на клетки живого вируса SARS-CoV-2 (hCoV-19/Russia/StPetersburg-3524/2020 EPI_ISL_415710 GISAID), это свидетельствует о том, что в ответ на иммунизацию гибридными белками, содержащими небольшие антигенные детерминанты Spike-белка SARS-CoV-2, образуются специфические антитела, способные нейтрализовать клинический изолят вируса. Максимальные значения среднего геометрического титра (СГТ) продемонстрировали сыворотки, полученные при иммунизации белками Rop-D13-Rop-Tri-HBD (6,7), Rop-D2-Rop-Tri-HBD (7,4), Rop-D4-Rop-Tri-HBD (8,2). Сыворотки, полученные при иммунизации контроль-

Таблица 2. Титры сывороточных антител, определённых методом иммуноферментного анализа к различным антигенам в сыворотках мышей после трёхкратной иммунизации, а также в экспериментах по вируснейтрализации

Группа мышей	Белок	Антиген, использованный при иммунизации	Инактивированный формалином SARS-CoV-2	RBD	СГТ в реакции микронейтрализации (разброс значений)
1	физиологический раствор	< 7,0 ± 1,00	< 7,0 ± 1,00	< 7,0 ± 1,00	5,0
2	Rop-D2-Rop-Tri-HBD	14,21 ± 1,04	8,64 ± 1,00	10,73 ± 1,12	7,4 (5; 10)
3	Rop-D3-Rop-Tri-HBD	13,48 ± 1,19	9,67 ± 1,18	11,44 ± 1,19	5,0
4	Rop-D4-Rop-Tri-HBD	> 15,64 ± 1,00	< 7,0 ± 1,00	< 7,0 ± 1,00	8,2 (5; 20)
5	Rop-D6-Rop-Tri-HBD	10,57 ± 1,40	< 7,0 ± 1,00	< 7,0 ± 1,00	–
6	Rop-D8-Rop-Tri-HBD	8,64 ± 1,32	< 7,0 ± 1,00	< 7,0 ± 1,00	–
7	Rop-D13-Rop-Tri-HBD	> 15,64 ± 1,00	< 7,0 ± 1,00	10,12 ± 1,16	6,7 (5; 10)
8	Rop-D2-Rop-ALD-HBD	> 15,64 ± 1,00	9,88 ± 1,12	11,36 ± 1,17	5,5 (5; 10)
9	Rop-D3-Rop-ALD-HBD	> 15,64 ± 1,00	9,75 ± 1,10	12,61 ± 1,08	5,5 (5; 10)
10	Rop-D4-Rop-ALD-HBD	> 5,64 ± 1,00	< 7,0 ± 1,00	< 7,0 ± 1,00	5,5 (5; 10)
11	Rop-D8-Rop-ALD-HBD	> 15,64 ± 1,00	< 7,0 ± 1,00	< 7,0 ± 1,00	–
12	Rop-D13-Rop-ALD-HBD	> 15,64 ± 1,00	< 7,0 ± 1,00	< 7,0 ± 1,00	–
13	Rop-RBM-Rop-Tri-HBD	–	–	–	11,0 (5; 20)
14	RBD	–	–	–	44,2 (20; 320)

Примечание. Данные по ИФА представлены в виде среднего геометрического титра для группы ($\log_2$) ± стандартное геометрическое отклонение, данные по вируснейтрализации – в виде среднего геометрического титра и разброса значений титров сывороток; данные по ИФА для белков Rop-D2-Rop-Tri-HBD, Rop-D3-Rop-Tri-HBD, Rop-D2-Rop-ALD-HBD и Rop-D3-Rop-ALD-HBD получены ранее [7] и приведены для удобства сравнения. Прочерк означает, что данный белок в соответствующем эксперименте не использовали. СГТ – средний геометрический титр.

Цитокин/ хемокин/ фактор роста	Rop-D2-Rop-Tri-HBD	Rop-D3-Rop-Tri-HBD	Rop-D2-Rop-ALD-HBD	Rop-D3-Rop-ALD-HBD	Rop-D4-Rop-Tri-HBD	Rop-D8-Rop-Tri-HBD	Rop-D4-Rop-ALD-HBD	Rop-D8-Rop-ALD-HBD	Rop-D13-Rop-ALD-HBD	Rop-D13-Rop-Tri-HBD
G-CSF	0,9	0,6	0,9	2,1	0,6	0,4	0,3	0,1	0,1	0,3
Эотаксин	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
GM-CSF	2,0	0,6	1,2	12,9	1,1	0,3	0,4	0,3	0,3	2,1
IFN-γ	3,8*	0,1	0,6	26,0*	0,2	0,0	0,1	0,0	0,0	0,2
IL-1α	1,3	1,0	1,1	2,3	1,0	0,4	0,7	0,5	0,4	1,0
IL-1β	1,8*	0,8	1,5	3,6	0,9	0,6	0,6	0,4	0,4	1,5
IL-2	3,8*	2,7	3,2*	9,1*	9,9*	0,9	4,2*	0,7	1,9	10,6*
IL-4	5,7*	0,0	4,6*	7,4*	6,6*	0,0	2,9*	0,0	2,3*	6,1*
IL-3	3,2*	0,0	1,4	6,4*	9,1*	0,9	2,8	0,0	2,0	6,3
IL-5	0,0	0,0	8,1*	18,0*	11,4*	0,0	0,0	0,0	0,0	7,6
IL-6	2,1*	1,1	1,5	6,5*	1,6	0,3	0,6	0,3	0,3	1,1
IL-7	0,0	0,0	0,0	1,4	0,0	0,0	0,0	1,4	0,0	0,0
IL-9	1,0	1,3	1,3	2,3*	1,3	0,4	1,3	1,6	1,0	1,0
IL-10	2,9*	1,6*	3,2*	7,6*	4,1*	1,0	2,8*	1,3	1,2	0,8
IL-12 (p40)	2,0	0,0	2,0	3,6*	2,0	0,0	2,8	2,0	0,0	2,0
IL-12 (p70)	6,2	6,2	11,7*	26,7*	11,7*	0,0	0,0	6,2*	0,0	0,0
LIF	1,4	1,0	1,2	9,9*	3,1*	0,0	2,8	1,7	0,6	2,1
IL-13	1,4	0,8	1,0	3,4	1,0	0,0	1,0	0,5	0,0	1,0
LIX	0,8	0,0	1,5	12,8*	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
IL-15	3,2	0,0	0,0	3,2	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
IL-17	2,6*	0,8	1,2	22,7*	2,5	0,6	0,6	0,2	0,2	3,8
IP-10	3,2*	0,3	2,2	7,0	0,8	0,2	0,4	0,1	0,1	0,3
KC	0,4	0,2	0,3	0,6	0,2	0,2	0,1	0,1	0,1	0,1
MCP-1	1,5*	1,5*	3,7*	3,9*	2,4*	1,0	1,7*	1,4	1,0	1,4
MIP-1α	1,4	0,6	0,7	2,9	0,8	0,4	0,3	0,1	0,1	0,7
MIP-1β	1,7*	0,9	1,2	2,7*	1,3	0,7	0,7	0,2	0,4	1,3
M-CSF	0,8	0,6	0,8	1,6	0,8	0,6	0,8	0,8	0,6	0,8
MIP-2	2,1*	1,4	2,1	2,3*	0,8	0,6	0,6	0,3	0,3	0,6
MIG	1,3	0,4	1,4	2,0	0,5	0,2	0,4	0,4	0,4	0,7
RANTES	1,8*	1,1	1,2	3,3*	1,0	0,6	0,6	0,4	0,6	0,5
VEGF	2,1*	2,0*	3,3*	3,9*	2,2*	1,2	1,8*	1,6	1,4*	1,4*
TNF-α	8,1*	3,7*	2,7*	2,8*	2,1*	1,3	1,4	0,8	0,7	0,7

Кратность выделена:

0–1	1–2	2–3	3–10	>10

Рис. 3. Кратные различия в медианных уровнях цитокинов/хемокинов/факторов роста у мышей, иммунизированных различными антигенами, по сравнению с контрольной группой. * Статистически значимые отличия от контрольной группы ($p < 0,05$) по критерию Тьюки

ным белком Rop-RBM-Rop-Tri-HBD и рекомбинантным RBD («Mount Sinai»), показали СГТ на уровне 11,0 и 44,2 (табл. 2).

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

В данной работе мы существенно расширили список исследуемых поверхностных эпитопов Spike-белка SARS-CoV-2: к исследованным ранее эпитопам D2 (470–490 а.о.) и D3 (453–494 а.о.) [7] добавилось ещё четыре эпитопа: D4 (496–507 а.о.), D6 (144–153 а.о.), D8 (337–346 а.о.) и D13 (414–425 а.о.) (рис. 1).

Важным обстоятельством при выборе эпитопов было то, что их последовательности должны включать а.о. Spike-белка, взаимодействующие с ACE2 и вируснейтрализующими антителами. В связывании RBD с рецептором ACE2 участвуют а.о. в следующих положениях: 417, 446, 449, 453, 455, 456, 475, 486, 487, 489, 493, 496, 498, 500, 504, 502 и 505 [10]. Большинство этих а.о. входит в состав выбранных эпитопов D2, D3, D4, D8 и D13. Ряд описанных в литературе нейтрализующих антител связывается с эпитопами в RBD, перекрывающимися с эпитопами, анализируемыми в наших работах: P2B-2F6 [11], BD23 [12], COVA2-39 [13], REGN10933 и REGN10987 [14], LY-CoV555 [15].

N-концевой домен S1-субъединицы Spike-белка (NTD) ограничен 20–286 а.о. Выделено несколько нейтрализующих антител, связывающихся с эпитопами в этом участке: 4A8 [16], COV2-2676 и COV2-2489 [17], S2L28, S2M28 и S2X333 [18]. Так что создание конструкций с эпитопами, соответствующими районам NTD (D6), также представляется перспективным.

Все эпитопы, за исключением D8, представляющего собой α-спираль, в структуре Spike-белка SARS-CoV-2 имеют петлеобразную конформацию со сближенными *N*- и *C*-концами. Конформацию выбранных эпитопов фиксировали с помощью встраивания в место поворота между двумя взаимодействующими друг с другом α-спиралями Rop-подобного белка из *M. capsulatus*. К такой конструкции на *C*-конец присоединяли тримеризующий модуль, представляющий собой либо альдолазу из *T. maritima*, либо тримеризующую α-спираль из Spike-белка SARS-CoV-2. На *C*-конец конструкции с тримеризующим модулем помещали фрагмент гемагглютинина из *M. tuberculosis* для облегчения очистки гибридных белков с помощью хроматографии на гепарин-сефарозе.

Интересно отметить, что, несмотря на то что абсолютно все полученные гибридные белки вызывали у мышей образование антител класса IgG, в высоком титре взаимодействующих с использованным для иммунизации антигеном, лишь белки, содержащие эпитопы D2 и D3, в достаточно высоком титре взаимодействовали также и с инактивированным вирусом. С RBD Spike-белка SARS-CoV-2, синтезированным в клетках прокариот, помимо белков с D2 и D3, взаимодействовал также белок Rop-D13-Rop-Tri-HBD. Те же белки, а также белки Rop-D4-Rop-ALD-HBD и Rop-D4-Rop-Tri-HBD вызывали максимально выраженное повышение уровня цитокинов в исследовании активации клеточного иммунитета. При рассмотрении профиля повышенных в результате стимуляции спленоцитов антигеном Rop-D3-Rop-ALD-HBD (и в меньшей степени другими белками) уровней цитокинов наблюдается развитие реакций врождённого иммунного ответа с потенциальной дифференцировкой В-клеток. Также можно отметить вовлечение самых ранних признаков развития и других звеньев адаптивного иммунного ответа на антиген, причём отмечается присутствие признаков дифференцировки Т-клеток в Th1 (IFN-γ), а также присутствие компонентов Th2 и Th17 (IL-4, IL-5 и IL-17). Наличие регуляторных цитокинов – стимулирующих (IL-1 и IL-12) и супрессирующих (IL-10) молекул – характеризует полноценность вызванного антигенами иммунного ответа. Тем не менее, несмотря на выраженный иммунный ответ, исследование вируснейтрализующей активности сывороток, полученных при иммунизации мышей с адъювантом 1, в реакции микронейтрализации показало отрицательный результат.

Известно, что выбор оптимального адъюванта может иметь решающее значение для формирования иммунного ответа с образованием протективных антител при формулировании вакцины для определённого патогена [19]. Имеются данные о том, что агонисты Toll-подобных рецепторов (TLR) могут функционировать в качестве компонентов адъюванта для повышения эффективности инактивированной ультрафиолетом вакцины против SARS-CoV [20] или вакцинной композиции на основе рекомбинантного белка, содержащего эктодомен Spike-белка SARS-CoV [6]. При этом иммунизация мышей эктодоменом Spike-белка SARS-CoV с наночастицами из золота в качестве адъюванта не приводила к получению протективных антител [6]. Учитывая вышесказанное, мы модифицировали адъювант для иммунизации – ввели в него вместо монтанида ISA 201 и ретинола пальмитата агонисты TLR – LPS из *E. coli* O55:B5 и CpG-олигодезоксинуклеотиды (ODN 1826). ДЭАЭ-декстран 500, являющийся компонентом обоих

адъювантов, в случае второго варианта адъюванта способствует также удержанию в месте введения (депонированию) CpG-олигонуклеотидов. При иммунизации мышей гибридными белками со вторым вариантом адъюванта удалось получить сыворотки, некоторые из которых продемонстрировали значимый уровень нейтрализации клинического изолята вируса SARS-CoV-2 в реакции микронейтрализации (табл. 2). При этом наиболее выраженную нейтрализующую активность продемонстрировали сыворотки, полученные при иммунизации гибридными белками Rop-D13-Rop-Tri-HBD, Rop-D2-Rop-Tri-HBD и Rop-D4-Rop-Tri-HBD. Интересно отметить, что все гибридные белки, вызывающие образование нейтрализующих антител, получены с использованием сравнительно небольшого тримеризационного домена из Spike-белка коронавируса, а не достаточно крупного альдолазного домена, что позволяет отдать предпочтение менее высокомолекулярным белковым носителям, смещающим соотношение в сторону преобладания антигенной части белка. Возможно, положительную роль также играет то, что используемый тримеризационный домен происходит из Spike-белка.

Гибридные белки, приводящие к максимально выраженному иммунному ответу с образованием нейтрализующих антител, содержат короткие петлеобразные эпитопы D2 и D4, расположенные в пределах RBM, или в области RBD, предшествующей RBM (D13). Эти эпитопы в значительной степени перекрываются с линейными эпитопами S406–420, S475–499 и S495–509 из статьи Lu et al. [5] (рис. 1). По данным, представленным в этой статье, все эти линейные эпитопы являются вируснейтрализующими в отношении варианта G614 вируса SARS-CoV-2 [5]. Это хорошо соответствует нашим результатам по вируснейтрализации клинического изолята вируса hCoV-19/Russia/StPetersburg-3524/2020 EPI_ISL_415710 GISAID, также несущего замену D614G. При этом максимальную способность к образованию нейтрализующих антител, приближающуюся по значению СГТ к белку с целым RBM, продемонстрировал белок, несущий короткий петлеобразный эпитоп D4.

Все выбранные нами эпитопы несут а.о., мутировавшие в Spike-белке варианта SARS-CoV-2 Омикрон (B.1.1.529), вызвавшего максимальную волну заболеваемости COVID-19 по сравнению с предыдущими [21]. При этом наибольшее количество вариабельных а.о. сосредоточено именно в области эпитопов, демонстрирующих максимальный уровень вируснейтрализации по нашим данным (рис. 1). Это неудивительно, поскольку все выбранные нами детерминанты расположены на поверхности Spike-белка, а тот участок RBD, в пределах которого расположены вируснейтрализующие эпитопы, непосредственно вовлечён во взаимодействие с ACE2. Высокая «кучность» вариабельных участков в области нейтрализующих эпитопов позволит на основе уже имеющихся конструкций быстро получать измененные варианты последовательностей и корректировать нейтрализующий ответ, направленный на соответствующий мутантный вариант коронавируса. Возможно, имеет смысл расширить границы эпитопов и использовать для разработки эпитопной вакцины весь участок RBM, несущий максимальное число вариабельных а.о. Это оправдано, поскольку в области RBM отсутствуют сайты гликозилирования, рекомбинантный белок с RBM эффективно нарабатывается в *E. coli*, демонстрирует высокую степень очистки, подвергается правильному рефолдингу с образованием дисульфидной связи и имеет максимальный уровень СГТ в реакции микронейтрализации из всех гибридных белков, полученных микробиологическим синтезом.

Следует отметить, что, несмотря на положительный результат, показанный в реакции микронейтрализации, демонстрирующий принципиальную возможность образования измеримых количеств нейтрализующих антител при иммунизации рекомбинантными белками с небольшими петлеобразными эпитопами RBD Spike-белка вируса SARS-CoV-2, полученные значения СГТ сывороток невелики по сравнению с полноразмерным RBD, синтезированным в клетках эукариот. Это определяет необходимость дальнейшей работы по созданию эпитопных вакцин для профилактики коронавирусной инфекции, которая возможна по следующим направлениям: 1) поиск новых перспективных вируснейтрализующих эпитопов в составе белков SARS-CoV-2, например, на основе использования экспериментальных данных по характеристике линейных эпитопов, хорошо коррелирующих с данными по конформационным эпитопам; 2) комбинированное использование нескольких гибридных белков для иммунизации с варьированием дозы антигенов; 3) укрупнение петлеобразных эпитопов, одним из которых может быть RBM; 4) оптимизация платформы для мультимеризации эпитопов.

Поскольку одним из наиболее значимых результатов работы является подбор адъюванта, способствующего формированию вируснейтрализующих антител даже при использовании в качестве антигенов рекомбинантных белков с очень короткими участками последовательнос-

ти Spike-белка вируса SARS-CoV-2, было бы интересно охарактеризовать иммуногенность белков, вызывающих образование нейтрализующих антител, способность получаемых при иммунизации ими сывороток связываться с RBD Spike-белка SARS-CoV-2 и инактивированным вирусом, а также оценить влияние иммунизации этими белками на клеточный иммунитет, чтобы иметь возможность предсказывать нейтрализующую активность белков на основании более простых экспериментов без использования живого вируса. Это также может быть одним из направлений дальнейших исследований.

Таким образом, в результате проведённой работы получены гибридные рекомбинантные белки, включающие небольшие петлеобразные конформационные эпитопы из RBD и *N*-концевого домена Spike-белка вируса SARS-CoV-2. Показана высокая иммуногенность полученных белков. Для ряда белков, содержащих эпитопы из RBD Spike-белка вируса SARS-CoV-2, продемонстрирована способность сывороток, полученных при иммунизации данными белками, в высоком титре связываться с RBD, синтезированным в клетках эукариот, и с инактивированным вирусом SARS-CoV-2. Исследована активация клеточного иммунитета при иммунизации рекомбинантными белками по уровню синтеза цитокинов спленоцитами иммунизированных мышей. После модификации адъюванта, заключающейся во введении в него агонистов TLR – LPS и CpG-олигонуклеотидов – для ряда белков показана нейтрализующая активность сывороток в реакции микронейтрализации в отношении живого вируса SARS-CoV-2.

Финансирование. Исследование выполнено при поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (проект № 20-04-60373\20). Получение белка Rop-RBM-Rop-Tri-HBD и исследование его способности вызывать образование вируснейтрализующих антител было проведено в рамках государственного задания Министерства здравоохранения Российской Федерации № 056-00119-21-00 («Разработка препарата блокатора рецептора ACE2 для профилактики и терапии коронавирусной инфекции»).

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

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

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Burton, D. R. (2002) Antibodies, viruses and vaccines, *Nat. Rev. Immunol.*, **9**, 706-713, doi: 10.1038/nri891.
2. Neu, K. E., Henry Dunand, C. J., and Wilson, P. C. (2016) Heads, stalks and everything else: how can antibodies eradicate influenza as a human disease? *Curr. Opin. Immunol.*, **42**, 48-55, doi: 10.1016/j.coi.2016.05.012.
3. Sok, D., and Burton, D. R. (2018) Recent progress in broadly neutralizing antibodies to HIV, *Nat. Immunol.*, **19**, 1179-1188, doi: 10.1038/s41590-018-0235-7.
4. Dejnirattisai, W., Supasa, P., Wongwiwat, W., Rouvinski, A., Barba-Spaeth, G., et al. (2016) Dengue virus sero-cross-reactivity drives antibody-dependent enhancement of infection with zika virus, *Nat. Immunol.*, **17**, 1102-1108, doi: 10.1038/ni.3515.
5. Lu, S., Xie, X. X., Zhao, L., Wang, B., Zhu, J., et al. (2021) The immunodominant and neutralization linear epitopes for SARS-CoV-2, *Cell Rep.*, **34**, 108666, doi: 10.1016/j.celrep.2020.108666.
6. Sekimukai, H., Iwata-Yoshikawa, N., Fukushi, S., Tani, H., Kataoka, M., et al. (2020) Gold nanoparticle-adjuvanted S protein induces a strong antigen-specific IgG response against severe acute respiratory syndrome-related coronavirus infection, but fails to induce protective antibodies and limit eosinophilic infiltration in lungs, *Microbiol. Immunol.*, **64**, 33-51, doi: 10.1111/1348-0421.12754.
7. Karyagina, A. S., Gromov, A. V., Grunina, A. M., Lyaschuk, A. M., Grishin, A. V., et al. (2021) Development of a platform for producing recombinant protein components of epitope vaccines for the prevention of COVID-19, *Biochemistry (Moscow)*, **86**, 1275-1287, doi: 10.1134/S0006297921100096.
8. Manenti, A., Maggetti, M., Casa, E., Martinuzzi, D., Torelli, A., et al. (2020) Evaluation of SARS-CoV-2 neutralizing antibodies using a CPE-based colorimetric live virus micro-neutralization assay in human serum samples, *J. Med. Virol.*, **92**, 2096-2104, doi: 10.1002/jmv.25986.
9. Barchuk, A., Shirokov, D., Sergeeva, M., Tursun Zade, R., Dudkina, O., et al. (2021) Evaluation of the performance of SARS-CoV-2 antibody assays for a longitudinal population-based study of COVID-19 spread in St. Petersburg, Russia, *J. Med. Virol.*, **93**, 5846-5852, doi: 10.1002/jmv.27126.
10. Lan, J., Ge, J., Yu, J., Shan, S., Zhou, H., et al. (2020) Structure of the SARS-CoV-2 spike receptor-binding domain bound to the ACE2 receptor, *Nature*, **581**, 215-220, doi: 10.1038/s41586-020-2180-5.
11. Ju, B., Zhang, Q., Ge, J., Wang, R., Sun, J., et al. (2020) Human neutralizing antibodies elicited by SARS-CoV-2 infection, *Nature*, **584**, 115-119, doi: 10.1038/s41586-020-2380-z.
12. Cao, Y., Su, B., Guo, X., Sun, W., Deng, Y., et al. (2020) Potent neutralizing antibodies against SARS-CoV-2 identified by high-throughput single-cell sequencing of convalescent patients' B cells, *Cell*, **182**, 73-84.e16, doi: 10.1016/j.cell.2020.05.025.
13. Brouwer, P., Caniels, T. G., van der Straten, K., Snitselaar, J. L., Aldon, Y., et al. (2020) Potent neutralizing antibodies from COVID-19 patients define multiple targets of vulnerability, *Science*, **369**, 643-650, doi: 10.1126/science.abc5902.
14. Hansen, J., Baum, A., Pascal, K. E., Russo, V., Giordano, S., et al. (2020) Studies in humanized mice and

convalescent humans yield a SARS-CoV-2 antibody cocktail, *Science*, **369**, 1010-1014, doi: 10.1126/science.abd0827.
15. Jones, B. E., Brown-Augsburger, P. L., Corbett, K. S., Westendorf, K., Davies, J., et al. (2021) The neutralizing antibody, LY-CoV555, protects against SARS-CoV-2 infection in nonhuman primates, *Sci. Transl. Med.*, **13**, eabf1906, doi: 10.1126/scitranslmed.abf1906.
16. Chi, X., Yan, R., Zhang, J., Zhang, G., Zhang, Y., et al. (2020) A neutralizing human antibody binds to the N-terminal domain of the Spike protein of SARS-CoV-2, *Science*, **369**, 650-655, doi: 10.1126/science.abc6952.
17. Suryadevara, N., Shrihari, S., Gilchuk, P., VanBlargan, L. A., Binshtein, E., et al. (2021) Neutralizing and protective human monoclonal antibodies recognizing the N-terminal domain of the SARS-CoV-2 spike protein, *Cell*, **184**, 2316-2331.e15, doi: 10.1016/j.cell.2021.03.029.
18. McCallum, M., De Marco, A., Lempp, F. A., Tortorici, M. A., Pinto, D., et al. (2021) *N*-terminal domain antigenic mapping reveals a site of vulnerability for SARS-CoV-2, *Cell*, **184**, 2332-2347.e16, doi: 10.1016/j.cell.2021.03.028.
19. Sarkar, I., Garg, R., and van Drunen Littel-van den Hurk, S. (2019) Selection of adjuvants for vaccines targeting specific pathogens, *Expert Rev. Vaccines*, **18**, 505-521, doi: 10.1080/14760584.2019.1604231.
20. Iwata-Yoshikawa, N., Uda, A., Suzuki, T., Tsunetsugu-Yokota, Y., Sato, Y., et al. (2014) Effects of Toll-like receptor stimulation on eosinophilic infiltration in lungs of BALB/c mice immunized with UV-inactivated severe acute respiratory syndrome-related coronavirus vaccine, *J. Virol.*, **88**, 8597-8614, doi: 10.1128/JVI.00983-14.
21. He, X., Hong, W., Pan, X., Lu, G., and Wei, X. (2021) SARS-CoV-2 Omicron variant: Characteristics and prevention, *MedComm*, **2**, 838-845, doi: 10.1002/mco2.110.

HYBRID PROTEINS WITH SHORT CONFORMATIONAL EPITOPES OF THE RECEPTOR-BINDING DOMAIN OF THE SARS-CoV-2 SPIKE PROTEIN PROMOTE THE PRODUCTION OF VIRUS-NEUTRALIZING ANTIBODIES DURING IMMUNIZATION

A. S. Karyagina[1,2,3]*, A. V. Gromov[1], T. M. Grunina[1,2], A. M. Lyaschuk[1], M. S. Poponova[1], D. A. Kleymenov[1], N. V. Strukova[1], M. S. Generalova[1], A. V. Ryazanova[1], Z. M. Galushkina[1], O. Yu. Dobrynina[1], T. N. Bolshakova[1], M. V. Sergeeva[4], E. A. Romanovskaya-Romanko[4], I. V. Krasilnikov[5], M. E. Subbotina[1,2]*, and V. G. Lunin[1,2]

[1] *Gamaleya National Research Center of Epidemiology and Microbiology, Ministry of Healthcare of the Russian Federation, 123098 Moscow, Russia; e-mail: akaryagina@gmail.com; e-mail: subbotinam@gmail.com*

[2] *All-Russia Research Institute of Agricultural Biotechnology, 127550 Moscow, Russia*

[3] *Belozersky Institute of Physico-Chemical Biology, Lomonosov Moscow State University, 119992 Moscow, Russia*

[4] *Institute of Influenza, Ministry of Healthcare of the Russian Federation, 197376 St. Petersburg, Russia*

[5] *Saint Petersburg Institute of Vaccines and Sera, FMBA, 198320 St. Petersburg, Russia*

Based on the previously proposed approach, hybrid recombinant proteins, potential components of epitope vaccines containing short conformational epitopes of the receptor-binding domain of the Spike protein of the SARS-CoV-2 virus, were obtained by synthesis in *Escherichia coli* cells (144-153, 337-346, 414-425, 496-507 a.a.), which implement a large number of protein-protein interactions in complexes with neutralizing antibodies and ACE2 (angiotensin-converting enzyme 2). The obtained proteins were used for immunization of mice three times with an interval of 2 weeks, and the immunogenicity of protein antigens and the ability of sera to interact with the inactivated SARS-CoV-2 virus and with the RBD of the Spike protein obtained in a eukaryotic producer were studied. All recombinant proteins showed high immunogenicity. The highest titer upon binding to the RBD of the Spike protein was demonstrated by the serum obtained by immunization with a protein based on epitope 414-425. At the same time, the serum titers upon binding to the inactivated virus and RBD in the case of other proteins turned out to be significantly lower than the titers for the previously obtained four proteins based on loop-like epitopes 452-494 and 470-491, the conformation of which was additionally fixed by a disulfide bond. For all proteins obtained earlier and in this work, we studied the activation of cellular immunity, which was detected by the level of cytokine synthesis by splenocytes of immunized mice. The most pronounced level of increased cytokine synthesis was observed in the case of a response to proteins, including epitopes with disulfide bonds (452-494, 470-491), as well as epitopes 414-425 and 496-507. After optimization of the adjuvant for some recombinant proteins with short conformational epitopes of the RBD of the Spike protein, mouse sera were obtained showing a virus-neutralizing effect in the microneutralization reaction with live virus SARS-CoV-2 (hCoV-19/Russia/StPetersburg-3524/2020 EPI_ISL_415710 GISAID). The results obtained can be used to develop epitope vaccines for the prevention of COVID-19 and other viral infections.

Keywords: SARS-CoV-2, Spike protein, RBD, RBM, epitope vaccine, epitope, aldolase

EDN: MIVEVI
БИОХИМИЯ, 2022, том 87, вып. 3, с. 321 – 336

УДК 577.29

ИЗУЧЕНИЕ ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ ДНК-ЗАВИСИМЫХ БЕЛКОВ СЕМЕЙСТВА PARP С НУКЛЕОСОМНЫМИ ЧАСТИЦАМИ, СОДЕРЖАЩИМИ ИНТЕРМЕДИАТЫ НАЧАЛЬНЫХ СТАДИЙ ПРОЦЕССА BER

© 2022 А.А. Украинцев[1#], Е.А. Белоусова[1#], М.М. Кутузов[1], О.И. Лаврик[1,2*]

[1] *Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН, 630090 Новосибирск, Россия; электронная почта: lavrik@niboch.nsc.ru*

[2] *Новосибирский государственный университет, 630090 Новосибирск, Россия*

Поступила в редакцию 05.10.2021
После доработки 20.01.2022
Принята к публикации 22.02.2022

Клеточным сигналом в ответ на повреждение ДНК является реакция (ADP-рибозил)ирования, катализируемая ДНК-зависимыми белками семейства поли(ADP-рибозо)полимераз (PARP) – PARP1, PARP2 и PARP3. Эти белки являются участниками процесса эксцизионной репарации оснований (BER). Несмотря на обширные исследования, остаётся неизвестным, каким образом PARP участвуют в регуляции процесса BER и как распределяются роли между ДНК-зависимыми членами семейства. В настоящей работе мы исследовали взаимодействие ДНК-зависимых белков семейства PARP с нуклеосомными частицами, содержащими в своем составе ДНК-интермедиаты начальных стадий процесса BER. Для этого были реконструированы нуклеосомы на основе последовательности ДНК Widom «Clone 603», содержащие повреждение вблизи одного из тупых концов ДНК-дуплекса. Были определены константы диссоциации комплексов PARP с нуклеосомами, ДНК которых содержали урацил (Native), апуриновый/апиримидиновый сайт (AP-сайт) или однонуклеотидную брешь с 5′-dRp-фрагментом (Gap). Показано, что сродство белков к нуклеосоме увеличивается в ряду PARP3 << PARP2 < PARP1, а сродство каждого белка к определённому типу повреждений увеличивается в ряду Native = AP-сайт < Gap для PARP1 и PARP2 и Gap <<< Native = AP-сайт – для PARP3. Также были определены области взаимодействия белков PARP с нуклеосомой методами боргидридной сшивки и футпринтинга. На основании полученных и литературных данных обсуждены закономерности вовлечения PARP1, PARP2 и PARP3 во взаимодействие с нуклеосомными частицами, содержащими ДНК-интермедиаты процесса BER.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: нуклеосома, PARP1, PARP2, PARP3, BER.

DOI: 10.31857/S0320972522030022

ВВЕДЕНИЕ

BER (base excision repair) – система эксцизионной репарации оснований ДНК, действие которой направлено на удаление небольших повреждений, возникающих в процессе нормальной жизнедеятельности клетки и не вызывающих значительных искажений структуры двойной спирали ДНК. К таким повреждениям относятся апуриновые/апиримидиновые сайты (AP-сайты), алкилированные или окисленные азотистые основания [1–3]. Процесс BER проходит в несколько этапов и требует активности целого ряда ферментов и белковых факторов. На первом этапе происходит распознавание повреждённого азотистого основания с последующим его удалением; на втором этапе происходит гидролиз сахарно-фосфатного остова по остатку AP-сайта; на третьем – реализуется процессинг разрыва, включающий коррекцию концов разрыва и включение комплементарного dNMP; на последнем этапе происходит лигирование цепи ДНК [4].

Несмотря на то что сам процесс BER известен достаточно давно, механизмы его регуляции являются основным предметом исследований многих лабораторий. В ответ на повреждение молекулы ДНК регуляция процессов репарации осуществляется в том числе с помощью клеточного сигнала поли(ADP-рибозил)ирования (PARилирования), катализируемого белка-

Принятые сокращения: пнт – пара нуклеотидов; AP-сайт – апуриновый/апиримидиновый сайт; AP-кластер – кластер AP-сайтов; APE1 – апуриновая/апиримидиновая эндонуклеаза 1; BER – эксцизионная репарация оснований; DNase I – дезоксирибонуклеаза I; 5′-dRP – 5′-дезоксирибозофосфат; Gap – 5′-dRp-фрагмент; NCP – нуклеосома, нуклеосомная частица; PARилирование – поли(ADP-рибозил)ирование; PARP – поли(ADP-рибозо)полимераза; UDG – урацил-ДНК-гликозилаза.

* Адресат для корреспонденции.

Авторы внесли равный вклад в работу.

ми семейства поли(ADP-рибозо)полимераз (PARP) [5]. Из 17 представителей семейства PARP три белка (PARP1, PARP2 и PARP3) являются ДНК-зависимыми, активируются и участвуют в формировании клеточного ответа на повреждение ДНК [6–8]. Белки PARP1 и PARP2 катализируют присоединение полимера ADP-рибозы, а PARP3 – перенос одного остатка ADP-рибозы на белок-акцептор [7–9]. Их мишенями преимущественно являются белки, обеспечивающие динамику процесса укладки хроматина и метаболизм ДНК, включая гистоны, транскрипционные факторы, белки репарации ДНК, а также сами PARP1, PARP2 и PARP3 [8, 10–14].

Белок PARP1 способен распознавать различные повреждения ДНК, в том числе интермедиаты процесса BER, активируется при взаимодействии с ними и катализирует реакцию PARилирования в ответ на их появление [9, 15–22]. PARP2 активируется при взаимодействии с одноцепочечными разрывами, частичными ДНК-дуплексами с одно- и двунуклеотидными брешами и флэп-структурами [9, 21–26]. Было показано, что PARP3 также может выступать в роли сенсора одноцепочечных разрывов, но, в отличие от PARP1, PARP3 активируется *in vitro* только в том случае, если 5′-конец разрыва содержит фосфатную группу [24, 11]. Кроме того, было показано, что PARP1, PARP2 и PARP3 катализируют ADP-рибозилирование ДНК, и реакция идёт наиболее эффективно при взаимодействии с ДНК-дуплексами, содержащими однонуклеотидную брешь с каноническими 5′-P- и 3′-OH-группами [27–29].

На сегодняшний день множество работ по исследованию регуляции процесса BER с помощью ДНК-зависимых белков PARP были проведены в контексте свободных ДНК-субстратов, тогда как в клетке ДНК компактизована в хроматин. Базовой структурной единицей хроматина является нуклеосома (NCP). Нуклеосома представляет собой белок-нуклеиновый комплекс, в котором вокруг белкового ядра намотана ДНК длиной 147 пнт [30, 31] (рис. 1, *а*). Ядро нуклеосомы состоит из четырёх гетеродимеров гистонов: двух H3–H4 и двух H2A–H2B. Гистоны являются высококонсервативными белками среди эукариот и имеют молекулярную массу ~11–15 кДа. Гистоновый октамер связывается с ДНК длиной ~121 пнт, ещё по 13 пнт с концов ДНК поддерживается за счёт взаимодействий с *N*-концевыми α-спиралями гистонов H3. Кроме того, 8 оставшихся *N*- и *C*-«хвостов» гистонов, имеющих большую подвижность, выступают за пределы нуклеосомного ядра. Потенциально эти участки могут влиять на белок-нуклеиновые взаимодействия других, например репарационных ДНК-связывающих белков. Нуклеотиды в составе ДНК-дуплекса располагаются несимметрично относительно гистонового октамера и могут быть обращены внутрь, наружу или занимать промежуточное положение относительно октамера гистонов [32]. Различная ориентация нуклеотидов накладывает отпечаток на функциональную активность ферментов при их взаимодействии с нуклеосомой [33, 34]. Наиболее доступными для ферментов являются ориентированные наружу нуклеотиды, наименее – ориентированные внутрь.

На сегодняшний день известно, что при взаимодействии с нуклеосомной частицей PARP1 связывается как с нуклеосомной ДНК [35], так и с октамером гистонов [36, 37]. PARP2 тоже способен эффективно взаимодействовать с ДНК в составе нуклеосомы [38]. Группа Caldecott [11] показала, что в нуклеосомном контексте PARP3 может являться сенсором одноцепочечных разрывов с 5′-P- и 3′-OH-группами, но количественные характеристики такого взаимодействия определены не были. Кроме того, PARP3 способен моно(АДФ-рибозил)ировать гистон H2B по аминокислотному остатку Glu2 *in vitro*. Таким образом, совокупность полученных данных говорит о способности ДНК-зависимых белков семейства PARP взаимодействовать с разными компонентами NCP. Однако характер взаимодействий PARP1, PARP2 и PARP3 с нуклеосомной частицей, содержащей в своём составе интермедиаты начальных стадий процесса BER, остаётся неизвестным.

Настоящая работа посвящена исследованию взаимодействия ДНК-зависимых белков семейства PARP, а именно: PARP1, PARP2 и PARP3, с нуклеосомными частицами, имитирующими интермедиаты начальных стадий процесса эксцизионной репарации оснований. В качестве субстрата были использованы NCP, реконструированные в присутствии октамера гистонов домашних кур *Gallus gallus* и 147 пнт ДНК-последовательности Widom «Clone 603», содержащей изотоп ^{32}P или остаток FAM на одном из 5′-концов ДНК-дуплекса и имеющей в своём составе урацил в положении 12 от 5′-меченого конца (рис. 1, *б*). Интермедиаты начальных стадий процесса BER, т.е. NCP, содержащие в своём составе ДНК с AP-сайтом или одноцепочечным разрывом с 5′-дезоксирибозофосфатом (5′-dRp) и 3′-P группами, получали при обработке реконструированных частиц урацил-ДНК-гликозилазой (UDG) и/или апуриновой/апиримидиновой эндонуклеазой 1 (APE1). С помощью методов EMSA, боргидридной сшивки и ферментативного футпринтинга с использованием дезокси-

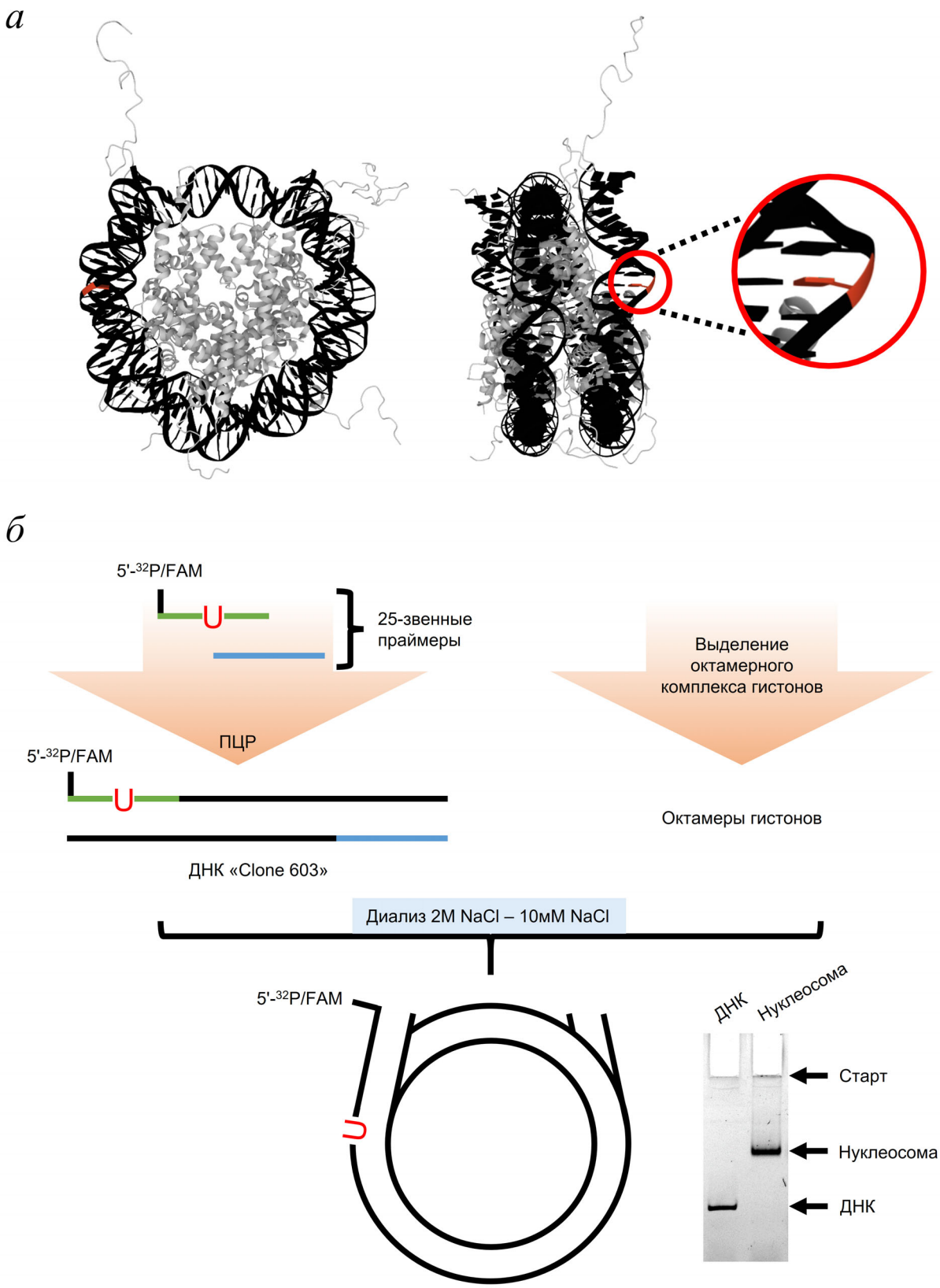


Рис. 1. Структура нуклеосомы (PDB: ID 1KX5); красным выделен нуклеотид в позиции 12 ДНК-дуплекса, гетероциклическое основание которого обращено наружу относительно октамера гистонов (*а*). *б* – Схема реконструирования нуклеосомы (согласно [31]) и автограф 4%-ного нативного ПААГ после разделения продуктов реакции реконструирования нуклеосом

рибонуклеазы I (DNase I) были охарактеризованы взаимодействия белков PARP1, PARP2 и PARP3 с NCP. На основании полученных результатов было выдвинуто предположение о разном характере взаимодействия ДНК-зависимых белков семейства PARP с повреждениями ДНК, имитирующими интермедиаты начальных этапов процесса BER в нуклеосомном контексте.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Для наработки целевой ДНК была использована плазмида pGEM-3z/603 («AddGene», США), содержащая последовательность ДНК Widom «Clone 603»: 5′-ACCCCAGGGACTTGAAGTAATAAGGACGGAGGGCCTCTTTCAACATCGATGCACGGTGGTTAGCCTTGGATTGCGCTCTACCGTGCGCTAAGCGTACTTAGAAGCCCGAGTGACGACTTCACACGGTAGGTGGGCGCGCGAACTGGG-3′, 147 нт.

Синтетические олигодезоксирибонуклеотиды, использованные в качестве праймеров при амплификации ДНК «Clone 603», в том числе олигодезоксирибонуклеотиды, меченные флуоресцеином по 5′-концу (5′-FAM), были синтезированы в Лаборатории биомедицинской химии ИХБФМ СО РАН (Россия): 5′-ACCCCAGGGACUTGAAGTAATAAGG-3′; 5′-FAM-ACCCCAGGGACUTGAAGTAATAAGG-3′; 5′-CCCAGTTCGCGCGCCCACC-3′.

В работе использовали следующие реактивы: диализные мембраны 3,5 кДа («Spectrum Laboratories Inc.», США); бромфеноловый синий и ксиленцианол («Fluka», Швейцария); [γ-^{32}P]-ATP с удельной активностью 185 ТБк/ммоль и [α-^{32}P]-ATP с удельной активностью 111 ТБк/ммоль (Лаборатория биотехнологии ИХБФМ СО РАН); Taq-полимераза («БИОСАН», Россия); DNase I («New England Biolabs», США). Основные реактивы, использованные в работе, были производства «Sigma» (США).

Рекомбинантные белки PARP1 человека, PARP2 *Mus musculus*, PARP3 человека, гистоновые октамеры H2A, H2B, H3 и H4 *G. gallus* были выделены согласно опубликованным ранее методикам [28, 31, 39] соответственно. Рекомбинантная APE1 человека и урацил-ДНК-гликозилаза *E. coli* были любезно предоставлены Ходыревой С.Н. (ИХБФМ СО РАН), полинуклеотидкиназа фага T4 – Петрусевой И.О. (ИХБФМ СО РАН).

Получение субстратов ДНК и NCP. В работе использовали олигодезоксирибонуклеотидный праймер, содержащий в положении 12 остаток dUMP и меченный по 5′-концу с помощью [γ-^{32}P]-ATP полинуклеотидкиназы T4, как описано в работе Belousova et al. [28], либо меченный флуоресцеином при химическом синтезе. Амплификацию ДНК с использованием 5′-[^{32}P]- или 5′-FAM-олигодезоксирибонуклеотидных праймеров для последующего реконструирования NCP проводили в соответствии с протоколом, описанным ранее [31]. При наработке ДНК-субстрата, содержащего статистически распределённый dUMP для получения кластера AP-сайтов (AP-кластера), реакционная смесь для амплификации содержала смесь dNTP в соотношении dATP/dGTP/dCTP/dUTP/dTTP = 1/1/1/0,9/0,1. Чистоту препарата реконструированных NCP оценивали по электрофоретической подвижности в 4%-ном ПААГ в неденатурирующих условиях. При использовании флуоресцентных компонентов в смеси после разделения продуктов реакции в геле детекцию проводили с помощью системы «Typhoon FLA 9500» («GE Healthcare Life Science», США) с использованием лазера с длиной волны возбуждения 473 нм. При использовании радиоактивных компонентов детекцию проводили с помощью радиолюминесцентного сканирования экрана Image Screen K («Kodak», США) с помощью системы «Typhoon FLA 9500» с использованием лазера с длиной волны возбуждения 635 нм. Полученные электрофореграммы анализировали с использованием программы «Quantity One» («Bio-Rad», США). Во всех случаях AP-сайт получали *in situ* с помощью активности UDG. Для этого реакционную смесь, содержащую 0,1 мкМ ДНК или NCP с одиночным или статистически распределённым по ДНК остатком урацила и 4 мкМ UDG в буфере следующего состава: 10 мМ Tris-HCl (pH 7,5), 0,1% NP-40, 0,2 мМ EDTA, 5 мМ β-ME, 10 мМ NaCl; инкубировали при 37 °C в течение 30 мин, после чего использовали для дальнейших превращений. Получение субстратов, содержащих брешь, осуществляли ферментативным гидролизом AP-сайта с помощью APE1. Реакционная смесь содержала 0,1 мкМ ДНК или NCP с одиночным остатком урацила, 4 мкМ UDG и 10 нМ APE1 в буфере следующего состава: 10 мМ Tris-HCl (pH 7,5), 0,1% NP-40, 0,2 мМ EDTA, 5 мМ β-ME, 10 мМ NaCl и 5 мМ $MgCl_2$. Смесь инкубировали при 37 °C в течение 30 мин, после чего использовали для дальнейших превращений.

Определение значений K_d. Значения констант диссоциации определяли методом EMSA, согласно материалам работы Kutuzov et al. [38]. Реакционная смесь объёмом 10 мкл содержала 0,1 мкМ 5′-[^{32}P]-меченой ДНК или NCP и 0,001,

0,005, 0,01, 0,05, 0,1, 0,5, 1 мкМ PARP1, PARP2 или PARP3 или 0,05, 0,1, 0,3, 0,5, 0,7, 0,85, 1, 1,5 мкМ PARP3 для структуры с 5′-dRp-фрагментом (Gap) Gap-ДНК и 0,2, 0,5, 1, 1,5, 3, 5, 7,5, 10 мкМ PARP3 – для структуры Gap-NCP в буфере следующего состава: 10 мМ Tris-HCl (pH 7,5), 0,1% NP-40, 0,2 мМ EDTA, 5 мМ β-ME, 10 мМ NaCl и 5 мМ $MgCl_2$. Реакционную смесь инкубировали при 37 °C в течение 20 мин. Компоненты реакционной смеси разделяли в 4%-ном ПААГ в неденатурирующих условиях. Детекцию продуктов электрофоретического разделения в геле проводили, как описано выше. Расчёт значений констант диссоциации проводили с использованием программного обеспечения OriginPro 7.5 («OriginLab Corporation», США).

Изучение белок-нуклеиновых взаимодействий методом боргидридной сшивки. Реакционную смесь объёмом 10 мкл, содержащую 0,2 мкМ 5′-[FAM]-меченую AP-ДНК или AP-NCP и 0,005, 0,01, 0,05, 0,1, 0,5, 1 мкМ PARP1, PARP2 или PARP3 в буфере следующего состава: 10 мМ Tris-HCl (pH 7,5), 0,1% NP-40, 0,2 мМ EDTA, 5 мМ β-ME, 10 мМ NaCl; инкубировали при 37 °C в течение 20 мин. Далее к смеси добавляли $NaBH_4$ до конечной концентрации 20 мМ и инкубировали во льду в течение 30 мин, после чего реакционную смесь прогревали при 65 °C в течение 5 мин для удаления остатков непрореагировавшего $NaBH_4$. Для деградации несвязанной белками ДНК в реакционную смесь добавляли 1 Ед DNase I и инкубировали при 37 °C в течение 15 мин. Реакцию останавливали добавлением 1/5 объёма раствора буфера Лэммли. Анализ компонентов реакционной смеси проводили с помощью гель-электрофореза в 10%-ном ПААГ по Лэммли [40]. Детекцию продуктов реакции проводили, как описано выше.

Изучение белок-нуклеиновых взаимодействий методом ферментативного футпринтинга. Реакционная смесь объёмом 10 мкл содержала 0,2 мкМ 5′-[^{32}P]-меченой ДНК или NCP и 0,1 мкМ PARP1, PARP2 или PARP3 в буфере следующего состава: 10 мМ Tris-HCl (pH 7,5), 0,1% NP-40, 0,2 мМ EDTA, 5 мМ β-ME, 10 мМ NaCl, 5 мМ $MgCl_2$. Реакционную смесь инкубировали при 37 °C в течение 15 мин. Для реакции PARирования реакционную смесь дополняли 400 мкМ NAD^+. Далее пробы с ДНК обрабатывали 0,002 Ед DNase I, пробы с NCP – 0,007 Ед DNase I при 37 °C в течение 15 мин. Концентрации всех белковых компонентов были подобраны экспериментально для получения оптимальной картины при анализе продуктов расщепления белок-нуклеиновых комплексов. Для стабилизации AP-сайтов реакционную смесь обрабатывали метоксиамином в конечной концентрации 30 мМ во льду в течение 30 мин. Реакцию останавливали добавлением 1/5 объёма раствора, содержащего 90% формамида, 50 мМ EDTA, 0,025% бромфенолового синего и 0,025% ксиленцианола. Пробы разделяли в 20%-ном ПААГ в денатурирующих условиях. Детекцию и обработку результатов проводили, как описано выше.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

Определение значений K_d комплексов ДНК/NCP–PARP1/PARP2/PARP3 методом задержки в геле. Для оценки вклада взаимодействий ДНК-зависимых белков семейства PARP с повреждением в составе ДНК-дуплекса или гистоновыми компонентами NCP был использован метод EMSA [41]. В работе были использованы ДНК-субстраты, свободный ДНК-дуплекс и намотанный на октамер гистонов, имитирующие интермедиаты начальных стадий процесса BER – 147 пнт ДНК с AP-сайтом и 147 пнт ДНК, содержащая однонуклеотидную брешь с 5′-dRP-фрагментом – Gap (рис. 2, *а*). Для контрольных экспериментов была использована нативная форма 147 пнт ДНК. Наличие на радиоавтографе полос, обладающих меньшей электрофоретической подвижностью по сравнению с контрольным препаратом, говорит об образовании продуктов комплексообразования белков PARP со свободной ДНК и ДНК/гистонами в составе NCP (рис. 2, *б*). По результатам EMSA были рассчитаны значения констант диссоциации для всех исследованных типов комплексов (таблица).

Оказалось, что сродство ДНК-связывающих белков PARP к использованным субстратам изменяется в ряду PARP3 << PARP2 < PARP1. При появлении повреждения в составе ДНК-дуплекса белки PARP1 и PARP2 проявляют следующую закономерность как при взаимодействии с ДНК в свободной форме, так и при комплексообразовании с NCP: Native = AP < Gap. Повышенное сродство PARP1 к Gap-субстратам проявляется как при использовании свободной ДНК, так и при использовании нуклеосомы. При формировании комплексов PARP2 с NCP этот эффект становится особенно выраженным. Следует отметить, что количественные данные, полученные методом измерения анизотропии флуоресценции для комплексов PARP1 и PARP2 с различными типами NCP, в общем случае коррелируют с данными метода EMSA [38].

Для PARP3 в целом наблюдается более низкое сродство к использованным субстратам по

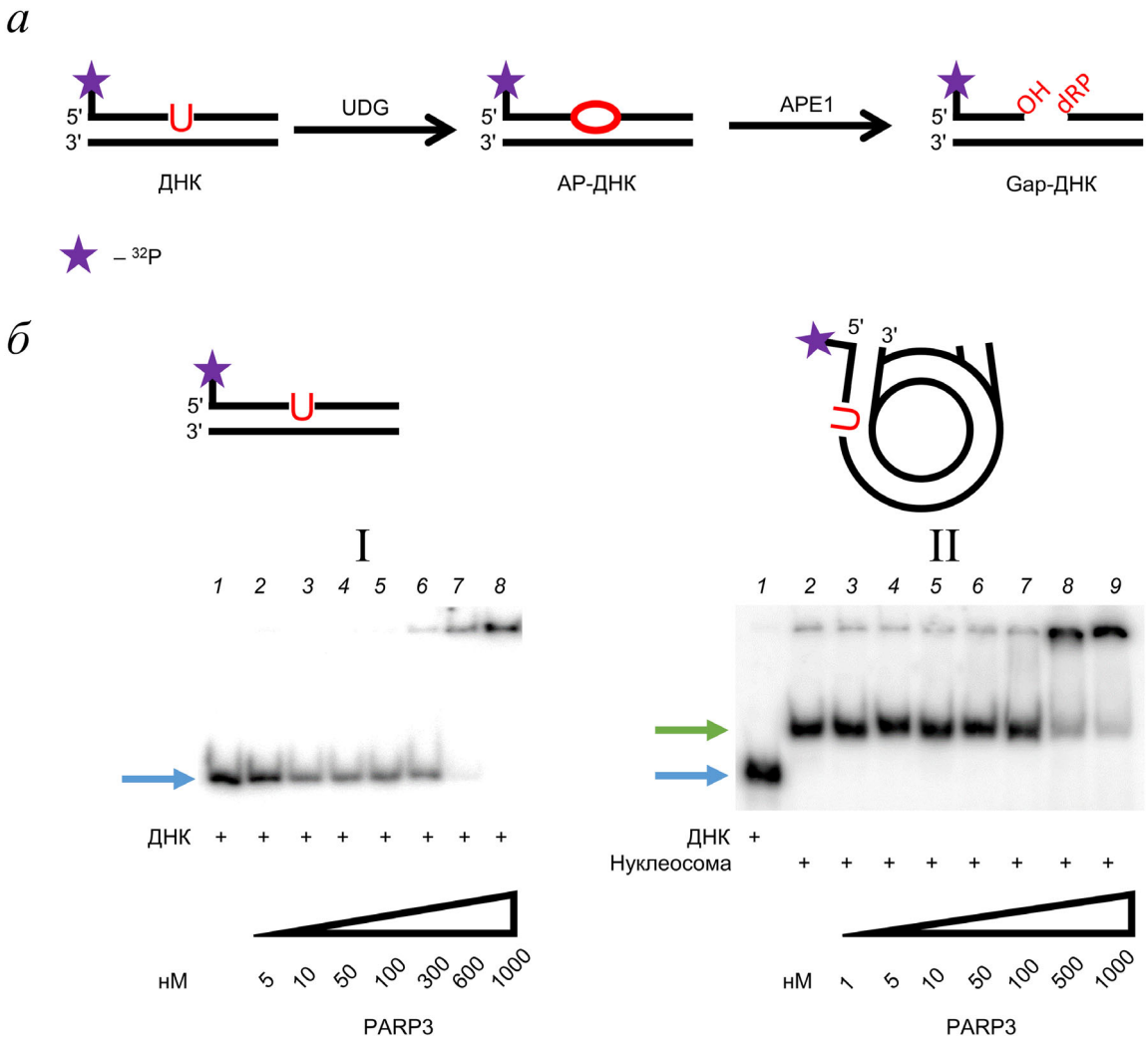


Рис. 2. Схема получения субстратов начальных стадий процесса BER (*а*). *б* – Радиоавтограф 4%-ного ПААГ после разделения продуктов реакции комплексообразования PARP3 с нативной ДНК в свободном (I) и нуклеосомном (II) состояниях в нативных условиях. I: дорожка *1* – свободная нативная ДНК, дорожки *2–8* – ДНК с PARP3; II: дорожка *1* – свободная нативная ДНК, дорожка *2* – NCP, дорожки *3–9* – NCP с PARP3. Стрелками обозначена подвижность: синей – свободной ДНК, зеленой – NCP. Концентрация ДНК/NCP составляла 100 нМ; концентрация PARP3 – 1–1000 нМ

сравнению с PARP1 и PARP2, а закономерность в изменении прочности комплекса трансформируется к Gap <<< Native = AP независимо от формы ДНК.

Изучение взаимодействия ДНК-зависимых белков семейства PARP с нуклеосомами методом боргидридной сшивки. В работах Zhou et al. [42], Sczepanski et al. [43] и Yang et al. [44] показано, что в составе нуклеосомной частицы октамеры гистонов способны образовывать основания Шиффа с АР-сайтами ДНК. С одной стороны, в зависимости от расположения АР-сайта взаимодействие гистонов с таким типом повреждения может влиять и на взаимодействие ДНК-связывающих белков, например PARP1, PARP2 и PARP3 с повреждённой нуклеосомной ДНК. С другой стороны, следствием формирования основания Шиффа между белком и цепью ДНК может быть расщепление последней по АР-сайту с образованием одноцепочечного разрыва [43]. Соответственно, если АР-сайты образуются одновременно в двух цепях ДНК-дуплекса, то возможно появление двуцепочечного разрыва наиболее токсичной формы повреждений [44]. Изучение взаимодействия гистонов и белков семейства PARP с ДНК, содержащей АР-сайты в составе нуклеосомы, может помочь в понимании механизма репарации множественных повреждений в контексте хроматина, особенно учитывая тот факт, что PARP1 и PARP2 обладают АР-лиазной активностью [16, 45].

Остатки дезоксирибозы АР-сайтов в молекуле ДНК представлены в нескольких равновесных формах [46]. Одной из них является ациклическая альдегидная форма АР-сайта, которая может образовывать основания Шиффа с аминогруппами ДНК-связывающих белков [47], в частности с различными участниками BER [2, 16, 45, 48, 49]. Основание Шиффа формируется как интермедиат многих ферментативных реакций, и его распад по механизму β-элиминирования приводит к разрыву сахарофосфатного остова ДНК [42]. Тем не менее *in vitro* этот интермедиат можно стабилизировать восстановлением боргидридом натрия [50] (рис. 3, *а*). Таким образом, при дальнейшем анализе продуктов реакции с помощью гель-электрофореза по Лэммли появление белок-нуклеиновых аддуктов будет свидетельствовать о формировании комплекса между исследуемым белком и локализованным АР-сайтом ДНК. Следует отметить, что при анализе продуктов реакции могут наблюдаться аддукты, соответствующие пришивке белка к целой цепи ДНК, а также к участку цепи ДНК, расщеплённому по положению АР-сайта. Кроме того, использование денатурирующих условий при проведении эксперимента не всегда гарантирует полную денатурацию двух цепей ДНК-дуплекса, особенно в составе белок-нуклеинового аддукта (рис. 3, *б*). Все эти факты будут влиять на электрофоретическую подвижность аддуктов. Метод боргидридной сшивки можно применять как универсальный подход при исследовании белок-нуклеиновых взаимодействий с использованием АР-сайт-содержащих ДНК различной структуры [51].

Для установления характера взаимодействий белков PARP1, PARP2 и PARP3 с АР-содержащими нуклеосомными частицами методом боргидридной сшивки были использованы 5′-FAM-меченые ДНК-структуры, содержащие как одиночный АР-сайт, так и кластер АР-сайтов, в котором повреждения были распределены статистически по всей длине дуплекса. Статистическое распределение АР-сайтов по ДНК-субстрату позволит выявить потенциальные участки взаимодействия белков семейства PARP по всей поверхности нуклеосомной частицы независимо от положения АР-сайта, как одиночного повреждения. Для контрольных экспериментов были использованы свободные АР-ДНК аналогичной структуры.

На рис. 4 и 5 представлены автографы гелей после разделения продуктов реакции боргидридной сшивки с помощью гель-электрофореза по Лэммли. Оказалось, что все три белка семейства PARP способны взаимодействовать как с одиночным АР-сайтом, так и с АР-кластером свободной или нуклеосомной ДНК. Формирование оснований Шиффа между PARP1, PARP2 и АР-сайтом в составе свободной ДНК было показано ранее [15, 16, 45]. Формирование оснований Шиффа между PARP3 и АР-сайтом в составе свободной ДНК, а также PARP1, PARP2, PARP3 и АР-сайтом в составе нуклеосомы показано впервые.

Константы диссоциации комплексов белков PARP1, PARP2 и PARP3 со свободной ДНК и нуклеосомой*

Структура	K_d, нМ (PARP1)	K_d, нМ (PARP2)	K_d, нМ (PARP3)
ДНК			
Native	113 ± 5	300 ± 100	461 ± 9
AP	92 ± 3	330 ± 80	426 ± 8
Gap	48 ± 3	240 ± 80	750 ± 20
Нуклеосома			
Native	65 ± 3**	192 ± 10**	287 ± 5
AP	61 ± 5**	130 ± 4**	250 ± 30
Gap	38 ± 4**	57 ± 8**	4400 ± 300

* Данные представлены как среднее минимум из трёх независимых экспериментов.
** Данные опубликованы в работе Kutuzov et al. [38].

При добавлении PARP1 в реакционную смесь наблюдается образование ковалентных аддуктов с АР-сайтом, расположенным вблизи тупого конца свободной или нуклеосомной ДНК, с молекулярной массой выше 95 кДа (рис. 4, *а* и 5, *а*, дорожки *4–15*). Кроме того, наблюдается формирование аддуктов с большей молекулярной массой, которые можно отнести к продуктам ковалентного присоединения PARP1 к нерасщеплённой по АР-сайту цепи ДНК, а также к белок-нуклеиновым аддуктам, содержащим неденатурированную двуцепочечную форму ДНК. Однако при взаимодействии PARP1 с АР-кластером как в составе свободной ДНК, так и в нуклеосомном контексте также происходило образование высокомолекулярных аддуктов, вероятно, являющихся следствием посадки нескольких молекул PARP1 на АР-кластер. В целом, наличие АР-кластера существенно не повлияло на характер взаимодействия PARP1 с нуклеосомой, что может быть следствием преимущественного взаимодействия PARP1 с тупыми концами ДНК-дуплекса или АР-сайтом, расположенным в непосредственной близости от тупого конца.

При формировании оснований Шиффа между PARP2 и АР-сайтом происходит перера-

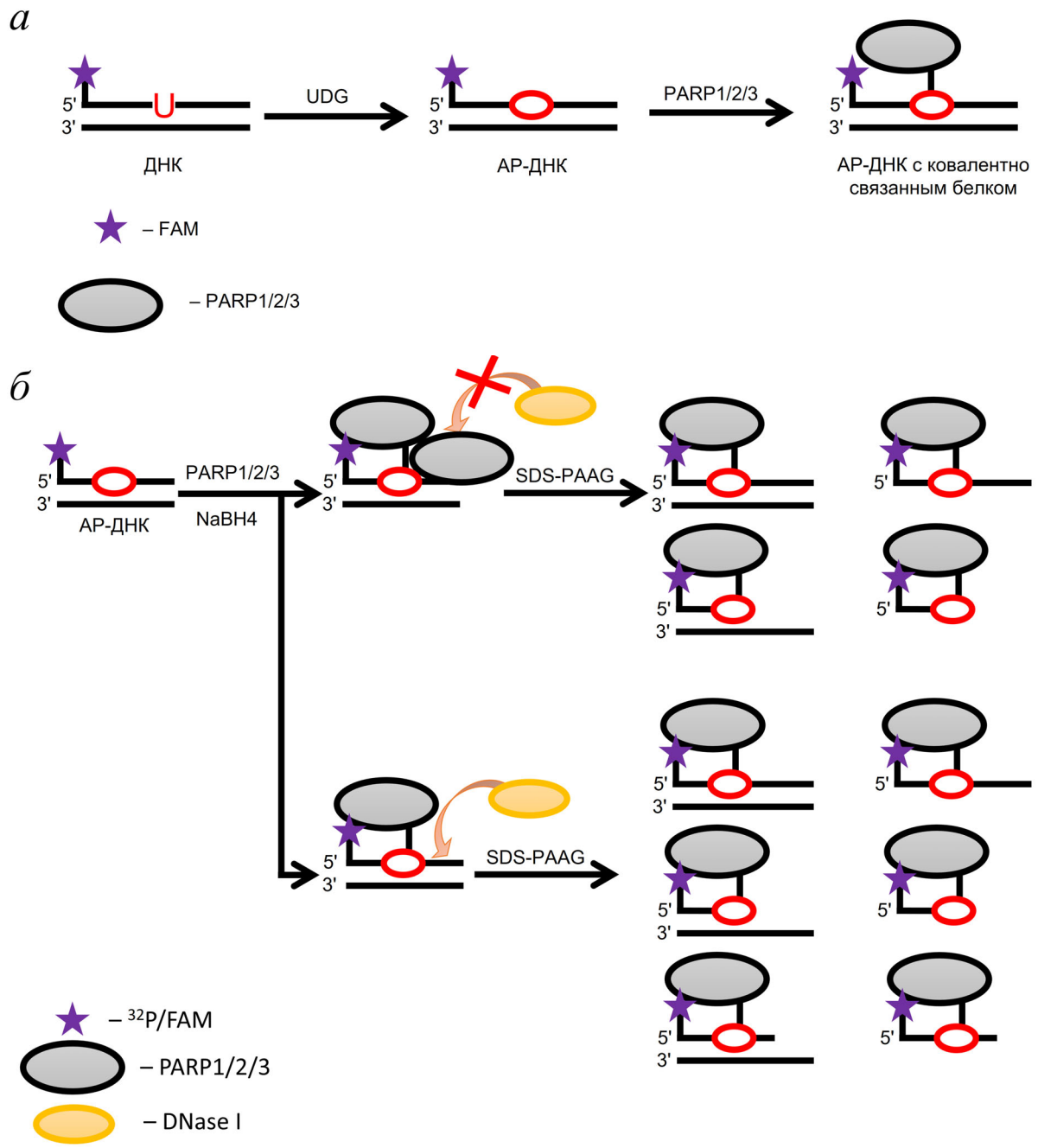


Рис. 3. Получение белок-нуклеиновых аддуктов методом боргидридной сшивки. *а* – Схема получения ковалентного аддукта ДНК–белок; *б* – типы возможных белок-нуклеиновых аддуктов при разделении продуктов реакции гель-электрофорезом по Лэммли

спределение доли аддуктов с низкой и высокой молекулярными массами: при увеличении количества АР-сайтов доля высокомолекулярных продуктов увеличивается с 45 до 59% (дорожка *15* на рис. 4, *б*I и 5, *б*I) при использовании свободной ДНК и с 53 до 64% (дорожка *15* на рис. 4, *б*II и 5, *б*II) при использовании ДНК в составе NCP (рис. 4, *б* и 5, *б*, дорожки *4–15*). Подобные изменения могут быть следствием взаимодействия молекулы PARP2 с разными участками NCP.

Сродство PARP3 к АР-содержащим субстратам существенно ниже, чем PARP1 и PARP2, что выражается в том числе в количестве непрореагировавшей с PARP3 АР-содержащей ДНК (отмечено синей стрелкой на рис. 4, *в*, ср. дорожки *1* и *10–15* в обеих частях). Интересно, что интенсивность сшивки между PARP3 и NCP-

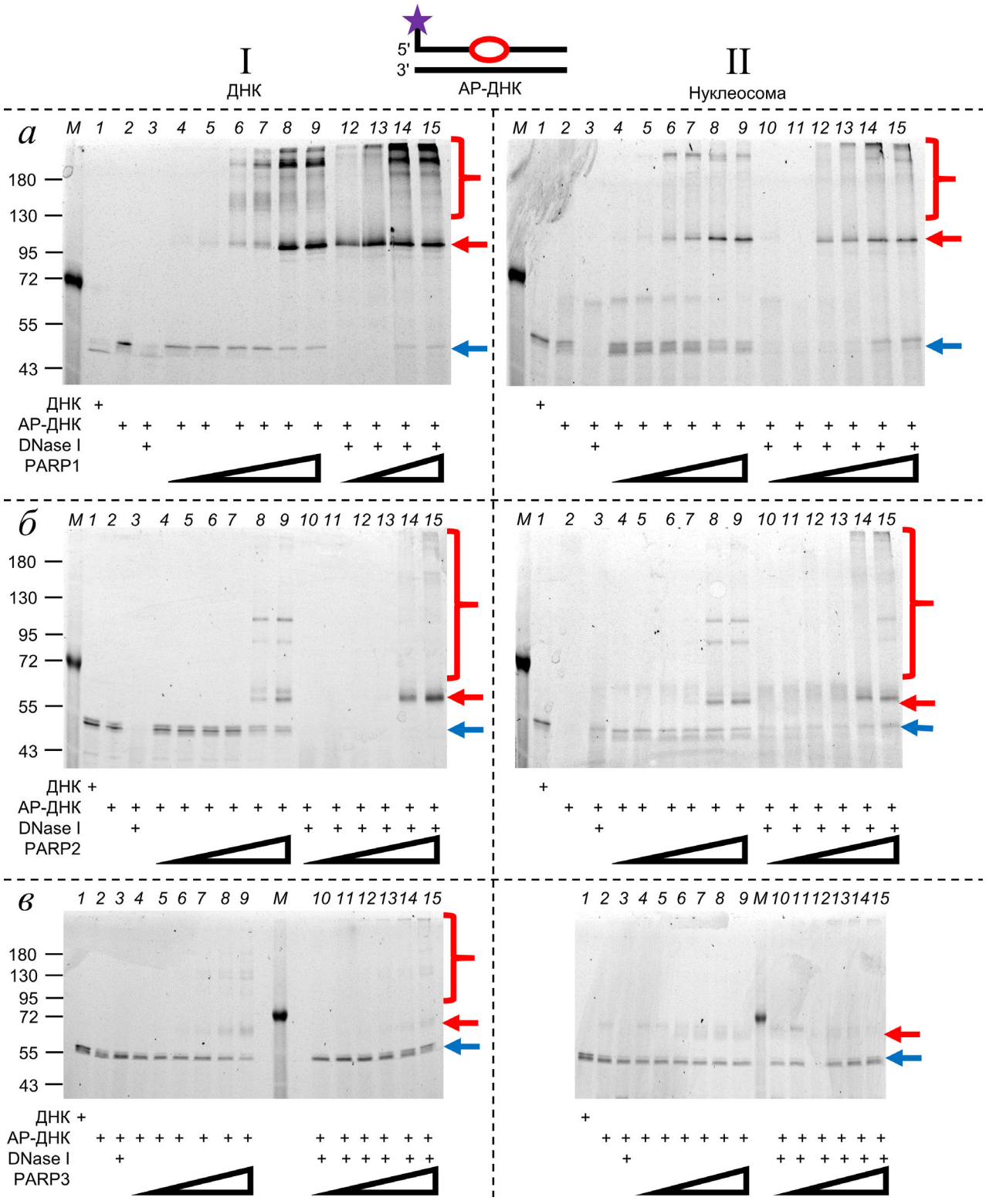


Рис. 4. Взаимодейсвтие белков PARP1 (*а*), PARP2 (*б*) и PARP3 (*в*) с АР-сайтом в составе свободной (I) и нуклеосомной (II) ДНК (см. «Материалы и методы»). Автографы гелей после разделения продуктов реакции в 10%-ном ПААГ по Лэммли. Слева указаны положения маркёров молекулярных масс (кДа). М – маркёры молекулярных масс; дорожка *1* – нативная ДНК/NCP; дорожка *2* – ДНК/NCP, обработанная UDG; дорожка *3* – ДНК/NCP, обработанная UDG и DNase I. Концентрация PARP в дорожках *4–9* и *10–15* составляла 5, 10, 50, 100, 500, 1000 нМ соответственно. Синими стрелками обозначена электрофоретическая подвижность нерасщеплённой цепи АР-ДНК, красными стрелками и скобками – белок-нуклеиновые аддукты

субстратом возрастает при переходе от одиночного к кластерному АР-сайту – доля комплекса с молекулярной массой выше 55 кДа по отношению к непрореагировавшей ДНК увеличивается с 22% до 38% (ср. дорожки *15* на рис. 4, *в*II и 5, *в*II). Однако образования аддуктов, соответствующих одновременному взаимодействию нескольких молекул PARP3 с несколькими АР-сайтами в составе NCP, не наблюдается (рис. 5, *в*II), что может быть обусловлено взаимодействием PARP3 с АР-сайтом, расположенным вблизи тупого конца ДНК-дуплекса или наличием структурных изменений АР-NCP в присутствии большого количества АР-сайтов.

Следует отметить, что сшивок, соответствующих белок-нуклеиновым аддуктам октамера гистонов при использовании описанных АР-содержащих субстратов, не наблюдалось. Этот факт позволяет исключить вклад конкретного типа повреждения в формирование одноцепочечных разрывов в нуклеосомной ДНК за счёт октамера гистонов.

Изучение локализации PARP1, PARP2 и PARP3 на нуклеосоме методом ферментативного футпринтинга. Выявить белок-белковые контакты членов семейства PARP, а также их специфических взаимодействий с повреждением ДНК в составе NCP позволяет метод футпринтинга с использованием фермента DNase I [52]. В представленной работе для изучения локализации PARP1, PARP2 и PARP3 на свободной ДНК и нуклеосоме использовали ДНК-субстраты как в нативной форме, так и с одиночным АР-сайтом.

Как видно из представленных данных, присутствие PARP1 практически полностью подавляет реакцию ферментативного расщепления нативной формы свободной ДНК (рис. 6, дорожка *3*). Такая ситуация возможна только в том случае, когда молекулы белка в составе комплекса равномерно распределены по всей длине ДНК-субстрата, включая 5′-концевой участок дуплекса. Добавление NAD^+ в реакционную смесь запускает реакцию PARилирования (рис. 6, дорожка *4*). Из представленных на электрофореграмме данных видно, что характер распределения полос ферментативного расщепления после PARилирования совпадает с характером распределения полос свободной ДНК, но не комплекса PARP1–ДНК. Следовательно, после PARилирования одноимённый заряд ДНК и поли(ADP-рибозы) способствует диссоциации комплекса поли(ADP-рибозил)ированный PARP–ДНК.

Из представленных данных видно, что доступ к ДНК в составе нуклеосомы ограничен по сравнению со свободной ДНК (рис. 6, ср. дорожки *2* и *9*, *5* и *12*). Сохранение сигнала полноразмерной ДНК в присутствии PARP1 свидетельствует о преимущественной локализации белка вблизи 5′-концевого участка дуплекса ДНК в составе NCP (дорожки *10*, *11*).

Формирование комплекса между PARP1 и АР-содержащей свободной ДНК практически полностью подавляет реакцию ферментативного расщепления (рис. 6, ср. дорожку *5* с *6* и *7*), что говорит о равномерном распределении молекул белка по всей длине ДНК-субстрата. Однако появление продуктов β-элиминирования говорит о специфическом взаимодействии PARP1 с АР-сайтом (рис. 6, ср. дорожку *5* с *6* и *7*; продукт β-элиминирования отмечен синей звёздочкой) [16].

При взаимодействии PARP1 и АР-содержащей NCP на электрофореграмме пропадает один из сигналов, соответствующий полноразмерной 5′-[^{32}P]-ДНК в составе нативной NCP (рис. 6, ср. дорожки *10*, *11* с *13*, *14*). Этот факт говорит о формировании разного типа комплексов PARP1–NCP с 5′-концевым участком ДНК-дуплекса при появлении АР-сайта. Кроме того, появляется продукт реакции β-элиминирования, т.е. специфического взаимодействия PARP1 с АР-сайтом в составе нуклеосомной ДНК.

Равномерный характер распределения полос, а также наличие интенсивного сигнала, соответствующего полноразмерной ДНК, при разделении продуктов расщепления комплексов свободной ДНК с PARP2 и PARP3 указывает на преимущественное связывание белков с 5′-концами ДНК-субстрата (рис. 6, дорожка *15* – для PARP2, дорожка *23* – для PARP3). Присутствие NAD^+ в реакционной смеси существенно не влияет на изменение распределения полос после реакции расщепления (рис. 6, ср. дорожки *15* и *16* – для PARP2, дорожки *25* и *26* – для PARP3). В случае PARP2 этот факт можно объяснить пониженным сродством фермента и его более низкой каталитической активностью по сравнению с PARP1, что может выражаться в отсутствии драматических изменений в концентрациях белок-нуклеинового комплекса в условиях проведения эксперимента. PARP3 имеет ещё более низкое сродство к ДНК и катализирует перенос лишь одного остатка ADP-рибозы, что может не приводить к существенному изменению концентрации белок-нуклеинового комплекса за счёт электростатического отталкивания компонентов при PARилировании.

Наличие АР-сайта в составе свободной ДНК приводит к изменению типа взаимодействия белков PARP2 и PARP3 с 5′-концевой частью ДНК-субстрата (рис. 6, ср. дорожки *15* с *17* – для PARP2, дорожки *23* с *25* – для PARP3). Наличие продуктов β,δ-элиминирования говорит о спон-

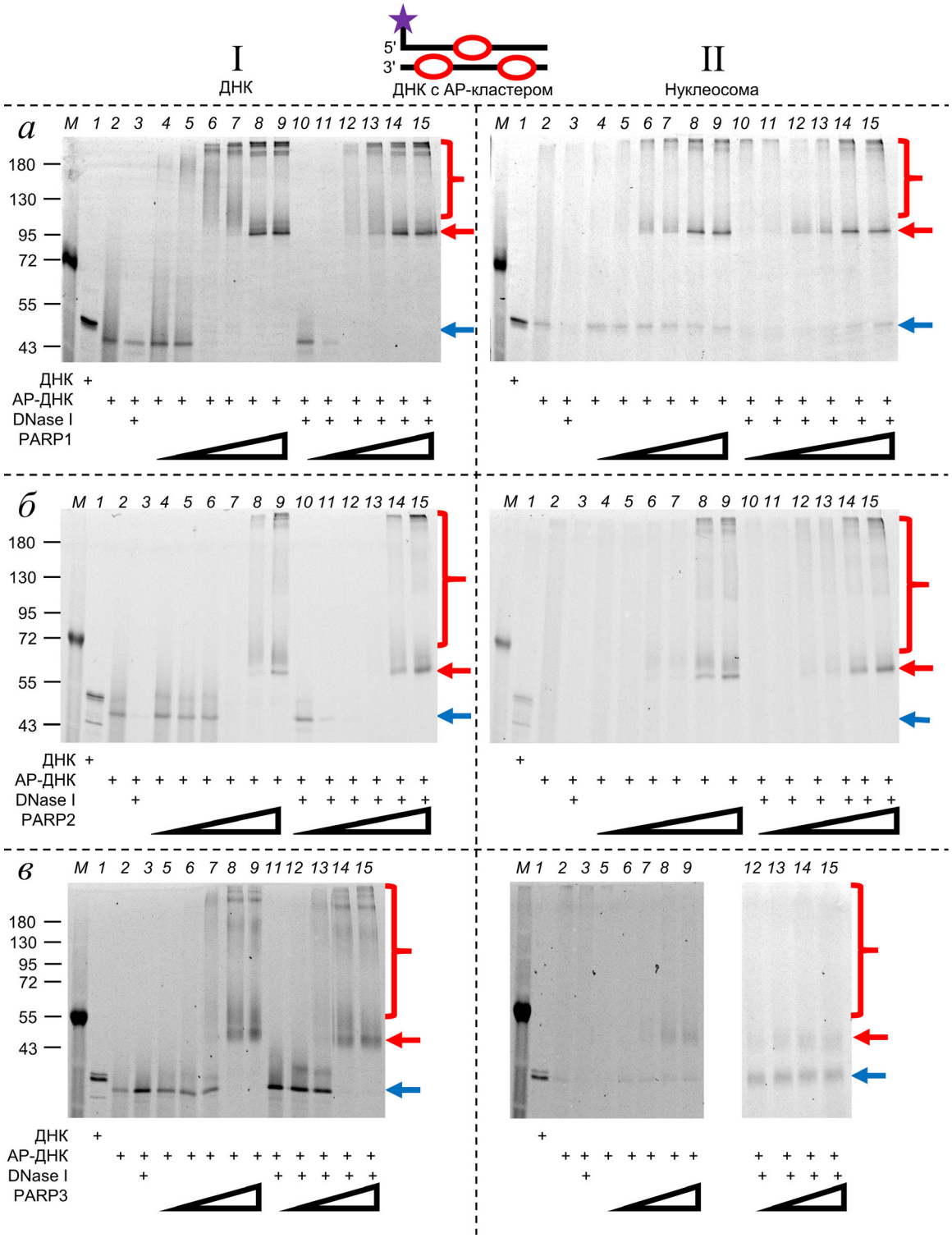


Рис. 5. Взаимодействие белков PARP1 (*а*), PARP2 (*б*) и PARP3 (*в*) с АР-кластером в составе свободной (I) и нуклеосомной (II) ДНК (см. «Материалы и методы»). Автографы гелей после разделения продуктов реакции в 10%-ном ПААГ по Лэммли. Слева указаны положения маркёров молекулярных масс (кДа). М – маркёры молекулярных масс; дорожка *1* – нативная ДНК/NCP; дорожка *2* – ДНК/NCP, обработанная UDG; дорожка *3* – ДНК/NCP, обработанная UDG и DNase I. Концентрация PARP1 и PARP2 в дорожках *4–9* и *10–15* составляла 5, 10, 50, 100, 500, 1000 нМ соответственно. Концентрация PARP3 в дорожках *5–9 в*I и *11–15 в*I составляла 10, 50, 100, 500, 1000 нМ соответственно; концентрация PARP3 в дорожках *5–9 в*II и *12–15 в*II составляла 10, 50, 100, 500, 1000 нМ и 50, 100, 500, 1000 нМ соответственно. Синими стрелками обозначена электрофоретическая подвижность нерасщеплённой цепи АР-ДНК, красными стрелками и скобками – белок-нуклеиновые аддукты

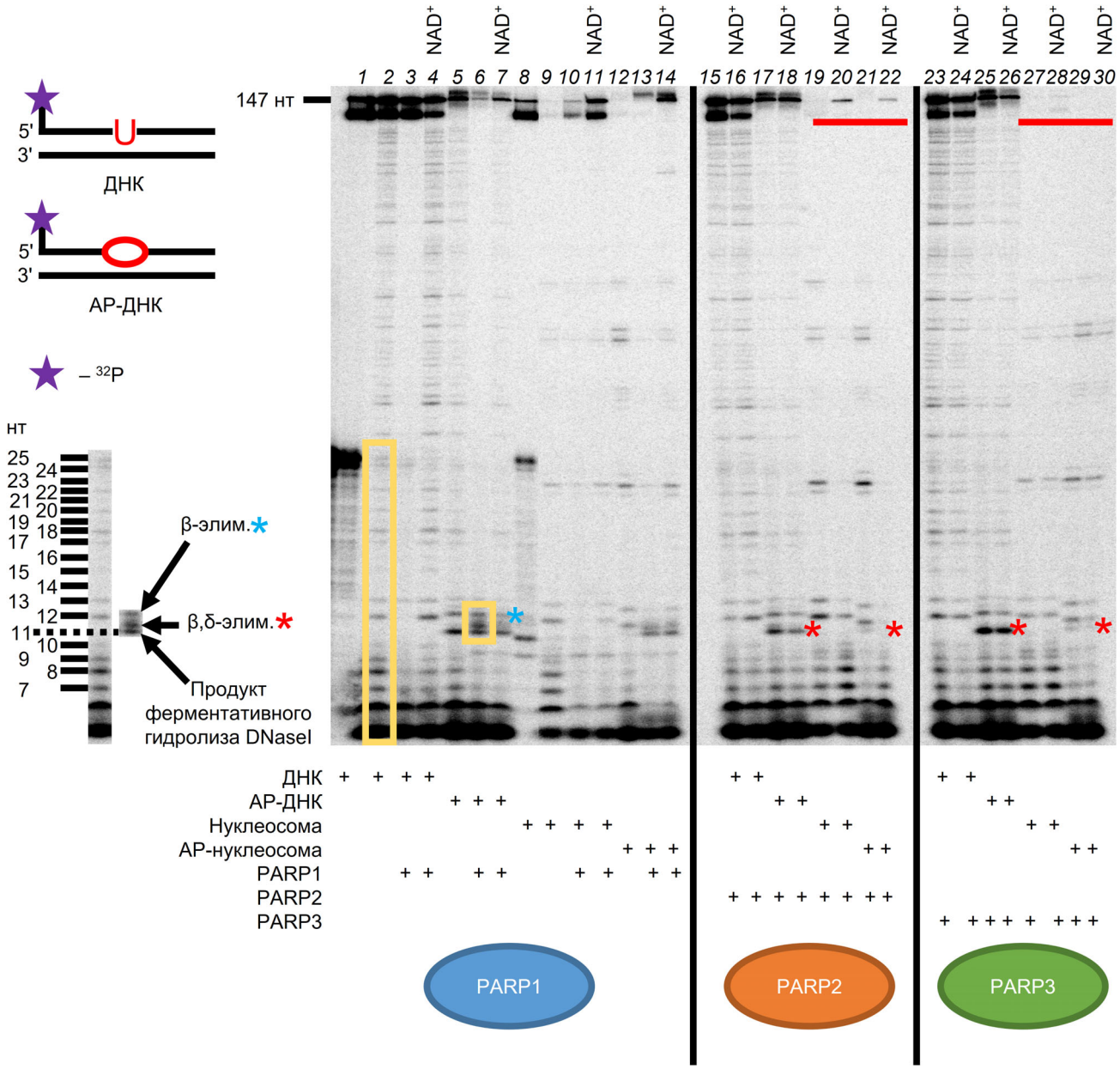


Рис. 6. Исследование структуры белок-нуклеиновых комплексов PARP1, PARP2 и PARP3 со свободной ДНК и с нуклеосомой. Дорожка *1* – смесь 5′-[^{32}P]-меченых компонентов системы – 147 пнт ампликон и 25 нт праймер; дорожка *8* – смесь 5′-[^{32}P]-меченых компонентов системы – NCP и 25 нт праймер с урацилом в положении 12; дорожки *2*, *9* – контрольная ДНК/NCP после обработки DNase I; дорожки *5*, *12* – контрольная АР-ДНК/AP-NCP после обработки DNase I; дорожки *3*, *4*, *6*, *7*, *10*, *11*, *13*, *14* – продукты расщепления комплексов PARP1 с ДНК, АР-ДНК, NCP и AP-NCP соответственно; дорожки *15–22* – продукты расщепления комплексов PARP2 с ДНК, АР-ДНК, NCP и AP-NCP; дорожки *23–30* – продукты расщепления комплексов PARP3 с ДНК, АР-ДНК, NCP и AP-NCP. Синей звёздочкой отмечены продукты β-элиминирования, красной звёздочкой – продукты β,δ-элиминирования, красной линией отмечено положение полноразмерной 5′-[^{32}P]-ДНК. Зоны в жёлтой рамке вынесены за пределы электрофореграммы

танном разрушении АР-сайта в процессе гель-электрофореза, т.е. об отсутствии АР-лиазной активности PARP3 (рис. 6, ср. дорожки *5* с *25*, *26*; продукт β,δ-элиминирования отмечен красной звёздочкой). PARP2 способен проявлять АР-лиазную активность в отношении АР-сайта, хотя и в существенно меньшей степени, чем PARP1, что выражается в появлении продукта реакции β-элиминирования (рис. 6, ср. дорожки *5* с *17*, *18*; продукт β,δ-элиминирования отмечен красной звёздочкой) [45].

Характер продуктов расщепления белок-нуклеиновых комплексов указывает на отсутствие взаимодействий белков PARP2 и PARP3 с

5′-концевой частью ДНК-субстрата в составе нуклеосомы независимо от наличия АР-сайта (рис. 6, ср. дорожки *9*, *12* с *19–22* (для PARP2) и с *27–30* (для PARP3); отмечено красной линией). Тем не менее продукт спонтанного распада АР-сайта также отсутствует, но наблюдается продукт β-элиминирования, что говорит о специфическом взаимодействии PARP2 и PARP3 с АР-сайтом и/или гистонами вблизи повреждения ДНК в составе NCP (рис. 6, ср. дорожки *19* с *23* – для PARP2 и *27* с *31* – для PARP3).

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

В представленной работе был изучен характер взаимодействия белков PARP1, PARP2 и PARP3 с нуклеосомными частицами, содержащими в своём составе ДНК-интермедиаты начальных стадий процесса BER. Использованный ДНК-субстрат содержал повреждение на расстоянии чуть более одного витка спирали от одного из тупых концов ДНК-дуплекса. Опираясь на полученные результаты, можно сделать ряд последовательных выводов, которые важны для понимания механизма действия ДНК-зависимых белков семейства PARP и регуляции начальных стадий процесса BER.

Известно, что PARP1 с высокой эффективностью связывается с тупыми концами модельных ДНК-дуплексов, проявляет АР-лиазную активность при взаимодействии с АР-сайтами, а также эффективно взаимодействует с разрывом ДНК после действия APE1 [6, 21, 22]. Отсутствие существенных различий в значениях констант диссоциации PARP1 с использованными в представленной работе структурами ДНК и NCP может быть связано с предпочтительным взаимодействием PARP1 с тупыми концами ДНК-дуплекса, являющимися аналогом двуцепочечного разрыва [35, 53]. Стоит обратить внимание, что сродство PARP1 к свободной ДНК оказалось несколько ниже, чем к нуклеосоме. Это может свидетельствовать о влиянии дополнительных белок-белковых взаимодействий PARP1 с гистонами при формировании комплекса PARP1–NCP. Тем не менее, по данным метода боргидридной сшивки, характер взаимодействия PARP1 с ДНК и ДНК в составе NCP существенно не изменяется (см. рис. 3, *а* и 4, *а*) либо эти изменения не выявляются с помощью использованного подхода. Можно предположить, что в контексте таких структур близкое расположение тупого конца дуплекса ДНК будет маскировать взаимодействие PARP1 с АР-сайтом или одноцепочечным разрывом и, как следствие, влиять на белок-белковые взаимодействия в процессе репарации.

Ранее с использованием модельных ДНК было установлено, что сродство PARP2 к тупым концам ДНК-дуплекса ниже, чем к одноцепочечному разрыву [21]. В работе Gaullier et al. [54] с использованием криоэлектронной микроскопии было показано, что PARP2 взаимодействует с NCP через связывание с тупыми концами ДНК-дуплекса. Стоит отметить, что такое взаимодействие было продемонстрировано с использованием реконструированной NCP с двумя линкерными участками длиной 9 пнт. На основе значений K_d, полученных в настоящей работе, можно предположить, что наличие одноцепочечного разрыва ДНК обеспечивает эффективность взаимодействия PARP2 с нуклеосомой. Методом футпринтинга было показано, что PARP2 не взаимодействует с тупыми концами нуклеосомной ДНК, но способен взаимодействовать с АР-сайтом вблизи тупого конца. Таким образом, на основании полученных нами данных, а также литературных данных с использованием свободной ДНК и ДНК в составе NCP [21, 22, 38] можно говорить об эффективном взаимодействии PARP2 как с АР-сайтом, так и с разрывом в ДНК в контексте нуклеосомы, содержащей повреждение вблизи конца ДНК-дуплекса.

С использованием модельных структур ДНК и NCP было установлено, что PARP3 взаимодействует и активируется ДНК с одноцепочечным разрывом, содержащим 5′-концевую фосфатную группу, – классическим интермедиатом поздних этапов BER [11, 24]. Тем не менее оказалось, что PARP3 взаимодействует с использованными в работе Gap-структурами менее эффективно, чем с нативной и АР-содержащей ДНК. Вероятно, такое различие в данных можно объяснить тем, что используемый в представленной работе классический интермедиат более ранних стадий BER – ДНК-дуплекс с одноцепочечной брешью с 5′-dRP-фрагментом – не является каноническим субстратом для PARP3. Кроме того, наличие одноцепочечного разрыва может приводить к структурным изменениям NCP, что, вероятно, является критическим фактором при взаимодействии PARP3 с нуклеосомой. Следовательно, аномально высокое значение константы диссоциации комплекса PARP3–Gap-NCP, вероятно, можно объяснить существованием пространственной структуры нуклеосомной частицы, не позволяющей PARP3 эффективно взаимодействовать с повреждением в цепи ДНК. Таким образом, аффинность PARP3 к ДНК с разрывом в составе NCP может определяться как размером бреши, так и модификацией 5′-концевого фрагмента.

Методом футпринтинга было показано, что PARP3 взаимодействует с AP-сайтом в составе NCP. Тем не менее при использовании NCP с AP-кластером не было зафиксировано высокомолекулярных белок-нуклеиновых аддуктов, которые обнаруживались при взаимодействии PARP3 со свободной ДНК аналогичной структуры. Возможно, PARP3 предпочтительно взаимодействует только с AP-сайтом вблизи тупых концов ДНК-дуплекса. Альтернативно такой результат может быть связан с наличием структурных изменений в NCP, содержащей ДНК с кластером AP-сайтов. Таким образом, совокупность полученных данных позволяет предположить, что PARP3 может взаимодействовать с AP-сайтами и/или октамером гистонов NCP, но вряд ли способен направленно конкурировать с белками PARP1 и PARP2 за взаимодействие с интермедиатами начальных стадий BER после действия APE1.

Таким образом, совокупность всех результатов, представленных в работе, говорит о разном характере взаимодействия ДНК-зависимых белков семейства PARP с повреждёнными ДНК в нуклеосомном контексте: PARP1 взаимодействует преимущественно с тупыми концами ДНК-дуплекса; PARP2 взаимодействует с повреждениями в структуре NCP и/или октамерами гистонов; PARP3 способен распознавать AP-сайты ДНК в нуклеосомном контексте и/или октамеры гистонов.

Финансирование. Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (грант № 20-04-00674) и Проекта государственного задания ИХБФМ СО РАН № 121031300041-4.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

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

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Lindahl, T. (1993) Instability and decay of the primary structure of DNA, *Nature*, **362**, 709-715, doi: 10.1038/362709a0.
2. Wilson, D. M., and Barsky, D. (2001) The major human abasic endonuclease: formation, consequences and repair of abasic lesions in DNA, *Mutat. Res.*, **485**, 283-307, doi: 10.1016/s0921-8777(01)00063-5.
3. Schärer, O. D. (2003) Chemistry and biology of DNA repair, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, **42**, 2946-2974, doi: 10.1002/anie.200200523.
4. Kim, Y.-J., and Wilson, D. M. (2012) Overview of base excision repair biochemistry, *Curr. Mol. Pharmacol.*, **5**, 3-13, doi: 10.2174/1874467211205010003.
5. Shall, S. S., and de Murcia, G. (2000) Poly(ADP-ribose) polymerase-1: what have we learned from the deficient mouse model? *Mutat. Res.*, **460**, 1-15, doi: 10.1016/s0921-8777(00)00016-1.
6. Khodyreva, S. N., and Lavrik, O. I. (2016) Poly(ADP-Ribose) polymerase 1 as a key regulator of DNA repair, *Mol. Biol. (Mosk)*, **50**, 580-595, doi: 10.7868/S0026898416040030.
7. Amé, J. C., Rolli, V., Schreiber, V., Niedergang, C., Apiou, F., et al. (1999) PARP-2, a novel mammalian DNA damage-dependent poly(ADP-ribose) polymerase, *J. Biol. Chem.*, **274**, 17860-17868, doi: 10.1074/jbc.274.25.17860.
8. Rouleau, M., McDonald, D., Gagné, P., Ouellet, M. E., Droit, A., et al. (2007) PARP-3 associates with polycomb group bodies and with components of the DNA damage repair machinery, *J. Cell. Biochem.*, **100**, 385-401, doi: 10.1002/jcb.21051.
9. Beck, C., Robert, I., Reina-San-Martin, B., Schreiber, V., and Dantzer, F. (2014) Poly(ADP-ribose) polymerases in double-strand break repair: focus on PARP1, PARP2 and PARP3, *Exp. Cell Res.*, **329**, 18-25, doi: 10.1016/j.yexcr.2014.07.003.
10. Isabelle, M., Moreel, X., Gagné, J. P., Rouleau, M., Ethier, C., et al. (2010) Investigation of PARP-1, PARP-2, and PARG interactomes by affinity-purification mass spectrometry, *Proteome Sci.*, **8**, 22-32, doi: 10.1186/1477-5956-8-22.
11. Grundy, G. J., Polo, L. M., Zeng, Z., Rulten, S. L., Hoch, N. C., et al. (2016) PARP3 is a sensor of nicked nucleosomes and monoribosylates histone H2B(Glu2), *Nat. Commun.*, **7**, 12404-12415, doi: 10.1038/ncomms12404.
12. Van Beek, L., McClay, E., Patel, S., Schimpl, M., Spagnolo, L., et al. (2021) A PARP power: Structural perspective on PARP1, PARP2, and PARP3 in DNA damage repair and nucleosome remodelling, *Int. J. Mol. Sci.*, **22**, 5112, doi: 10.3390/ijms22105112.
13. Huang, X., LeDuc, R. D., Fornelli, L., Schunter, A. J., Bennett, R. L., et al. (2019) Defining the NSD2 interactome: PARP1 PARylation reduces NSD2 histone methyltransferase activity and impedes chromatin binding, *J. Biol. Chem.*, **294**, 12459-12471, doi: 10.1074/jbc.RA118.006159.
14. Boehler, C., Gauthier, L. R., Mortusewicz, O., Biard, D. S., Saliou, J.-M., et al. (2011) Poly(ADP-ribose) polymerase 3 (PARP3), a newcomer in cellular response to DNA damage and mitotic progression, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **108**, 2783-2788, doi: 10.1073/pnas.1016574108.
15. Cistulli, C., Lavrik, O. I., Prasad, R., Hou, E., and Wilson, S. H. (2004) AP endonuclease and poly(ADP-ribose) polymerase-1 interact with the same base excision repair intermediate, *DNA Repair (Amst)*, **3**, 581-591, doi: 10.1016/j.dnarep.2003.09.012.
16. Khodyreva, S. N., Prasad, R., Ilina, E. S., Sukhanova, M. V., Kutuzov, M. M., et al. (2010) Apurinic/apyrimidinic (AP) site recognition by the 5′-dRP/AP lyase in poly(ADP-ribose) polymerase-1 (PARP-1), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **107**, 22090-22095, doi: 10.1073/pnas.1009182107.
17. Sukhanova, M., Khodyreva, S., and Lavrik, O. (2010) Poly(ADP-ribose) polymerase 1 regulates activity of DNA polymerase β in long patch base excision repair, *Mutat. Res.*, **685**, 80-89, doi: 10.1016/j.mrfmmm.2009.08.009.
18. Lavrik, O. I., Prasad, R., Sobol, R. W., Horton, J. K., Ackerman, E. J., et al. (2001) Photoaffinity labeling of

mouse fibroblast enzymes by a base excision repair intermediate. Evidence for the role of poly(ADP-ribose) polymerase-1 in DNA repair, *J. Biol. Chem.*, **276**, 25541-25548, doi: 10.1074/jbc.M102125200.
19. Hanzlikova, H., Kalasova, I., Demin, A. A., Pennicott, L. E., Cihlarova, Z., et al. (2018) The importance of poly(ADP-ribose) polymerase as a sensor of unligated Okazaki fragments during DNA replication, *Mol. Cell*, **71**, 319-331, doi: 10.1016/j.molcel.2018.06.004.
20. Hakmé, A., Wong, H. K., Dantzer, F., and Schreiber, V. (2008) The expanding field of poly(ADP-ribosyl)ation reactions. "Protein Modifications: Beyond the Usual Suspects" Review Series, *EMBO Rep.*, **9**, 1094-1100, doi: 10.1038/embor.2008.191.
21. Sukhanova, M. V., Abrakhi, S., Joshi, V., Pastre, D., Kutuzov, M. M., et al. (2016) Single molecule detection of PARP1 and PARP2 interaction with DNA strand breaks and their poly(ADP-ribosyl)ation using high-resolution AFM imaging, *Nucleic Acids Res.*, **44**, 1-12, doi: 10.1093/nar/gkv1476.
22. Sukhanova, M. V., Hamon, L., Kutuzov, M. M., Joshi, V., Dobra, I., et al. (2019) A single-molecule atomic force microscopy study of PARP1 and PARP2 recognition of base excision repair DNA intermediates, *J. Mol. Biol.*, **431**, 2655-2673, doi: 10.1016/j.jmb.2019.05.028.
23. Kutuzov, M. M., Khodyreva, S. N., Amé, J.-C., Ilina, E. S., Sukhanova, M. V., et al. (2013) Interaction of PARP-2 with DNA structures mimicking DNA repair intermediates and consequences on activity of base excision repair proteins, *Biochimie*, **95**, 1208-1215, doi: 10.1016/j.biochi.2013.01.007.
24. Langelier, M. F., Riccio, A. A., and Pascal, J. M. (2014) PARP-2 and PARP-3 are selectively activated by 5′ phosphorylated DNA breaks through an allosteric regulatory mechanism shared with PARP-1, *Nucleic Acids Res.*, **42**, 7762-7775, doi: 10.1093/nar/gku474.
25. Yélamos, J., Schreiber, V., and Dantzer, F. (2008) Toward specific functions of poly(ADP-ribose)polymerase-2, *Trends Mol. Med.*, **14**, 169-178, doi: 10.1016/j.molmed.2008.02.003.
26. Kutuzov, M. M., Khodyreva, S. N., Schreiber, V., and Lavrik, O. I. (2014) The role of PARP2 in DNA repair, *Mol. Biol. (Mosk)*, **48**, 561-572, doi: 10.1134/S0026893314040062.
27. Talhaoui, I., Lebedeva, N. A., Zarkovic, G., Saint-Pierre, C., Kutuzov, M. M., et al. (2016) Poly(ADP-ribose) polymerases covalently modify strand break termini in DNA fragments *in vitro*, *Nucleic Acids Res.*, **44**, 9279-9295, doi: 10.1093/nar/gkw67523.
28. Belousova, E. A., Ishchenko, A. A., and Lavrik, O. I. (2018) DNA is a new target of Parp3, *Sci. Rep.*, **8**, 4176-4187, doi: 10.1038/s41598-018-22673-3.
29. Zarkovic, G., Belousova, E. A., Talhaoui, I., Saint-Pierre, C., Kutuzov, M. M., et al. (2018) Characterization of DNA ADP-ribosyltransferase activities of PARP2 and PARP3: new insights into DNA ADP-ribosylation, *Nucleic Acids Res.*, **46**, 2417-2431, doi: 10.1093/nar/gkx1318.
30. McGinty, R. K., and Tan, S. (2015) Nucleosome structure and function, *Chem. Rev.*, **115**, 2255-2273, doi: 10.1021/cr500373h.
31. Kutuzov, M. M., Kurgina, T. A., Belousova, E. A., Khodyreva, S. N., and Lavrik, O. I. (2019) Optimization of nucleosome assembly from histones and model DNAs and estimation of the reconstitution efficiency, *Biopolym. Cell*, **35**, 91-98, doi: 10.7124/bc.00099A.
32. Beard, B. C., Wilson, S. H., and Smerdon, M. J. (2003) Suppressed catalytic activity of base excision repair enzymes on rotationally positioned uracil in nucleosomes, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **100**, 7465-7470, doi: 10.1073/pnas.1330328100.
33. Cole, H. A., Tabor-Godwin, J. M., and Hayes, J. J. (2010) Uracil DNA glycosylase activity on nucleosomal DNA depends on rotational orientation of targets, *J. Biol. Chem.*, **285**, 2876-2885, doi: 10.1074/jbc.M109.073544.
34. Hinz, J. M. (2014) Impact of abasic site orientation within nucleosomes on human APE1 endonuclease activity, *Mutat. Res.*, **766**, 19-24, doi: 10.1016/j.mrfmmm.2014.05.008.
35. Clark, N. J., Kramer, M., Muthurajan, U. M., and Luger, K. (2012) Alternative modes of binding of poly(ADP-ribose) polymerase 1 to free DNA and nucleosomes, *J. Biol. Chem.*, **287**, 32430-32439, doi: 10.1074/jbc.M112.397067.
36. D'Amours, D., Desnoyers, S., D'Silva, I., and Poirier, G. G. (1999) Poly(ADP-ribosyl)ation reactions in the regulation of nuclear functions, *Biochem. J.*, **342**, 249-268.
37. Messner, S., Altmeyer, M., Zhao, H., Pozivil, A., Roschitzki, B., et al. (2010) PARP1 ADP-ribosylates lysine residues of the core histone tails, *Nucleic Acids Res.*, **38**, 6350-6362, doi: 10.1093/nar/gkq463.
38. Kutuzov, M. M., Belousova, E. A., Kurgina, T. A., Ukraintsev, A. A., Vasil'eva, I. A., et al. (2021) The contribution of PARP1, PARP2 and poly(ADP-ribosyl)ation to base excision repair in the nucleosomal context, *Sci. Rep.*, **11**, 4849-4865, doi: 10.1038/s41598-021-84351-1.
39. Amé, J.-C., Kalisch, T., Dantzer, F., and Schreiber, V. (2011) Purification of recombinant poly(ADP-ribose) polymerases, *Methods Mol. Biol.*, **780**, 135-152, doi: 10.1007/978-1-61779-270-0_9.
40. Laemmli, U. K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4, *Nature*, **227**, 680-685, doi: 10.1038/227680a0.
41. Dey, B., Thukral, S., Krishnan, S., Chakrobarty, M., Gupta, S., et al. (2012) DNA–protein interactions: Methods for detection and analysis, *Mol. Cell. Biochem.*, **365**, 279-299, doi: 10.1007/s11010-012-1269-z.
42. Zhou, C., Sczepanski, J. T., and Greenberg, M. M. (2012) Mechanistic studies on histone catalyzed cleavage of apyrimidinic/apurinic sites in nucleosome core particles, *J. Am. Chem. Soc.*, **134**, 16734-16741, doi: 10.1021/ja306858m.
43. Sczepanski, J. T., Zhou, C., and Greenberg, M. M. (2013) Nucleosome core particle – catalyzed strand scission at abasic sites, *Biochemistry*, **52**, 2157-2164, doi: 10.1021/bi3010076.
44. Yang, K., and Greenberg, M. M. (2018) Enhanced cleavage at abasic sites within clustered lesions in nucleosome core particles, *Chembiochem*, **19**, 2061-2065, doi: 10.1002/cbic.201800338.
45. Kutuzov, M. M., Khodyreva, S. N., Ilina, E. S., Sukhanova, M. V., Amé, J.-C., et al. (2015) Interaction of PARP-2 with AP site containing DNA, *Biochimie*, **112**, 10-19, doi: 10.1016/j.biochi.2015.02.010.
46. Wiederhold, L., Leppard, J. B., Kedar, P., Karimi-Busheri, F., Rasouli-Nia, A., et al. (2004) AP endonuclease-independent DNA base excision repair in human cells, *Mol. Cell*, **15**, 209-220, doi: 10.1016/j.molcel.2004.06.003.
47. Khodyreva, S. N., and Lavrik, O. I. (2020) Non-canonical interaction of DNA repair proteins with intact and cleaved AP sites, *DNA Repair (Amst)*, **90**, 102847-102861, doi: 10.1016/j.dnarep.2020.102847.
48. Fromme, J. C., and Verdine, G. L. (2004) Base excision repair, *Adv. Protein Chem.*, **69**, 1-41, doi: 10.1016/S0065-3233(04)69001-2.
49. Krokeide, S. Z., Bolstad, N., Laerdahl, J. K., Bjørås, M., and Luna, L. (2009) Expression and purification of NEIL3, a human DNA glycosylase homolog, *Protein Expr. Purif.*, **65**, 160-164, doi: 10.1016/j.pep.2008.11.014.
50. Piersen, C. E., McCullough, A. K., and Lloyd, R. S. (2000) AP lyases and dRPases: Commonality of mechanism,

Mutat. Res., **459**, 43-53, doi: 10.1016/s0921-8777(99)00054-3.
51. Khodyreva, S. N., and Lavrik, O. I. (2011) Affinity modification in a proteomic study of DNA repair ensembles, *Bioorg. Khim.*, **37**, 91-107, doi: 10.1134/s1068162011010109.
52. Galas, D. J., and Schmitz, A. (1978) DNAse footprinting: a simple method for the detection of protein-DNA binding specificity, *Nucleic Acids Res.*, **5**, 3157-3170, doi: 10.1093/nar/5.9.3157.
53. Maluchenko, N. V., Nilov, D. K., Pushkarev, S. V., Kotova, E. Y., Gerasimova, N. S., et al. (2021) Mechanisms of nucleosome reorganization by PARP1, *Int. J. Mol. Sci.*, **22**, 12127, doi: 10.3390/ijms222212127.
54. Gaullier, G., Roberts, G., Muthurajan, U. M., Bowerman, S., Rudolph, J., et al. (2020) Bridging of nucleosome-proximal DNA double-strand breaks by PARP2 enhances its interaction with HPF1, *PLoS One*, **15**, doi: 10.1371/journal.pone.0240932.

THE STUDY OF THE INTERACTION PARP FAMILY DNA-DEPENDENT PROTEINS WITH NUCLEOSOMES CONTAINING DNA-INTERMEDIATES OF THE INITIAL STAGES OF THE BER PROCESS

A. A. Ukraintsev[1#], E. A. Belousova[1#], M. M. Kutuzov[1], and O. I. Lavrik[1,2*]

[1] *Institute of Chemical Biology and Fundamental Medicine Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences, 630090 Novosibirsk, Russia; e-mail: lavrik@niboch.nsc.ru*

[2] *Novosibirsk State University, 630090 Novosibirsk, Russia*

The cellular signal at the DNA damage response is the reaction of (ADP-ribosyl)ation catalyzed by PARP's family DNA-dependent proteins – PARP1, PARP2, and PARP3. These proteins are involved in the base excision repair process, BER. Despite of the extensive research, it remains unknown how PARPs are involved in BER regulation and how roles are distributed between DNA-dependent family members. Here, we investigated the interaction of PARP's family DNA-dependent proteins with nucleosome core particles containing DNA intermediates of the BER initial stages. To do that, the nucleosomes containing damage in the vicinity of the duplex blunt end were reconstituted based on the Widom "Clone 603" DNA sequence. The dissociation constants of PARP complexes with nucleosomes bearing DNA contained uracil (Native), AP-site, or single nucleotide gap (Gap), were determined. It was shown that the affinity of proteins for the nucleosomes was increased in row PARP3<<PARP2<PARP1; and the affinity of each protein for the specific damage type was increased in the row Native = AP-site < Gap for PARP1 and PARP2, Gap <<< Native = AP-site for PARP3. The interaction regions of each PARP protein with the nucleosome were also determined by sodium borohydride cross-linking and footprinting assay. Based on the obtained and published data, the involvement pattern of PARP1, PARP2, and PARP3 into the interaction with NCPs containing DNA intermediates of the BER process was discussed.

Keywords: nucleosome, PARP1, PARP2, PARP3, BER

EDN: XATVLX
БИОХИМИЯ, 2022, том 87, вып. 3, с. 337 – 355

УДК 576.5

НЕАПОПТОТИЧЕСКАЯ РОЛЬ АПОПТОТИЧЕСКИХ ПРОЦЕССОВ

Обзор

© 2022 М.А. Савицкая, И.И. Захаров, Г.Е. Онищенко*

Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, биологический факультет, 119234 Москва, Россия; электронная почта: galina22@mail.ru

Поступила в редакцию 21.06.2021
После доработки 02.01.2022
Принята к публикации 15.01.2022

Апоптоз – наиболее подробно охарактеризованный вариант регулируемой клеточной гибели. Ряд событий, которые широко используются исследователями для идентификации апоптоза и которые традиционно считались необратимыми, такие как появление фосфатидилсерина во внешнем монослое плазматической мембраны, пермеабилизация внешней мембраны митохондрий, активация каспаз, фрагментация ДНК и блеббинг цитоплазмы, как выясняется, также могут участвовать в процессах нормальной жизнедеятельности клетки, не связанных с индукцией апоптоза и с гибелью клеток в целом. Более того, такие процессы нередко оказываются обратимыми. В данном обзоре описаны события, характерные для апоптоза, однако не приводящие к гибели, но играющие немаловажную роль в дифференцировке, делении и подвижности клеток, а также участвующие в процессах воспаления, клиренса стареющих эритроцитов и свертывания крови, в инфицировании клеток вирусами и в неапоптотической гибели клеток. В статье уделяется внимание трем процессам: экстернализации фосфатидилсерина, блеббингу и активации каспаз. Нарушение проницаемости внешней митохондриальной мембраны и фрагментация ДНК в настоящем обзоре не обсуждаются.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: апоптоз, активация каспаз, MOMP, экстернализация фосфатидилсерина, блеббинг.
DOI: 10.31857/S0320972522030034

ВВЕДЕНИЕ

Апоптоз – это наиболее полно охарактеризованный вариант регулируемой клеточной гибели [1]. Апоптоз играет крайне важную роль в развитии организма в ходе онтогенеза и в поддержании гомеостаза. Он представляет собой определенную последовательность событий, происходящих как на молекулярном, так и на морфологическом уровне. Многие из этих событий рассматриваются как характерные признаки апоптоза, и их обнаружение часто используется для идентификации исследуемого типа гибели клеток в качестве апоптотической. Апоптоз может происходить с участием множества механизмов и сигнальных путей, но в большинстве случаев для него характерно появление фосфатидилсерина (ФС) в наружном монослое плазматической мембраны, считающееся одним из наиболее ранних апоптотических событий, пермеабилизация внешней мембраны митохондрий (MOMP), блеббинг цитоплазмы, фрагментация ДНК и активация каспаз. Экстернализация ФС служит для узнавания гибнущей клетки фагоцитами и соседними клетками (сигнал «eat me»), в то время как MOMP обеспечивает выход в цитоплазму белков межмембранного пространства. Часть из этих белков (AIF, ENDOG) способны разрушать мишени напрямую – в частности, наряду с ДНКазой CAD вызывать фрагментацию ДНК, в то время как другие (цитохром *c*) способствуют активации каспаз – цистеиновых протеиназ, вызывающих разрушение белков клетки.

Данные признаки считаются характерными для апоптоза и часто используются при доказательстве апоптотической гибели клеток [2]. Тем не менее уже достаточно долгое время известно, что все перечисленные события могут происходить и вне апоптотического контекста. При этом можно выделить два аспекта: участие в процессах нормальной жизнедеятельности клетки, таких как подвижность, деление, дифференцировка; и участие в неапоптотических формах регулируемой клеточной гибели. Инте-

Принятые сокращения: ФС – фосфатидилсерин; ЭПР – эндоплазматический ретикулум; AIF – фактор, индуцирующий апоптоз; BCR – рецептор В-клетки; ENDOG – эндонуклеаза G; IAPs – ингибиторы апоптоза; IL – интерлейкин; TNFα – фактор некроза опухоли α; MHC – главный комплекс гистосовместимости; MOMP – пермеабилизация внешней мембраны митохондрий; PARP – поли(ADP-рибоза)-полимераза; RAC – Ras-ассоциированный субстрат ботулотоксина C3; TLR – toll-подобный рецептор.

* Адресат для корреспонденции.

ресно, что данные события могут быть обратимыми – как будучи частью не связанных с гибелью клетки физиологических процессов, так и при регулируемой гибели, в том числе при апоптозе. Проблема обратимости апоптоза подробно рассмотрена в нашем другом обзоре [3]; здесь же мы остановимся на характеристике роли таких апоптотических событий, как экстернализация ФС, блеббинг и активация каспаз, в неапоптотических процессах.

ЭКСТЕРНАЛИЗАЦИЯ ФОСФАТИДИЛСЕРИНА

Для плазматической мембраны живых клеток характерна асимметрия распределения липидных молекул. Так, фосфатидилхолин и сфингомиелин расположены преимущественно в наружном монослое, в то время как большая часть фосфатидилэтаноламина (ФЭ) и практически весь ФС локализуются во внутреннем. Так, молекулы ФС составляют всего ~4% всех фосфолипидов клеточной мембраны, при этом во внутреннем монослое ФС формирует ~20–30% всех молекул фосфолипидов, а во внешнем – лишь 0–2%. Такое распределение обеспечивается с помощью термодинамических ловушек, активного транспорта и низкой подвижности липидов между двумя монослоями [4]. Появление ФС во внешнем монослое клеток, находящихся на ранних стадиях апоптоза, было описано в 1992 г. [5].

Переход ФС в наружный монослой плазматической мембраны на протяжении долгого времени считался характерным и уникальным маркером апоптоза. Наряду с другими сигналами «eat me», такими как аминосахара, манноза, кальретикулин, молекула межклеточной адгезии ICAM3 (intercellular adhesion molecule 3), Tubby и TULP1 (Tubby-like protein 1), а также молекулами-«мостиками» GAS6, белком S, MFGE8 (milk fat globule EGF factor 8) [6], экстернализованный ФС способствует распознаванию и фагоцитозу (эфероцитозу) гибнущих клеток. Благодаря этому апоптотическая гибель не сопровождается воспалительным ответом.

Тем не менее обнаружено, что ФС может переходить в наружный монослой плазматической мембраны и в ходе процессов, не связанных с апоптозом, таких как дифференцировка клеток, в т.ч. слияние клеток с формированием симпласта [4, 7, 8] и накопление минеральных веществ остеобластами [9], активация ооцитов [10] и тромбоцитов [11], ишемическое повреждение [12], злокачественная трансформация [13, 14], миграция клеток [15]. ФС на поверхности клеток не распознается макрофагами в том случае, если он связан с ФС-связывающими белками [6]. Появление ФС в наружном монослое плазматической мембраны также встречается при неапоптотических формах гибели клеток, например, некроптозе (регулируемом некрозе) [16]. Во многих случаях появление ФС в наружном монослое плазматической мембраны живых клеток имеет сигнальное значение [4].

Несмотря на то что появление ФС в наружном монослое плазматической мембраны в качестве характерного признака апоптоза известно давно, к пониманию молекулярного механизма этого процесса исследователи приблизились только в течение последнего десятилетия. В живой неапоптотической клетке асимметрия плазматической мембраны поддерживается АТР-зависимыми аминофосфолипидтранслоказами, или флиппазами, которые осуществляют транспорт фосфолипидов в соответствующий монослой против градиента концентрации. В частности, важную роль в таком переносе играют члены семейства P-ATPаз IV типа, ATP11C (adenosine triphosphatase type 11C) и ATP11A (adenosine triphosphatase type 11A), а также их шаперон CDC50A (cell division cycle protein 50A). Эти белки обеспечивают флип-флоп ФС и ФЭ из внешнего монослоя плазматической мембраны во внутренний [17]. ATP11C и ATP11A имеют сайты узнавания каспазами; в клетках, содержащих устойчивые к действию каспаз формы ATP11A/C, экстернализация ФС не происходит. Segawa et al. показали, что клетки хронической миелогенной лейкемии человека KBM7, дефицитные по ATP11A и ATP11C, демонстрируют снижение флиппазной активности без исчезновения асимметрии. Таким образом, инактивации флиппаз недостаточно для быстрой экстернализации ФС; пассивная транслокация происходит слишком медленно. При этом в CDC50A-дефицитных клетках флиппазная активность плазматической мембраны исчезает, и ФС постоянно присутствует на их поверхности. По-видимому, ATP11C принадлежит большая часть флиппазной активности, но при этом в клетке присутствуют и другие, менее активные флиппазы, которые тем не менее способны к поддержанию липидной асимметрии [6]. Показано, что белки TMEM16F (transmembrane protein 16F) и XKR8 (XK-related protein 8) способны к неспецифическому транспорту фосфолипидов между монослоями мембраны и, таким образом, могут считаться скрамблазами. Скрамблаза TMEM16F является Ca^{2+}-зависимой; для большинства случаев экстернализации ФС показано, что переход ФС в наружный монослой плазматической мембраны стимулируется ионами Ca^{2+} [18–20]. Таким об-

разом, можно предположить, что в создании липидной асимметричности наряду с флиппазами участвуют определенные варианты скрамблаз.

В настоящее время механизм работы TMEM16 описан достаточно подробно. Этот фермент создает в мембране гидрофильный «вырез». Когда такой гидрофильный путь открывается, «головкам» молекул липидов предоставляется «мостик» между монослоями, в то время как их углеводородные «хвосты» остаются в гидрофобном центре. После создания «мостика» фосфолипиды неселективно перемещаются по своим градиентам концентрации, предварительно созданным транспортерами [4].

В отличие от скрамблазы TMEM16, белки из семейства XKR активируются каспазами и обеспечивают экстернализацию ФС при апоптозе; эти скрамблазы различаются по своим механизмам действия, что позволяет им работать независимо друг от друга. Помимо каспаз, белки XKR могут активироваться с помощью фосфорилирования; хотя биологический смысл такого пути остается неясным. В активном состоянии они производят неспецифический скремблинг фосфолипидов, в результате чего, среди прочего, ФС попадает в наружный монослой плазматической мембраны.

Хотя как Ca^{2+}-зависимые, так и каспазозависимые скрамблазы обеспечивают экстернализацию ФС, сигнальная роль ФС при этом значительно отличается. Так, отличается время, необходимое для появления ФС в наружном монослое, пространственная организация этого процесса и его обратимость. Например, экстернализация ФС под действием Ca^{2+}-зависимых скрамблаз происходит в течение 5–15 мин после стимуляции, в то время как при апоптозе и действии каспазозависимых скрамблаз ФС появляется на поверхности клетки не менее чем через час. Скорее всего, такое временно́е различие обусловливается разницей в скорости высвобождения Ca^{2+} и многоступенчатой активацией каскада каспаз с последующим расщеплением ими субстратов. Различия между этими сигнальными процессами выражаются и в пространственном распределении ФС по поверхности плазматической мембраны клетки. При неапоптотической экстернализации ФС образуются дискретные, точечные области, богатые ФС, в то время как при апоптозе ФС распределяется по поверхности клетки равномерно и в большом количестве. Каким именно образом ФС формирует отдельные области, остается неясным. Экстернализованный ФС может преимущественно скапливаться в отдельных доменах плазматической мембраны, таких как рафты, обогащенные холестерином. И действительно, липидные рафты оказались обогащены и ФС, и TMEM16F. Также богатые ФС точки могут формироваться и стабилизироваться с помощью связывания с белками, такими как аннексин A5. Наконец, домены ФС могут быть результатом локальной активации Ca^{2+}-зависимых скрамблаз и деактивации P4-АТРаз. Сигналинг с участием Ca^{2+} может обеспечивать обратимость локальной экстернализации ФС: если ФС будет диффундировать за пределы соответствующего домена, вне зоны повышенной концентрации Ca^{2+}, транспортеры будут возвращать его во внутренний монослой. При апоптозе же ФС обычно обнаруживается по всему наружному монослою плазматической мембраны, и такая экстернализация будет уже необратимой. По-видимому, данное различие связано с тем, как по-разному в каждом случае ингибируются P4-АТРазы, которые предотвращают переход ФС в наружный монослой. При неапоптотической экстернализации ФС P4-АТРазы ингибируются связыванием с ионами Ca^{2+} – как прямым, так и непрямым, и этот процесс является обратимым. В ходе же апоптоза P4-АТРазы расщепляются каспазами и теряют способность выполнять свою функцию. Таким образом, в первом случае, при отсутствии апоптоза, зависимые от Ca^{2+} скрамблазы сохраняют способность работать в качестве транзиторного клеточного сигнала, в то время как каспазозависимые скрамблазы делают экстернализацию ФС сигналом постоянным и необратимым.

Помимо активности скрамблаз, экстернализация ФС может происходить и за счет других механизмов. Так, поскольку ФС концентрируется в люминальном монослое мембраны некоторых органелл клетки, обогащенные ФС зоны могут возникать в местах слияния этих органелл с плазматической мембраной. И действительно, кластеры ФС характерны для сайтов слияния везикул и плазматической мембраны. Стоит отметить, что в последнем случае появление ФС в наружном монослое может сопровождаться активностью PLSCR-1 как в плазматической мембране, так и в мембране везикулы. Также сайты, обогащенные ФС, могут соответствовать местам отщепления внеклеточных везикул. Механизмы экстернализации ФС во многих биологических процессах остаются неясными – как, например, у *C. elegans* в поврежденных аксонах с участием ABC-транспортера CED-7, при индукции галектином в клетках лейкемии человека HL-60, при введении вирусных белков (Gag ВИЧ или VP40 вируса Эбола) в клетки гепатокарциномы человека, эмбриональных почек человека, легкого человека и яичников китайского хомячка [4].

В ряде случаев ФС играет роль в дифференцировке клеток. Так, ФС участвует в слиянии миобластов с формированием миотубул. Экстернализация ФС при этом происходит, согласно некоторым данным, транзиторно [8], а согласно другим – на протяжении по крайней мере 48 ч в условиях, при которых активно формируются миотубулы [21, 22]. При этом его наибольшая концентрация наблюдается в области контакта между соседними миобластами [8, 22]. Отметим, что признаки апоптоза, такие как нарушение проницаемости митохондриальных мембран, конденсация хроматина или активация каспазы 3, в миобластах не наблюдаются [8]. Фосфолипид узнается рецепторами ФС, что запускает сигнальный каскад, приводящий к слиянию миобластов. На поверхности клетки ФС ингибирует активность механочувствительного Ca^{2+}-канала PIEZO1, который служит ключевым регулятором формирования миотубул. По-видимому, в ингибировании важную роль играет сериновая группа в молекуле ФС. Активация PIEZO1 происходит при транслокации ФС во внутренний монослой с участием флиппазного комплекса ATP11A и CDC50A. PIEZO1 опосредует ток Ca^{2+} в клетку и способствует сборке актомиозиновых комплексов при участии RhoA/ROCK. Таким образом, в данном случае флип-флоп ФС служит молекулярным переключателем для активации PIEZO1 и морфогенеза поперечно-полосатых мышечных волокон [20]. Экстернализация ФС обнаруживается также в кардиомиобластах и может участвовать в формировании вставочных дисков между кардиомиоцитами, способствуя таким образом организации функциональных волокон миокарда [8].

Интересно, что ФС участвует не только в слиянии одних клеток с другими, но также и в проникновении в клетку вирусов, которое требует слияния мембран. Среди таких вирусов – ВИЧ, вирусы Зика, Эбола и множество других оболочечных вирусов; для их проникновения в клетку необходимо присутствие ФС в мембране вируса, которое обеспечивается скрамблазами (такими как Xkr8) и наличием рецепторов ФС на поверхности клетки-хозяина. Для проникновения некоторых вирусов требуется также присутствие ФС в наружном монослое плазматической мембраны клетки-хозяина, которое может вызываться взаимодействием вируса с клеткой; так, например, гликопротеин H альфа-герпесвируса связывается с интегринами $\alpha4$ и $\beta1$, активирует сигналинг с участием Ca^{2+} и вызывает экстернализацию ФС на плазматической мембране клетки-хозяина. Блокирование сигнальных путей, связанных как с Ca^{2+}, так и с ФС, препятствует инфекции альфагерпесвирусом. Сходным образом, при проникновении в клетку ВИЧ-1 взаимодействия между вирусным белком gp120 и рецепторами CD4 и корецепторами, связанными с G-белком клетки-хозяина, запускают в инфицированных клетках сигнальный путь с участием Ca^{2+} и экстернализацию ФС с участием TMEM16F, что благоприятствует слиянию. Кроме того, считается, что ФС на мембране клетки-мишени способствует изменению структуры и олигомеризации фузогенов вирусов везикулярного стоматита и ВИЧ, притягивая их положительно заряженные области [4].

Экстернализованный ФС обнаруживается на поверхности созревающих В-лимфоцитов в красном костном мозге при лимфопоэзе на стадии перехода от про-В к пре-В; при этом его содержание ниже, нежели у клеток, гибнущих в процессе апоптоза [19]. По-видимому, увеличение концентрации Ca^{2+}, способствующее экстернализации ФС, происходит вследствие активации сигнальных путей при переходе пре-BCR в BCR. В костном мозге в ходе развития в предшественниках В-лимфоцитов после стадии пре-про-В исчезает экспрессия ATP11A. Также ФС присутствует в наружном монослое плазматической мембраны зрелых В-лимфоцитов, активированных с помощью антител к IgM, где он располагается в составе микродоменов вблизи IgM, CD19 и MHCI [19]. Segawa et al. показали, что при активации В-лимфоцитов Ca^{2+}-зависимая скрамблаза обеспечивает экстернализацию ФС, а флиппазы плазматической мембраны быстро возвращают его во внутренний монослой [19]. Недавно было обнаружено, что у ATP11C-дефицитных мышей развивается В-клеточная лимфопения. Выяснено, что при отсутствии ATP11C популяция предшественников В-клеток, несущих на поверхности ФС, значительно увеличивается. В норме ATP11C обеспечивает интернализацию ФС, в то время как у *Atp11c*$^{-/y}$ В-клеточных предшественников ФС сохраняется в наружном монослое; такие клетки эффективно поглощаются макрофагами, что и приводит к лимфопении [19].

Примечательно, что экстернализация ФС участвует не только в созревании иммунных клеток, но и в их активации. Так, ФС транзиторно появляется в наружном монослое плазматической мембраны нейтрофилов под действием хемотаксического пептида fMet-Leu-Phe (fMLP). В активированных нейтрофилах и некоторых лейкоцитарных клеточных линиях человека ряд белков семейства галектинов (галектины 1, 2 и 4) вызывают экстернализацию ФС [22].

ФС присутствует в наружном монослое плазматической мембраны в субпопуляции Т-лимфоцитов, где он необходим для активации катионного канала P2X7, которая запускает воспаление [22].

ФС также играет роль в дифференцировке клеток костной ткани [9, 23]. Для слияния мононуклеарных предшественников остеокластов необходима DC-STAMP-зависимая неапоптотичекая экстернализация ФС (DC-STAMP, dendrocyte-expressed seven transmembrane protein). Кроме того, в этом процессе ключевую роль играют внеклеточные аннексины (A1 и A5), взаимодействующие с ФС, которые наряду с аннексин-связывающим белком S100A4 регулируют активность белка синцитина 1, участвующего в слиянии клеток. Судя по всему, комплексы аннексинов, связанных с ФС, и S100A4 формируют мостикоподобные структуры между сливающимися клетками, что вместе с изменением конформации синцитина 1 способствует процессу слияния [23]. У остеобластов появление ФС в наружном монослое плазматической мембраны принимает участие в образовании матричных пузырьков, мембрана которых богата экстернализованным ФС, и отложении гидроксиапатитов; экстернализация ФС показана также для образующих матричные пузырьки гипертрофированных хондроцитов. Возможно, ФС связывается с аннексинами, которые осуществляют ассоциацию матричных пузырьков с фибриллами коллагена. Известно, что комплекс ФС–аннексин–коллаген может регулировать ток Ca^{2+} в матричные пузырьки и в клетки *in vitro*, влияя таким образом на его концентрацию как в самих клетках, так и в мембранных компонентах внеклеточного матрикса [9, 18].

Также экстернализация ФС обнаружена у макрофагов, сливающихся с образованием гигантских клеток инородных тел [24], и у трофобластов, образующих синцитиотрофобласт [25, 26].

Транзиторная Ca^{2+}-зависимая экстернализация ФС происходит в ооците мыши при партеногенетической активации или оплодотворении. Обработка ооцитов перед активацией джасплакинолидом, стабилизирующим F-актин, показала, что появление ФС в наружном монослое плазматической мембраны представляет собой актин-зависимый процесс. На стадии двух бластомеров ФС на поверхности клеток уже не выявляется [10]. Экстернализация ФС наблюдается также при капацитации сперматозоидов; в этом случае ФС локализуется вблизи акросомы и, вероятно, участвует в слиянии гамет [27].

ФС может присутствовать на поверхности некоторых нормальных постклеточных структур, в частности форменных элементов крови – эритроцитов и тромбоцитов, где он выступает в качестве кофактора превращения протромбина в тромбин протромбиназным комплексом при активации свертывания крови и способствует формированию вторичного тромба. Интересно, что свертывание крови, как и апоптоз, связано с высоким уровнем выделения внеклеточных везикул, содержащих на поверхности ФС [4]. Кроме того, ФС на поверхности активированных тромбоцитов, который скапливается в результате активации скрамблазы TMEM16F, служит каталитической платформой для запуска каскада свертывания крови. Активация TMEM16F происходит с помощью Ca^{2+}, который поступает в клетку из внеклеточной среды и ЭПР в результате открытия Ca^{2+} каналов. Такая оптимальная анионная поверхность способствует повышению уровня тромбина в миллион раз и дальнейшему процессу свертывания крови. Далее происходит блеббинг тромбоцитов и формирование экзовезикул или микрочастиц, которые продолжают усиливать образование тромбина [22, 28]. Вероятно, биологический смысл формирования таких структур состоит в увеличении площади каталитической поверхности. Роль липидной асимметрии в свертывании крови наглядно демонстрирует молекулярный механизм синдрома Скотта – заболевания с нарушением гемокоагуляции, описанного в 1979 г., для которого характерны тяжелые кровотечения. Исследования с участием пациентов с синдромом Скотта показали, что у них не происходит экстернализации ФС в плазматической мембране тромбоцитов вследствие нарушения активности скрамблазы; генетическими методами было показано, что у таких людей имеются гомозиготные или компаунд-гетерозиготные мутации в гене, кодирующем белок TMEM16F [28]. При синдроме Скотта также нарушается образование микрочастиц. Фенотип, похожий на таковой у пациентов с синдромом Скотта, наблюдается у мышей со специфической тромбоцитарной мутацией в *Tmem16f* [22].

У эритроцитов изменения распределения липидов по монослоям плазматической мембраны – в том числе экстернализация ФС – связаны с процессом старения. Для объяснения появления ФС в наружном монослое было предложено несколько механизмов. Один из них связан с окислительными процессами: известно, что при старении эритроцитов усиливается перекисное окисление липидов и окисление ФС, что делает его неспособным выступать в роли субстрата аминофосфолипидтранслоказы, переносящей ФС из наружного монослоя во внутренний. Это приводит к его удержанию в наружном монослое

и дальнейшему распознаванию макрофагами. Другой вероятный механизм связан с цитоскелетом, который играет немаловажную роль в поддержании асимметричного распределения липидов. ФС взаимодействует с одним из основных белков, связанных с цитоскелетом эритроцитов, – спектрином. К экстернализации ФС может приводить нарушение взаимодействий между плазматической мембраной эритроцита и цитоскелетом, связанное с формированием агрегатов белка полосы 3 при старении. У модельных мышей вследствие усиленной экстернализации ФС в эритроцитах, дефицитных по белку полосы 3, наблюдался обширный тромбоз и тяжелый гемолиз. Таким образом, это позволяет предположить роль белка полосы 3 в сохранении липидной асимметрии мембраны. Тем не менее при наследственном сфероцитозе эритроциты полностью сохраняют асимметричное распределение липидов, несмотря на нарушение структуры кортикального цитоскелета [29].

Увеличение уровня внутриклеточного Ca^{2+} в эритроцитах активирует скрамблазу: этот процесс похож на тот, что происходит при апоптозе. Механизм, который приводит к повышению концентрации Ca^{2+} при старении эритроцитов, неясен [29].

Эриптоз – процесс сжатия эритроцита и появления ФС на его поверхности вследствие поступления в эритроцит ионов кальция и активации скрамблазы, приводящей к перераспределению фосфолипидов в обоих монослоях мембраны. Эриптоз может участвовать в клиренсе эритроцитов при патологических состояниях, однако его роль при старении эритроцитов остается спорной [29].

Лактадгерин (MFGE8) – опсонин, который связывается с ФС, в том числе на поверхности эритроцитов. Опосредованный лактадгерином эритрофагоцитоз, как предполагается, может служить механизмом клиренса стареющих эритроцитов активированными клетками эндотелия. Тем не менее у дефицитных по лактадгерину мышей выживаемость эритроцитов нормальная; и, как упоминалось выше, вопрос о том, действительно ли у стареющих эритроцитов больше экстернализованного ФС, остается предметом оживленных споров [29].

Предполагают, что другие белки макрофагов, связывающие экстернализованный ФС, в том числе CD36, SR-B1, CD68, CD14, Mer, LOX-1 Bai1, TIM-4 RAGE и стабилин 2 могут также участвовать в клиренсе стареющих эритроцитов [29]. Кроме того, присутствие ФС в наружном монослое плазматической мембраны характерно для эритроцитов при серповидноклеточной анемии и талассемии [30, 31].

В норме экстернализация ФС может происходить у эндотелиоцитов в ответ на усиление токов Ca^{2+} под действием тромбина [32], гиперлипидемии [33] и нелитических концентраций компонента комплемента C5b-9 [34]. ФС опосредует прикрепление Т-лимфоцитов к активированным тромбином эндотелиальным клеткам [32], активирует систему комплемента, участвуя в лизисе ФС-положительных клеток [30]. Наконец, ФС в наружном монослое плазматической мембраны эндотелиоцитов участвует в обеспечении отрицательно заряженной липидной поверхности для сборки и активации комплексов свертывания крови [35].

ФС был найден на поверхности тучных клеток после их дегрануляции как у грызунов, так и у человека [35, 36]. Возможно, он присутствует во внутреннем монослое мембраны гранул, который при экзоцитозе становится внешним. Согласно другой версии, фосфолипиды перераспределяются между монослоями плазматической мембраны вследствие самого процесса слияния, или такое перераспределение является предпосылкой для слияния мембран. Экстернализация происходит транзиторно (в течение нескольких минут), обратимо и не связана с апоптотической гибелью [36].

Интересно, что ФС был обнаружен во внешнем монослое плазматической мембраны ряда опухолевых клеток, причем как в культуре, в том числе в первичной, так и в клетках метастазов. Таковы клетки лейкозов, меланомы, карциномы предстательной железы, желудка и почки, глиобластомы и рабдомиосаркомы [13, 14, 37–42]. При этом такие клетки не были апоптотическими. Интересно отметить, что при количественной оценке общего содержания фосфолипидов в меланоцитах человека (FOM101) и двух линиях клеток меланомы (SBcl-2 и WM164) не было обнаружено различия в содержании ФС у опухолевых клеток по сравнению с нормальными [13]. Таким образом, у злокачественных клеток оказывается измененным именно распределение ФС между монослоями плазматической мембраны, но не его общее содержание. При этом, как было показано с помощью метода флуоресцентной микроскопии, ФС, визуализируемый с помощью меченого аннексина V, локализуется на плазматической мембране опухолевых клеток в виде кластеров, которые способны отпочковываться в составе блебов и даже передаваться от одной клетки к другой. В связи с этим отметим, что блеббинг и последующее образование экзовезикул нередко сопровождает случаи потери мембраной асимметрии [41].

Оказалось, что существует корреляция между степенью злокачественности клеточных ли-

ний, полученных на разных стадиях прогрессии опухоли, и количеством экстернализованного ФС. Авторы предполагают, что такие клетки, возможно, должны были бы погибнуть, но определенным образом избегают всех последующих стадий апоптоза [14]. В этом случае можно говорить о явлении обратимости апоптоза – анастазе [3]. Таким образом, ФС может служить маркером злокачественности, а также стать потенциальной мишенью для разработки новых терапевтических подходов при лечении злокачественных новообразований [13].

Кроме того, *in vivo* ФС встречается на поверхности эндотелиальных клеток в сосудах опухоли [13, 14, 42]. Считается, что экстернализация ФС в эндотелиоцитах сосудов опухоли может быть вызвана воздействием цитокинов (TNFα и IL-1), гипоксии/реоксигенации, повышенной кислотности или кислородных радикалов [42].

Существует мнение, что в опухолях взаимодействие ФС с его рецептором активирует ряд иммуносупрессорных путей, которые могут использоваться опухолевыми клетками с целью избегания иммунного ответа. По-видимому, ФС может функционировать как важный иммунный чекпоинт и служить одной из мишеней опухолевой терапии [13].

Наконец, экстернализация ФС может присутствовать при отличных от апоптоза формах регулируемой гибели клеток, а также при дегенерации определенных частей клетки – как это происходит при дегенерации отростков нейронов. Так, при некроптозе ФС появляется в наружном монослое после поступления в клетку Ca^{2+} и активации и транслокации на мембрану псевдокиназы MLKL, но до нарушения целостности плазматической мембраны [43]. При некроптозе в этом процессе не участвуют активируемая Ca^{2+} скрамблаза TMEM16F [43] и каспазы [44]. Ключевые молекулы, которые отвечают за появление ФС в наружном монослое плазматической мембраны в этом случае, до сих пор остаются неизвестными. Авторы предполагают, что в экстернализации может участвовать MLKL, поскольку ФС появляется на поверхности клетки в течение 5 мин после активации данного белка, а ингибирование активации MLKL некросульфонамидом предотвращало экстернализацию ФС. Как и при апоптозе, при некроптозе ФС может играть роль сигнала «eat me» и способствовать фагоцитозу гибнущей клетки до нарушения ее целостности. Это, в свою очередь, снижает воспалительный ответ [43].

Есть данные, согласно которым экстернализация ФС и следующий за этим фагоцитоз встречаются при пироптозе [45] и ферроптозе [46]. Описана транслокация ФС во внешний монослой плазматической мембраны при онкозе [47], а также при неканонической гибели клеток острого миелоидного лейкоза под действием финголимода (FTY720) [48]. Механизмы этих процессов практически не изучены. При ферроптозе, в отличие от некроптоза, задействована TMEM16F, а в случае неканонической гибели показано, что для экстернализации ФС необходима активность фосфатазы PP2A и вакуолизация, связанная с нарушением эндоцитоза: так, при ингибировании PP2A и вакуолизации экстернализация ФС не происходит. Известно, что ФС обогащены рециклирующие эндосомы; авторы предполагают, что появление ФС в наружном монослое плазматической мембраны может быть связано с изменением его распределения в рециклирующих эндосомах, что, возможно, нарушает внутриклеточный транспорт мембран. При этом типе гибели клеток, как и при некроптозе, не требуется активация каспаз.

Недавно появились данные о связи экстернализации ФС и дегенерации нейритов. Поскольку находящийся на поверхности клетки ФС служит сигналом «eat me», он привлекает фагоциты к разрушающимся отросткам нейронов. Это способствует поддержанию тканевого гомеостаза и препятствует нейровоспалению. При дегенерации аксонов в культуре нейронов спинального ганглия мыши в экстернализации ФС участвуют скрамблаза Xkr8 и транслоказа липидов ABC1, относящаяся к семейству ABC-транспортеров. У дрозофилы ФС появляется на поверхности дегенерирующих дендритов при прунинге в ходе онтогенеза и после физического повреждения. Экстернализацию ФС у мух также можно вызвать путем нокаута флиппазы фосфолипидов ATP8A и гиперэкспрессии скрамблазы TMEM16. Более того, нокаут CDC50 и гиперэкспрессия скрамблазы могут приводить к редукции дендритов. Ортологи ATP8A у млекопитающих – ATP8A1 и ATP8A2 – способны переносить ФС между монослоями плазматической мембраны, что позволяет предположить участие ATP8A в распределении ФС в дегенерирующих нейритах. Было показано, что у *C. elegans* экстернализация ФС после повреждения аксона выступает в качестве сигнала, способствующего последующему восстановлению целостности аксона. В сигнальной функции ФС после повреждения аксона участвуют белки апоптотического клиренса CED-7 и CED-3. Тиретин TTR-11, ассоциированный с ФС, может активировать интегрины, что способствует регенерации аксона. Таким образом, в этом процессе участвует сразу несколько компонентов апоптотической программы [22].

БЛЕББИНГ ПЛАЗМАТИЧЕСКОЙ МЕМБРАНЫ

Блеббинг плазматической мембраны представляет собой образование и втягивание выростов на поверхности клетки. Блеббинг вызывается разборкой кортикального актинового цитоскелета, в результате которой под действием давления цитоплазмы она выдавливается, образуя пузыревидную структуру. Если актиновый цитоскелет реорганизуется, рост блеба прекращается. Актиновые филаменты собираются под поверхностью блеба, далее к ним привлекается миозин, и блеб втягивается [49]. Сначала формируются блебы небольшого размера, также называемые поверхностными блебами, затем их размер увеличивается, в их образовании задействуется практически весь объем клетки. При апоптозе в процессе блеббинга важную роль играет ряд протеинкиназ; в частности, ROCK1 (rho associated kinase 1), серин-треониновая киназа, которая активируется, когда каспаза 3 отщепляет от ее молекулы аутоингибиторный домен. ROCK1 фосфорилирует легкую цепь миозина, вызывая сокращение актомиозинового комплекса. Также положительным регулятором блеббинга служит PAK2 (p21 activated kinase 2). Активная каспаза 3 может усиливать блеббинг путем протеолиза и деактивации MYPT1, субъединицы миозинфосфатазы. Кроме того, показано, что блеббинг может регулировать и киназа LIMK1 (LIM domain kinase 1), ингибирующая белок кофилин, который способствует деполимеризации актина. Вопрос о том, требуется ли для осуществления блеббинга согласованная активность данных регуляторов или же они могут работать по отдельности, остается открытым. Блеббинг может также быть связан с другими протеинкиназами, такими как DAPK (death-associated protein kinase), SRC и MET (MNNG HOS transforming gene) [50].

Помимо блеббинга при апоптозе существует и неапоптотический блеббинг. Такой блеббинг имеет место при цитокинезе, распластывании клеток на субстрате, миграции, созревании и активации клеток иммунной системы, при защитных реакциях на стресс, а также при пассировании культивируемых клеток. Как и в процессе апоптоза, при неапоптотическом блеббинге важную роль играет сигнальный путь RhoA-ROCK1 [51, 52]. В процессе свертывания крови участвует блеббинг тромбоцитов [28].

Динамический блеббинг происходит сразу после резкого открепления клеток от субстрата, а также в течение первых нескольких минут при распластывании клеток, предшествуя формированию ламеллоподий [51, 52]. Роль его в данном случае неясна [51]. Возможно, что при откреплении и распластывании резко изменяется натяжение плазматической мембраны, и в условиях медленного (около 30 мин) рециклирования мембран блеббинг служит одним из способов поддержания гомеостаза [52].

Неапоптотический блеббинг часто связан с процессами клеточной подвижности. При этом, в отличие от псевдоподий или ламеллоподий, движущей силой которых служит полимеризация актиновых филаментов, образование и рост блебов происходят за счет давления жидкости, создающегося вследствие сокращения актомиозиновых комплексов в кортикальной цитоплазме клетки, а уменьшение и втягивание блебов – благодаря сборке и сокращению компонентов кортекса, которые формируются внутри блеба [53, 54]. Также блеббинг может происходить при дестабилизации кортикальных филаментов, как это имеет место в клетках, дефицитных по филамину [53]. На активном крае клетки блебы могут сосуществовать наряду с протрузиями, движимыми F-актином [54, 55]. Клеточная подвижность, связанная с блеббингом, наблюдается при инвазии и метастазировании опухолевых клеток [51], при миграции клеток HEK-293 [56], первичных зародышевых клеток у рыбы *Danio rerio* [57], иммунных клеток морского ежа [58] и лимфоцитов млекопитающих [59], при снижении адгезии к субстрату нейтрофилов и лимфоцитов [51], при миграции *Dictyostelium discoideum* [60]. Опухолевые клетки способны переходить от движения с помощью F-актин-зависимых протрузий к амебоидному с участием блебов и обратно в зависимости от окружения, при этом переключение происходит быстро, в течение нескольких секунд, и не связано с мезенхимно-амебоидным переходом [51, 61, 62]. Также клетки могут формировать неапоптотические блебы и в том случае, если нарушен механизм полимеризации актина, как это происходит с клетками HeLa, в которых заблокирован комплекс WAVE (WASp-family verprolin-homologous) [63]. Блеббинг можно вызвать блокировкой белка p53, причем как в нормальных клетках, таких как эмбриональные фибробласты мыши, так и в клетках меланомы; при этом наблюдается повышенная активация сигнального пути RhoA-ROCK [64]. Для опухолевых клеток амебоидный способ движения не требует деградации внеклеточного матрикса. Это позволяет злокачественным клеткам противостоять противоопухолевой терапии, основанной на ингибиторах металлопротеаз [51]. Блеббинг может способствовать и инвазии метастазирующих клеток меланомы в различные ткани через эндотелий сосудов [65]. Паразитическое простейшее *Entamoeba histo-*

lytica использует движение с участием блебов для проникновения во внутренние органы, например, в печень; подобно клеткам опухоли, этот одноклеточный организм может переключаться между амебоидным типом движения с участием блебов и мезенхимным типом движения [66]. Интересно, что неинвазивные клетки способны приобретать инвазивный фенотип при экспериментальной индукции мембранных блебов [64]. Таким образом, блебы могут служить дополнительным способом локомоции клеток в случае повреждения структур, связанных с F-актином. Интересно отметить, что блеббинг бластомеров при эмбриогенезе иногда морфологически отличается от других типов блеббинга: в таких клетках единственный блеб может перемещаться по периметру клетки («circus movement») [67].

При рассмотрении роли блеббинга в подвижности клеток возникает вопрос, служат ли блебы необходимыми участниками в процессе перемещения клетки или же появляются как побочный эффект при усилении сократительной активности кортекса. Для объяснения участия блебов в движении клеток были предложены различные модели. Kardash et al. предположили [68], что у первичных зародышевых клеток *D. rerio* блебы играют важную роль при перемещении тела клетки за счет движения вперед цитоплазмы и, таким образом, смещения центра массы. В этой модели актиновые структуры, получившие название «актиновых кистей», связаны с молекулой клеточной адгезии E-кадгерином в основании блеба и прикрепляют клетки к окружающему субстрату. Таким образом, блеб в передней части клетки может продвигаться вперед, в то время как остальная часть клетки закреплена, что приводит к переносу цитоплазмы в направлении миграции. Сходный механизм может работать и на двумерном субстрате, если удается достичь достаточной тяги путем адгезии к субстрату или к соседним клеткам.

Для объяснения миграции клеток в трехмерной среде при отсутствии специфической адгезии был предложен другой механизм, называемый в литературе «chimneying», поскольку он напоминает технику, которую применяют трубочисты для перемещения в дымоходе или альпинисты для передвижения вверх в трещинах скал. Так, например, лейкоциты, лишенные рецепторов, которые могли бы поддерживать адгезионные связи с внеклеточным окружением, мигрируют путем сжимания и создания давящих сил, направленных перпендикулярно к границе клетки. При этом ток богатого актином кортекса по краям клетки совместно с силой трения о субстрат проталкивают клетку вперед. В этой модели трение может возникать как благодаря специфической адгезии, так и за счет неспецифических взаимодействий между клеткой и субстратом. По-видимому, скорость такого движения оказывается больше той, что достигается за счет полимеризации актина при образовании ламеллы. В неоднородной среде, такой как сеть внеклеточного матрикса, блеббинг также может способствовать миграции за счет проникновения клеточных протрузий в промежутки в структуре субстрата. Согласно теоретической модели, такая миграция должна быть особенно эффективной в условиях слабой адгезии или ее отсутствия. Наконец, была создана компьютерная модель, предполагающая, что клетки могут использовать блеббинг для движения наподобие плавания – она предложена для объяснения способности *D. discoideum* и нейтрофилов перемещаться по хемотаксическому градиенту, находясь в суспензии.

Некоторые стимулы могут вызывать формирование как неапоптотических блебов, участвующих в локомоции клеток, так и апоптотических, в зависимости от длительности воздействия. Так, короткое (5 мин) воздействие щелочной среды на эстроген-независимую линию клеток карциномы молочной железы вызывает блеббинг плазматической мембраны [55]. При этом в цитоплазматическую часть образовавшихся блебов поступают молекулы, играющие важную роль в подвижности и инвазии клеток, такие как интегрин $\alpha 2$, JAM-1 (junctional adhesion molecule 1) и FAK (focal adhesion kinase). Блебы обладают высокой динамичностью, в присутствии хемоаттрактанта (в данном случае EGF) они поляризуются в направлении его действия. При возвращении клеток к прежним условиям с физиологическим значением pH (7,4) блеббинг оказывается полностью обратимым, однако пролонгированная инкубация в щелочной среде длительностью более 4 ч приводит к индукции апоптоза [50].

Амебоидное движение с участием блебов, по всей видимости, представляет собой более простой способ передвижения, нежели локомоция с участием ламеллоподий. Так, для образования и роста блебов достаточно только сократительной активности кортекса с участием миозина II, в то время как рост ламеллоподий требует координации сборки актиновых филаментов, поляризованного роста разветвленной актиновой сети, адгезии к субстрату и в некоторых случаях протеолиза матрикса. Кроме того, образование и рост блебов происходит быстрее, чем рост филоподий и ламеллоподий [50]. Данные по распластыванию клеток указывают на то, что рост блебов требует меньших затрат энергии, чем формиро-

вание ламеллоподий. Таким образом, локомоция с участием блеббинга, возможно, представляет собой эволюционно более древний, простой и энергетически менее затратный способ передвижения, нежели ламеллоподии [51].

Неапоптотический блеббинг сопровождает процессы клеточного деления и длится с начала анафазы до позднего цитокинеза. Блебы формируются на полюсах клетки вдали от борозды деления [69]. Несмотря на то что митотический блеббинг был обнаружен столетие назад, его роль в цитокинезе остается неясной. Не исключено, что он представляет собой побочный эффект напряжения в кортексе, возникающего при разделении клеточного тела. Другое возможное объяснение состоит в том, что блебы могут формировать дополнительную мембранную поверхность, которая будет использоваться в процессе цитокинеза и дальнейшего распластывания дочерних клеток [51].

Примечательно, что неапоптотический блеббинг может сопровождать вирусные инфекции [51]. Так, было показано, что вирус осповакцины при проникновении в клетки вызывает формирование крупного округлого блеба в месте контакта вирусной частицы с плазматической мембраной, за которым следует появление блебов по всему клеточному телу. Когда вирус оказывается внутри клетки, происходит реорганизация кортикального актинового цитоскелета, и блеббинг прекращается. Обработка клеток блеббистатином или дефицит Rac1 подавляет формирование блебов и значительно ингибирует инфицирование, что говорит об участии блеббинга в процессе проникновения вирусных частиц внутрь клеток [70].

Бабийчук с соавт. обнаружили [71], что блебы способны участвовать в защите клеток при химическом или механическом повреждении плазматической мембраны. Блебы образуются вследствие того, что при повреждении мембраны нарушается ее проницаемость, происходит увеличение внутриклеточного содержания Ca^{2+}, что, в свою очередь, способствует фосфорилированию миозина II Ca^{2+}/кальмодулин-зависимой киназой легких цепей миозина. Сокращение кортекса вызывает локальное повышение гидростатического давления в цитозоле, и плазматическая мембрана выпячивается, формируя блеб, содержащий поврежденный участок. В случае, если клетка способна справиться с повреждением, Ca^{2+} выкачивается из блеба, и блеб втягивается. В противном случае концентрация Ca^{2+} внутри блеба продолжает нарастать, и по достижении величины 10 μM с плазматической мембраной начинает ассоциировать Ca^{2+}-связывающий белок аннексин A1. Такие блебы, будучи отграничены от остальной цитоплазмы «затычками», образованными аннексином A1, изолируют поврежденные области плазматической мембраны от прилегающих к ней участков цитозоля. В результате предотвращается утечка цитозоля и приток содержимого межклеточного пространства, в частности, Ca^{2+}. В присутствии Ca^{2+} аннексин A1 способствует слиянию биологических мембран; в данном случае он связывает мембрану блеба в наиболее тонкой области присоединения блеба к остальному телу клетки («шейки»). Таким образом, блеббинг можно рассматривать как механизм контроля повреждения, который запускается, если первоначальные попытки репарации мембраны не увенчались успехом. Если мембрана репарируется уже в составе блеба, то концентрация Ca^{2+} в нем постепенно снижается. В случае, когда повреждение оказывается необратимым и не поддается восстановлению, ограниченный аннексином A1 блеб отделяется от клетки и деградирует.

Блеббинг может сопровождать неапоптотические формы регулируемой клеточной гибели. Так, он предшествует некроптозу с участием церамида в клетках карциномы легкого человека A549 и карциномы яичника человека [72], участвует в пироптозе [73], онкозе в клетках глиомы при действии берберина [74]. Блеббинг обнаружен в клетках плоскоклеточного рака и в клетках лейкоза при действии соламагрина и аденокарциномы молочной железы при действии флуопсина C [75, 76]. При типах регулируемой гибели с некротической морфологией, по-видимому, блеббинг обеспечивается повреждениями кортикального цитоскелета при нехватке ATP и/или сильном окислительном стрессе, а также дальнейшим набуханием клетки, при котором нарастает внутриклеточное давление. Основной движущей силой этого процесса служит ток Na^{+} внутрь клетки, и цитоплазма выдавливается в блебы. Чем выше осмотическое давление внутри клетки, тем быстрее наступает блеббинг. Затем возрастает проницаемость плазматической мембраны и происходит ее разрыв [77]. Блеббинг является характерной чертой регулируемой гибели эритроцитов – эриптоза [78, 79]. Интересно отметить, для эриптоза показано, что в блеббинге участвует цистеиновая эндопептидаза кальпаин, разрушающая элементы цитоскелета; помимо блеббинга, как уже упоминалось, происходит и экстернализация ФС [78].

АКТИВАЦИЯ КАСПАЗ

Роль каспаз в апоптозе хорошо известна. У млекопитающих к апоптотическим относятся

каспазы 2, 3, 6–10. В последнее время накапливается все больше и больше свидетельств того, что каспазы могут работать и вне апоптотических процессов. Так, они принимают участие в дифференцировке волокон хрусталика, эритроцитов, сперматогенезе, активации микроглии, воспалении, поддержании гомеостаза В-лимфоцитов, регенерации и развитии нейронов, образовании опухолей, заживлении ран, старении. Каспазы вовлечены в такие внутриклеточные процессы, как аутофагия и поддержание стабильности генома. Также они активны в неапоптотических типах регулируемой клеточной гибели – например, в пироптозе [80–82].

Впервые участие каспаз в процессе дифференцировки клеток было обнаружено при образовании волокон хрусталика. Оказалось, что *in vitro* ингибирование каспаз с помощью z-VAD-FMK препятствовало формированию энуклеированных хрусталикоподобных телец (лентоидов). Эти результаты наводили на мысль, что каспазы могут участвовать в дифференцировке клеток, на определенном этапе теряющих ядро, таких как предшественники эритроцитов или роговых чешуек. Сейчас известно, что при формировании хрусталиковых волокон активируется каспаза 3; кроме того, происходит MOMP, и цитохром *c* выходит из митохондрий в цитозоль. Считается, что в этом случае митохондриальный путь апоптоза действительно активируется, но сдерживается с помощью определенных механизмов, таких как усиление экспрессии белков-ингибиторов апоптоза (IAPs) и ограничение активности каспаз определенными компартментами [82]. Возможно также, что после выполнения своих функций каспазы могут деградировать в протеасомах [81]. Такое развитие событий открывает вопрос не только о роли активации каспаз в неапоптотических процессах, но в большей степени о роли анастаза, т.е. обратимости апоптоза в дифференцировке определённых специализированных структур организма.

Каспаза 14 присутствует только у наземных млекопитающих, а ее экспрессия ограничена эпителиальными тканями – в частности, эпидермисом кожи, где она встречается в дифференцирующихся кератиноцитах и отсутствует в пролиферирующих клетках. Показано, что каспаза 14 участвует в корнификации клеток эпидермиса и защите от УФ-излучения, процессируя белок профилаггрин и превращая его в филаггрин, необходимый для образования роговых чешуек. На этапе коммитирования кератиноцитов на терминальную дифференцировку наряду с каспазой 14 действует каспаза 3, которая индуцируется сигнальным путем Notch1 и опосредует протеолиз и активацию PKCδ, являющейся положительным регулятором процессов ороговения. Данная роль каспазы 3 подтверждается тем, что у мышей, дефицитных по этой каспазе, в ходе эмбриогенеза наблюдается усиление пролиферации кератиноцитов и при этом снижение уровня их дифференцировки. Таким образом, в процессе дифференцировки кератиноцитов и корнификации принимают участие как неапоптотическая каспаза 14, так и апоптотическая эффекторная каспаза 3 [80].

Описанные выше процессы терминальной дифференцировки приводят к превращению клеток в безъядерные структуры. Но существуют и другие примеры участия каспаз в клеточной дифференцировке. Таким примером служит дифференцировка моноцитов в макрофаги, которая блокируется при обработке клеток синтетическими ингибиторами каспаз. Кроме того, делеция гена каспазы 8 предотвращает макрофагальную дифференцировку клеток миеломоноцитарного ряда под действием M-CSF. Каспаза 8, как было показано в экспериментах с использованием антисенс-олигонуклеотидов и ингибиторов каспаз, необходима для дифференцировки трофобластов плаценты [82].

Активная форма каспазы 3 ассоциирована с пролиферацией и миграцией клеток при нейральной дифференцировке. При моделировании инсульта у мышей уровень активной каспазы 3 повышается в нейральных клетках-предшественниках (NPCs) в ходе восстановления после инсульта; в это время не наблюдается активации апоптоза. При ингибировании же каспазы 3 в данных условиях пролиферация и миграция NPCs значительно усиливаются. Негативная регуляция пролиферации обеспечивается с помощью снижения уровня фосфорилирования Akt. Таким образом, каспаза 3 принимает участие в механизме, сдерживающем индуцированный инсультом эндогенный нейрогенез [83]. Каспазы 3 и 9 также участвуют в дифференцировке мышечных клеток-предшественников в миотубулы [80].

Активность каспазы 3 необходима для остеогенной дифференцировки мезенхимных стволовых клеток. При дифференцировке остеобласта также происходит транзиторная и значительная активация других каспаз, в том числе каспаз 8 и 2, причем такая активация не сопровождается повышением уровня апоптотической гибели остеобластов. Каспаза 7 необходима для нормального функционирования одонтобластов. Показано, что у мышей, нокаутных по данному ферменту, нарушается минерализация зубов. При дифференцировке моноцитов в макрофаги с участием M-CSF важна активность каспаз 3 и 8 [80].

Базальная активность каспазы 3 необходима для дифференцировки эмбриональных стволовых клеток (ЭСК), в которых каспаза осуществляет процессинг белка Nanog [84]. Было показано, что в ЭСК мыши активность каспазы 3 повышается при отсутствии апоптотической гибели: в таких клетках не обнаруживалась конденсация хроматина, фрагментация ядра, блеббинг плазматической мембраны. Интересно отметить, что при этом, однако, происходило расщепление PARP-1. Использование ингибитора каспаз пептида VAD приводило к ингибированию дифференцировки ЭСК в присутствии ретиноевой кислоты. В ЭСК, нокаутных по каспазе 3, дифференцировка также значительно подавлялась. Также было показано, что *in vitro* каспаза 3 вызывает протеолиз транскрипционного фактора Nanog, но не расщепляет Sox2 и Okt4 – другие факторы, участвующие в дифференцировке [85].

Показано, что каспаза 3 участвует в дифференцировке волокон поперечнополосатой мышечной ткани: дефицит по каспазе 3 в миобластах нарушает формирование миотубул. Это связано с тем, что каспаза 3 способна протеолитически активировать киназы, в частности – серин/треониновую киназу MST1 (Mammalian Sterile Twenty-like 1), служащую вышележащим эффектором для MAP-киназного пути [86].

Также важны каспазы в процессе развития нервной ткани. Так, каспазы 2, 3, 6, 9 участвуют в направленности формирования и роста аксонов и образовании нервных окончаний (в том числе, устранении неправильно сформированных и избыточных) и синапсов. Каспаза 2, активируя сигнальный путь RhoA/ROCK-II, способствует снижению количества дендритных шипиков. У мышей, дефицитных по каспазе 9 и Apaf1, нарушается направленность формирования аксонов и синаптогенез, при этом уровень гибели нейронов не изменяется. Механизм участия каспазы 9 в направленном росте аксонов связан с расщеплением необходимого для этого процесса белка семафорина 7A. Также каспазы могут играть существенную роль в обеспечении функциональной активности мозга. Каспаза 3, например, необходима для долговременной потенциации, в ходе которой рецептор AMPA на постсинаптической мембране интернализуется с ее участием. Процесс блокируется ингибиторами как каспазы 3, так и каспазы 9. Следует отметить, что при долговременной потенциации транзиторная активация каспаз не связана с гибелью клеток [80]. Недавно появились данные об участии прокаспазы 3 в биогенезе митохондрий в нервной ткани. Так, Kim et al. [87] с помощью нокдауна гена прокаспазы 3 показали, что она осуществляет регуляцию транскрипционных активаторов биогенеза митохондрий TFAM (mitochondrial transcription factor A), NRF-1 (nuclear respiratory factor 1) и PGC-1α (proliferator-activated receptor γ coactivator 1α) в дофаминергических нейронах. При таком нокдауне в этих клетках значительно подавляется активность комплексов дыхательной цепи I, II и IV, нарушается морфология митохондрий, что проявляется в их набухании, фрагментации, разрушении крист и в конечном итоге митофагии; при этом химическое ингибирование активной каспазы 3 такого эффекта не оказывает [87]. Механизм участия прокаспазы 3 в регуляции транскрипционных активаторов биогенеза митохондрий до сих пор остается неисследованным.

Каспазы могут модулировать секрецию паракринных факторов, регулируя регенерацию. Так, *Casp3*$^{-/-}$ и/или *Casp7*$^{-/-}$ MEFs при сокультивировании со стволовыми или прогениторными клетками менее эффективно стимулируют их пролиферацию, чем фибробласты дикого типа, причем дефицит по обеим каспазам имеет более выраженный эффект, чем дефицит лишь по одной из них, что свидетельствует о перекрывающихся функциях каспаз 3 и 7. У нокаутных по каспазам 3 и 7 мышей значительно нарушаются процессы заживления ран и регенерации печени после частичной гепатэктомии. Это связано с тем, что данные каспазы расщепляют фосфолипазу iPLA2 и таким образом активируют ее, что приводит к усилению секреции арахидоновой кислоты и лизофосфохолина и, в конечном счете, простагландина E2. Последний способствует пролиферации клеток, заживлению ран и регенерации тканей [80].

Такое явление может быть неблагоприятным в случае радиотерапии: каспазы в гибнущих под действием ионизирующего излучения клетках активируют пролиферацию соседних клеток опухоли и способствуют их репопуляции. Как было показано на клетках опухоли молочной железы у мышей, дефицит по каспазе 3 как в самих опухолевых клетках, так и в клетках стромы значительно повышает чувствительность опухоли к радиотерапии. У пациентов с карциномами органов головы и шеи, а также карциномой молочной железы высокий уровень активации каспазы 3 связан с повышением числа рецидивов и летальных исходов [88].

В клетках микроглии стимуляция TLR4 липополисахаридами приводит к активации каспаз 8 и 3, не сопровождающейся гибелью клеток. Каспаза 3 расщепляет PKCδ и таким образом активирует ее. В свою очередь, PKCδ активирует комплекс IKK (киназа IκB), который

фосфорилирует IκB, что приводит к его деградации. В результате освободившийся от ингибитора NF-κB транслоцируется в ядро и там запускает транскрипцию провоспалительных факторов, таких как NOS2 (NO synthase 2), TNFα и IL-1β. Таким образом, умеренная активация каспазы 3 в микроглиоцитах способствует приобретению провоспалительного фенотипа и может вызывать нейротоксичность. Интересно, что в данном случае механизм активации каспазы без запуска апоптотической гибели известен. Дело в том, что для активации каспазы 3 требуется ее протеолиз инициаторной каспазой. В клетках микроглии такой процессинг происходит с образованием промежуточной формы эффекторной каспазы, p19/p12, которая обладает неполной активностью. Дальнейшему аутокаталитическому расщеплению каспазы 3 до полностью активной формы p17/p12 препятствует повышение экспрессии белка-ингибитора апоптоза cIAP2 [89].

Недавно появились данные о том, что помимо провоспалительных каспаз в регуляции процессов воспаления может участвовать каспаза 8. Примечательно, что она может как способствовать развитию воспаления, так и препятствовать ему. Так, с одной стороны, наряду с каспазой 1 каспаза 8 способна осуществлять расщепление про-IL-1β и таким образом участвовать в созревании провоспалительного цитокина [90]. Причем каспаза 8 может процессировать IL-1β как в составе инфламмасом, так и напрямую, а также модулировать экспрессию мРНК IL-1β через NF-κB; эта антиапоптотическая функция не требует протеазной активности [91]. Показано, что каталитически активная каспаза 8 также может ингибировать инфламмасому, содержащую ASC и каспазу 1; при этом в неактивной форме она служит скэффолдом для ее активации. Молекулярные механизмы такой регуляции остаются практически неизвестными. Стоит отметить, что у пациентов, дефицитных по каспазе 8, наблюдается раннее развитие воспалительного заболевания кишечника [92]. Делеция каспазы 8 в кератиноцитах эпидермиса сопровождает развитие хронической воспалительной болезни кожи. Противовоспалительный эффект каспазы 8 не зависит от сигнальных путей с участием TNF, IL-1β или TLR-рецепторов, а также NF-κB, но задействует киназу TBK1 (IκK-related, TANK-related, TANK-binding kinase 1) и IRF3. Мутации по каспазе 8 (и 10) ассоциированы с аутоиммунным лимфопролиферативным синдромом [80].

Каспаза 8 может расщеплять гасдермин D (GSDMD) при заражении клетки чумной палочкой (*Yersinia pestis*). В нормальных условиях киназа TAK1 (transforming growth factor β activated kinase 1) ингибирует NLRP3-инфламмасому и фосфорилирование RIPK1. YopJ, эффекторная молекула *Y. pestis*, связывает TAK1 и устраняет репрессию RIPK1. Активированная RIPK1 рекрутирует FADD и прокаспазу 8, формируя комплекс под названием рипоптосома. В составе рипоптосомы каспаза 8 активируется путем аутопроцессирования, после чего она расщепляет GSDMD и запускает пироптоз. Каспаза 3 способна расщеплять гасдермин E (GSDME), в результате чего его *N*-концевые фрагменты p30 формируют мембранные поры и активируют пироптоз. Интересно отметить, что GSDME работает как опухолевый супрессор, запуская пироптоз в ответ на химиотерапевтические воздействия, приводящие к активации каспазы 3. GSDMD, в отличие от GSDME, расщепляется каспазой 3 (а также каспазой 7) в неканоническом сайте, который располагается в *N*-концевом домене, что подавляет его способность образовывать поры [93].

Интересно отметить и то, что каспазы могут быть задействованы в регуляции миграции клеток. Так, у дрозофилы ингибирование гомолога каспаз 2 и 9 DRONC с помощью эндогенного ингибитора (DIAP) делает возможной миграцию пограничных клеток яичника, необходимых для правильного созревания ооцитов. При этом DIAP взаимодействует с RAC [94].

Регуляция клеточной подвижности с участием каспаз имеет место и у млекопитающих. Так, у клеток, дефицитных по каспазе 8, значительно затрудняется миграция. У MEFs, полученных из нокаутных по каспазе 8 мышей, а также у опухолевых клеток, таких как клетки нейробластомы и опухоли молочной железы человека с дефицитом каспазы 8, заметно снижается подвижность. Предполагают, что каспаза 8 способствует активации белка Rac и таким образом запускает перестройку актинового цитоскелета. Кроме того, ранняя эмбриональная летальность у мышей, дефицитных по каспазе 8 (*caspase 8*$^{-/-}$), связана с невозможностью формирования функциональной кровеносной системы, которая, в свою очередь, может быть обусловлена нарушением миграции эндотелиоцитов [82].

Каспазы играют большую роль в процессах, связанных с образованием и прогрессией опухолей. Очевидно, что, осуществляя программу гибели клеток, они предотвращают опухолевый рост, однако их участие в туморогенезе не ограничивается апоптотическими путями: каспазы могут влиять на пролиферацию, инвазию и миграцию. Так, каспаза 8 взаимодействует с фокальными адгезивными комплексами опухолевых клеток, способствуя миграции клеток *in vitro*

и метастазированию *in vivo*. Каспаза 8 способна также взаимодействовать с ранними эндосомами, усиливая обновление компонентов фокальных контактов и рециклирование интегринов на поверхность клетки [95]. Так, каспаза 8 участвует в передаче сигнала от интегринов с участием малой GTPазы ранних эндосом RAB5 к RAC. Показано, что в клетках нейробластомы, дефицитных по каспазе 8, активация RAB5 не происходит. Активация RAB5 способствует колокализации интегринов с каспазой 8: каспаза обнаруживается в составе фракции выделенных фокальных контактов из клеток нейробластомы. Методом иммунопреципитации и с помощью исследования колокализации продемонстрировано, что активация RAB5 приводит к усилению формирования комплексов каспазы 8 с интегринами β1 на периферии клетки. Кроме того, экспрессия каспазы 8 способствует опосредованной RAB5 интернализации и рециклированию интегрина β1 [96].

Остается открытым вопрос, каким образом активация апоптотических каспаз не всегда приводит к гибели клеток. Возможно, это достигается с помощью низкого уровня активности каспаз, недостаточного для индукции регулируемой гибели [97], либо благодаря ограничению их активности в пределах отдельных внутриклеточных компартментов или расщепления субстратов, не связанных с гибелью [98]. До сих пор остается нерешенным важный вопрос о том, как в каждом конкретном неапоптотическом процессе происходит активация апоптотических инициаторных и эффекторных каспаз и как это может быть связано с анастазом [3].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Экстернализация фосфатидилсерина может сопутствовать множеству неапоптотических клеточных процессов, включая дифференцировку клеток мышечной и костной тканей, В-лимфоцитов, иммунный ответ и свертывание крови. Также она участвует в дегрануляции тучных клеток, клиренсе стареющих эритроцитов, а также оплодотворении и партеногенетической активации. Наличие фосфатидилсерина во внешнем монослое плазматической мембраны также может служить маркером злокачественности опухолевых клеток (рисунок).

Блеббинг цитоплазмы также не является достаточным признаком апоптоза. Согласно данным литературы, блеббинг участвует в клеточной подвижности, включая амебоидное движение, открепление и прикрепление клеток к субстрату, делении клетки, защите клетки от химических и механических повреждений плазматической мембраны, а также может сопутствовать вирусным инфекциям (рисунок). Молекулярные механизмы блеббинга во многих случаях неизвестны или неясны. Их изучение прольет свет на существование различных видов блебов. Это может способствовать разработке противоопухолевых препаратов с минимальными побочными эффектами. Исследование блеббинга при амебоидном движении также необходимо для лучшего понимания возможностей метастазирующих клеток опухолей.

Каспазы участвуют в дифференцировке, регуляции процесса воспаления, регенерации, миграции клеток. Механизмы их активации в ходе апоптотической гибели достаточно хорошо охарактеризованы, однако о множестве неапоптотических функций каспаз данных недостаточно. Активность каспаз связана с расщеплением белковых субстратов; характер этих субстратов определяет направление изменений и процессов, происходящих в клетке (рисунок). Углубление понимания неапоптотических функций каспаз может стать основой при разработке терапевтических подходов для лечения патологий, связанных с клеточной миграцией, регенерацией, воспалением, канцерогенезом.

Таким образом, ни один из упомянутых признаков сам по себе не является однозначным маркером апоптоза, и для его идентификации необходимо использовать совокупность признаков.

Изучение роли апоптотических событий в неапоптотических процессах позволит расширить понимание апоптоза и связи между его составляющими. Это особенно актуально для изучения обратимости апоптоза – анастаза. Для выживания клетки после инициации апоптоза необходимо остановить и обратить вспять все отдельные апоптотические события – от экстернализации ФС, пермеабилизации внешней мембраны митохондрий и каскада эффекторных каспаз до разрушения ДНК апоптотическими нуклеазами и блеббинга цитоплазмы. Интересно, что экстернализация ФС, блеббинг и активация каспаз в отсутствие гибели клетки оказываются обратимы. Изучение каждого апоптотического события по отдельности в неапоптотических условиях может способствовать обнаружению путей его обратимости. Механизмы ингибирования апоптотических каспаз в процессе анастаза до сих пор неясны.

Систематизация информации об участии апоптотических событий в неапоптотических процессах поможет в исследовании молекулярных механизмов, ассоциированных с этими событиями, и их роли в более сложных клеточных

Неапоптотические функции экстернализации фосфатидилсерина, блеббинга цитоплазмы и активации каскада каспаз

процессах, таких как поддержание гомеостаза, дифференцировка, воспаление, канцерогенез и пр.

Финансирование. Работа выполнена при поддержке гранта РФФИ 19-015-00233а.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

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

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Galluzzi, L., Vitale, I., Aaronson, S. A., Abrams, J. M., Adam, D., et al. (2018) Molecular mechanisms of cell death: Recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death, *Cell Death. Differ.*, **25**, 486-541, doi: 10.1038/s41418-017-0012-4.
2. Saraste, A., and Pulkki, K. (2000) Morphologic and biochemical hallmarks of apoptosis, *Cardiovasc. Res.*, **45**, 528-537, doi: 10.1016/s0008-6363(99)00384-3.
3. Захаров И. И., Савицкая М. А., Онищенко Г. Е. (2020) Проблема обратимости апоптотических процессов, *Биохимия*, **85**, 1344-1360, doi: 10.31857/S0320972520100036.
4. Whitlock, J. M., and Chernomordik, L. V. (2021) Flagging fusion: Phosphatidylserine signaling in cell-cell fusion, *J. Biol. Chem.*, **296**, 100411, doi: 10.1016/j.jbc.2021.100411.
5. Fadok, V. A., Voelker, D. R., Campbell, P. A., Cohen, J. J., Bratton, D. L., et al. (1992) Exposure of phosphatidylserine on the surface of apoptotic lymphocytes triggers specific recognition and removal by macrophages, *J. Immunol.*, **148**, 2207-2216.
6. Segawa, K., and Nagata, S. (2015) An apoptotic "Eat Me" signal: Phosphatidylserine exposure, *Trends Cell Biol.*, **25**, 639-650, doi: 10.1016/j.tcb.2015.08.003.
7. Sessions, A., and Horwitz, A. F. (1981) Myoblast aminophospholipid asymmetry differs from that of fibroblasts, *FEBS Lett.*, **134**, 75-78, doi: 10.1016/0014-5793(81)80554-6.
8. Van den Eijnde, S.M., van den Hoff, M. J., Reutelingsperger, C. P., van Heerde, W. L, Henfling, M. E., et al. (2001) Transient expression of phosphatidylserine at cell-cell contact areas is required for myotube formation, *J. Cell. Sci.*, **114 (Pt. 20)**, 3631-3642.
9. Ehlen, H. W., Chinenkova, M., Moser, M., Munter, H. M., Krause, Y., et al. (2013) Inactivation of anoctamin-6/Tmem16f, a regulator of phosphatidylserine scrambling in osteoblasts, leads to decreased mineral deposition in skeletal tissues, *J. Bone Miner. Res.*, **28**, 246-259, doi: 10.1002/jbmr.1751.
10. Curia, C. A., Ernesto, J. I., Stein, P., Busso, D., Schultz, R. M., Cuasnicu, P. S., et al. (2013) Fertilization induces a transient exposure of phosphatidylserine in mouse eggs, *PLoS One*, **8**, e71995, doi: 10.1371/journal.pone.0071995.
11. Zwaal, R. F., Bevers, E. M., Comfurius, P., Rosing, J., Tilly, R. H., et al. (1989) Loss of membrane phospholipid asymmetry during activation of blood platelets and sickled red cells; mechanisms and physiological significance, *Mol. Cell. Biochem.*, **91**, 23-31, doi: 10.1007/BF00228075.
12. Boyle, E. M., Pohlman, T. H., Cornejo, C. J., and Verrier, E. D. (1996) Endothelial cell injury in cardiovascular surgery: Ischemia-reperfusion, *Ann. Thor. Surg.*, **62**, 1868-1875, doi: 10.1016/s0003-4975(96)00950-2.
13. Park, M., and Kang, K. W. (2019) Phosphatidylserine receptor-targeting therapies for the treatment of cancer, *Arch. Pharm. Res.*, **42**, 617-628, doi: 10.1007/s12272-019-01167-4.
14. Riedl, S., Rinner, B., Asslaber, M., Schaider, H., Walzer, S., et al. (2011) In search of a novel target – phosphatidylserine exposed by non-apoptotic tumor cells and metastases of malignancies with poor treatment efficacy, *Biochim. Biophys. Acta*, **1808**, 2638-2645, doi: 10.1016/j.bbamem.2011.07.026.
15. Vogt, E., Ng, A. K., and Rote, N. S. (1996) A model for the antiphospholipid antibody syndrome: Monoclonal antiphosphatidylserine antibody induces intrauterine growth restriction in mice, *Am. J. Obstet. Gynecol.*, **174**, 700-777, doi: 10.1016/s0002-9378(96)70453-2.
16. Gong, Y. N., Crawford, J. C., Heckmann, B. L., and Green, D. R. (2019) To the edge of cell death and back, *FEBS J.*, **286**, 430-440, doi: 10.1111/febs.14714.
17. Segawa, K., Suzuki, J., and Nagata, S. (2014) Flippases and scramblases in the plasma membrane, *Cell Cycle*, **13**, 2990-2991, doi: 10.4161/15384101.2014.962865.
18. Damek-Poprawa, M., Golub, E., Otis, L., Harrison, G., Phillips, C., et al. (2006) Chondrocytes utilize a cholesterol-dependent lipid translocator to externalize phosphatidylserine, *Biochemistry*, **45**, 3325-3336, doi: 10.1021/bi0515927.
19. Segawa, K., Yanagihashi, Y., Yamada, K., Suzuki, C., Uchiyama, Y., et al. (2018) Phospholipid flippases enable precursor B cells to flee engulfment by macrophages, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **115**, 12212-12217, doi: 10.1073/pnas.1814323115.
20. Tsuchiya, M., Hara, Y., Okuda, M., Itoh, K., Nishioka, R., et al. (2018) Cell surface flip-flop of phosphatidylserine is critical for PIEZO1-mediated myotube formation, *Nat. Commun.*, **9**, 2049, doi: 10.1038/s41467-018-04436-w.
21. Jeong, J., and Conboy, I. M. (2011) Phosphatidylserine directly and positively regulates fusion of myoblasts into myotubes, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **414**, 9-13, doi: 10.1016/j.bbrc.2011.08.128.
22. Shin, H.-W., and Takatsu, H. (2020) Phosphatidylserine exposure in living cells, *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.*, **55**, 166-178, doi: 10.1080/10409238.2020.1758624.
23. Verma, S. K., Leikina, E., Melikov, K., Gebert, C., Kram, V., et al. (2018) Cell-surface phosphatidylserine regulates osteoclast precursor fusion, *J. Biol. Chem.*, **293**, 254-270, doi: 10.1074/jbc.M117.809681.
24. Helming, L., Winter, J., and Gordon, S. (2009) The scavenger receptor CD36 plays a role in cytokine-induced macrophage fusion, *J. Cell Sci.*, **122(Pt 4)**, 453-459, doi: 10.1242/jcs.037200.
25. Lyden, T. W., Ng, A. K., and Rote, N. S. (1993) Modulation of phosphatidylserine epitope expression by BeWo cells during forskolin treatment, *Placenta*, **14**, 177-186, doi: 10.1016/s0143-4004(05)80259-0.
26. Das, M., Xu, B., Lin, L., Chakrabarti, S., Shivaswamy, V., et al. (2004) Phosphatidylserine efflux and intercellular fusion in a BeWo model of human villous cytotrophoblast, *Placenta*, **25**, 396-407, doi: 10.1016/j.placenta.2003.11.004.
27. Gadella, B. M., and Harrison, R. A. (2002) Capacitation induces cyclic adenosine 3',5'-monophosphate-dependent, but apoptosis-unrelated, exposure of aminophospholipids at the apical head plasma membrane of boar sperm cells, *Biol. Reprod.*, **67**, 340-350, doi: 10.1095/biolreprod67.1.340.
28. Clarke, R. J., Hossain, K. R., and Cao, K. (2020) Physiological roles of transverse lipid asymmetry of animal membranes, *Biochim. Biophys. Acta*, **1862**, 183382, doi: 10.1016/j.bbamem.2020.183382.
29. Thiagarajan, P., Parker, C. J., and Prchal, J. T. (2021) How do red blood cells die? *Front. Physiol.*, **12**, 655393, doi: 10.3389/fphys.2021.655393.
30. Test, S. T., and Mitsuyoshi, J. (1997) Activation of the alternative pathway of complement by calcium-loaded erythrocytes resulting from loss of membrane phospholipid asymmetry, *J. Lab. Clin. Med.*, **130**, 169-182, doi: 10.1016/s0022-2143(97)90093-7.
31. Zwaal, R. F., Comfurius, P., and Bevers, E. M. (2005) Surface exposure of phosphatidylserine in pathological cells, *Cell. Mol. Life Sci.*, **62**, 971-988, doi: 10.1007/s00018-005-4527-3.

32. Qu, J., Conroy, L. A., Walker, J. H., Wooding, F. B., and Lucy, J. A. (1996) Phosphatidylserine-mediated adhesion of T-cells to endothelial cells, *Biochem. J.*, **317 (Pt. 2)**, 343-346, doi: 10.1042/bj3170343.
33. Lupu, F., Moldovan, N., Ryan, J., Stern, D., and Simionescu, N. (1993) Intrinsic procoagulant surface induced by hypercholesterolaemia on rabbit aortic endothelium, *Blood Coagul. Fibrinol. Int J. Haemost. Thromb.*, **4**, 743-752.
34. Christiansen, V. J., Sims, P. J., and Hamilton, K. K. (1997) Complement C5b-9 increases plasminogen binding and activation on human endothelial cells, *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.*, **17**, 164-171, doi: 10.1161/01.atv.17.1.164.
35. Bevers, E. M., Rosing, J., and Zwaal, R. F. (1985) Development of procoagulant binding sites on the platelet surface, *Adv. Exp. Med. Biol.*, **192**, 359-371, doi: 10.1007/978-1-4615-9442-0_25.
36. Martin, S., Pombo, I., Poncet, P., David, B., Arock, M., et al. (2000) Immunologic stimulation of mast cells leads to the reversible exposure of phosphatidylserine in the absence of apoptosis, *Int. Arch. Allergy Immunol.*, **123**, 249-258, doi: 10.1159/000024451.
37. Connor, J., Bucana, C., Fidler, I. J., and Schroit, A. J. (1989) Differentiation-dependent expression of phosphatidylserine in mammalian plasma membranes: quantitative assessment of outer-leaflet lipid by prothrombinase complex formation, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **86**, 3184-3188, doi: 10.1073/pnas.86.9.3184.
38. Utsugi, T., Schroit, A. J., Connor, J., Bucana, C. D., and Fidler, I. J. (1991) Elevated expression of phosphatidylserine in the outer membrane leaflet of human tumor cells and recognition by activated human blood monocytes, *Cancer Res.*, **51**, 3062-3066.
39. Woehlecke, H., Pohl, A., Alder-Baerens, N., Lage, H., and Herrmann, A. (2003) Enhanced exposure of phosphatidylserine in human gastric carcinoma cells overexpressing the half-size ABC transporter BCRP (ABCG2), *Biochem. J.*, **376 (Pt. 2)**, 489-495, doi: 10.1042/BJ20030886.
40. Schröder-Borm, H., Bakalova, R., and Andrä, J. (2005) The NK-lysin derived peptide NK-2 preferentially kills cancer cells with increased surface levels of negatively charged phosphatidylserine, *FEBS Lett.*, **579**, 6128-6134, doi: 10.1016/j.febslet.2005.09.084.
41. Comfurius, P., Senden, J. M., Tilly, R. H., Schroit, A. J., Bevers, E. M., et al. (1990) Loss of membrane phospholipid asymmetry in platelets and red cells may be associated with calcium-induced shedding of plasma membrane and inhibition of aminophospholipid translocase, *Biochim. Biophys. Acta*, **1026**, 153-160, doi: 10.1016/0005-2736(90)90058-v.
42. Ran, S., Downes, A., and Thorpe, P. E. (2002) Increased exposure of anionic phospholipids on the surface of tumor blood vessels, *Cancer Res.*, **62**, 6132-6140.
43. Zargarian, S., Shlomovitz, I., Erlich, Z., Hourizadeh, A., Ofir-Birin, Y., et al. (2017) Phosphatidylserine externalization, "necroptotic bodies" release, and phagocytosis during necroptosis, *PLoS Biol.*, **15**, e2002711, doi: 10.1371/journal.pbio.2002711.
44. Maeda, A., and Fadeel, B. (2014) Mitochondria released by cells undergoing TNF-α-induced necroptosis act as danger signals, *Cell Death Dis.*, **5**, e1312, doi: 10.1038/cddis.2014.277.
45. Wang, Q., Imamura, R., Motani, K., Kushiyama, H., Nagata, S., et al. (2013) Pyroptotic cells externalize eat-me and release find-me signals and are efficiently engulfed by macrophages, *Int. Immunol.*, **25**, 363-372, doi: 10.1093/intimm/dxs161.
46. Klöditz, K., and Fadeel, B. (2019) Three cell deaths and a funeral: Macrophage clearance of cells undergoing distinct modes of cell death, *Cell Death Discov.*, **5**, 65, doi: 10.1038/s41420-019-0146-x.
47. Krysko, O., De Ridder, L., and Cornelissen, M. (2004) Phosphatidylserine exposure during early primary necrosis (oncosis) in JB6 cells as evidenced by immunogold labeling technique, *Apoptosis Int. J. Programm. Cell Death*, **9**, 495-500, doi: 10.1023/B:APPT.0000031452.75162.75.
48. Young, M. M., Bui, V., Chen, C., and Wang, H. G. (2019) FTY720 induces non-canonical phosphatidylserine externalization and cell death in acute myeloid leukemia, *Cell Death Dis.*, **10**, 847, doi: 10.1038/s41419-019-2080-5.
49. Ikenouchi, J., and Aoki, K. (2017) Membrane bleb: A seesaw game of two small GTPases, *Small GTPases*, **8**, 85-89, doi: 10.1080/21541248.2016.1199266.
50. Khajah, M. A., and Luqmani, Y. A. (2016) Involvement of membrane blebbing in immunological disorders and cancer, *Med. Princ. Pract.*, **25 Suppl. 2**,18-27, doi: 10.1159/000441848.
51. Charras, G., and Paluch, E. (2008) Blebs lead the way: How to migrate without lamellipodia, *Nat. Rev. Mol. Cell. Biol.*, **9**, 730-736, doi: 10.1038/nrm2453.
52. Norman, L. L., Brugués, J., Sengupta, K., Sens, P., and Aranda-Espinoza, H. (2010) Cell blebbing and membrane area homeostasis in spreading and retracting cells, *Biophys. J.*, **99**, 1726-1733, doi: 10.1016/j.bpj.2010.07.031.
53. Ridley, A. J. (2011) Life at the leading edge, *Cell*, **145**, 1012-1022, doi: 10.1016/j.cell.2011.06.010.
54. Zatulovskiy, E., Tyson, R., Bretschneider, T., and Kay, R. R. (2014) Bleb-driven chemotaxis of Dictyostelium cells, *J. Cell Biol.*, **204**, 1027-1044, doi: 10.1083/jcb.201306147.
55. Khajah, M. A., Mathew, P. M., Alam-Eldin, N. S., and Luqmani, Y. A. (2015) Bleb formation is induced by alkaline but not acidic pH in estrogen receptor silenced breast cancer cells, *Int. J. Oncol.*, **46**, 1685-1698, doi: 10.3892/ijo.2015.2884.
56. Karlsson, T., Bolshakova, A., Magalhães, M. A., Loitto, V. M., and Magnusson, K. E. (2013) Fluxes of water through aquaporin 9 weaken membrane-cytoskeleton anchorage and promote formation of membrane protrusions, *PLoS One*, **8**, e59901, doi: 10.1371/journal.pone.0059901.
57. Blaser, H., Reichman-Fried, M., Castanon, I., Dumstrei, K., Marlow, F. L., et al. (2006) Migration of zebrafish primordial germ cells: A role for myosin contraction and cytoplasmic flow, *Dev. Cell*, **11**, 613-627, doi: 10.1016/j.devcel.2006.09.023.
58. D'Andrea-Winslow, L., and Novitski, A. K. (2008) Active bleb formation is abated in Lytechinus variegatus red spherule coelomocytes after disruption of acto-myosin contractility, *Integr. Zool.*, **3**, 115-122, doi: 10.1111/j.1749-4877.2008.00086.x.
59. Haston, W. S., and Shields, J. M. (1984) Contraction waves in lymphocyte locomotion, *J. Cell Sci.*, **68**, 227-241.
60. Zatulovskiy, E., and Kay, R. R. (2016) Chemotactic blebbing in dictyostelium cells, *Methods Mol. Biol.*, **1407**, 97-105, doi: 10.1007/978-1-4939-3480-5_7.
61. Wolf, K., Mazo, I., Leung, H., Engelke, K., von Andrian, U. H., et al. (2003) Compensation mechanism in tumor cell migration: Mesenchymal-amoeboid transition after blocking of pericellular proteolysis, *J. Cell Biol.*, **160**, 267-277, doi: 10.1083/jcb.200209006.
62. Bergert, M., Chandradoss, S. D., Desai, R. A., and Paluch, E. (2012) Cell mechanics control rapid transitions between blebs and lamellipodia during migration, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **109**, 14434-14439, doi: 10.1073/pnas.1207968109.

63. Derivery, E., Fink, J., Martin, D., Houdusse, A., Piel, M., et al. (2008) Free Brick1 is a trimeric precursor in the assembly of a functional wave complex, *PLoS One*, **3**, e2462, doi: 10.1371/journal.pone.0002462.
64. Gadea, G., de Toledo, M., Anguille, C., and Roux, P. (2007) Loss of p53 promotes RhoA-ROCK-dependent cell migration and invasion in 3D matrices, *J. Cell Biol.*, **178**, 23-30, doi: 10.1083/jcb.200701120.
65. Voura, E. B., Sandig, M., Kalnins, V. I., and Siu, C. (1998) Cell shape changes and cytoskeleton reorganization during transendothelial migration of human melanoma cells, *Cell Tissue Res.*, **293**, 375-387, doi: 10.1007/s004410051129.
66. Maugis, B., Brugués, J., Nassoy, P., Guillen, N., Sens, P., et al. (2010) Dynamic instability of the intracellular pressure drives bleb-based motility, *J. Cell Sci.*, **123 (Pt. 22),** 3884-3892, doi: 10.1242/jcs.065672.
67. Olson, E. C. (1996) Onset of electrical excitability during a period of circus plasma membrane movements in differentiating *Xenopus neurons*, *J. Neurosci.*, **16**, 5117-5129, doi: 10.1523/JNEUROSCI.16-16-05117.1996.
68. Kardash, E., Reichman-Fried, M., Maître, J. L., Boldajipour, B., Papusheva, E., et al. (2010) A role for Rho GTPases and cell-cell adhesion in single-cell motility *in vivo*, *Nat. Cell Biol.*, **12**, 47-53, doi: 10.1038/ncb2003.
69. Charras, G. T. (2008) A short history of blebbing, *J. Microsc.*, **231**, 466-478, doi: 10.1111/j.1365-2818.2008.02059.x.
70. Mercer, J., and Helenius, A. (2008) Vaccinia virus uses macropinocytosis and apoptotic mimicry to enter host cells, *Science*, **320**, 531-535, doi: 10.1126/science.1155164.
71. Babiychuk, E. B., Monastyrskaya, K., Potez, S., and Draeger, A. (2011) Blebbing confers resistance against cell lysis, *Cell Death Differ.*, **18**, 80-89, doi: 10.1038/cdd.2010.81.
72. Nganga, R., Oleinik, N., Kim, J., Selvam, S. P., De Palma, R., et al. (2019) Receptor-interacting Ser/Thr kinase 1 (RIPK1) and myosin IIA-dependent ceramidosomes form membrane pores that mediate blebbing and necroptosis, *J. Biol. Chem.*, **294**, 502-519, doi: 10.1074/jbc.RA118.005865.
73. Chen, X., He, W. T., Hu, L., Li, J., Fang, Y., et al. (2016) Pyroptosis is driven by non-selective gasdermin-D pore and its morphology is different from MLKL channel-mediated necroptosis, *Cell Res.*, **26**, 1007-1020, doi: 10.1038/cr.2016.100.
74. Sun, Y., Yu, J., Liu, X., Zhang, C., Cao, J., et al. (2018) Oncosis-like cell death is induced by berberine through ERK1/2-mediated impairment of mitochondrial aerobic respiration in gliomas, *Biomed. Pharmacother.*, **102**, 699-710, doi: 10.1016/j.biopha.2018.03.132.
75. Ma, L. S., Jiang, C. Y., Cui, M., Lu, R., Liu, S. S., et al. (2013) Fluopsin C induces oncosis of human breast adenocarcinoma cells, *Acta Pharmacol. Sin.*, **34**, 1093-1100, doi: 10.1038/aps.2013.44.
76. Sun, L., Zhao, Y., Yuan, H., Li, X., Cheng, A., et al. (2010) Solamargine, a steroidal alkaloid glycoside, induces oncosis in human K562 leukemia and squamous cell carcinoma KB cells, *Cancer Chemother. Pharmacol.*, **67**, 813-821, doi: 10.1007/s00280-010-1387-9.
77. Simard, J. M., Woo, S. K., and Gerzanich, V. (2012) Transient receptor potential melastatin 4 and cell death, *Pflüg. Arch. Eur. J. Physiol.*, **464**, 573-582, doi: 10.1007/s00424-012-1166-z.
78. Repsold, L., and Joubert, A. M. (2018) Eryptosis: An erythrocyte's suicidal type of cell death, *BioMed Res. Int.*, **2018**, 1-10, doi: 10.1155/2018/9405617.
79. Naveed, A., Jilani, K., Siddique, A. B., Akbar, M., Riaz, M., et al. (2020) Induction of erythrocyte shrinkage by omeprazole, *Dose Response*, **18**, doi: 10.1177/1559325820946941.
80. Shalini, S., Dorstyn, L., Dawar, S., and Kumar, S. (2015) Old, new and emerging functions of caspases, *Cell Death Differ.*, **22**, 526-539, doi: 10.1038/cdd.2014.216.
81. Julien, O., and Wells, J. A. (2017) Caspases and their substrates, *Cell Death Differ.*, **24**, 1380-1389, doi: 10.1038/cdd.2017.44.
82. Lamkanfi, M., Festjens, N., Declercq, W., Vanden Berghe, T., and Vandenabeele, P. (2007) Caspases in cell survival, proliferation and differentiation, *Cell Death Differ.*, **14**, 44-55, doi: 10.1038/sj.cdd.4402047.
83. Fan, W., Dai, Y., Xu, H., Zhu, X., Cai, P., et al. (2014) Caspase-3 modulates regenerative response after stroke, *Stem Cells*, **32**, 473-486, doi: 10.1002/stem.1503.
84. Baena-Lopez, L. A., Arthurton, L., Xu, D. C., and Galasso, A. (2018) Non-apoptotic Caspase regulation of stem cell properties, *Semin. Cell Dev. Biol.*, **82**, 118-126, doi: 10.1016/j.semcdb.2017.10.034.
85. Fujita, J., Crane, A. M., Souza, M. K., Dejosez, M., Kyba, M., et al. (2008) Caspase activity mediates the differentiation of embryonic stem cells, *Cell Stem Cell*, **2**, 595-601, doi: 10.1016/j.stem.2008.04.001.
86. Fernando, P., Kelly, J. F., Balazsi, K., Slack, R. S., and Megeney, L. A. (2002) Caspase 3 activity is required for skeletal muscle differentiation, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **99**, 11025-11030, doi: 10.1073/pnas.162172899.
87. Kim, J.-S., Ha, J.-Y., Yang, S., and Son, J. H. (2017) A novel non-apoptotic role of procaspase-3 in the regulation of mitochondrial biogenesis activators, *J. Cell. Biochem.*, **119**, 347-357, doi:10.1002/jcb.26186.
88. Huang, Q., Li, F., Liu, X., Li, W., Shi, W., et al. (2011) Caspase 3-mediated stimulation of tumor cell repopulation during cancer radiotherapy, *Nat. Med.*, **1**7, 860-866, doi: 10.1038/nm.2385.
89. Shen, X., Venero, J. L., Joseph, B., and Burguillos, M. A. (2018) Caspases orchestrate microglia instrumental functions, *Progr. Neurobiol.*, **171**, 50-71, doi: 10.1016/j.pneurobio.2018.09.007.
90. Maelfait, J., Vercammen, E., Janssens, S., Schotte, P., Haegman, M., et al. (2008) Stimulation of Toll-like receptor 3 and 4 induces interleukin-1beta maturation by caspase-8, *J. Exp. Med.*, **205**, 1967-1973, doi: 10.1084/jem.20071632.
91. Gurung, P., and Kanneganti, T. D. (2015) Novel roles for caspase-8 in IL-1β and inflammasome regulation, *Am. J. Pathol.*, **185**, 17-25, doi: 10.1016/j.ajpath.2014.08.025.
92. Schwarzer, R., Laurien, L., and Pasparakis, M. (2020) New insights into the regulation of apoptosis, necroptosis, and pyroptosis by receptor interacting protein kinase 1 and caspase-8, *Curr. Opin. Cell Biol.*, **63**, 186-193, doi: 10.1016/j.ceb.2020.02.004.
93. Xia, S., Hollingsworth, L. R., 4th, and Wu, H. (2020) Mechanism and regulation of gasdermin-mediated cell death, *Cold Spring Harb Perspect Biol.*, **12**, a036400, doi: 10.1101/cshperspect.a036400.
94. Geisbrecht, E. R., and Montell, D. J. (2004) A role for Drosophila IAP1-mediated caspase in-hibition in Rac-dependent cell migration, *Cell*, **118**, 111-125, doi: 10.1016/j.cell.2004.06.020.
95. Graf, R. P., Keller, N., Barbero, S., and Stupack, D. (2014) Caspase-8 as a regulator of tumor cell motility, *Curr. Mol. Med.*, **14**, 246-254, doi: 10.2174/1566524014666140128111951.
96. Torres, V. A., Mielgo, A., Barbero, S., Hsiao, R., Wilkins, J. A., et al. (2010) Rab5 mediates caspase-8-promoted cell motility and metastasis, *Mol. Biol. Cell*, **21**, 369-376, doi: 10.1091/mbc.e09-09-0769.

97. Aram, L., Yakobi-Sharon, K., and Arama, E. (2017) CDPs: Caspase-dependent non-lethal cellular processes, *Cell Death Differ.*, **24**, 1307-1310, doi: 10.1038/cdd.2017.111.

98. Espinosa-Oliva, A.M., García-Revilla, J., Alonso-Bellido, I. M., and Burguillos, M. A. (2019) Brainiac caspases: Beyond the wall of apoptosis, *Front. Cell Neurosci.*, **13**, 500, doi: 10.3389/fncel.2019.00500.

THE APOPTOTIC FEATURES IN NON-APOPTOTIC PROCESSES

Review

M. A. Savitskaya, I. I. Zakharov, and G. E. Onishchenko*

Lomonosov Moscow State University, Faculty of Biology, 119234 Moscow, Russia; e-mail: galina22@mail.ru

Apoptosis is the most thoroughly studied type of regulated cell death. Certain events, such as externalization of phosphatidylserine into the outer leaflet of plasma membrane, mitochondrial outer membrane permeabilization, caspase cascade activation, DNA fragmentation and blebbing, are widely considered to be hallmarks of apoptosis as well as being traditionally viewed as irreversible. This review shows that these events can also under particular circumstances participate in normal cell life processes not associated with induction of apoptosis – cell differentiation, division, and motility, as well as non-apoptotic types of cell death. Moreover, these processes may often be reversible. The article focuses on three processes phosphatidylserine: externalization, blebbing and activation of caspases. Mitochondrial outer membrane permeabilization and DNA fragmentation are not discussed in this review.

Keywords: apoptosis, caspase activation, MOMP, PS externalization, blebbing

EDN: CAQKHS
БИОХИМИЯ, 2022, том 87, вып. 3, с. 356 – 375

УДК 577.29

РОЛЬ ГЛИКОПРОТЕИНА МУЦИН 2 И L-ФУКОЗЫ ВО ВЗАИМОДЕЙСТВИИ ИММУНИТЕТА И МИКРОФЛОРЫ НА ПРИМЕРЕ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЙ МОДЕЛИ ВОСПАЛИТЕЛЬНЫХ ЗАБОЛЕВАНИЙ КИШЕЧНИКА

© 2022 В.Д. Бец[1], К.М. Ачасова[2,3], М.А. Борисова[4], Е.Н. Кожевникова[1,2,3], Е.А. Литвинова[2]*

[1] *Новосибирский государственный аграрный университет, 630039 Новосибирск, Россия*

[2] *Научно-исследовательский институт нейронаук и медицины, 630117 Новосибирск, Россия; электронная почта: litvinovaea@physiol.ru*

[3] *Институт молекулярной и клеточной биологии СО РАН, 630090 Новосибирск, Россия*

[4] *Федеральный исследовательский центр Институт цитологии и генетики СО РАН, 630090 Новосибирск, Россия*

Поступила в редакцию 10.11.2021
После доработки 24.02.2022
Принята к публикации 24.02.2022

В основе развития воспалительных заболеваний кишечника у человека лежит множество факторов. В том числе огромную роль играют дисбаланс микробиоты и истончение мукозального слоя в толстом кишечнике. Патогенные микроорганизмы также усугубляют протекание заболеваний. Было выполнено исследование роли дефицита муцина 2 в формировании микрофлоры кишечника на экспериментальной модели мышей с нокаутом гена *Muc2* в присутствии инфекции *Helicobacter* spp. А также проведена оценка восстанавливающего и противовоспалительного эффекта пищевой L-фукозы у мышей *Muc2*$^{-/-}$ на микрофлору и иммунитет. С этой целью у животных исследовали бактериальное разнообразие в фекалиях до и после применения антибактериальной терапии и оценивали роль пищевой L-фукозы в её восстановлении. Для определения влияния бактериального дисбаланса и роли фукозы на иммунную систему определяли уровни мРНК генов провоспалительных цитокинов (*Tnf*, *Il1a*, *Il1b*, *Il6*) и транскрипционных факторов Т-клеток (*Foxp3* – Treg, *Rorc* – Th17, *Tbx21* – Th1) в ткани толстой кишки у мышей *Muc2*$^{-/-}$. Значительная элиминация бактерий на фоне применения антибиотиков вызывала снижение фукозы в кишечнике, а также провоцировала снижение транскрипционного фактора Т-регуляторных клеток (*Foxp3*). При добавлении к антибиотикам пищевой L-фукозы уровень бактериальной ДНК *Bacteroides* spp. в фекалиях мышей *Muc2*$^{-/-}$ частично восстанавливался. В регуляции воспаления у мышей *Muc2*$^{-/-}$ участвуют Т-регуляторные клетки. Антибиотики снижали их количество, что не позволило уменьшить воспалительный ответ на инфекцию. Фукоза, как компонент муцина 2, при антибактериальной терапии мышей *Muc2*$^{-/-}$ помогает сохранить *Bacteroides* spp. и восстановить биохимические показатели, но не влияет на воспалительный ответ.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: ВЗК, макрофаги, патогены, микробиота, антибиотики, L-фукоза, муцин 2.

DOI: 10.31857/S0320972522030046

ВВЕДЕНИЕ

Во всём мире стремительно набирает темпы распространение воспалительных заболеваний кишечника (ВЗК), в том числе в США и странах Западной Европы отмечаются более высокие показатели заболеваемости язвенным колитом (ЯК) и болезнью Крона (БК), чем в других странах мира. По последним данным, в США и Европе более 3 млн больных ВЗК. В России же эти показатели, по опубликованным данным, составляют 4,1 на 100 тыс. населения для ЯК и 0,8 на 100 тыс. – для БК. Ежегодный прирост заболеваемости составляет 5–20 случаев на 100 тыс. населения, и этот показатель продолжает увеличиваться [1].

В этиологии ВЗК лежат полифакторные компоненты, среди которых отмечают: генетическую предрасположенность, изменение состава микробиоты кишечника, применение различного рода лекарственных препаратов (в том числе и антибиотиков), дисбаланс механизмов адаптивной и врождённой иммунных систем, а также влияние диет и факторов окружающей среды [2]. Особую роль в развитии ВЗК играет рацион питания. Диета способна оказывать

Принятые сокращения: БК – болезнь Крона; ВЗК – воспалительные заболевания кишечника; ЖКТ – желудочно-кишечный тракт; ЯК – язвенный колит; DSS – декстран сульфат натрия; Treg – Т-регуляторные клетки.

* Адресат для корреспонденции.

сильное влияние на состав микрофлоры кишечника, вызывая дисбиоз, повреждая слизистый слой, что, в свою очередь, повышает проницаемость тканей кишечника и создаёт благоприятные условия для адгезии и развития патогенной и условно-патогенной микрофлоры [3]. Существуют данные о росте показателей БК и ЯК в некоторых районах Азии в связи с вестернизацией рациона, характеризующейся преобладанием пищи с высоким содержанием жиров, животного белка, сахара и снижением потребления клетчатки [4].

Поскольку микробиом кишечника является уникальной экосистемой, вовлечённой практически во все процессы жизнедеятельности макроорганизма, важно учитывать особо тесное взаимодействие бактериального сообщества с иммунной системой хозяина, которое начинается на ранних стадиях онтогенеза и сопровождает всю жизнь [5, 6]. По последним данным, микробиом кишечника человека формируется до 5-летнего возраста [7].

Ещё одной причиной развития ВЗК считают иммунную реакцию на одного или нескольких представителей микрофлоры кишечника [8]. Бактериальные агенты в составе кишечной микробиоты способны запускать как воспалительные, так и противовоспалительные процессы в организме хозяина [9]. Так, например на безмикробных мышах (germ-free) было показано, что животные с отсутствием бактерий в просвете кишечника имеют менее развитую иммунную систему по сравнению с животными, выращенными в обычных условиях [6]. У безмикробных мышей регистрировали меньшее количество Пейеровых бляшек и брыжеечных лимфатических узлов, а также у некоторых мышей в желудочно-кишечном тракте (ЖКТ) отсутствуют подтипы Т-хелперов [10].

Терапия ВЗК на данный момент ориентирована на снижение патогенной нагрузки и уменьшение альтерации тканей кишечника с помощью стероидных противовоспалительных препаратов и антибиотиков [11]. Антибактериальная терапия влияет на изменение микробиомного состава, что способствует разрастанию патогенной микрофлоры. Побочными эффектами могут быть диарея, вызванная инфекционными бактериями *Clostridium difficile* и *Salmonella typhimurium*, а также различные аутоиммунные заболевания [9]. *Helicobacter pylori* – широко распространённый возбудитель инфекции желудка среди людей, другие виды *Helicobacter* также являются серьёзной проблемой для лабораторных грызунов [12]. На сегодняшний день у мышей описаны следующие виды *Helicobacter*: *H. bilis*, *H. ganmani*, *H. hepaticus*, *H. muridarum*, *H. mastomyrinus*, *H. rappini*, *H rodentium* и *H. typhlonius.* Видами *Helicobacter*, связанными с клиническими заболеваниями у крыс и мышей, в первую очередь являются *H. bilis* и *H. Hepaticus* [13]. При этом *H. pylori*, характерный для человека, у заражённых мышей FVB/N-Tg (Ins1-GAS)1Sbr/J нарушал состав микробиты желудка [14]. Кроме того, есть предположение, что вызванная *H. pylori* патология желудка у мышей линии C57BL/6 может быть ослаблена сочетанной инфекцией *H. bilis* или *H. muridarum* или стимулироваться сочетанной инфекцией *H. hepaticus*, все они являются энтерогепатическими хеликобактерами, преимущественно колонизирующими толстую кишку [15, 16]. Недавнее исследование продемонстрировало, что инфекция *H. pylori* у мышей C57BL/6 изменяет как желудочный, так и кишечный микробный состав, а также модулирует иммунные ответы хозяина как в желудке, так и в лёгких [14].

Что касается энтерогепатических видов *Helicobacter* (Enterohepatic *Helicobacter*, ЕНН), то на животных моделях было показано, что *H. hepaticus* и *H. bilis* вызывают стойкое воспаление в толстой и слепой кишках у иммунодефицитных грызунов [15, 16]. *H. hepaticus* вызывает колит у мышей с дефицитом интерлейкина 10 (IL-10), свободных от других патогенов, посредством механизма, зависимого от интерлейкина 12 (IL-12) и интерферона-гамма (IFN-gamma) [15]. *H. muridarum* усиливает воспаление в модели острого колита [17] и провоцирует БК-подобное воспаление у мышей с тяжёлым комбинированным иммунодефицитом при получении Т-клеток [18].

Применение пробиотиков и пребиотиков в качестве поддерживающей терапии показало хорошие результаты при синдроме раздражённого кишечника (СРК) и у пациентов с *C. difficile* [19], однако не столь эффективно при средней и высокой степени тяжести ВЗК и не всегда способствуя восстановлению деятельности кишечной микрофлоры и снижению воспалительного процесса в тканях кишечника [20].

Для коррекции микробиомных отклонений у пациентов с ЯК была предпринята попытка применения заместительной терапии в форме трансплантации кала от здоровых пациентов. Однако наряду с положительными результатами исследований, остаётся не раскрытым до конца вопрос побочных действий данной методики и вопросы контроля исследований [21]. Недавние исследования на эту тему дают основание полагать, что этот подход способен работать и в обратную (негативную для здоровья пациента) сторону. Показано, что микроорганизмы, вызывающие воспаление кишечника, но не проявля-

ющиеся у донора, могут негативно влиять на реципиента с ВЗК [20].

Помимо медикаментозной и диетической поддержки пациента с ВЗК, существуют также хирургические методы лечения, применение которых определяется степенью тяжести поражения тканей, площадью поражения и проявлением внекишечных симптомов. Здесь также существуют факторы риска послеоперационных осложнений, в частности резервуарит, как частое осложнение при ИАРА (илеоанальный резервуарный анастомоз), а также воспаление слизистой оболочки прямой кишки, сохраняемое при наложении аппаратного анастомоза [11].

Таким образом, на сегодняшний день нет эффективного способа лечения ВЗК, и эти патологии остаются объектом пристального внимания исследователей. В связи с этим актуальными являются поиски способов облегчения состояние пациентов с ВЗК и увеличения периода ремиссии.

На всех этапах изучения острого и хронического воспаления кишечника использовали различные модели на животных – от беспозвоночных (нематод, дрозофил, кишечнополостных) [22], используемых для изучения механизмов врождённого иммунитета, до свиней, как альтернативной модели млекопитающих с морфофункциональной схожестью ЖКТ человека [23]. Также используют модели на приматах, которые обеспечивают более сопоставимые данные из-за их высокой степени генетического и физиологического родства с человеком. Однако существуют проблемы этического характера и опасность переноса высоковирулентных зоонозных агентов [24, 25]. Есть модели воспаления кишечника на кроликах, морских свинках [26] и, в меньшей степени, жвачных животных. Например, овца (как биологическая модель) использовалась для исследований кишечника, но, в отличие от моногастричных видов (*Homo sapiens*, грызуны и свиньи), большая часть бактериальной ферментации углеводов у овец, как правило, происходит в рубце, а не в толстом кишечнике [27]. Есть модели ВЗК на собаках, так как у них проявляется дисфункция генов, аналогичная людям с БК [28]. Несмотря на огромный выбор моделей, оптимальными являются лабораторные грызуны, среди которых мыши играют значимую роль, поскольку морфофункциональное развитие их кишечника относительно похоже на развитие кишечника человека и у них есть многие из тех же иммунных ответов и генов [29, 30].

Модели мышей с ВЗК можно разделить на 3 категории: индуцируемые химическим путём, полученные путём адоптивного переноса субпопуляций Т-клеток и развивающиеся спонтанно у генетически модифицированных мышей (например, мыши *Il10*$^{-/-}$) [31].

Химически-индуцированный колит вызывают добавлением отрицательно заряженного сульфатированного полисахарида, декстрана сульфата натрия (DSS), который повреждает эпителиальные клетки. Врождённые иммунные клетки в ответ на альтерацию тканей выделяют цитокины, вызывая воспаление в толстой кишке, которое характеризуется язвами и инфильтрацией гранулоцитов [32]. Ещё одна химически-индуцированная модель – это использование тринитробензолсульфокислоты (TNBS) для изучения иммунологических аспектов БК, так как кислота вызывает Th1-опосредованный иммунный ответ, характеризующийся инфильтрацией клеток Т-хелперов, нейтрофилов и макрофагов в окружающие ткани [32]. Все модели мышей с ВЗК, которые индуцируются химическим путём, имеют общую тенденцию повреждения тканей кишечника, что вызывает воспалительную реакцию. Важно отметить, что поражения кишечника, наблюдаемые у людей с ВЗК, не идентичны повреждениям, наблюдаемым у мышей после воздействия химических агентов. Например, введение DSS мышам вызывает химическое повреждение эпителиальной выстилки, которое имитирует повреждение слизистой оболочки, наблюдаемое у людей с ЯК, тяжесть повреждений не всегда является репрезентативной для людей с ЯК [30, 33].

Существует модель воспаления кишечника с переносом адоптивных Т-клеток, которая способствует развитию хронического воспаления тонкой и толстой кишок. Для создания такой модели Т-клетки $CD4^+CD45RB^{hight}$ (которые являются $CD25^-$) сортируются и выделяются из донорских спленоцитов мышей линии BALB/c; при переносе клеток сингенному иммунодефицитному реципиенту *Prkdc*^{SCID} или *Rag2*$^{-/-}$ создаётся модель первичного воспаления в толстой кишке. Это воспаление объясняется отсутствием Т-регуляторных клеток (Treg) в популяции наивных Т-клеток у реципиента. Поэтому модель адаптивного переноса Т-клеток используется для изучения роли патогенных Т-клеток в воспалении слизистой оболочки, и на этой модели было выполнено множество исследований Treg и других популяций Т-клеток [33].

Также существует более 74 видов генетически модифицированных линий мышей. Некоторые из них несут гены восприимчивости, идентифицированные при ВЗК человека, и функции некоторых других генов восприимчивости к ВЗК [34]. Основная концепция генетически спроектированных моделей воспаления заключается в нока-

уте гена, определяющего морфофункциональные особенности строения кишечника и особенности иммунного ответа. Так, на примере моделей мышей с конститутивным нокаутом *Il10*$^{-/-}$ показано спонтанное развитие колита, поскольку Treg этих животных неспособны продуцировать IL-10. В частности, наблюдается воспаление толстой кишки, характеризующееся воспалительным инфильтратом лимфоцитов, макрофагов и нейтрофилов [34]. Другая трансгенная модель – это мыши с нуль-мутацией гена *Muc2*, кодирующего белок муцин 2, который участвует в формировании защитного муцинового слоя в тонкой и толстой кишке [35, 36]. Таким образом, различные методы воспроизведения воспаления на мышах используются при определённо поставленных задачах исследования. Однако стоит отметить, что модели с генетическим нокаутом точно определяют фено- и генотипические особенности с рождения, что может играть важную роль при решении определённых задач, в то время как все остальные модели с повреждением и переносом Т-клеток – приобретённые, что может накладывать отпечаток на результаты исследования и их последующий анализ.

Известно, что признаком всех моделей ВЗК является истончение мукозального слоя кишечника и изменение кишечной микрофлоры [37, 38]. Основным компонентом слизистой оболочки кишечника является гликозилированный белок (муцин 2) с терминальными молекулами фукозы и сиаловой кислоты. Моносахариды служат не просто источником энергии, но и фактором вирулентности для кишечных бактерий [39-41]. Несмотря на активное изучение взаимного влияния друг на друга иммунитета и кишечной микрофлоры, механизм развития воспаления при ВЗК до сих пор остаётся не раскрытым. Ранее было показано, что L-фукоза влияет на репродуктивную функцию у мышей *Muc2*$^{+/-}$. В этом исследовании было обнаружено, что пищевая фукоза может действовать как дифференциальный регулятор поляризации макрофагов во время имплантации в зависимости от иммунного статуса хозяина [42]. Также было установлено, что L-фукоза помогает элиминировать протозойную инфекцию у мышей *Muc2*$^{-/-}$ и способна восстанавливать триптофан-продуцируемые бактерии в кишечнике при DSS-индуцируемом колите [36, 43–46].

В представленной работе мы показали, что отсутствие муцина 2 и входящих в его состав моносахаридов влияют на разнообразие микрофлоры кишечника в присутствии инфекции *Helicobacter* spp., а также что обеднение симбиотической и патогенной микрофлоры на фоне приёма антибиотиков меняет характер воспаления на примере экспериментальной модели ВЗК мышей *Muc2*$^{-/-}$. Мы продемонстрировали, как пищевая L-фукоза оказывает восстанавливающий эффект на микрофлору кишечника и оказывает противовоспалительное действие у мышей *Muc2*$^{-/-}$.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Животные, условия содержания. Исследование проводилось в Центре генетических ресурсов ИЦиГ СО РАН (уникальный идентификатор проекта RFMEFI62117X0015). Все манипуляции с животными были одобрены межинститутской комиссией по биоэтике СО РАН (номер 18.6 от 14.10.2013). В исследовании использовали животных SPF-статуса – свободных от специфических патогенов, которые входят в расширенный список, рекомендованный FELASA в 2014 г. [47]. Исключением был *Helicobacter* spp., который детектировали у животных на протяжении всего эксперимента.

Для эксперимента использовали мышей *Muc2*$^{-/-}$ инбредного скрещивания, которые поступили в ЦКП «Центр генетических ресурсов лабораторных животных, “SPF-виварий”» ИЦиГ СО РАН из ФИЦ «Фундаментальные основы биотехнологий» РАН, г. Москва. В целях обеспечения максимально различимой микрофлоры между линиями и оценки её роли в развитии воспаления в качестве контроля использовали мышей линии C57BL/6, а не сибсов от гетерозиготного скрещивания.

Животных содержали однополыми группами по 3–5 особей в индивидуальных вентилируемых клетках («Optimice», США). Световой режим искусственный: 14 ч освещения и 10 ч темноты; температура – 20–22 °C; влажность – 36%; давление – 38 Па. Для подстила использовали обеспыленную березовую стружку. Животные получали корм ssniff® R/M-H autoclavable V1534-3 («Ssniff», Германия) *ad libitum*. В качестве питьевой воды животным предоставляли стерильную деионизированную воду с добавлением минералов K^+, Mg^{2+} («Северянка», Санкт-Петербург, Россия) *ad libitum*.

Антибактериальная терапия. В целях эксперимента группе животных обеих линий (n = 10) с питьевой водой добавляли три антибиотика: амоксицилин, метронидазол и кларитромицин. Расчёт антибиотиков в 1 мл воды был проведён из количества потребляемой воды одним животным в день (в среднем 4 мл):

- амоксициллин в концентрации 0,75 мг/мл, суточная доза для одного животного составила 3 мг;

- метронидазол в концентрации 0,25 мг/мл, суточная доза для одного животного составила 1 мг;
- кларитромицин в концентрации 0,25 мг/мл, суточная доза для одного животного составила 1 мг.

Соответствующей группе мышей (по 10 животных в каждой группе) в питьевую воду добавляли три антибиотика вместе с 0,1%-ной L-фукозой.

Концентрации антибиотиков и фукозы брали из ранее опубликованных работ [35, 44, 46, 48]. Расчёт дозы антибиотиков проводили согласно стандартной схемы лечения мышей *Helicobacter* spp. [49]. Ранее в нашей лаборатории было показано, что такие дозы антибиотиков только при добавлении в корм наиболее эффективны в борьбе с хеликобактерной инфекцией [36, 50].

Гистологический анализ толстой кишки. Для гистологического анализа образцы проксимального отдела толстой кишки мышей длиной ~5 мм фиксировали в 10%-ном формалине, далее обезвоживали в спиртах восходящей концентрации и последовательно проводили через бутанол и ксилол с последующим заключением в парафин. Далее выполняли срезы толщиной 3 мкм и окрашивали с помощью двух окрашиваний: на ШИК-реакцию и гематоксилин-эозином («БиоВитрум», Россия). Перед окраской образцы помещали в толуол для удаления парафина, затем проводили по спиртам нисходящей концентрации и доводили до воды. Далее выполняли окрашивание, согласно инструкции производителя.

Анализ экспрессии генов в толстой кишке. Экспрессию генов в ткани толстой кишки оценивали по количеству мРНК соответствующего гена методом ПЦР в реальном времени. Образец ткани дистального отдела толстой кишки (~5 мм) гомогенизировали в 500 мкл TriReagent («Invitrogen», США), затем добавляли 100 мкл хлороформа и центрифугировали 10 мин, 12 000 g, 4 °C. Водную фазу, содержащую РНК, отбирали в чистую пробирку и осаждали изопропанолом (на льду в течение 10 мин), центрифугировали 15 мин, 12 000 g, 4 °C, а затем промывали 75%-ным этанолом. Образец высушивали и растворяли РНК в ультрачистой деионизированной воде (Milli-Q). Затем образцы РНК обрабатывали ДНКазой I («Thermo Scientific», США), согласно рекомендациям производителя. Обработанную РНК осаждали 96%-ным этанолом при 20 °C в течение 2 ч, а затем центрифугировали (15 мин, 12 000 g, 4 °C), далее промывали 70%-ным этанолом, высушивали от спирта и растворяли в воде Milli-Q. Концентрацию РНК в образцах определяли при помощи NanoDrop 2000 («Thermo Scientific»).

кДНК получали путём проведения реакции обратной транскрипции с матрицы РНК, реакцию проводили с обратной транскриптазой MulV («СибЭнзим», Россия), согласно рекомендациям производителя. Смесь РНК (3–7 мкг), праймерных олигонуклеотидов (oligo dT и Random, 600 нг каждого) («БИОСЕТ», Россия) и нуклеотидов (концентрация 1 мМ каждого) нагревали до 65 °C в течение 5 мин и охлаждали в течение 5 мин на льду. Затем в реакционную смесь добавляли обратную транскриптазу (100 Ед.а.) и реакционный буфер. Реакцию проводили при 37 °C в течение часа, а затем инактивировали фермент нагреванием до 70 °C в течение 5 мин. Полученные образцы кДНК хранили при –20 °C.

Количество мРНК генов оценивали по количеству кДНК в образце при помощи количественной ПЦР в реальном времени. Последовательности праймерных олигонуклеотидов подбирали самостоятельно (табл. 1).

Правильность полученного продукта оценивали по длине бэнда полученного продукта методом электрофореза в агарозном геле. Реакционная смесь (20 мкл) содержала БиоМастер HS-qPCR SYBR Blue 1x («БиоЛабМикс», Россия), соответствующие праймеры (0,3 мкМ каждого) и 40–200 нг кДНК. ПЦР проводили в детектирующем амплификаторе CFX96 TouchTM Deep Well Real-Time PCR Detection System («BioRad Laboratories», США). ДНК денатурировали 5 мин при 95 °C; далее 40 циклов: денатурация – 95 °C, 15 с; отжиг праймеров – 62 °C, 25 с; элонгация – 72 °C, 25 с. Каждый эксперимент повторяли 3 раза и в качестве результата брали среднее значение по трём показателям. Не было ни одного случая повтора, который отличался от двух других более чем на 5%. Количество мРНК целевого гена нормировали на количество мРНК гена бета-тубулина (Tubb) по формуле: 2^ (Ct целевого гена – Ct гена Tubb), где Ct – цикл, соответствующий пороговому уровню светимости продукта ПЦР.

Определение количества фукозы в толстой кишке. Образец ткани толстой кишки гомогенизировали в жидком азоте, для анализа брали 5 мг образца и добавляли 1 мл 96%-ного этанола, затем перемешивали 5 мин и центрифугировали 10 мин при 3000 g и 4 °C. Далее переносили по 30 мкл супернатанта в две чистые пробирки и оставляли на льду для определения количества свободной фукозы (в одной пробирке определяли фукозу, а во второй – фон образца). К оставшемуся образцу ткани добавляли ещё 1 мл 96%-ного этанола, и после повторения описан-

ной выше процедуры удаляли супернатант, чтобы избавиться от следовых остатков свободной фукозы. Затем помещали пробирку с тканью на лёд и растворяли осадок в 200 мкл 0,1N NaOH, после растворения переносили по 20 мкл образца в две чистые пробирки для определения связанной с белками фукозы (в одной пробирке определяли фукозу, а во второй – фон образца). Во все пробирки с образцами добавляли по 150 мкл реактива серной кислоты (концентрированная H_2SO_4 : H_2O = 6 : 1), охлаждённого до 0 °C. Далее содержимое пробирок перемешивали и инкубировали в термостате при температуре 100 °C в течение 5 мин, а затем охлаждали под проточной водой. Ко всем пробам, кроме тех, которые служили для определения фона, добавляли по 10 мкл 3%-ного гидрохлорид L-цистина (CysHCl) и инкубировали 90 мин при комнатной температуре. Далее определяли поглощение при 405/450 нм. Для построения калибровочных кривых использовали растворы L-фукозы, анализ калибровочных образцов проводили параллельно с экспериментальными образцами аналогичным образом (с шага добавления реактива серной кислоты). Количество фукозы в образцах нормировали на количество белка, определенное методом Брэдфорда [51], и выражали как мкг фукозы на мг белка.

Определение концентрации цитокинов в крови методом мультиплексного анализа. Для измерения уровня цитокинов 200 мкл образца крови (n = 6 – для контроля, n = 3 – для *Muc2*$^{-/-}$) центрифугировали при 3 000 g в течение 15 мин при 4 °C, затем отбирали в чистую пробирку по 150 мкл сыворотки. Концентрацию цитокинов в сыворотке измеряли с помощью 6-плексной панели MILLIPLEX MAP Mouse Cytokine Magnetic Bead Panel («Merck», Германия) в соответствии с рекомендациями производителя. Детекцию проводили с помощью системы Luminex 200 («Merck»), используя программное обеспечение xPONENT 3.1. Концентрацию цитокинов (IL-1a, IL-17, IL-12p40, IL-12p70, IL-22, INF-gamma) представляли как пг цитокина в мл крови.

Определение бактериальной ДНК в фекалиях и ткани толстой кишки методом количественной ПЦР в реальном времени. Количество бактерий в фекалиях оценивали по количеству бактериальной ДНК гена 16S рибосомной РНК (рРНК), нормированному на ДНК гена 28S рРНК *Mus musculus*. ДНК-консервативный участок гена 16S рРНК, а также *Helicobacter* spp., *Bacteroides* spp., *Lactobacillus* spp. определяли при помощи праймеров к участку гена 16S рРНК соответствующей группы бактерий. Для определения общего количества бактерий использовали праймеры к консервативному участку бактериального гена 16S рРНК. Количество ДНК гена 28S рРНК *M. musculus* определяли при помощи праймерных олигонуклеотидов («БИОСЕТ»), которые подбирали самостоятельно (табл. 2).

Таблица 1. Последовательности олигонуклеотидов, используемых для определения уровня экспрессии генов мРНК

Название праймера	Последовательность 5′→3′	Мишень
Tnf-F	CCCTCACACTCAGATCATCTTCT	мРНК *Tnf* (кДНК)
Tnf-R	GGCACCACTAGTTGGTTGTCTTT	
Il1b-F	AAGGAGAACCAAGCAACGACAA	мРНК *Il1b* (кДНК)
Il1b-R	AACTCTGCAGACTCAAACTCCA	
Il6-F	GCTACCAAACTGGATATAATCAGGA	мРНК *Il6* (кДНК)
Il6-R	CCAGGTAGCTATGGTACTCCAGAA	
Rorc-F	ACTACGGGGTTATCACCTGT	мРНК *Rorc* (кДНК)
Rorc-R	GTGCAGGAGTAGGCCACATT	
Foxp3-F	AGGAGACATCCATCAGGGCT	мРНК *Foxp3* (кДНК)
Foxp3-R	TGCTGCTTTAGGTGGAGTGG	
Il1a-F	CCCGTCCTTAAAGCTGTCTG	мРНК *Il1a* (кДНК)
Il1a-R	AATTGGAATCCAGGGGAAAC	
Tubb5-F	TGAAGCCACAGGTGGCAAGTAT	мРНК *Tubb5* (кДНК)
Tubb5-R	CCAGACTGACCGAAAACGAAGT	
Tbet-F	CCAGGGAACCGCTTATATG	мРНК *Tbx21* (кДНК)
Tbet-R	CGATCATCTGGGTCACATTGT	

Все праймерные последовательности подбирали при помощи программ Primer-BLAST [52] и Unipro UGENE [53]. Реакционная смесь (20 мкл) содержала БиоМастер HS-qPCR SYBR Blue 1x («БиоЛабМикс»), соответствующие праймеры (300 нМ каждого) и ДНК, выделенную из фекалий. ПЦР проводили в детектирующем амплификаторе CFX96 TouchTM Deep Well Real-Time PCR Detection System. ДНК денатурировали 5 мин при температуре 95 °C; далее проводили 40 циклов: денатурация – 95 °C, 15 с; отжиг праймеров – 62 °C, 25 с; элонгация – 72 °C, 25 с.

Нормирование бактериальной ДНК на ДНК мыши (*M. musculus*) выполняли по формуле: 2^ (Ct гена 28S рРНК *M. musculus* – Ct гена 16S рРНК *Bacteria*), для специфических бакте-

Таблица 2. Последовательности олигонуклеотидов, используемых для определения количества ДНК бактерий

Название праймера	Последовательность 5′→3′	Мишень
Mus28S-F	CCTGGCGCTAAACCATTCGT	28S pRNA *M. musculus*
Mus28S-R	AAAGCCCGCAGAGACAAACC	
16S-F	TCCTACGGGAGGCAGCAG	16S pRNA *Bacteria*
16S-R	ATTACCGCGGCTGCTGG	
Bac.spp-F	GAGAGGAAGGTCCCCCAC	16S pRNA *Bacteroides* spp.
Bac.spp-R	CGCTACTTGGCTGGTTCAG	
Lac.spp-F	ATCTTCCACAATGGRCGC	16S pRNA *Lactobacillus* spp.
Lac.spp-R	GGCTGCTGGCACGTAGTTAG	
Hel.spp-F	CGGAGGGTGCAAGCGTTACT	16S pRNA *Helicobacter* spp.
Hel.spp-R	ATTCCACCTGCCTCTCCCAC	
E. coli-F	GGCAGGCCTAACACATGCAA	16S pRNA *Escherichia* coli
E. coli-R	CCCCTCTTTGGTCTTGCGAC	
Staphyl-F	ATGCAAGTCGAGCGAACG(A)GA	16S pRNA *Staphylococcus* spp.
Staphyl-R	TGTCTCAGTTCCAGTGTGGC	
Str.spp-F	GTACAGTTGCTTCAGGACGTATC	16S pRNA *Streptococcus* spp.
Str.spp-R	ACGTTCGATTTCATCACGTTG	
CCOC-F	GACGCCGCGTGAAGGA	16S pRNA *Blautia* spp.
CCOC-R	AGCCCCAGCCTTTCACATC	

рий – по формуле: 2^ (Ct гена 16S рРНК *Bacteria* – Ct гена 16S рРНК специфическая для определенного сообщества бактерий), где Ct – цикл, соответствующий пороговому уровню светимости продукта ПЦР. Уровень бактериальной ДНК у мышей дикого типа C57BL/6 и у мышей *Muc2*$^{-/-}$ выражали в условных единицах.

Определение разнообразия бактериального состава. Разнообразие бактериальной микрофлоры определяли методом одноцепочечного конформационного полиморфизма (Single-strand conformation polymorphism, SSCP) гена 16S рРНК, за основу брали методику, предложенную Schwieger и Tebbe [54] в 1998 г. Выделенную из фекалий ДНК объединяли по группам и проводили ПЦР, используя рекомбинантную ДНК-полимеразу Phusion High-Fidelity DNA Polymerase («Thermo Scientific») и праймеры («БИОССЕТ»), комплементарные вариабельному региону 4 (V4) гена 16S рРНК, обратный праймер был фосфорилирован на 5′-конце (табл. 3).

В реакционную смесь (High-Fidelity-буфер для полимеразы; 3% диметилсульфоксида; 200 мкМ нуклеотиды; 1 мкМ праймеры; ДНК-полимераза) добавляли 25 нг ДНК (общий объ-

Таблица 3. Последовательность олигонуклеотидов, используемых в методе SSCP

Название праймера	Последовательность 5′→3′	Краткое обозначение	Источник
Com-F	CAGCAGCCGCGGTAATAC	V4 16S pRNA *Bacteria*	[54]
Com-R	P-CCGTCAATTCCTTTGAGTTT		

ём реакции 50 мкл). Реакцию проводили в амплификаторе T100TM Thermal Cycler («BioRad Laboratories»). ДНК денатурировали при 98 °C 3 мин; затем проводили 35 циклов: денатурация – 98 °C, 15 с; отжиг праймеров – 50 °C, 20 с; элонгация – 72 °C, 20 с. Наличие продукта ПЦР проверяли при помощи электрофореза в 1,5%-ном агарозном геле с добавлением бромистого этидия. Электрофорез проводили в 0,5-кратном Tris-боратном буфере (44,5 мМ Tris; 44,5 мМ борная кислота; 1 мМ ЭДТА; pH 8) в течение 40 мин при напряжении 130 В. Продукты ПЦР вычищали из реакционной смеси с помощью набора GeneJET PCR Purification Kit («Thermo Scientific»), согласно протоколу производителя. С очищенной пробой ставили реакцию с экзонуклеазой фага лямбда (Lambda Exonuclease, «Thermo Scientific»), согласно рекомендациям производителя. Данный фермент обладает экзонуклеазой активностью по отношению к двуцепочечным ДНК при наличии в них фосфатных групп на 5′-конце, с его помощью получали одноцепочечные ДНК. Полученные ДНК (10 мкл) денатурировали 5 мин при температуре 95 °C в 15 мкл денатурирующего буфера (95%-ный формамид; 10 мМ KOH) и охлаждали реакционную смесь на льду. К полученным образцам добавляли краску (0,1% бромфенолового синего; 0,1% ксиленцианола) в соотношении 1/100, наносили ДНК на 12%-ный полиакриламидный гель и проводили электрофорез в 1-кратном Tris-боратном буфере (89 мМ Tris; 89 мМ борная кислота; 2 мМ ЭДТА; pH 8) в течение 20 ч при напряжении 220 В. После электрофореза гель красили серебром [55]. Гель промывали ультрачистой деионизированной водой (Milli-Q) и фиксировали 20 мин в 10%-ном растворе уксусной кислоты. Затем отмывали гель от кислоты водой Milli-Q 3 раза по 2 мин и оставляли в растворе серебра (0,1% $AgNO_3$, 0,15%-ный параформальдегид) на 30 мин. Раствор серебра удаляли и промывали гель водой Milli-Q 20 с. Гель проявляли холодным проявочным раствором (3% Na_2CO_3; 0,3% параформальдегида; 0,0002% $Na_2S_2O_3$), после проявки окрашивание останавливали холодным 10%-ным раствором уксусной кислоты. Гель фотографировали при помощи гель-документирующей системы Gel DocTM XR+ System («Bio Rad», США).

Получение лимфоцитов из мезентериальных лимфатических узлов. Мезентериальные лимфатические узлы вырезали из брыжейки и помещали в пробирку на 1,5 мл, содержащую 500 мкл натрий-фосфатного буфера (1,8 мМ KH_2PO_4, 10 мМ Na_2HPO_4, 2,7 мМ KCl, 137 мМ NaCl; pH 7,4), далее пробирку держали на льду. Гомогенизировали лимфатические узлы при помощи пестикового ручного гомогенизатора («Sovtech», Россия), затем фильтровали суспензию через фильтр для клеток с диаметром пор 70 мкм («BD Falcon», США), объём суспензии клеток доводили до 1 мл натрий-фосфатным буфером, отбирали 50 мкл для подсчёта количества клеток в камере Горяева. Далее промывали суспензию 2 раза 2%-ным бычьим сывороточным альбумином (БСА) в том же натрий-фосфатном буфере и затем центрифугировали при 1500 g, 7 мин при 4 °C. Разбавляли лимфоциты буфером для окрашивания (1% БСА, 0,1% NaN_3 в натрий-фосфатном буфере).

Определение количества $CD25^+Foxp3^+CD4^+$ клеток методом проточной цитометрии. Полученную суспензию клеток разбавляли натрий-фосфатном буфером (1,8 мМ KH_2PO_4, 10 мМ Na_2HPO_4, 2,7 мМ KCl, 137 мМ NaCl; pH 7,4) до концентрации 3000–5000 клеток/мкл и проводили окрашивание клеток. Для этого 250 мкл суспензии инкубировали с антителами PE/Cy7-anti-CD4 и APC-anti-CD25 («BioLegend», США) 60 мин при +4 °C. Затем образцы фиксировали при помощи однократного реактива True-Nuclear™ Fix («BioLegend») 50 мин в темноте при комнатной температуре. Далее пермобилизировали клеточную мембрану при помощи однократного True-Nuclear™ Perm Buffer («BioLegend»), центрифугировали 10 мин при 2100 g и 20 °C. Затем разбавляли клетки 100 мкл буфера для пермобилизации True-Nuclear™ Perm («BioLegend») и инкубировали с антителами AlexaFluor488-anti-Foxp3 («BioLegend») 90 мин в темноте при комнатной температуре. Затем образцы промывали буфером для пермобилизации True-Nuclear™ Perm и буфером для окрашивания. После промывки клетки разбавляли буфером для окрашивания до концентрации 1500–3000 клеток/мкл и хранили в темноте при температуре 4 °C до анализа (1–2 дня). Анализ клеток проводили на проточном цитофлуориметре Guava easyCyte 8HT Flow Cytometer («Merk»), в каждом образце анализировали 50 000 лимфоцитов. В популяции лимфоцитов выделяли одиночные клетки (синглеты), затем выделяли одиночные $CD4^+$-лимфоциты. Процент $CD25^+Foxp3^+$-клеток определяли среди $CD4^+$-лимфоцитов, количество $CD4^+CD25^+Foxp3^+$-клеток вычисляли из клеточности и выражали как 10^6 клеток. Процент $CD4^+CD25^+$ и $CD4^+Foxp3^+$ определяли среди лимфоцитов.

Биохимический анализ крови. Биохимический анализ крови проводили на анализаторе Dimension RxL Max («Dade Bexring Inc.», США). Использовали картриджи с реагентами для определения креатинина, креатинкиназы, аланин-

аминотрансферазы (АЛТ), аспартатаминотрансферазы (АСТ) (Dimension Clinical Kit, «Siemens Healthcare Diagnostics, Inc.», США).

Статистическая обработка. Все данные представлены как среднее ± стандартное отклонение. Статистическую обработку полученных данных проводили при помощи программного обеспечения IBM@SPSS@Statistic (версия 23). Для анализа выборок, не описывающихся нормальным распределением, использовали непараметрические методы статистической обработки. Сравнение между двумя группами для выборок с нормальным распределением проводили при помощи *t*-критерия Стьюдента, а для выборок при отсутствии нормального распределения – при помощи критерия Манна–Уитни. Для сравнения групп, в которых детектировался или нет признак, использовали точный тест Фишера. Обработку данных по биохимическим показателям проводили методом MANOVA.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

Мыши *Muc2*$^{-/-}$ являются наиболее подходящей моделью для изучения ВЗК, поскольку нарушение синтеза муцина 2 связано с сокращением количества бокаловидных клеток у людей, которые страдают ЯК [56]. В данной работе у мышей линии C57BL/6 наблюдали ярко-розовые гранулы с гликопротеинами (ШИК-реакция) в бокаловидных клетках толстой кишки,

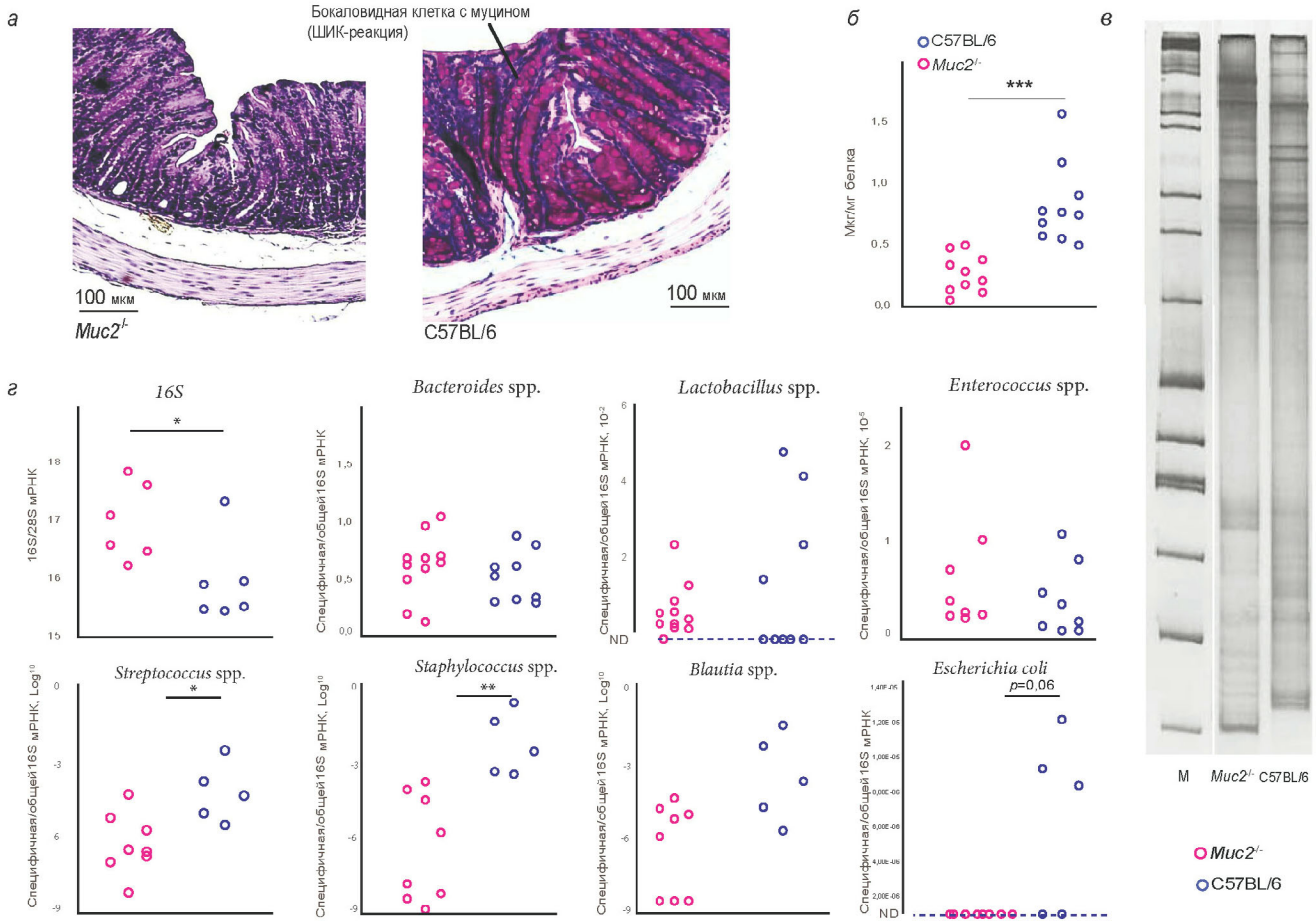


Рис. 1. Муцины на гистологических срезах толстой кишки и концентрация фукозы в толстой кишке, качественный и количественный бактериальный состав фекалий мышей *Muc2*$^{-/-}$ и дикого типа C57BL/6. *а* – Гистологический срез толстой кишки (проксимальный отдел) мышей *Muc2*$^{-/-}$ и дикого типа C57BL/6. Стрелка указывает на бокаловидную клетку с окрашенным (ШИК-реакция) муцином. *б* – Фукоза, связанная с белком в ткани толстой кишки мышей *Muc2*$^{-/-}$ ($n = 10$) и дикого типа C57BL/6 ($n = 10$). *в* – Качественный состав кишечной микрофлоры у мышей *Muc2*$^{-/-}$ и дикого типа C57BL/6, оценённый методом одноцепочечного конформационного полиморфизма (SSCP) вариабельного (V4) участка 16s рРНК. *г* – Количество бактериальной ДНК (16S рРНК *Bacteria*, $n = 12$; *Bacteroides* spp., $n = 20$; *Enterococcus* spp., $n = 20$; *Lactobacillus* spp., $n = 20$; *Streptococcus* spp., $n = 13$; *Staphylococcus* spp., $n = 13$; *Blautia* spp., $n = 13$; *E. coli*, $n = 13$) в фекалиях у мышей *Muc2*$^{-/-}$ и дикого типа C57BL/6. *** $p < 0,001$, *t*-тест Стьюдента. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ – Манн–Уитни *u*-тест. $p = 0,06$ точный тест Фишера. ND – ниже порога чувствительности метода детекции

тогда как у мышей линии *Muc2*$^{-/-}$ гранулы с гликопротеинами отсутствовали (рис. 1, *а*). Известно, что муцин 2 – основной гликопротеин, который вырабатывают бокаловидные клетки как толстой, так и тонкой кишок [57]. Именно поэтому у мышей *Muc2*$^{-/-}$ отсутствуют гранулы с муцином 2 в бокаловидных клетках.

Также известно, что у людей с БК нарушается фукозилирование муцина 2, т.е. процесс прикрепления терминального моносахарида фукозы [58]. На рис. 1, *б* мы наблюдали снижение количества связанной с белком фукозы у мышей линии *Muc2*$^{-/-}$ по сравнению с мышами дикого типа C57BL/6. Надо отметить, что у мышей, используемых в экспериментах, присутствовала инфекция *Helicobacter* spp. Известно, что она способна провоцировать колит у мышей *Il10*$^{-/-}$ [15].

Мы предположили, что подобный дефицит связанной фукозы может приводить к снижению фукозилированных протеогликанов в просвете толстой кишки. А фукоза в составе гликанов может отщепляться фукозидазами бактерий [59]. Тем самым отсутствие фукозы в составе гликанов или отсутствие самих гликанов может влиять на разнообразие кишечных симбиотических бактерий, так как фукоза является для многих бактерий фактором вирулентности и источником энергии [41]. Действительно, у мышей *Muc2*$^{-/-}$ обнаружили качественные изменения состава кишечной микрофлоры по сравнению с мышами дикого типа C57BL/6, которые оценивали методом одноцепочечного конформационного полиморфизма (SSCP) вариабельного (V4) участка 16s рРНК (рис. 1. *в*). Одна дорожка на рис. 1. *в* – это определенный штамм бактерий.

Количественный анализ отдельных видов бактерий, который был оценён методом ПЦР в реальном времени, показал изменение количества ДНК 16S рРНК *Bacteria* (Манн-Уитни *u*-тест: $Z = 2{,}24$, $p > 0{,}05$) и некоторых семейств бактерий между линиями мышей. Мыши *Muc2*$^{-/-}$ с инфекцией *Helicobacter* spp. не отличались от мышей дикого типа C57BL/6 по количеству ДНК 16S рРНК *Bacteroides* spp. ($Z = 0{,}95$, $p > 0{,}05$), *Enterococcus* spp. ($Z = 1{,}05$, $p > 0{,}05$), *Lactobacillus* spp. ($Z = 0{,}57$, $p > 0{,}05$), *Blautia* spp. ($Z = 1{,}54$, $p > 0{,}05$). Однако представители семейств *Streptococcus* spp., *Staphylococcus* spp. и *E. coli* были достоверно ниже у мышей *Muc2*$^{-/-}$ по сравнению с мышами дикого типа C57BL/6 ($Z = 2{,}2$, $p > 0{,}05$; $Z = 2{,}8$, $p < 0{,}01$ и точный тест Фишера – $p = 0{,}06$; рис. 1, *г*). Схожесть по некоторым таксономическим группам, возможно, связана с тем, что животные проходили этап совместного содержания в процессе выполнения возвратного скрещивания мышей *Muc2*$^{-/-}$ на дикий тип C57BL/6, и дальнейшее получение животных через гетерозиготное скрещивание родителей *Muc2*$^{+/-}$. Но все же некоторые бактериальные сообщества кишечника мышей *Muc2*$^{-/-}$ отличались от мышей дикого типа C57BL/6, что, скорее всего, обусловлено отсутствием муцина 2 в просвете кишки.

Истончение муцинового слоя кишечника, основным компонентом которого является муцин 2, приводит к снижению фукозы в кишечнике и, как следствие, к качественным изменениям кишечного микробиома [36, 45, 46]. Как известно, из-за постоянного взаимодействия кишечной микрофлоры и иммунных клеток кишечника отсутствие муцина 2 в сочетании с изменением состава бактериальных представителей, особенно в присутствии инфекции *Helicobacter* spp., должны вызывать воспалительные реакции. Однако на гистологических срезах у мышей *Muc2*$^{-/-}$ не было выявлено признаков острой воспалительной реакции: инфильтрация нейтрофилов, отёк и разрушение крипт (рис. 2, *а*). Ранее было показано, что на химически-индуцированной модели ВЗК признаки острого воспаления ярко выражены в виде отёка, разрушения крипт и инфильтратов иммунных клеток [43]. На гистологических срезах проксимального отдела толстой кишки у мышей *Muc2*$^{-/-}$ было выявлено только удлинение крипт более чем в 2 раза по сравнению с мышами линии C57BL/6 (рис. 2, *а*). Количество клеток в крипте достоверно больше у мышей линии *Muc2*$^{-/-}$ по сравнению с мышами дикого типа C57BL/6 (рис. 2, *б*). Применение антибиотиков и в сочетании с фукозой не повлияло на высоту крипт (рис. 2, *в* и *д*), так, различий по количеству клеток в пределах одного генотипа не наблюдалось, а разница количества клеток в крипте между мышами *Muc2*$^{-/-}$ и C57BL/6 сохранилась такой же, как и у нативных животных (рис. 2, *г* и *е*). Удлинение крипт не было связано и с наличием инфекции *Helicobacter* spp., так как в другом исследовании также было показано удлинение крипт у мышей *Muc2*$^{-/-}$, которые не имели *Helicobacter* spp. [43]. Мы предполагаем, что в связи с отсутствием кишечного гликопротеина, эпителиальные клетки и микроорганизмы тесно взаимодействуют, а удлинение крипт может иметь адаптивный характер и обеспечивать более эффективное выведение бактерий из просвета кишечника вместо подвижного жидкого слоя муцина.

Анализ уровня экспрессии генов в восходящем отделе ткани толстой кишки показал увеличение количества мРНК генов провоспали-

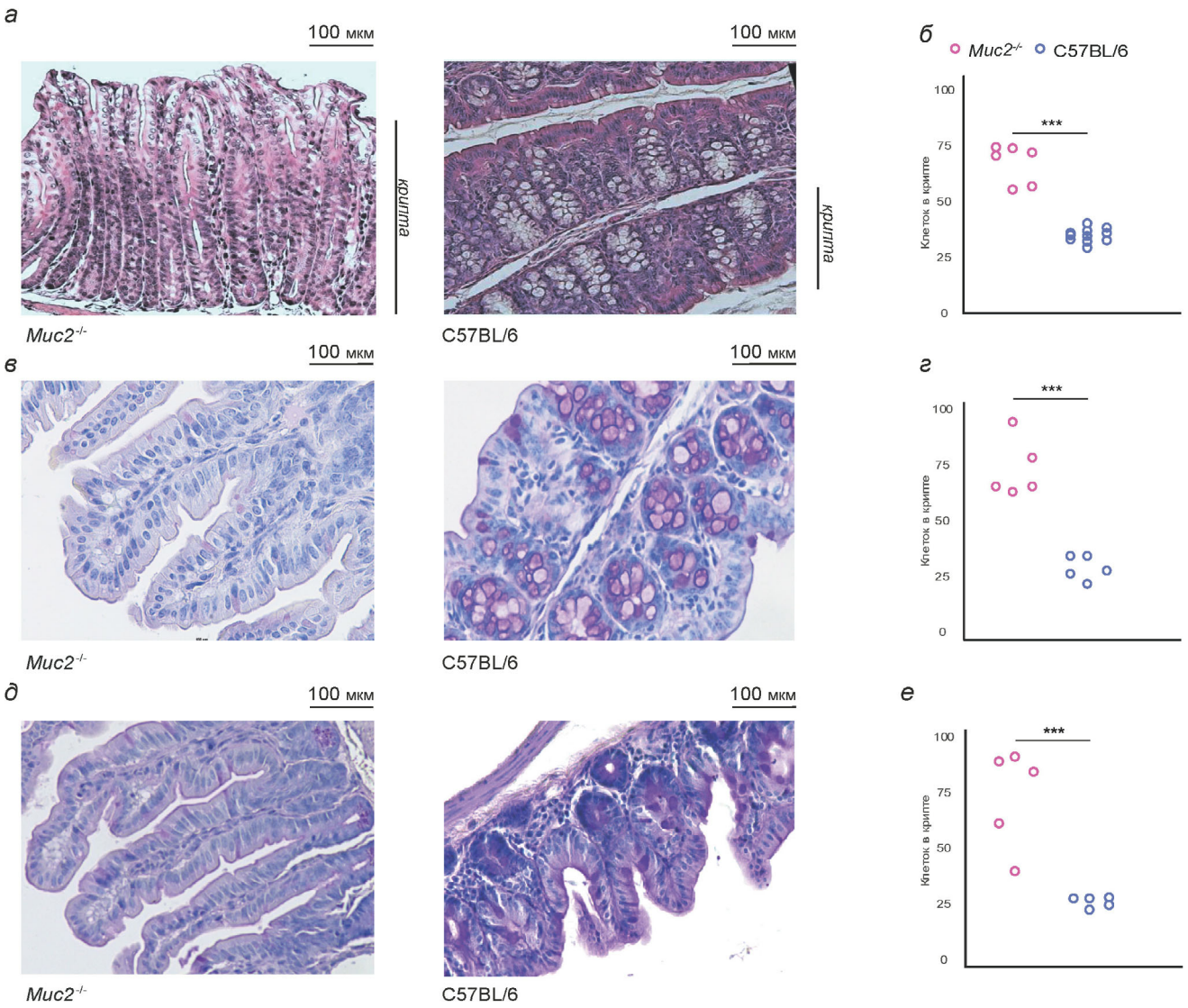


Рис. 2. Высота крипт на гистологических срезах толстой кишки интактных мышей *Muc2*$^{-/-}$ и дикого типа C57BL/6 до и после применения антибиотиков или антибиотиков в сочетании с фукозой. *а* – Гистологический срез толстой кишки (проксимальный отдел) мышей, сравнение высоты крипт между мышами *Muc2*$^{-/-}$ и диким типом C57BL/6. Окраска гематоксилин-эозином. *б* – Количество клеток в крипте проксимального отдела толстой кишки мышей *Muc2*$^{-/-}$ (n = 6) и C57BL/6 (n = 11). *в* – Гистологический срез толстой кишки (проксимальный отдел) мышей *Muc2*$^{-/-}$ и дикого типа C57BL/6 после применения антибиотиков. Окраска – ШИК-реакция. *г* – Количество клеток в крипте проксимального отдела толстой кишки мышей *Muc2*$^{-/-}$ (n = 5) и C57BL/6 (n = 5) после применения антибиотиков. *д* – Гистологический срез толстой кишки (проксимальный отдел) мышей *Muc2*$^{-/-}$ и дикого типа C57BL/6 после применения антибиотиков в сочетании с фукозой. Окраска – ШИК-реакция. *е* – Количество клеток в крипте проксимального отдела толстой кишки мышей *Muc2*$^{-/-}$ (n = 5) и C57BL/6 (n = 5) после применения антибиотиков в сочетании с фукозой. *** $p < 0{,}001$, t-тест Стьюдента

тельных цитокинов. Количество мРНК генов *Tnf* и *Il1a* было значительно выше у мышей *Muc2*$^{-/-}$ по сравнению с мышами дикого типа C57BL/6 (рис. 2, *в*). Уровень мРНК генов *Il1b* и *Il6* не отличался между мышами *Muc2*$^{-/-}$ и диким типом C57BL/6 (t = 1,8, $p > 0{,}05$; рис. 3, *а*). Уровень экспрессии белка IL-1a в ткани толстой кишки тоже демонстрирует повышение у мышей *Muc2*$^{-/-}$ по сравнению с диким типом C57BL/6 ($Z = 2{,}1$, $p < 0{,}05$). Количество IFN-gamma в ткани толстой кишки не отличалось между мышами *Muc2*$^{-/-}$ и диким типом C57BL/6 ($Z = 1{,}3$, $p > 0{,}05$; рис. 3, *б*).

Известно, что в ответ на длительное воспаление организм запускает противовоспалительный ответ с помощью активации Т-регуляторных клеток [33, 60]. В связи с этим определение экспрессии различных транскрипционных фак-

торов, запускающих активацию Т-клеток по разным путям, поможет понять, какие пулы Т-клеток преобладают в ткани толстой кишки мышей *Muc2*$^{-/-}$. Количество мРНК гена транскрипционного фактора Т-регуляторных клеток (*Foxp3*) было достоверно выше у мышей *Muc2*$^{-/-}$ по сравнению с мышами дикого типа C57BL/6 (рис. 3, *в*). Подобный эффект был показан нами ранее на клетках, участниках Т-регуляторного иммунного ответа. В мезентериальных лимфатических узлах количество $CD4^+CD25^+Foxp3^+$-клеток было выше у мышей *Muc2*$^{-/-}$ по сравнению с мышами дикого типа C57BL/6 при наличии *Helicobacter* spp. [41]. Уровень мРНК генов транскрипционных факторов Th1-клеток (*Tbx21*) и Th17-клеток (*Rorc*) не отличался между мышами *Muc2*$^{-/-}$ и C57BL/6 ($t = 0{,}9$, $p > 0{,}05$ и $t = 1{,}1$, $p > 0{,}05$ соответственно; рис. 3, *в*). Также не было различий между генотипами мышей по уровню цитокинов IL-22 ($Z = 0{,}8$, $p > 0{,}05$), IL-17 ($Z = 0{,}5$, $p > 0{,}05$), IL-12p40 ($Z = 1{,}8$, $p > 0{,}05$), IL-12p70 ($Z = 1{,}5$, $p > 0{,}05$), которые участвуют в развитии Th1- и Th17-иммунных ответов.

По всей видимости, запуск не только воспалительных, но и регуляторных механизмов обеспечивают стабильность гомеостаза иммунитета в толстой кишке у мышей *Muc2*$^{-/-}$. В более ранних наших работах мы показали, что в региональных лимфатических узлах количество Т-регуляторных клеток действительно становится больше у мышей линии *Muc2*$^{-/-}$, но только в случае присутствия инфекции *Helicobacter* spp. [44]. В ряде работ показано, что бактерии рода *Helicobacter* могут запускать толерагенный ответ, чтобы обеспечить себе благоприятную среду для развития [17, 36, 44], но требуются дополнительные исследования, чтобы понять роль хеликобактерной инфекции в этом феномене.

Для уменьшения бактериальной нагрузки и воспаления у пациентов с ВЗК часто применяют антибактериальную терапию. Было показано, что антибиотики для лечения *Helicobacter* spp. у мышей *Muc2*$^{-/-}$ были не только малоэффективными, но и также приводили к гибели животного из-за сопутствующего разрастания протозойной инфекции [49]. Но антибиотики влияют на представленность бактерий в кишечнике. Применение антибиотиков широкого спектра снижало количество ДНК 16S рРНК *Bacteria* как у мышей *Muc2*$^{-/-}$ (с 3298,7 ± 3427,7 до 12,5 ± 4,7; $Z = 2{,}2$; $p < 0{,}05$; $n = 6$), так и у C57BL/6 (с 2567,8 ± 719,7 до 44,8 ± 81,3; $Z = 2{,}8$; $p < 0{,}01$; $n = 11$). На фоне этого применение антибиотиков у мышей *Muc2*$^{-/-}$ и C57BL/6 вызывало более чем в 2 раза снижение связанной с белком фукозы в толстой кишке (рис. 4, *а*). Такое снижение фукозы может быть связано с уменьшением количества бактерий, так как фукозидазы бакте-

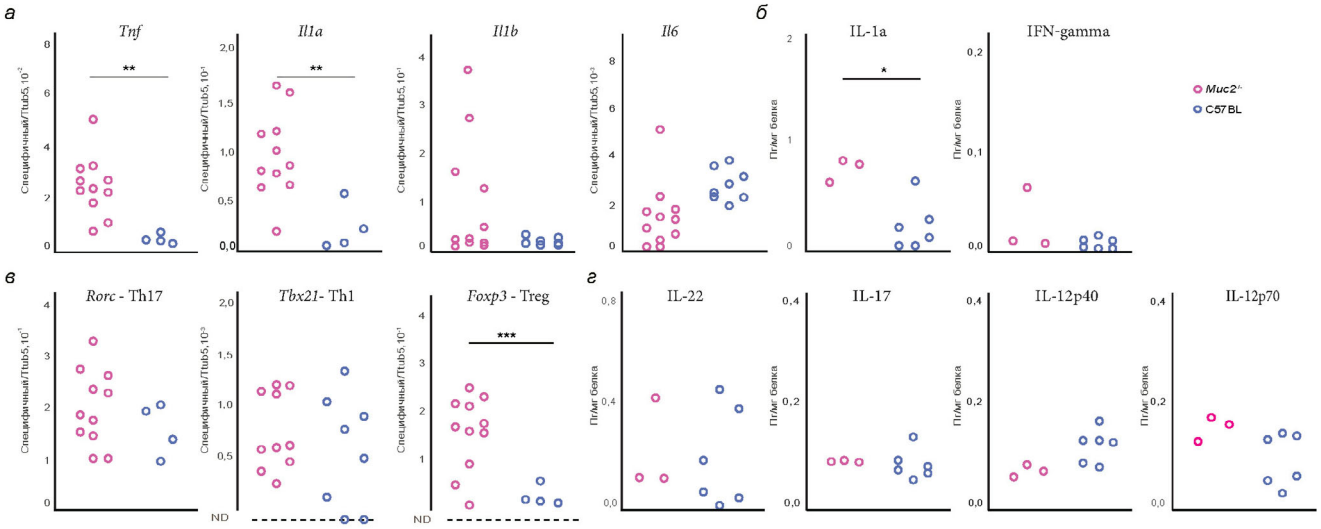


Рис. 3. Провоспалительные цитокины и транскрипционные факторы в толстой кишке мышей *Muc2*$^{-/-}$ и дикого типа C57BL/6. *а* – Количество мРНК генов провоспалительных цитокинов (*Tnf*, *Il1a*, *Il1b*, *Il6*) в восходящем отделе ткани толстой кишки у мышей *Muc2*$^{-/-}$ ($n = 11$) и C57BL/6 ($n = 4$). *б* – Количество белка провоспалительных цитокинов (IL-1a, IFN-gamma) в ткани восходящего отдела толстой кишки у мышей *Muc2*$^{-/-}$ ($n = 3$) и C57BL/6 ($n = 6$). *в* – Количество мРНК генов в восходящем отделе транскрипционных факторов Т-клеток (*Foxp3* – Treg, *Rorc* – Th17, *Tbx21* – Th1) в ткани толстой кишки у мышей *Muc2*$^{-/-}$ ($n = 11$) и C57BL/6 ($n = 4$–8). *г* – Количество белка цитокинов (IL-22, IL-17, IL-12p40, IL-12p70), участников Th1- и Th17-ответа в ткани восходящего отдела толстой кишки у мышей *Muc2*$^{-/-}$ ($n = 3$) и C57BL/6 ($n = 6$). *** $p < 0{,}001$; ** $p < 0{,}01$ – *t*-тест Стьюдента. * $p < 0{,}05$ – Манн–Уитни *u*-тест. ND – ниже порога чувствительности метода детекции

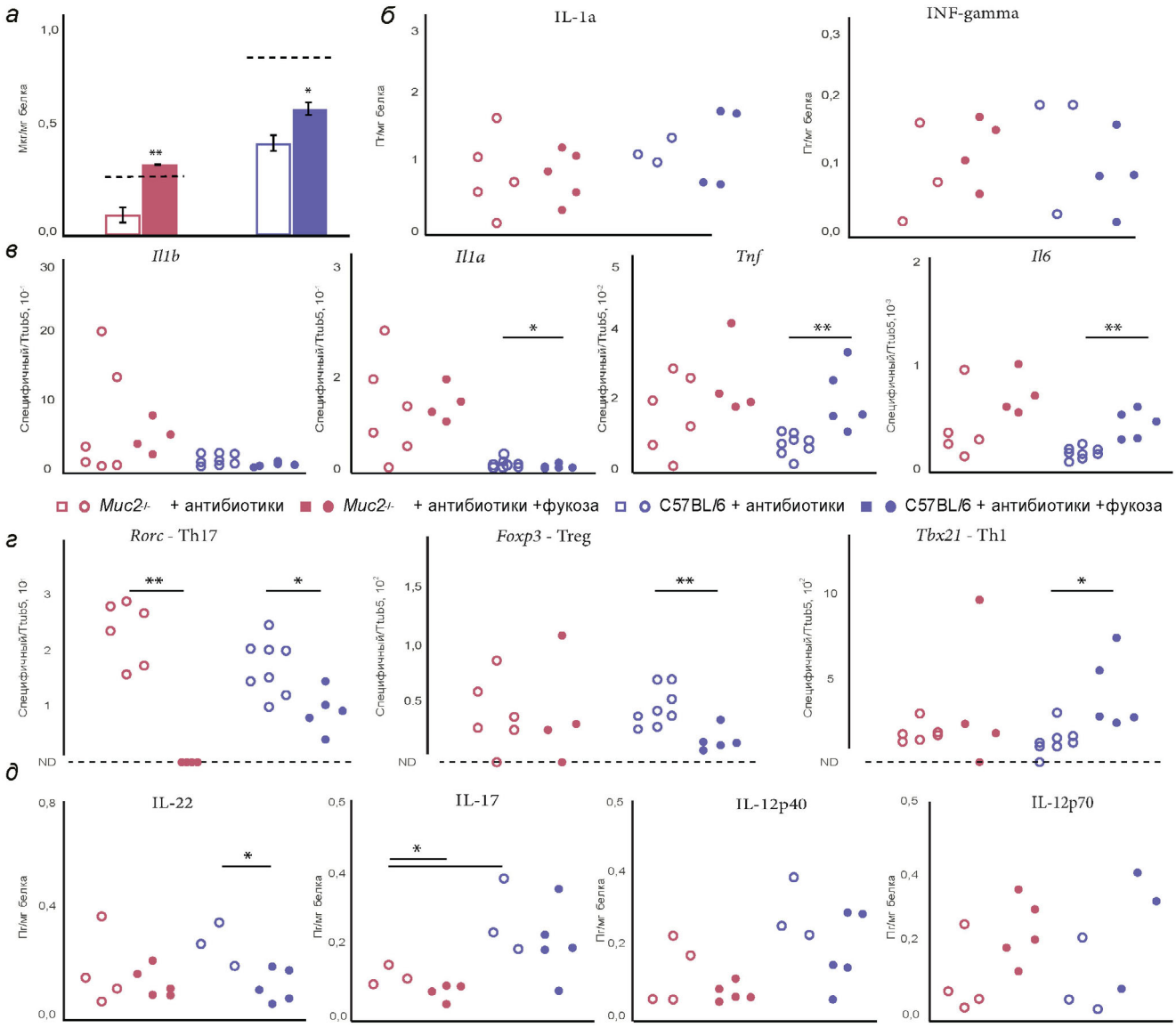


Рис. 4. Фукоза, провоспалительные цитокины и транскрипционные факторы в толстой кишке мышей *Muc2*$^{-/-}$ и дикого типа C57BL/6 после применения антибиотиков или антибиотиков в сочетании с фукозой. *а* – Фукоза, связанная с белком в проксимальном отделе толстой кишки мышей *Muc2*$^{-/-}$ (n = 7) и C57BL/6 (n = 10) на фоне применения антибиотиков и антибиотиков в сочетании с фукозой. Пунктирная линия: базальный уровень фукозы у каждой линии мышей, не принимавших антибиотики. *б* – Количество белка провоспалительных цитокинов (IL-1a, INF-gamma) в восходящем отделе ткани толстой кишки у мышей *Muc2*$^{-/-}$ (n = 10) и C57BL/6 (n = 8) на фоне применения антибиотиков и антибиотиков в сочетании с фукозой. *в* – Количество мРНК генов провоспалительных цитокинов (*Il1b*, *Il1a*, *Tnf*, *Il6*) в восходящем отделе ткани толстой кишки у мышей *Muc2*$^{-/-}$ (n = 10) и C57BL/6 (n = 13) на фоне применения антибиотиков и антибиотиков в сочетании с фукозой. *г* – Количество транскрипционных факторов Т-клеток (*Foxp3* – Treg, *Rorc* – Th1, *Tbx21* – Th17) в восходящем отделе ткани толстой кишки у мышей *Muc2*$^{-/-}$ (n = 10) и C57BL/6 (n = 13) на фоне применения антибиотиков и антибиотиков в сочетании с фукозой. *д* – Количество белка цитокинов (IL-22, IL-17, IL-12p40, IL-12p70), участников Th1- и Th17-ответа в ткани восходящего отдела толстой кишки у мышей *Muc2*$^{-/-}$ (n = 10) и C57BL/6 (n = 8) на фоне применения антибиотиков и антибиотиков в сочетании с фукозой. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$; t-тест Стьюдента. ND – ниже порога чувствительности метода детекции

рий могут отщеплять фукозу из гликанов как самих хозяев, так и клеточных стенок бактерий. Известно, что представители рода *Bacteroides* могут экспрессировать подобные ферменты [61]. В связи с этим мы решили оценить изменение количества представителей разных родов бактерий после применения антибиотиков. Нам не удалось детектировать ДНК *Bacteroides* spp., *Enterococcus* spp. и *Lactobacillus* spp. как у мышей *Muc2*$^{-/-}$ (11 из 11 позитивных без анти-

биотиков к 6 из 6 негативных после терапии, точный критерий Фишера, $p < 0{,}001$), так и у дикого типа C57BL/6 на фоне приёма антибиотиков (9 из 9 позитивных без антибиотиков к 6 из 6 негативных после терапии, точный критерий Фишера, $p < 0{,}001$).

Известно, что у пациентов с ВЗК применение антибиотиков может уменьшать воспаление в силу снижения бактериальной нагрузки [19]. На фоне приёма антибиотиков у мышей *Muc2*$^{-/-}$ не было достоверного изменения количества мРНК генов провоспалительных цитокинов *Tnf* (с 0,024 ± 0,011 до 0,019 ± 0,009; $Z = 0{,}9$; $p > 0{,}05$; $n = 16$), *Il1a* (с 0,097 ± 0,04 до 0,14 ± 0,11; $Z = 0{,}6$; $p > 0{,}05$; $n = 17$), *Il1b* (с 0,096 ± 0,12 до 0,07 ± 0,08; $Z = 0{,}4$; $p > 0{,}05$; $n = 17$) и *Il6* (с 0,002 ± 0,001 до 0,004 ± 0,003; $Z = 1{,}9$; $p > 0{,}05$; $n = 14$; рис. 3, *б*). Также не было эффекта от антибиотиков у мышей *Muc2*$^{-/-}$ на количество белка провоспалительных цитокинов IL-1a (с 0,69 ± 0,09 до 0,94 ± 0,52; $Z = 0{,}7$; $p > 0{,}05$; $n = 8$) и IFN-gamma (с 0,02 ± 0,02 до 0,07 ± 0,06; $Z = 1{,}5$; $p > 0{,}05$; $n = 8$). При этом у мышей линии C57BL/6 был эффект антибиотиков на уровень мРНК генов провоспалительных цитокинов. Количество мРНК гена *Tnf* возрастало с 0,004 ± 0,002 до 0,008 ± 0,009; $Z = 2{,}1$ ($p < 0{,}05$; $n = 12$), а *Il6* снижалось в 3 раза с 0,003 ± 0,0005 до 0,001 ± 0,0005; $Z = 2{,}6$ ($p < 0{,}01$; $n = 12$). Экспрессия остальных генов не изменилась: *Il1a* (с 0,022 ± 0,025 до 0,018 ± 0,009; $Z = 0{,}3$; $p > 0{,}05$; $n = 12$) и *Il1b* (с 0,006 ± 0,005 до 0,016 ± 0,008; $Z = 1{,}9$; $p > 0{,}05$; $n = 12$). Количество провоспалительного цитокина IL-1a в ткани толстой у мышей линии C57BL/6 увеличилось в 5 раз на фоне применения антибиотиков (с 0,18 ± 0,22 до 1,23 ± 0,16; $Z = 2{,}3$; $p < 0{,}05$; $n = 9$), тогда как INF-gamma не изменился (с 0,004 ± 0,004 до 0,06 ± 0,08; $Z = 1{,}1$; $p > 0{,}05$; $n = 9$). Несмотря на применение антибиотиков разница между линиями сохранилась (рис. 4, *в*). Таким образом, при наличии *Helicobacter* spp. у мышей *Muc2*$^{-/-}$приём антибиотиков снижает количество бактерий основных таксономических групп, но не вызывает уменьшения провоспалительного ответа.

Известно, что для переключения воспаления на противовоспалительный ответ необходимо активировать Т-регуляторные клетки. Действительно, уровень экспрессии гена *Foxp3* у мышей *Muc2*$^{-/-}$ на фоне приёма антибиотиков драматически снижался с 0,17 ± 0,06 до 0,005 ± 0,002 ($Z = 3{,}1$; $p < 0{,}01$; $n = 15$). У мышей *Muc2*$^{-/-}$, получавших только антибиотики, количество $CD4^+CD25^+Foxp3^+$-клеток достоверно снижалось (с $(171{,}0 \pm 86{,}9) \times 10^3$ до $(33{,}9 \pm 23{,}2) \times 10^3$; $Z = 3{,}18$; $p < 0{,}01$; $n = 15$). Таким образом, обеднение микрофлоры вызывало снижение Т-регуляторных клеток в мезентериальных лимфатических узлах.

Транскрипционные факторы Th1- и Th17-ответа не изменились на фоне терапии антибиотиками у мышей *Muc2*$^{-/-}$: *Tbex* с 0,0008 ± 0,0004 до 0,0012 ± 0,0006 ($Z = 1{,}1$; $p > 0{,}05$; $n = 17$) и *Rorc* с 0,20 ± 0,07 до 0,17 ± 0,05 ($Z = 1{,}7$; $p > 0{,}05$; $n = 16$). Аналогично, у мышей *Muc2*$^{-/-}$ не было эффекта антибиотиков на количество цитокинов IL-22 (с 0,35± 0,36 до 0,17 ± 0,12; $Z = 0{,}1$; $p > 0{,}05$; $n = 8$), IL-17 (с 0,08 ± 0,001 до 0,09 ± 0,02; $Z = 0{,}6$; $p > 0{,}05$; $n = 8$), IL-12p40 (с 0,06 ± 0,01 до 0,10 ± 0,06; $Z = 0{,}7$; $p > 0{,}05$; $n = 8$), IL-12p70 (с 0,12 ± 0,02 до 0,08 ± 0,07; $Z = 1{,}1$; $p > 0{,}05$; $n = 8$), которые участвуют в развитии Th17- и Th1-иммунных ответов. У мышей дикого типа C57BL/6 антибиотики привели не только к повышению экспрессии гена *Tnf* с 0,004 ± 0,002 до 0,008 ± 0,003 ($Z = 2{,}0$; $p < 0{,}05$; $n = 12$), но и к активации гена *Tbex21* (транскрипционного фактора Th1-клеток) с 0,00006 ± 0,00007 до 0,00082 ± 0,00071 ($Z = 2{,}7$; $p < 0{,}01$; $n = 11$). Остальные транскрипционные факторы не изменились на фоне терапии антибиотиками у C57BL/6 мышей, так же как и у мышей *Muc2*$^{-/-}$: *Foxp3* с 0,011 ± 0,008 до 0,005 ± 0,002 ($Z = 1{,}3$; $p > 0{,}05$; $n = 12$) и *Rorc* с 0,16 ± 0,05 до 0,17 ± 0,05 ($Z = 0{,}5$; $p > 0{,}05$; $n = 12$). Однако уровень IL-17, который вовлечён в Th17-ответ, вырос в 2 раза на фоне приёма антибиотиков (с 0,09 ± 0,02 до 0,21 ± 0,08; $Z = 2{,}3$; $p < 0{,}05$; $n = 9$). Антибиотики не повлияли на другие цитокины, участвующие в Th17- и Th1-иммунных ответах: IL-22 (с 0,18 ± 0,18 до 0,26 ± 0,08; $Z = 0{,}8$; $p > 0{,}05$; $n = 9$), IL-12p40 (с 0,09 ± 0,03 до 0,16 ± 0,15; $Z = 0{,}8$; $p > 0{,}05$; $n = 9$) и IL-12p70 (с 0,08 ± 0,04 до 0,06 ± 0,08; $Z = 0{,}8$; $p > 0{,}05$; $n = 9$). Антибиотики нивелировали различия между линиями мышей (рис 4, *г*). Таким образом, снижение экспрессии Т-регуляторного фактора у мышей *Muc2*$^{-/-}$ на фоне приёма антибиотиков не способно сдерживать воспаление в кишке даже при снижении бактериальной нагрузки.

Ранее был показан эффект добавления пищевой L-фукозы на активацию макрофагов, элиминацию протозойной инфекции и увеличение триптофан-производящих бактерий [42, 43, 49]. При терапии антибиотиками уровень фукозы снижался у мышей *Muc2*$^{-/-}$, а добавленная к антибиотикам L-фукоза восстанавливала уровень связанной фукозы до исходного уровня в толстой кишке как мышей *Muc2*$^{-/-}$, так и C57BL/6 (рис 4, *а*). Повышение уровня фукозы в кишке может быть ассоциировано с восстановлением бактериального сообщества. Анализ

качественного разнообразия бактерий в фекалиях мышей *Muc2*$^{-/-}$ показал изменение при добавлении фукозы к антибиотикам по сравнению с монотерапией антибиотиками (рис. 5, *а*). И действительно, добавление фукозы к антибиотикам частично восстанавливало количество ДНК 16S рРНК *Bacteria* только у мышей *Muc2*$^{-/-}$ (с 12,5 ± 4,7 до 81,6 ± 61,6; $Z = 2,2$; $p < 0,05$; $n = 6$), тогда как у C57BL/6 достоверного восстановления не было (с 44,6 ± 81,2 до 0,7 ± 0,7; $Z = 0,5$; $p > 0,05$; $n = 11$). Фукоза с антибиотиками частично восстанавливала только количество ДНК *Bacteroides* spp. у мышей *Muc2*$^{-/-}$ (6 из 6 негативных на фоне антибиотикотерапии против 5 из 5 позитивных при добавлении фукозы, точный критерий Фишера, $p < 0,01$), чего не наблюдалось у мышей линии C57BL/6 (6 из 6 негативных на фоне антибиотикотерапии против 2 из 5 позитивных при добавлении фукозы, точный критерий Фишера, $p > 0,05$; рис. 5, *б*). Восстановленный добавлением фукозы уровень *Bacteroides* spp. не отличался от исходного (рис. 5, *б*). При этом *Enterococcus* spp. и *Lactobacillus* spp. не восстанавливались даже частично у мышей обоих генотипов. Можно предположить, что фукоза в толстой кишке мышей *Muc2*$^{-/-}$ является источником энергии в большей степени для бактерий рода *Bacteroides*, что обусловливает частичное восстановление их популяции на фоне приёма пищевой L-фукозы. Однако *Enterococcus* spp. и *Lactobacillus* spp. не восстанавливались у обоих генотипов мышей, что даёт возможность предположить о более сложной метаболической роли фукозы для бактериального сообщества кишечника.

Так как интоксикация бактериальными паттернами и самими антибиотиками может приводить к нарушению биохимических показателей крови, были оценены ферменты в крови: аланинаминотрансфераза (АЛТ), аспартатаминотрансферазы (АСТ), креатинин до и после применения антибиотиков и в сочетании с фукозой у мышей *Muc2*$^{-/-}$. MANOVA показала достоверный эффект группы только для АСТ (рис. 5, *в*). У мышей дикого типа C57BL/6 не наблюдали достоверных отличий между биохимическими показателями на фоне приёма антибиотиков и в сочетании с фукозой (рис. 5, *г*). Можно предположить, что применение антибиотиков не влияет на гомеостаз мышей дикого типа, поскольку у них присутствует естественный барьер в виде муцинов, и это препятствует интоксикации погибающими патогенами в кишечнике.

Антибиотики вызывали увеличение количества фермента АСТ в крови у мышей *Muc2*$^{-/-}$, что может быть связано с интоксикацией и изменением общего метаболизма в результате дисбиоза. Ранее у мышей *Muc2*$^{-/-}$*Kaiso*$^{y/-}$ было показано, что лечение *Helicobacter* spp. антибиотиками приводило к гибели животных [35]. У мышей при отсутствии муцина 2 повышается проницаемость кишечника [36, 37], таким образом, бактериальные паттерны могут попадать в кровь и вызывать цитотоксичность, которая сопровождается увеличением АСТ и даже гибелью животных, как было показано ранее [36, 50]. Добавление L-фукозы к данной схеме приёма антибиотиков снижает концентрацию данного фермента в крови до нормы, что является признаком уменьшения количества негативного действия антибиотиков (рис. 5, *в*). Добавление фукозы полностью не восстанавливало уровень креатинина, в связи с чем можно предположить, что метаболизм *Muc2*$^{-/-}$ не может восстановиться до исходного уровня (рис. 5, *в*).

Приём фукозы с антибиотиками восстанавливал связанную с белком фукозу в толстой кишке, частично поднимал количество ДНК *Bacteroides* spp. и нормализовал биохимические показатели у мышей *Muc2*$^{-/-}$, однако это не снижало уровень воспалительных факторов. Уменьшение экспрессии гена *Foxp3* также может усугубить состояние иммунной системы мышей *Muc2*$^{-/-}$. В связи с этим можно полагать, что восстановление микрофлоры при добавлении фукозы к антибиотикам может повлиять на уровень воспалительных цитокинов и транскрипционные факторы. У мышей *Muc2*$^{-/-}$ фукоза не восстанавливала уровень экспрессии генов провоспалительных цитокинов (рис. 4, *в*). Не восстановила фукоза и количество провоспалительных цитокинов в ткани толстой кишки у мышей *Muc2*$^{-/-}$ (рис. 4, *б*). Уровень мРНК генов транскрипционных факторов Th1 и Treg также не изменился под действием фукозы, кроме гена *Rorc* (Th17), который вообще переставал детектироваться (рис. 4, *г*). Несмотря на отсутствие действия фукозы на количество мРНК гена *Foxp*3, мы обнаружили, что при добавлении фукозы восстанавливается количество регуляторных Т-клеток в мезентериальных лимфатических узлах у мышей *Muc2*$^{-/-}$ (с $(33,9 \pm 23,2) \times 10^3$ до $(89,0 \pm 54,3) \times 10^3$; $Z = 1,97$; $p < 0,05$; $n = 13$). Таким образом, добавление L-фукозы корригировало эффект антибиотиков на снижение количества регуляторных Т-клеток. Снижение же экспрессии гена *Rorc* в ответ на добавление фукозы согласовывалось и с уменьшением количества IL-17 у мышей *Muc2*$^{-/-}$ (рис. 4, *д*).

Стоит отметить, что фукоза приводила к повышению экспрессии генов *Tnf* и *Il6* и снижению *Ila* C57BL/6-мышей (рис. 4, *в*). Однако фукоза не повлияла на количество провоспали-

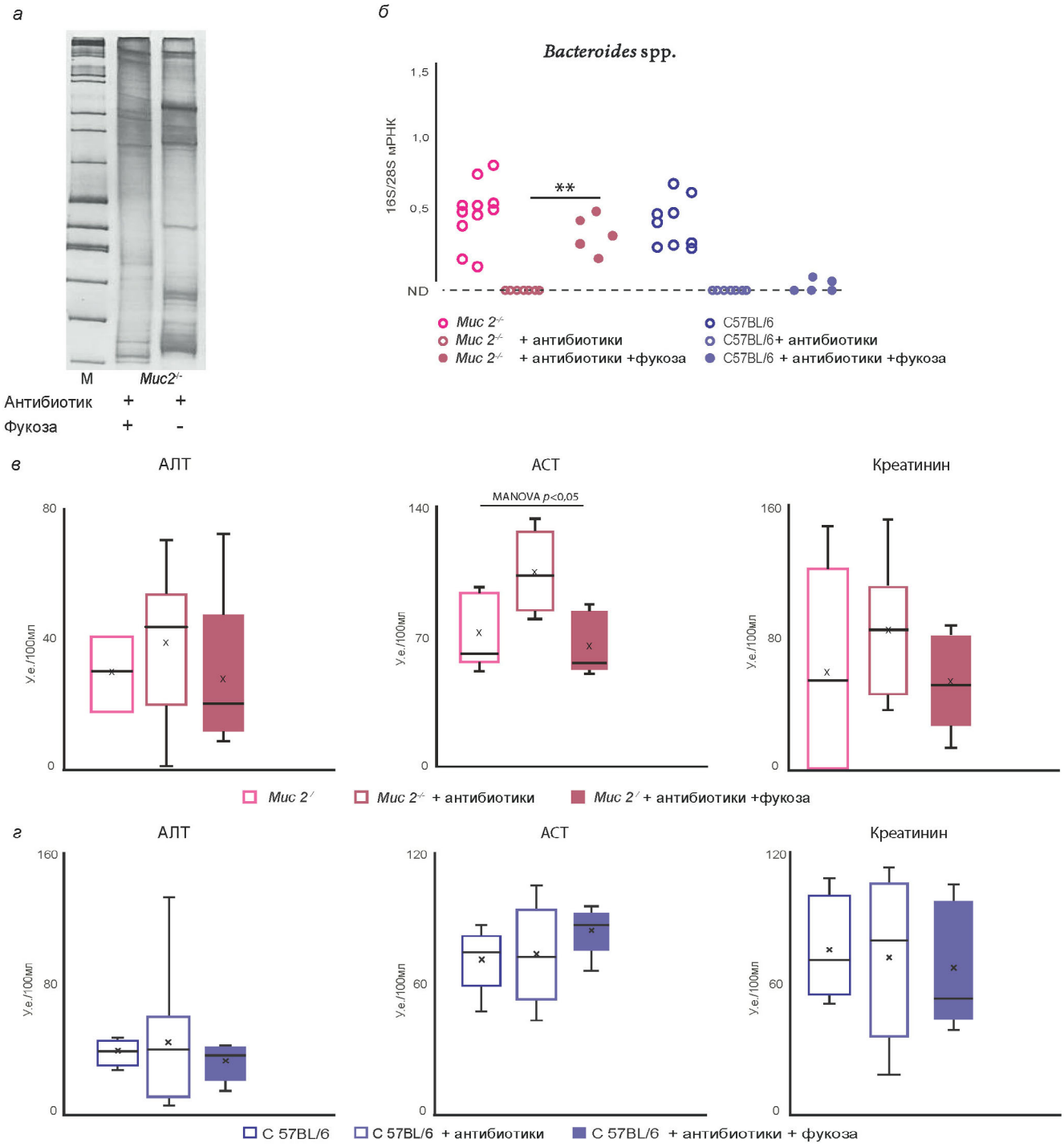


Рис. 5. Качественный и количественный бактериальный состав фекалий, биохимические показатели крови мышей *Muc2*$^{-/-}$ и дикого типа C57BL/6 после применения антибиотиков или антибиотиков в сочетании с фукозой. *а* – Качественный состав кишечной микрофлоры у мышей *Muc2*$^{-/-}$ после применения антибиотиков и фукозы, оценённый методом одноцепочечного конформационного полиморфизма (SSCP) вариабельного (V4) участка 16s рРНК. *б* – Количество бактериальной ДНК *Bacteroides* spp. в фекалиях у интактных мышей *Muc2*$^{-/-}$ (n = 22) и дикого типа C57BL/6 (n = 21) после применения антибиотиков или антибиотиков в сочетании с фукозой. *в* – Биохимические показатели крови мышей линии *Muc2*$^{-/-}$ (n = 26) до применения антибиотиков, на фоне приёма антибиотиков и антибиотиков с совокупности с фукозой. *г* – Биохимические показатели крови мышей линии C57BL/6 (n = 17) до применения антибиотиков, на фоне приёма антибиотиков и антибиотиков с совокупности с фукозой. ** $p < 0,01$ – точный критерий Фишера. ND – ниже порога чувствительности метода детекции

тельных цитокинов в ткани толстой кишки у C57BL/6-мышей (рис. 4, *б*). Достоверно снизилось на фоне приёма антибиотиков с фукозой количество мРНК транскрипционных факторов, участвующих в Th17- и Th1-иммунных ответах, и повысился *Tbx21* у C57BL/6-мышей (рис. 4, *г*). Но только количество IL-22, участвовавшего в Th17-ответе, точно также снизилось при добавлении фукозы к антибиотикам у мышей дикого типа (рис. 4, *д*). Фукоза повлияла на экспрессию и уровень белка отдельных иммунных факторов.

Таким образом, добавление фукозы, компонента муцина 2, при антибактериальной терапии мышей *Muc2*$^{-/-}$ помогает сохранить *Bacteroides* spp., ослабить негативное действие антибиотиков и восстановить количество регуляторных Т-клеток в мезентериальных лимфатических узлах, но не влияет на другие иммунные показатели. Для понимания механизма действия фукозы необходимо в дальнейшем протестировать её на животных без сопутствующих патогенов, а также проверить её эффект на отдельных пулах иммунных клеток, таких как макрофаги, дендритные клетки и лимфоциты как в экспериментах *in vivo*, так и *in vitro*. Важно ещё оценить возможность утилизации L-фукозы различными бактериями, обитающими в ЖКТ и возможность её воздействия на запуск фукозилирования клеточных стенок бактерий. Если подобные гликаны клеточных стенок бактерий будут способны запускать толерагенность, то они станут перспективными компонентами для поддерживающей терапии при ВЗК.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Применение антибиотиков, глюкокортикостероидов и иммуносупрессоров является ключевым звеном в медикаментозной терапии воспалительных заболеваний кишечника, при этом очевидно, что, в целом, это отрицательно влияет на симбиотическую микрофлору ЖКТ и в связи с угнетением иммунной системы и изменением метаболических процессов организма может способствовать укреплению колоний условно-патогенной и патогенной микрофлоры за счёт освобождения адгезивной поверхности и увеличения количества нутриентов, характерных для питания данных микроорганизмов [19]. Также известно, что признаком всех моделей ВЗК является истончение мукозального слоя кишечника и, как следствие, дисбаланс нормофлоры [37, 38]. Таким образом, для оценки состояния кишечной микробиоты и иммунного ответа организма было проведено сравнение двух линий мышей, одна из которых (*Muc2*$^{-/-}$) имеет дефицит муцина 2 в кишечнике. При этом отличий по основным таксономическим группам бактерий у мышей обоих линий нет, а также у животных на протяжении всего эксперимента детектировали *Helicobacter* spp. Удлинение крипт, как анатомо-физиологическая особенность мышей *Muc2*$^{-/-}$, вероятно, имеет адаптивный механизм элиминации микрофлоры из кишечника.

Применение пребиотиков при ВЗК может иметь огромную перспективу. Так, в настоящем исследовании было показано, что пищевая L-фукоза частично восстанавливала *Bacteroides* spp. и помогала сохранить связанную с белком фукозу в ткани кишечника. Это сочеталось с восстановление уровня АСТ. Но фукоза не показала эффективного снижения воспалительного процесса в ткани толстой кишки на фоне приёма антибиотиков. Отсутствие эффекта на воспаление может быть связано с негативным действием антибиотиков на количество Т-регуляторных клеток, повышение которых является характерной особенностью для мышей *Muc2*$^{-/-}$, у которых воспаление, по всей видимости, начинается с раннего возраста. Необходимо в дальнейшем исследовать возрастные особенности развития воспаления у мышей *Muc2*$^{-/-}$.

Исследования эффектов пищевой фукозы, как компонента муцина 2, необходимо продолжать в том числе на моделях без сопутствующих инфекций, а также более подробно рассмотреть её на культурах иммунных клеток, макрофагов и дендритных клеток, которые имеют рецептор, способный распознавать фукозу в составах гликанов бактерий. Также следует понять, может ли пищевая фукоза встраиваться в клеточные стенки бактерий, которые имеют различные фукозилтрансферазы. Все это подтверждает актуальность изучения фукозы и фукозилированных гликанов как потенциальных активаторов Т-регуляторной функции.

Финансирование. Работа выполнена за счёт средств федерального бюджета на проведение фундаментальных научных исследований (тема № АААА-А21-121011990039-2 – приобретение и содержание лабораторных животных) и при поддержке Российского научного фонда (грант № 20-64-47020 – анализ бактерий, экспрессия иммунных показателей).

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Соблюдение этических норм. Все процедуры, выполненные в исследованиях с участием животных, соответствовали этическим стандартам

учреждения, в котором проводились исследования, и утверждённым правовым актам РФ и международных организаций. Все манипуляции с животными были одобрены межинститутской комиссией по биоэтике СО РАН (номер 18.6 от 14.10.2013).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Князев О. В., Шкурко Т. В., Каграманова А. В., Веселов А. В., Никонов Е. Л. (2020) Эпидемиология воспалительных заболеваний кишечника. Современное состояние проблемы (обзор литературы), *Доказательная гастроэнтерология*, **9**, 66-73, doi: 10.17116/dokgastro2020902166.
2. Long, M. D., Hutfless, S., Kappelman, M. D., Khalili, H., Kaplan, G. G., et al. (2014) Challenges in designing a national surveillance program for inflammatory bowel disease in the United States, *Inflamm. Bowel Dis.*, **20**, 398-415, doi: 10.1097/01.MIB.0000435441.30107.8b.
3. Камалова А. А., Сафина Э. Р., Низамова Р. А., Зайнетдинова М. Ш., Квитко, Э. М. (2020) Питание при воспалительных заболеваниях кишечника у детей, *Российский вестник перинатологии и педиатрии*, **65**, 145-151, doi: 10.21508/1027-4065-2020-65-5-145-151.
4. Ananthakrishnan, A. N. (2013) Environmental risk factors for inflammatory bowel disease, *Gastroenterol Hepatol* (N Y), **9**, 367-374.
5. Wikoff, W. R., Anfora, A. T., Liu, J., Schultz, P. G., Lesley, S. A., et al. (2009) Metabolomics analysis reveals large effects of gut microflora on mammalian blood metabolites, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **106**, 3698-3703, doi: 10.1073/pnas.0812874106.
6. Abrams, G. D., Bauer, H., and Sprinz, H. (1963) Influence of the normal flora on mucosal morphology and cellular renewal in the ileum. A comparison of germ-free and conventional mice, *Lab. Invest. J. Tech. Methods Pathol.*, **12**, 355-364.
7. Roswall, J., Olsson, L. M., Kovatcheva-Datchary, P., Nilsson, S., Tremaroli, V., et al. (2021) Developmental trajectory of the healthy human gut microbiota during the first 5 years of life, *Cell Host Microbe*, **29**, 765-776.e763, doi: 10.1016/j.chom.2021.02.021.
8. Franke, A., McGovern, D. P. B., Barrett, J. C., Wang, K., Radford-Smith, G. L., et al. (2010) Genome-wide meta-analysis increases to 71 the number of confirmed Crohn's disease susceptibility loci, *Nat. Genet.*, **42**, 1118-1125, doi: 10.1038/ng.717.
9. Hooper, L. V., Littman, D. R., and Macpherson, A. J. (2012) Interactions between the microbiota and the immune system, *Science*, **336**, 1268-1273, doi: 10.1126/science.1223490.
10. Ivanov, I. I., Atarashi, K., Manel, N., Brodie, E. L., Shima, T., et al. (2009) Induction of intestinal Th17 cells by segmented filamentous bacteria, *Cell*, **139**, 485-498, doi: 10.1016/j.cell.2009.09.033.
11. Ивашкин В. Т., Шелыгин Ю. А., Абдулганиева Д. И., Абдулхаков Р. А., Алексеева О. П., и др. (2015) Рекомендации Российской гастроэнтерологической ассоциации и Ассоциации колопроктологов России по диагностике и лечению взрослых больных язвенным колитом, *Российский журнал гастроэнтерологии, гепатологии, колопроктологии*, **1**, 48-65.
12. Fox, J. G., and Lee, A. (1997) The role of *Helicobacter* species in newly recognized gastrointestinal tract diseases of animals, *Lab. Anim. Sci.*, **47**, 222-255.
13. Goldman, C. G., and Mitchell, H. M. (2010) *Helicobacter* spp. other than *Helicobacter pylori*, *Helicobacter*, **15**, 69-75, doi: 10.1111/j.1523-5378.2010.00780.x.
14. Kienesberger, S., Cox, L. M., Livanos, A., Zhang, X. S., Chung, J., et al. (2016) Gastric *Helicobacter pylori* infection affects local and distant microbial populations and host responses, *Cell Rep.*, **14**, 1395-1407, doi: 10.1016/j.celrep.2016.01.017.
15. Kullberg, M. C., Ward, J. M., Gorelick, P. L., Caspar, P., Hieny, S., et al. (1998) *Helicobacter hepaticus* triggers colitis in specific-pathogen-free interleukin-10 (IL-10)-deficient mice through an IL-12- and gamma interferon-dependent mechanism, *Infect. Immun.*, **66**, 5157-5166, doi: 10.1128/iai.66.11.5157-5166.1998.
16. Shomer, N. H., Dangler, C. A., Schrenzel, M. D., and Fox, J. G. (1997) *Helicobacter bilis*-induced inflammatory bowel disease in scid mice with defined flora, *Infect. Immun.*, **65**, 4858-4864, doi: 10.1128/iai.65.11.4858-4864.1997.
17. Christopher, P., Monceaux, T. L. T., Boktor, M., Jordan, P., Adegboyega, P., et al. (July 2013) *Helicobacter* infection decreases basal colon inflammation, but increases disease activity in experimental IBD, *Open J. Gastroenterol.*, 177-189, doi: 10.4236/ojgas.2013.33029.
18. Jiang, H. Q., Kushnir, N., Thurnheer, M. C., Bos, N. A., and Cebra, J. J. (2002) Monoassociation of SCID mice with *Helicobacter muridarum*, but not four other enterics, provokes IBD upon receipt of T cells, *Gastroenterology*, **122**, 1346-1354, doi: 10.1053/gast.2002.32959.
19. Ивашкин К. В., Решетова М. С., Зольникова О. Ю., Корнеева В. Р., и др. (2020) Место пробиотиков в комплексной терапии различных заболеваний желудочно-кишечного тракта, Р*оссийский журнал гастроэнтерологии, гепатологии, колопроктологии*, **30**, 42-48, doi: 10.22416/1382-4376-2020-30-1-42-48.
20. Weingarden, A. R., and Vaughn, B. P. (2017) Intestinal microbiota, fecal microbiota transplantation, and inflammatory bowel disease, *Gut Microbes*, **8**, 238-252, doi: 10.1080/19490976.2017.1290757.
21. Щербаков П. Л., Белова Н. Д., Генерозов Э. В., Жгун Е. С., и др. (2019) Применение фекальной трансплантации в лечении заболеваний пищеварительного тракта (первый клинический опыт), *Доктор.Ру.*, **3**, 40-46, doi: 10.31550/1727-2378-2019-158-3-40-46.
22. Lin, J., and Hackam, D. J. (2011) Worms, flies and four-legged friends: the applicability of biological models to the understanding of intestinal inflammatory diseases, *Disease Models Mech.*, **4**, 447-456, doi: 10.1242/dmm.007252.
23. Walters, E. M., Wolf, E., Whyte, J. J., Mao, J., Renner, S., et al. (2012) Completion of the swine genome will simplify the production of swine as a large animal biomedical model, *BMC Med. Genom.*, **5**, 55, doi: 10.1186/1755-8794-5-55.
24. Coors, M. E., Glover, J. J., Juengst, E. T., and Sikela, J. M. (2010) The ethics of using transgenic non-human primates to study what makes us human, *Nat. Rev. Genet.*, **11**, 658-662, doi: 10.1038/nrg2864.
25. Ideland, M. (2009) Different views on ethics: How animal ethics is situated in a committee culture, *J. Med. Ethics*, **35**, 258-261, doi: 10.1136/jme.2008.026989.
26. Robinson, A. M., Sakkal, S., Park, A., Jovanovska, V., Payne, N., et al. (2014) Mesenchymal stem cells and conditioned medium avert enteric neuropathy and colon dysfunction in guinea pig TNBS-induced colitis, *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.*, **307**, G1115-G1129, doi: 10.1152/ajpgi.00174.2014.
27. Hungate, R.E. (1966) *The Rumen and Its Microbes*, 1st Edn., Academic Press/New York and London.

28. Kathrani, A., Lee, H., White, C., Catchpole, B., Murphy, A., et al. (2014) Association between nucleotide oligomerisation domain two (Nod2) gene polymorphisms and canine inflammatory bowel disease, *Vet. Immunol. Immunopathol.*, **161**, 32-41, doi: 10.1016/j.vetimm.2014.06.003.
29. Waterston, R. H., Lindblad-Toh, K., Birney, E., Rogers, J., Abril, J. F., et al. (2002) Initial sequencing and comparative analysis of the mouse genome, *Nature*, **420**, 520-562, doi: 10.1038/nature01262.
30. Jiminez, J. A., Uwiera, T. C., Douglas Inglis, G., and Uwiera, R. R. E. (2015) Animal models to study acute and chronic intestinal inflammation in mammals, *Gut Pathog.*, **7**, 29, doi: 10.1186/s13099-015-0076-y.
31. Westbrook, A. M., Szakmary, A., and Schiestl, R. H. (2016) Mouse models of intestinal inflammation and cancer, *Arch. Toxicol.*, **90**, 2109-2130, doi: 10.1007/s00204-016-1747-2.
32. Wirtz, S., Popp, V., Kindermann, M., Gerlach, K., Weigmann, B., et al. (2017) Chemically induced mouse models of acute and chronic intestinal inflammation, *Nat. Protocols*, **12**, 1295-1309, doi: 10.1038/nprot.2017.044.
33. Cano-Gamez, E., Soskic, B., Roumeliotis, T. I., So, E., Smyth, D. J., et al. (2020) Single-cell transcriptomics identifies an effectorness gradient shaping the response of $CD4^+$ T cells to cytokines, *Nat. Commun.*, **11**, 1801, doi: 10.1038/s41467-020-15543-y.
34. Mizoguchi, A., Takeuchi, T., Himuro, H., Okada, T., and Mizoguchi, E. (2016) Genetically engineered mouse models for studying inflammatory bowel disease, *J. Pathol.*, **238**, 205-219, doi: 10.1002/path.4640.
35. Литвинова Е. А., Ачасова К. М., Борисова М. А., Женило С. В., Прохорчук Е. Б., и др. (2018) Роль гена *Kaiso* в развитии воспаления у мышей с дефицитом Муцина-2, *Вавиловский журнал генетики и селекции*, **22**, 1078-1083, doi: 10.18699/VJ18.453.
36. Литвинова Е. А., Беляев М. Д., Прохорчук А. В., Коростина В. С., Прохорчук Е. Б., и др. (2015) Вклад кишечного муцина-2 в эффективность антибактериальной терапии *Helicobacter* spp. у лабораторных мышей, *Вавиловский журнал генетики и селекции*, **19**, 494-498, doi: 10.18699/VJ15.066
37. Kawashima, H. (2012) Roles of the gel-forming MUC2 mucin and its O-glycosylation in the protection against colitis and colorectal cancer, *Biol. Pharm. Bull.*, **35**, 1637-1641, doi: 10.1248/bpb.b12-00412.
38. Tailford, L. E., Crost, E. H., Kavanaugh, D., and Juge, N. (2015) Mucin glycan foraging in the human gut microbiome, *Front. Genet.*, **6**, 81, doi: 10.3389/fgene.2015.00081.
39. Martens, E. C., Roth, R., Heuser, J. E., and Gordon, J. I. (2009) Coordinate regulation of glycan degradation and polysaccharide capsule biosynthesis by a prominent human gut symbiont, *J. Biol. Chem.*, **284**, 18445-18457, doi: 10.1074/jbc.M109.008094.
40. Morgan, X. C., Tickle, T. L., Sokol, H., Gevers, D., Devaney, K. L., et al.(2012) Dysfunction of the intestinal microbiome in inflammatory bowel disease and treatment, *Genome Biol.*, **13**, R79, doi: 10.1186/gb-2012-13-9-r79.
41. Pickard, J. M., and Chervonsky, A. V. (2015) Intestinal fucose as a mediator of host-microbe symbiosis, *J. Immunol.*, **194**, 5588-5593, doi: 10.4049/jimmunol.1500395.
42. Litvinova, E. A., Bets, V. D., Feofanova, N. A., Gvozdeva, O. V., Achasova, K. M., et al. (2021) Dietary fucose affects macrophage polarization and reproductive performance in mice, *Nutrients*, **13**, 855, doi: 10.3390/nu13030855.
43. Borisova, M. A., Snytnikova, O. A., Litvinova, E. A., Achasova, K. M., Babochkina, T. I., et al. (2020) Fucose ameliorates tryptophan metabolism and behavioral abnormalities in a mouse model of chronic colitis, *Nutrients*, **12**, 445, doi: 10.3390/nu12020445.
44. Ачасова К. М., Гвоздева О. В., Кожевникова Е. Н., Литвинова Е. А. (2021) Регкляторные Т-клетки лимфатических узлов у $Muc2^{-/-}$ мышей с *Helicobacter* spp., *Медицинская иммунология*, **23**, 629-634, doi: 10.15789/1563-0625-LNR-2268.
45. Ачасова К. М., Литвинова Е. А. (2019) Мыши с нокаутом гена *Muc2* – модель для оценки способов воздействия на микрофлору кишечника, *Российский иммунологический журнал*, **13**, 713-715, doi: 10.31857/S102872210006753-3.
46. Ачасова К. М., Литвинова Н. А., Кожевникова Е. Н., Литвинова Е. А. (2020) Вляние L-фукозы на макрофаги и Т-клетки при нарушении микрофлоры кишечника на экспериментальной модели ВЗК, *Медико-биологические и нутрициологические аспекты здоровьесберегающих технологий/материалы I Международной научно-практической конференции*, 21-25.
47. Mähler Convenor, M., Berard, M., Feinstein, R., Gallagher, A., Illgen-Wilcke, B., et al. (2014) FELASA recommendations for the health monitoring of mouse, rat, hamster, guinea pig and rabbit colonies in breeding and experimental units, *Lab. Animals*, **48**, 178-192, doi: 10.1177/0023677213516312.
48. Borisova, M. A., Achasova, K. M., Morozova, K. N., Andreyeva, E. N., Litvinova, E. A., et al. (2020) Mucin-2 knockout is a model of intercellular junction defects, mitochondrial damage and ATP depletion in the intestinal epithelium, *Sci. Rep.*, **10**, 21135, doi: 10.1038/s41598-020-78141-4.
49. Achasova, K. M., Kozhevnikova, E. N., Borisova, M. A., and Litvinova, E. A. (2021) Fucose ameliorates *Tritrichomonas* sp.-associated illness in antibiotic-treated $Muc2^{-/-}$ mice, *Int. J. Mol. Sci.*, **22**, 10699, doi: 10.3390/ijms221910699.
50. Litvinova, E. A., Kozhevnikova, E. N., Achasova, K. M., Kontsevaya, G. V., and Moshkin, M. P. (2017) Eradication of *Helicobacter* spp. in mucin2-deficient mice, *Lab. Animals*, **51**, 311-314, doi: 10.1177/0023677216670687.
51. Bradford, M. M. (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding, *Anal. Biochem.*, **72**, 248-254, doi: 10.1006/abio.1976.9999.
52. Ye, J., Coulouris, G., Zaretskaya, I., Cutcutache, I., Rozen, S., and Madden, T. L. (2012) Primer-BLAST: a tool to design target-specific primers for polymerase chain reaction, *BMC Bioinformatics*, **13**, 134, doi: 10.1186/1471-2105-13-134.
53. Okonechnikov, K., Golosova, O., and Fursov, M. (2012) Unipro UGENE: a unified bioinformatics toolkit, *Bioinformatics*, **28**, 1166-1167, doi: 10.1093/bioinformatics/bts091.
54. Schwieger, F., and Tebbe, C. (1999) A new approach to utilize PCR-Single-Strand-Conformation Polymorphism for 16S rRNA Gene-Based Microbial Community Analysis, *Appl. Environ. Microbiol.*, **64**, 4870-4876, doi: 10.1128/AEM.64.12.4870-4876.1998.
55. Bassam, B. J., Caetano-Anollés, G., and Gresshoff, P. M. (1991) Fast and sensitive silver staining of DNA in polyacrylamide gels, *Anal. Biochem.*, **196**, 80-83, doi: 10.1016/0003-2697(91)90120-i.
56. Heazlewood, C. K., Cook, M. C., Eri, R., Price, G. R., Tauro, S. B., et al. (2008) Aberrant mucin assembly in mice causes endoplasmic reticulum stress and spontaneous inflammation resembling ulcerative colitis, *PLoS Med.*, **5**, e54, doi: 10.1371/journal.pmed.0050054.
57. Allen, A., Hutton, D. A., and Pearson, J. P. (1998) The MUC2 gene product: a human intestinal mucin, *Int. J. Biochem. Cell Biol.*, **30**, 797-801, doi: 10.1016/s1357-2725(98)00028-4.

58. McGovern, D. P., Jones, M. R., Taylor, K. D., Marciante, K., Yan, X., et al. (2010) Fucosyltransferase 2 (FUT2) non-secretor status is associated with Crohn's disease, *Hum. Mol. Genet.*, **19**, 3468-3476, doi: 10.1093/hmg/ddq248.
59. Crouch, L. I., Liberato, M. V., Urbanowicz, P. A., Baslé, A., Lamb, C. A., et al. (2020) Prominent members of the human gut microbiota express endo-acting O-glycanases to initiate mucin breakdown, *Nat. Commun.*, **11**, 4017, doi: 10.1038/s41467-020-17847-5.
60. Tadesse, S., Corner, G., Dhima, E., Houston, M., Guha, C., et al. (2017) MUC2 mucin deficiency alters inflammatory and metabolic pathways in the mouse intestinal mucosa, *Oncotarget*, **8**, 71456-71470, doi: 10.18632/oncotarget.16886.
61. Luijkx, Y., Bleumink, N. M. C., Jiang, J., Overkleeft, H. S., Wösten, M., et al. (2020) Bacteroides fragilis fucosidases facilitate growth and invasion of Campylobacter jejuni in the presence of mucins, *Cell. Microbiol.*, **22**, e13252, doi: 10.1111/cmi.13252.

THE ROLE OF GLYCOPROTEIN MUCIN 2 AND L-FUCOSY IN THE INTERACTION OF IMMUNITY AND MICROFLORA OF EXPERIMENTAL MODEL OF INFLAMMATORY BOWEL DISEASES

V. D. Betz[1], K. M. Achasova[2,3], M. A. Borisova[4], E. N. Kozhevnikova[1,2,3], and E. A. Litvinova[2]*

[1] *Novosibirsk State Agrarian University, 630039 Novosibirsk, Russia*

[2] *Research Institute of Neurosciences and Medicine, 630117 Novosibirsk, Russia; e-mail: litvinovaea@physiol.ru*

[3] *Institute of Molecular and Cellular Biology, Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences, 630090 Novosibirsk, Russia*

[4] *Federal Research Center Institute of Cytology and Genetics, Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences, 630090 Novosibirsk, Russia*

Many factors underlie the development of inflammatory bowel diseases in humans. In particular, an imbalance in the microbiota and a thinning of the mucosal layer in the large intestine play a huge role. Pathogenic agents exacerbate disease progression. In view of this role, a study was carried out on the effect of mucin 2 deficiency on the diversity of intestinal microflora in an experimental model of Muc2 knockout mice in the presence of Helicobacter spp. We also evaluated the regenerative and anti-inflammatory effect of dietary L-fucose in *Muc2*$^{-/-}$ mice. For this purpose, the bacterial diversity in feces was studied in animals before and after the application of antibacterial therapy and the role of dietary L-fucose in its recovery was assessed. To determine the effect of bacterial imbalance and the role of fucose on the immune system, the mRNA levels of the genes of proinflammatory cytokines (*Tnf*, *Il1a*, *Il1b*, *Il6*) and transcription factors of T cells (*Foxp3* – Treg, *Rorc* – Th17, *Tbx21* – Th1) were determined in the colon tissue of *Muc2*$^{-/-}$ mice. A significant elimination of bacteria against the background of antibiotic use caused a decrease in fucose in the intestine, and also provoked a decrease in the transcription factor T of regulatory cells (*Foxp3*). When food L-fucose is added to antibiotics, the level of bacterial DNA of Bacteroides spp. in the feces of mice, *Muc2*$^{-/-}$ was partially restored. T regulatory cells are involved in the regulation of inflammation in *Muc2*$^{-/-}$ mice. Antibiotics reduced their number, which did not reduce the inflammatory response to infection. Fucose, as a component of mucin2, helps preserve *Bacteroides* spp. During antibiotic therapy in *Muc2*$^{-/-}$ mice and restore biochemical parameters, but does not affect the inflammatory response.

Keywords: IBD, macrophages, pathogens, microbiota, antibiotics, L-fucose, mucin 2

EDN: QYZJHE
БИОХИМИЯ, 2022, том 87, вып. 3, с. 376 – 386

УДК 578.1

ПОВЫШЕНИЕ УРОВНЯ СЫВОРОТОЧНОГО ПРОГРАНУЛИНА У БОЛЬНЫХ КОРОНАВИРУСНОЙ ИНФЕКЦИЕЙ (COVID-19): ПИЛОТНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ

© 2022 F.B. Özgeriş[1]*, Ö.F. Koçak[2], N. Kurt[3], E. Parlak[4], N. Yüce[5], M.S. Keleş[6]

[1] *Department of Nutrition and Dietetics, Faculty of Health Sciences, Atatürk University, Erzurum, 25240 Turkey; e-mail: betul.ozgeris@atauni.edu.tr*

[2] *Department of Chemistry and Chemical Process Technologies, Erzurum Vocational College, Atatürk University, Erzurum, 25240 Turkey*

[3] *Department of Basic Medical Sciences, Faculty of Medicine, Erzincan Binali Yildirim University, Erzincan, 24002 Turkey*

[4] *Department of Infection Diseases, Faculty of Medicine, Atatürk University, Erzurum, 25240 Turkey*

[5] *Department of Medical Biochemistry, Faculty of Medicine, Atatürk University, Erzurum, 25240 Turkey*

[6] *Department of Medical Biochemistry, Faculty of Medicine, Uskudar University, İstanbul, 34662 Turkey*

Поступила в редакцию 07.12.2021
После доработки 29.01.2022
Принята к публикации 29.01.2022

В настоящей работе мы исследовали влияние уровня сывороточного програнулина на течение и тяжесть заболевания, вызванного коронавирусной инфекцией (COVID-19). Также была изучена возможность использования этого параметра в качестве биомаркера у больных коронавирусной инфекцией. В исследовании участвовал 61 пациент с COVID-19, все больные были отнесены к следующим группам: бессимптомные, пациенты с легкой формой заболевания, пациенты средней тяжести и тяжелые. В образцах сыворотки крови, полученных от всех участников проекта, с помощью коммерческих наборов для проведения иммуноферментного анализа (ELISA) определяли концентрации програнулина, TNF-α и IL-6. Клинические показатели, такие как WBC, PLT, NE, LY, ALT, AST, Hb, PCT и CRP, определяли на биохимическом анализаторе. Все результаты анализа образцов крови больных мы сравнили с параметрами образцов 20 здоровых участников исследования. У больных с COVID-19 концентрация програнулина в сыворотке крови была статистически достоверно выше, чем в контрольной группе здоровых людей [112,6 ± 54,8, 0,0 (0,0–54,2 пкг/мл соответственно, $p = 0{,}000$)]. Чтобы оценить возможность использования програнулина в качестве биомаркера у больных COVID-19 мы использовали ROC-анализ. Мы обнаружили, что для програнулина характерно более высокое значение AUC (0,931 ± 0,08) и более статистически значимая величина p по сравнению с CRP ($p = 0{,}000$). Таким образом, мы пришли к выводу, что при коронавирусной инфекции уровни програнулина достигают высоких значений и могут быть использованы в качестве определяющего параметра при диагностике и прогнозировании течения болезни; уровень програнулина также может быть лучшим маркером по сравнению с CRP.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: COVID-19, CRP, IL-6, програнулин.

DOI: 10.31857/S0320972522030058

ВВЕДЕНИЕ

Болезнь, вызываемая коронавирусной инфекцией COVID-19, или SARS-CoV-2 (тяжелый острый респираторный синдром, вызываемый коронавирусом, 2), ассоциирована со значительными нарушениями функции легких и множественными проявлениями в других органах и тканях, включая тромбоэмболию, кровотечения, повреждения миокарда, нарушение работы желудка и кишечника [1]. Спектр клинических проявлений варьирует от отсутствия симптомов и относительно легкого течения болезни до тяжелых и опасных для жизни состояний, требующих интенсивной терапии [2]. В связи с усилением эпидемии COVID-19 возникает острая необходимость в выявлении клинико-лабораторных предикторов прогрессирования в сторону тяжелых и фатальных форм течения этого заболевания.

Интерлейкин 6 (IL-6) и фактор некроза опухоли α (TNF-α) являются важными членами сети цитокинов, обладающими как противовоспалительными, так и провоспалительными свой-

Принятые сокращения: COVID-19 – коронавирусная инфекция 2019 г.; CRP – С-реактивный белок; IL-6 – интерлейкин-6; PRGN – програнулин; TNF-α – фактор некроза опухоли α.

* Адресат для корреспонденции.

ствами. Нарушение регуляции продукции цитокинов способствует развитию аутоиммунных состояний или персистированию инфекции, что приводит к поддержанию патологического хронического воспалительного состояния [3]. Белок IL-6 представляет собой провоспалительный цитокин, который стимулирует ответные реакции острой фазы, гематопоэз и специфические иммунные реакции. Недавно было показано, что уровень этого цитокина коррелирует с высокой смертностью у пациентов с COVID-19 [4]. Из числа изученных цитокинов также была особо отмечена роль TNF-α, что обусловлено его расположением у истока каскада воспалительных реакций и наличия у него множества функций в работе иммунной системы [5].

Програнулин (PGRN), также известный как предшественник гранулина-эпителина, проэпителин [6], акрогранин [7] и эпителиальный трансформирующий фактор роста, представляет собой гликопротеин, состоящий из тандемных повторов 12 цистеин-содержащих модулей, называемых гранулиновыми или эпителиновыми доменами. Известно, что PGRN как плейотропный фактор роста играет важную роль в поддержании и регуляции динамики гомеостаза в ходе нормального развития тканей, пролиферации, регенерации тканей и при иммунном ответе (HDR, host defense response). В связи с этими функциями белок активно исследовали в контексте развития инфекционных заболеваний, при заживлении ран, канцерогенезе, нейропролиферативных и нейродегенеративных заболеваниях [8]. Взаимосвязи между PGRN и воспалительными процессами носят сложный характер. PGRN связывается с рецепторами TNF-α и ингибирует TNF-α-зависимые сигнальные пути. В частности, PGRN блокирует способность TNF-α стимулировать респираторный взрыв нейтрофилов. На этом основании PGRN рассматривается как противовоспалительный фактор [9].

С-реактивный белок (CRP) является одним из неспецифических белков острой фазы ответа, синтезируемых в печени с участием IL-6-ассоциированного сигнального пути. Повышение его уровня служит в качестве биомаркера воспалительных процессов, инфекции и повреждения тканей [10, 11]. В ряде работ было обнаружено, что в сыворотке крови больных COVID-19 повышена концентрация этого белка [12–14].

Коронавирусная инфекция (COVID-19) является новым инфекционным заболеванием, для которого до настоящего времени не выработаны лабораторные маркеры для оценки тяжести заболевания. В связи с этим целью настоящей работы было изучение возможности использования показателей уровня програнулина для предсказания течения и тяжести протекания болезни у пациентов с COVID-19, а также оценка того, может ли этот показатель быть использован в качестве биомаркера в таких случаях.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Материалы. Больные COVID-19 и здоровые люди были отобраны из числа посетителей инфекционного отделения исследовательской больницы университета имени Ататюрка. Группы были организованы из больных с COVID-19, а также здоровых пациентов со сходными демографическими показателями. COVID-19 диагностировали с помощью ПЦР в реальном времени (RT-PCR). Для этого у больных брали образцы из носоглотки и ротовой полости. В контрольную группу были включены здоровые волонтеры со сходными с COVID-положительными пациентами демографическими показателями и отрицательными результатами ПЦР-тестирования на коронавирусную инфекцию при отсутствии каких-либо жалоб. Забор образцов крови производили после одобрения настоящего исследования этическим комитетом по проведению клинических исследований (No: B.30. 2.ATA.0.01.00/411). Все случаи коронавирусной инфекции велись в соответствии с Национальными рекомендациями. Больные COVID-19 были разбиты на следующие группы: бессимптомные (AG, отсутствие симптомов, без отклонений от нормы при визуализационных исследованиях грудной клетки), больные с легкой формой при отсутствии осложнений (NCG, больные с такими симптомами, как повышенная температура, боли в мышцах и суставах, кашель, боли в горле при отсутствии дыхательных нарушений: частота дыхания < 24/мин, SpO_2 > 93% в комнатном воздухе и нормальная картина при рентгенографии грудной клетки и/или КТ легких), больные средней тяжести (MG, больные с такими симптомами, как повышенная температура, боли в мышцах и суставах, кашель, боли в горле, частота дыхания < 30/мин, SpO_2 > 90% в комнатном воздухе и признаки пневмонии от легких до средних на рентгеновских снимках и/или КТ) и тяжелобольные (SG, больные с такими симптомами, как лихорадка, боли в мышах, суставах, кашель и боли в горле с учащенным поверхностным дыханием (тахипноэ, частота дыхания ≥ 30/мин), уровень SpO_2 ≤ 90% в комнатном воздухе и признаки двусторонней пневмонии, выявляемые при рентгенографии или КТ грудной клетки). В первый день поступления производили забор крови у больных в

группах MG и SG. В эти группы входили пациенты, принимавшие различные противовирусные препараты (Tamiflu, Plaquanil, Favipavir) и при этом не имевшие хронических заболеваний (таких как ХОБЛ, туберкулез или СПИД). Больные, принимающие антидепрессанты или получающие химиотерапию, в исследование включены не были. Здоровые добровольцы – взрослые люди старше 18 лет, сопоставимые по возрасту с группой больных, имеющие нормальные показатели физического развития и нормальные результаты рутинных анализов, не беременные и не имеющие хронических заболеваний, таких как ХОБЛ, туберкулез или СПИД. Все больные с COVID-19 (COVID-19 (+)), вошедшие в группу тяжелобольных, получали медицинскую помощь в отделении интенсивной терапии (ICU, intensive care unit), и девять больных были подключены к аппарату искусственной вентиляции легких. В начале настоящего исследования образцы крови были получены в общей сложности от 95 человек, и все они были включены в число участников исследования. Однако с учетом критериев включения и исключения четверо молодых людей моложе 20 лет, восемь человек, чьи образцы сыворотки крови подверглись гемолизу, а также двое пациентов, получивших отрицательный результат при повторном ПЦР-тестировании, были исключены из настоящего исследования. В итоге в настоящем исследовании были использованы образцы сыворотки крови, полученные от 81 человека.

Биохимический и клинический анализ крови. У больных, госпитализированных в нашу больницу, были взяты образцы крови. Часть образцов была отправлена в лабораторию при больнице для проведения рутинных анализов, а другая часть – в лабораторию отделения медицинской биохимии медицинского факультета университета имени Ататюрка для определения уровней IL-6, TNF-α и PGRN. Результаты тестов на IL-6, TNF-α и PGRN, полученные для каждого пациента, регистрировали вместе с информацией о возрасте, поле, коморбидных состояниях и биохимических параметрах крови (ALT, AST, WBC, NE, LY, PLT, Hb, PCT и CRP).

Определение уровня IL-6, TNF-α и PGRN в сыворотке крови. Концентрации TNF-α в образцах сыворотки крови определяли с помощью специфичного для белков человека иммуноферментного анализа (Hu TNF-ELISA kit; Cat. No. KE00154, AuthentiKine, США). Концентрации сывороточного IL-6 измеряли с использованием специфичного для белков человека иммуноферментного анализа (Hu IL-6 ELISA kit; Cat. No. KE00139, AuthentiKine). Определение концентрации PGRN в образцах сыворотки крови проводили с использованием соответствующего набора для иммуноферментного определения белков (Hu PGRN ELISA kit; Cat. No. MBS163502, MyBioSource, Бельгия). Анализ IL-6, TNF-α и PGRN проводили с использованием микропланшетного ридера (XS Powerwave, BioTEK, США).

Статистическая обработка результатов. Для проведения статистической обработки полученных результатов нами был использован пакет программ IBM SPSS 20.0. Полученные результаты представлены в виде среднего значения, стандартного отклонения, минимального и максимального значений, процента и количества. Для определения нормального распределения непрерывных величин использовали критерий Колмогорова–Смирнова. При сравнении двух независимых групп для данных с нормальным распределением использовали *t*-критерий для независимых образцов, а в других случаях применяли U-критерий Манна–Уитни. При сравнении непрерывных величин из более чем двух независимых групп и при условии соблюдения нормального распределения использовали критерий ANOVA. В противном случае использовали критерий Краскела–Уоллиса. Для анализа данных с нормальным распределением использовали корреляционный анализ Пирсона, а для других данных – корреляционный анализ Спирмена.

Анализ данных с использованием ROC-кривой (ROC, receiver operating characteristic) применяли с целью оценки возможности использования непрерывных величин для диагностики, а также определения порогового значения, положительной прогностической ценности (PPV, positive predictive value), отрицательной прогностической ценности (NPV) и площади под кривой (AUC, area under the curve). Уровень статистической значимости для всех данных был установлен на значении $p < 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

В табл. 1 представлены демографические характеристики и параметры радиологических снимков пациентов с COVID-19 и контрольной группы здоровых людей. Статистически достоверных различий между средним значением возраста объединенной группы больных и контрольной группы ($p = 0,997$) обнаружено не было. 49,3% из 81 участника исследования составляли женщины, 50,7% – мужчины.

В то время как програнулин был обнаружен только у 4 из 20 человек в контрольной группе, то среди больных он отсутствовал лишь у 6 из 61

Таблица 1. Демографические характеристики и параметры изображений для контрольной группы и больных с COVID-19

Переменные	PG					HCG (n = 20)
	AG (n = 10)	NCG (n = 13)	MG (n = 25)	SG (n = 13)	Всего PG (n = 61)	
Возраст (лет)	39,4 ± 14,1	38,1 ± 17,1	53,0 ± 18,1	59,0 ± 13,8	48,8 ± 18,4	48,9 ± 15,9
Пол (женщин/мужчин)	6/4	9/4	11/14	4/9	30/31	10/10
Радиологические параметры (N/GG/GG+C)	8/2/0	8/4/1	1/20/4	0/4/9	17/30/14	–
Выживаемость (живы/мертвы)	10/0	13/0	25/0	6/7	54/7	–

Примечание. PG (patient group) – группа больных с COVID-19 (COVID-19 (+)); AG (asymptomatic group) – группа бессимптомных больных; NCG (noncomplicated group) – группа больных без осложнений; MG (moderate group) – группа пациентов с болезнью средней тяжести; SG (severe group) – группа тяжелобольных; HCG (healthy control group) – контрольная группа здоровых людей; N (normal) – норма; GG (ground glass) – «матовое стекло»; GG + C – «матовое стекло» + уплотнение.

человека. Поскольку степень поглощения в образцах с недетектируемым содержанием програнулина была такой же, как в пустом образце, концентрация програнулина в этих образцах была принята равной 0,00 мг/л. Концентрация сывороточного програнулина была статистически достоверно выше в группе больных COVID-19 по сравнению с контрольной группой здоровых людей (p = 0,000). Не было выявлено статистически достоверных различий между уровнями програнулина в подгруппах больных COVID-19 (p = 0,078). Диаграммы типа «ящик с усами» для подгрупп больных COVID-19 и контрольной группы представлены на рис. 1. Не было выявлено статистически значимых различий в уровнях TNF-α и IL-6 между группами больных и контрольной группой или между подгруппами больных (p = 0,000). Не выявлено статистически достоверных различий между подгруппами больных COVID-19 по биохимическим параметрам ALT, AST, WBC, NE, LY, PLT, PCT и Hb. Было выявлено значительное снижение NE, LY и PLT и значительное повышение Hb в объединенной группе больных по сравнению с контрольной группой. В то же время концентрация CRP отличалась как между

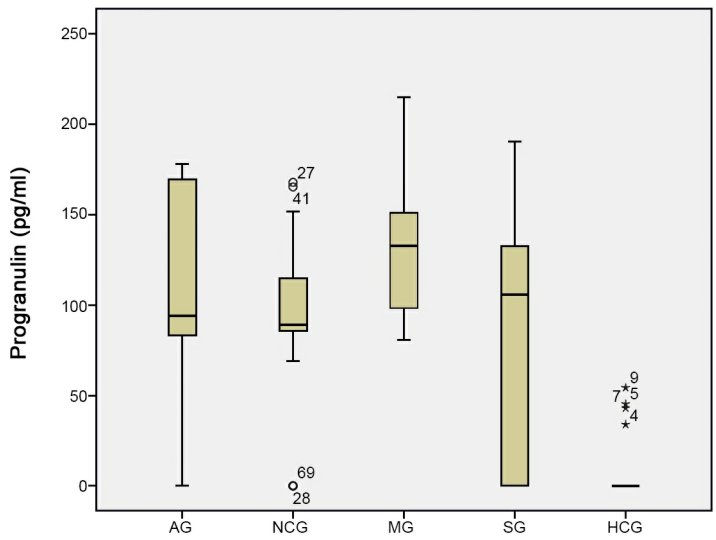


Рис. 1. Диаграммы типа «ящик с усами», демонстрирующие уровень сывороточного програнулина в контрольной группе и подгруппах больных с COVID-19 (COVID-19 (+)) (p = 0,000). Обозначения: AG – бессимптомная группа; NCG – группа без осложнений; MG – группа больных средней тяжести; SG – группа тяжелобольных; HCG – контрольная группа здоровых людей

Таблица 2. Биохимические показатели здоровых людей из контрольной группы и больных с COVID-19

Переменные	PG						HCG (n = 20) Среднее значение ± ± SD или медиана (min–max)	p^2-значение
	AG (n = 10) Среднее значение ± ± SD или медиана (min–max)	NCG (n = 13) Среднее значение ± ± SD или медиана (min–max)	MG (n = 25) Среднее значение ± ± SD или медиана (min–max)	SG (n = 13) Среднее значение ± ± SD или медиана (min–max)	p^1-значение	Total PG (n = 61) Среднее значение ± ± SD или медиана (min–max)		
PRG (пкг/мл)	112,8 ± 58,8	94,5 ± 52,5	132,8 ± 39,1	91,6 ± 70,2	0,078	112,6 ± 54,8	0,0 (0,0–54,2)	0,000
TNF-α (пкг/мл)	22,4 ± 8,9	23,1 ± 4,3	26,2 ± 7,1	34,3 ± 7,6	0,00	26,68 ± 8,1	18,8 ± 4,5	0,038
IL-6 (пкг/мл)	25,1 ± 13,0	38,9 ± 8,4	67,8 ± 18,8	92,1 ± 12,2	0,00	60,15 ± 27,59	20,27 ± 10,9	0,000
ALT (U/л)	36 (13–79)	17 (10–37)	20 (7–80)	20 (10–43)	0,392	20 (7–80)	27 (11–93)	0,796
AST (U/л)	27,0 ± 12,2	27,3 ± 8,4	24,1 ± 7,8	30,9 ± 9,1	0,194	26,7 ± 9,1	28,1 ± 20,0	0,700
WBC ($\times 10^3$)	8,3 ± 1,7	6,4 ± 3,1	6,2 ± 2,8	6,1 ± 1,2	0,140	6,6 ± 2,5	8,5 ± 2,8	0,050
NE ($\times 10^3$)	5,01 ± 1,7	5,0 ± 0,3	5,4 ± 0,2	5,8 ± 2,5	0,065	5,5 ± 2,5	5,2 ± 2,1	0,035
LY ($\times 10^3$)	1,8 ± 0,5	1,7 ± 1,0	1,4 ± 0,9	1,2 ± 0,4	0,153	1,5 ± 0,8	2,3 ± 1,1	0,000
PLT ($\times 10^6$)	240 (191–281)	240 (154–385)	240 (135–408)	192 (51–291)	0,238	227 (51–408)	280 (166–616)	0,000
Hb (г/дл)	15,6 ± 1,9	14,8 ± 2,1	14,7 ± 1,7	14,6 ± 0,9	0,366	14,8 ± 1,7	13,2 ± 2,6	0,002
CRP (мг/л)	3,5 (3,1–47,0)	3,1 (3,1–53,1)	3,2 (3,1–66,1)	30,5 (3,0–192,0)[a,b,c]	0,015	3,7 (3,0–192,0)	1,2 (0,0–5,38)	0,000
PCT (нг/мл)	0,047 ± 0,1	0,049 ± 0,1	0,043 ± 0,1	0,039 ± 0,2	0,47	0,044 ± 0,0	–	–

Примечание. PG – группа больных с COVID-19 (COVID-19 (+)); AG – группа асимптоматичных больных; NCG – группа больных без осложнений; MG – группа больных средней тяжести; SG – группа тяжелобольных; HCG – контрольная группа здоровых людей; PRG – програнулин; TNF-α – фактор некроза опухоли α; IL-6 – интерлейкин 6; WBC – лейкоциты; ALT – аланинаминотрансфераза; Ast – аспартатаминотрансфераза; Hb – гемоглобин; PLT – тромбоциты; NE – нейтрофилы; LY – лимфоциты; CRP – С-реактивный белок; PCT – прокальцитонин; [a], $p < 0,05$ при сравнении с AG; [b], $p < 0,05$ при сравнении с NCG; [c], $p < 0,05$ при сравнении с MG; p^1, сравнение между подгруппами COVID-19 (+); p^2, сравнение между группами PG и HCG.

группой больных и контролем, так и между подгруппами больных с COVID-19. Биохимические параметры крови для всех групп представлены в табл. 2.

В группе больных COVID-19 не было обнаружено значительной корреляции между уровнями програнулина и другими параметрами. В то же время в подгруппах больных COVID-19 была выявлена положительная корреляция с CRP (r = 0,474, p = 0,017) – в группе больных MG, и отрицательная корреляция с PLT – в группе тяжелобольных (r = –0,578, p = 0,038) (рис. 2). С другой стороны, если рассматривать всех участников, то наблюдается положительная корреляция между уровнями програнулина, TNF-α и IL-6 (r = 0,260, p = 0,018, r = 0,461, p = 0,000 соответственно) (рис. 3).

Таблица 3. Результаты ROC-анализа содержания програнулина и CRP

Биомаркер	AUC (CI%)	p-значение	PPV (CI%)	NPV (CI%)
PRG	0,931 (87,6–98,6)	0,000	91,8 (82,3–82,4)	69,5 (52,5–82,5)
CRP	0,791 (66,8–91,3)	0,000	93,3 (79,1–88,2)	34,6 (28,7–40,9)

Примечание. CI (coefficient interval) – интервал коэффициента.

Для оценки потенциала програнулина в качестве биомаркера у больных COVID-19 был проведен ROC-анализ. Мы обнаружили, что значение AUC для програнулина было выше и значение p – более значимым по сравнению с CRP. Пороговое значение было равно 38 пкг/мл в случае програнулина и 6 мг/мл – для CRP. Также были рассчитаны величины положительной прогностической ценности (PPV) и отрицательной прогностической ценности (NPV). Рассчитанные параметры ROC-анализа представлены в табл. 3 и на рис. 4.

Болезнь, вызванная коронавирусной инфекцией, которая создала существенные проблемы для системы здравоохранения во всем мире, протекает у людей по-разному. Поэтому выявле-

ние параметров, с помощью которых будет возможно осуществлять мониторинг тяжести протекания и последствий этой болезни, внесет значительный вклад в патофизиологию. Количественные параметры, отражающие стадию развития заболевания, вызванного коронавирусной инфекцией, чрезвычайно важны для классификации пациентов по степени тяжести заболевания и быстрого применения эффективного лечения. В настоящей работе в сыворотке крови больных COVID-19 различной степени тяжести были определены концентрации IL-6, TNF-α и PGRN, а также различные биохимические параметры, которые сравнивались с соответствующими параметрами у здоровых людей. В результате оценки этих потенциально важных данных были предложены новые диагностические мишени.

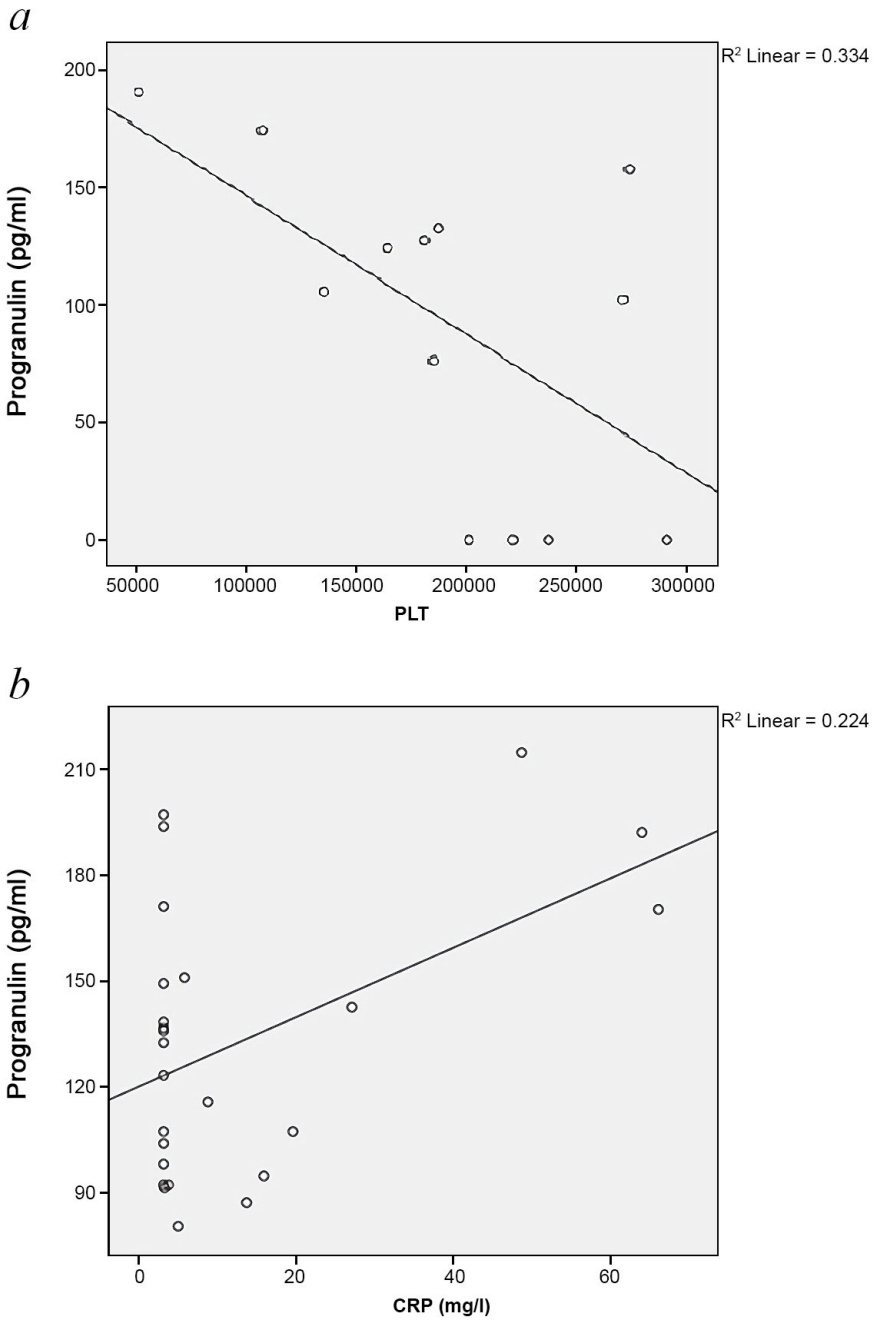


Рис. 2. *a* – Диаграмма разброса корреляции уровня програнулина и PLT в группе тяжелобольных ($R^2 = 0{,}334$, $r = -0{,}578$, $p = 0{,}038$); *b* – диаграмма разброса корреляции уровня програнулина и CRP в группе MG ($R^2 = 0{,}224$, $r = 0{,}474$, $p = 0{,}017$)

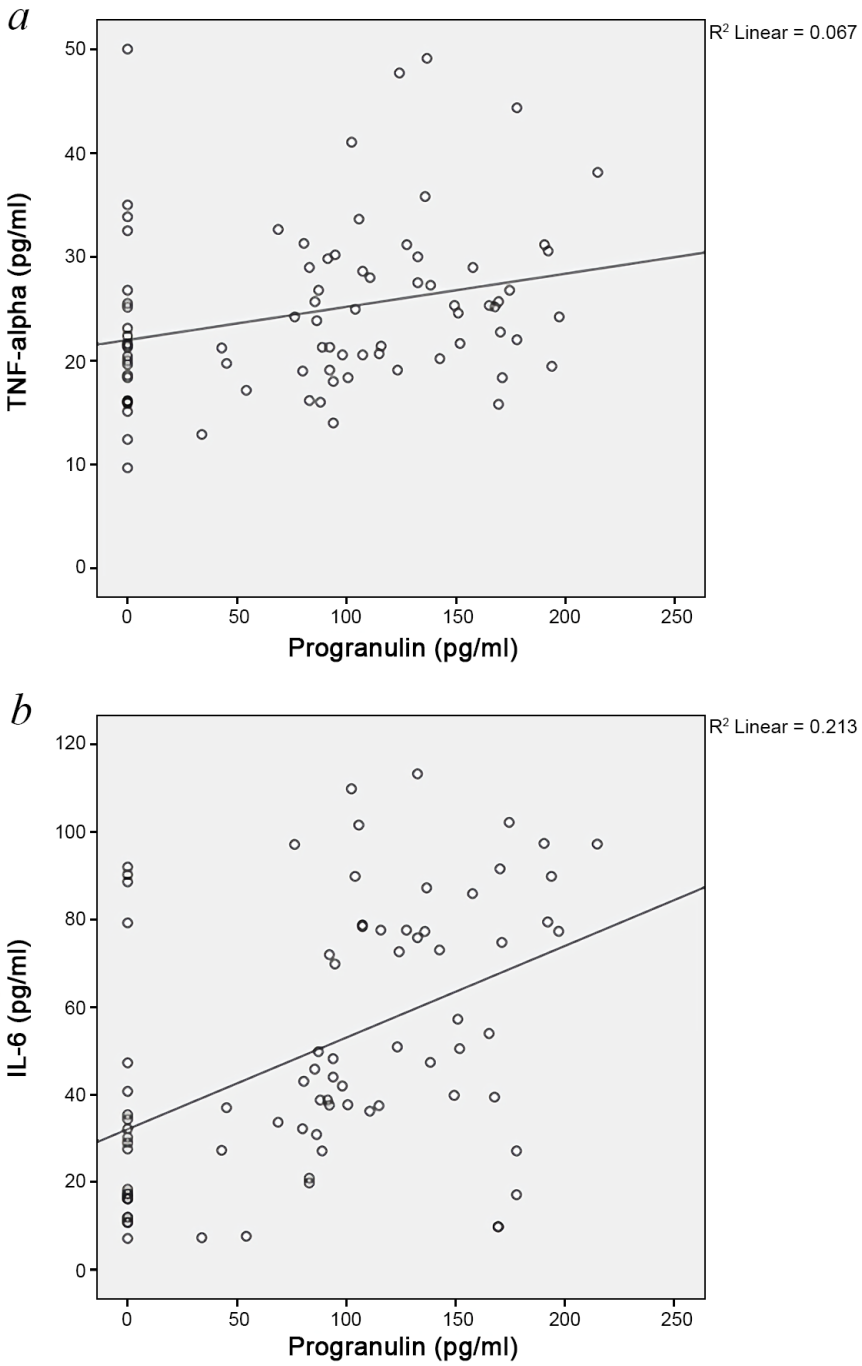


Рис. 3. *a* – Диаграмма разброса корреляции уровня програнулина и TNF-α в образцах, полученных от всех участников исследования; *b* – диаграмма разброса корреляции уровня програнулина и IL-6 в образцах, полученных от всех участников исследования

При иммунном ответе на инфекцию и повреждения тканей происходит быстрая продукция IL-6 с помощью механизмов контроля транскрипции и посттранскрипционных механизмов. Нарушение нормальной экспрессии IL-6 оказывает патологическое влияние на хронические воспалительные и аутоиммунные процессы [15]. Принято считать, что IL-6 играет ключевую роль в цитокиновом шторме, индуцированном SARS-CoV-2, как многофункциональный медиатор воспалительных процессов, и он участвует в развитии интерстициальной пневмонии и острого респираторного дистресс-синдрома (ARDS, acute respiratory distress

syndrome), наблюдаемых при тяжелых случаях протекания заболевания, вызванного коронавирусной инфекцией [16]. В острой фазе инфекции при наличии воспалительного процесса продукция IL-6 у больных COVID-19 наблюдается в иммунных клетках, в особенности в Т-хэлперах тип 17 (TH17) [17]. Кроме того, продукция IL-6 индуцируется TNF-α после высвобождения этого пирогенного цитокина из иммунных клеток в ответ на хронические воспалительные и аутоиммунные состояния, что позволяет предположить роль IL-6 в качестве нижележащего эффектора TNF-α [18]. Используя мета-анализ накопленных данных из 24 исследований, Wu et al. [19] изучили роль воспалительных цитокинов, включая IL-6, IL-10 и TNF-α, в тяжести протекания болезни и смертности. Они показали, что у больных COVID-19 значительно повышены уровни IL-6. В другой работе с участием больных с коронавирусной инфекцией также было показано, что по мере повышения тяжести болезни уровни IL-6 в плазме крови возрастают [20]. В нашей работе было выявлено значительное различие в уровнях TNF-α и IL-6 между больными и людьми из контрольной группы, а также между различными подгруппами больных (p = 0,000).

У больных COVID-19 в плазме крови также обнаруживаются повышенные уровни провоспалительных цитокинов, включая хемокины, такие как IFN-γ, IL-1β, IP-10 и MCP-1. Кроме того, у больных в тяжелом состоянии, направляемых в отделение интенсивной терапии, были обнаружены повышенные концентрации TNF-α [21]. В этой работе были определены уровни цитокинов и хемокинов у бессимптомных больных, больных с симптомами и выздоравливающих после COVID-19, а также здоровых людей. Было показано, что уровни TNF-α выше у людей с симптомами болезни по сравнению со здоровыми людьми из контрольной группы [22].

Wu et al. [19] в восьми последующих работах по мета-анализу данных касательно уровня TNF-α в крови больных, тяжело переносящих COVID-19 (n = 725), и больных, у кого эта болезнь протекает легче (n = 587), показали отсутствие статистически достоверных различий между этими группами. В нашей работе мы также не смогли выявить статистически достоверных различий между уровнями TNF-α в разных группах.

PGRN является плейотропным гормоном роста и регулятором иммунной системы. Он был выявлен в эпителии, костном мозге и в различных типах иммунных клеток, таких как Т-клетки, дендритные клетки, моноциты и макрофаги [23]. Связываясь с мембраносвязанными рецепторами TNF-R1, TNF-R2 или Toll-like рецептором 9, PGRN выполняет различные функции в системах врожденного и адаптивного иммунитета. В системе адаптивного иммунитета PGRN

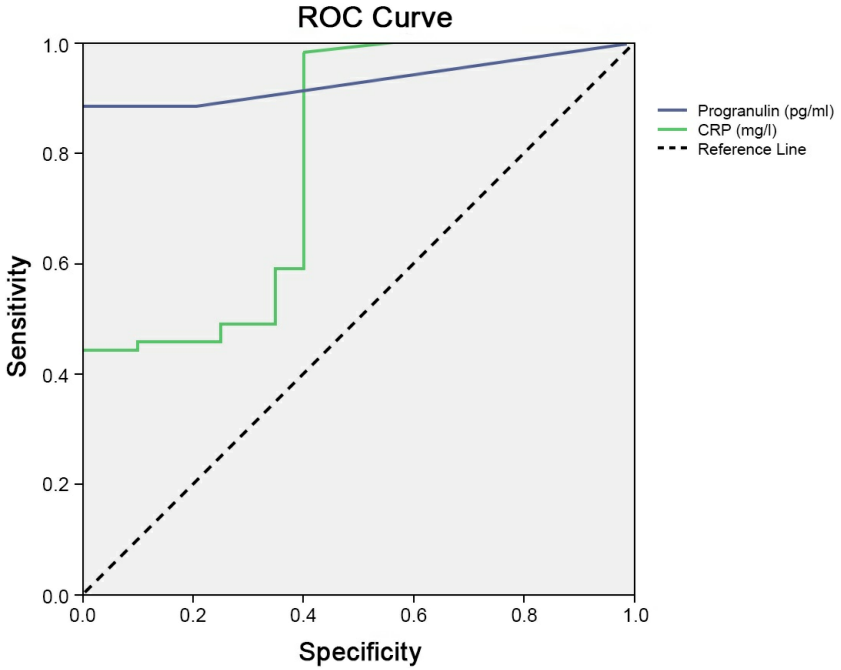


Рис. 4. ROC-кривая для програнулина и CRP (AUC = 0,931, p = 0,000 для програнулина; AUC = 0,791; p = 0,000 для CRP)

играет важную роль в Т-клеточной регуляции, способствуя превращению $CD4^+$ Т-клеток в регуляторные Т-клетки Foxp (Tregs) и защищая Tregs от негативной регуляции белком TNF-α [24, 25]. PGRN препятствует проявлению цитотоксичности регуляторных NK-клеток, направленной против антивирусных Т-клеток, и ингибирует липополисахарид-опосредованную секрецию IL-6 и TNF-α макрофагами [9]. В настоящей работе нами было показано, что у больных коронавирусной инфекцией уровни PGRN значительно выше, чем у здоровых людей из контрольной группы. Когда мы брали во внимание тяжесть болезни, то мы не смогли выявить какие-либо статистически значимые различия между уровнями PGRN ($p = 0{,}078$). Данные по экспрессии белков в сыворотке крови больных COVID-19 описаны в литературе; не было выявлено различий в уровне экспрессии IL-6 у людей, положительных по SARS-CoV-2, при сравнении с больными со сходными симптомами и тяжестью болезни, но при этом имеющих отрицательные результаты на эту коронавирусную инфекцию. В то же время наблюдалось специфическое повышение уровня PGRN [26]. Yao et al. [27] показали, что сывороточные уровни VCAM-1 и PGRN выше у больных с COVID-19, чем у здоровых людей из контрольной группы.

В ходе определения уровня PGRN при сепсисе, внебольничной бактериальной пневмонии (CAP, community-acquired bacterial pneumonia) и COVID-19 учеными было обнаружено, что у больных COVID-19 с подтвержденной пневмонией значительно повышены уровни PGRN по сравнению с больными с внебольничной бактериальной пневмонией и с отрицательным результатом тестирования на COVID-19. Они подчеркнули, что для больных COVID-19 с подтвержденной пневмонией програнулин является даже лучшим биомаркером, чем прокальцитонин и CRP [28].

В исследованиях также было показано, что уровни CRP достигают высоких значений в начале заболевания, вызванного коронавирусной инфекцией, и они являются определяющими при диагностике и прогнозе течения болезни [13, 14]. CRP является биомаркером, который используется не только для диагностики заболевания, но и для определения тяжести болезни, оценки ответа организма больного на лечение и прогнозирования вероятности летального исхода [29]. В ходе мультицентрового ретроспективного исследования Feng et al. [12] показали, что в 476 случаях уровень CRP по мере ухудшения клинической картины повышался и достигал значительных различий для всех больных, находящихся в критическом состоянии. В результате проведенного нами ROC-анализа для оценки возможности использования PGRN в качестве биомаркера у больных COVID-19 мы определили, что этот белок имеет большее значение AUC и более статистически значимое значение *p* по сравнению с CRP. Таким образом, мы считаем, что PGRN может быть хорошим маркером заболевания, вызванного коронавирусной инфекцией.

ВЫВОДЫ

Коронавирусная инфекция (COVID-19) признана глобальной угрозой для здоровья людей. Поэтому важно, чтобы клиницисты имели доступ к надежному экспресс-тестированию патогенов и дифференциальной диагностике, основанной на клинической идентификации во время их первого контакта с предположительными больными. В сравнении с уровнями TNF-α и IL-6, PGRN почти никогда не обнаруживался в сыворотке крови здоровых людей, и в то же время уровень этого белка был высоким у больных COVID-19. Было обнаружено, что уровень этого белка является более чувствительным маркером по сравнению с CRP при дифференцировании между больными COVID-19 и здоровыми людьми. Кроме того, низкие уровни PCT у больных COVID-19 позволяют предполагать, что повышение уровня PGRN связано с вирусной природой инфекции. Мы полагаем, что у больных коронавирусной инфекцией уровни програнулина достигают высоких значений и могут быть использованы в качестве определяющего параметра при диагностике и прогнозировании течения заболевания, и что этот белок может стать лучшим биомаркером по сравнению с CRP.

Благодарности. Авторы благодарны медицинским работникам, принимавшим участие в сборе образцов.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Соблюдение этических норм. Выполнение настоящей работы было одобрено этическим комитетом по клиническим исследованиям университета имени Ататюрка (№: B.30.2.ATA. 0.01.00/411). Все случаи заболевания COVID-19 велись в соответствии с Национальным руководством.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Wolfel, R., Corman, V. M., Guggemos, W., Seilmaier, M., Zange, S., et al. (2020) Virological assessment of hospitalized patients with COVID-2019, *Nature*, **581**, 465-469.
2. Zou, S., Luo, Q., Song, Z. X., Zhang, L. P., Xia, Y., et al. (2017) Contribution of progranulin to protective lung immunity during bacterial pneumonia, *J. Infect.. Dis.*, **215**, 1764-1773.
3. Dalkiliç, E., Gül, C. B., and Alkiş, N. (2012) İnterlökin-6: İnflamasyonda başrol oyuncularindan, *Uludağ Üniversitesi Tip Fakültesi Dergisi*, **38**, 157-160.
4. Marshall, J. C., Murthy, S., Diaz, J., Cheng, A., Denholm, J., et al. (2020) A minimal common outcome measure set for COVID-19 clinical research, *Lancet Infect. Dis.*, **20**, E192-E197.
5. Wu, F., Zhao, S., Yu, B., Chen, Y. M., Wang, W., et al. (2020) A new coronavirus associated with human respiratory disease in China, *Nature*, **579**, 265-269.
6. Zanocco-Marani, T., Bateman, A., Romano, G., Valentinis, B., He, Z. H., et al. (1999) Biological activities and signaling pathways of the granulin/epithelin precursor, *Cancer Res.*, **59**, 5331-5340.
7. Anakwe, O. O., and Gerton, G. L. (1990) Acrosome biogenesis begins during meiosis – evidence from the synthesis and distribution of an acrosomal glycoprotein, acrogranin, during guinea-pig spermatogenesis, *Biol. Reprod.*, **42**, 317-328.
8. Jian, J, L., Konopka, J., and Liu, C. J. (2013) Insights into the role of progranulin in immunity, infection, and inflammation, *J. Leukoc. Biol.*, **93**, 199-208.
9. Tang, W., Lu, Y., Tian, Q. Y., Zhang, Y., Guo, F. J., et al. (2011) The growth factor progranulin binds to TNF receptors and is therapeutic against inflammatory arthritis in mice, *Science*, **332**, 478-484.
10. Nehring, S. M., Goyal, A., Bansal, P., and Patel, B. C. (2022) C reactive protein (CRP), *StatPearls*, PMID: 28722873.
11. Pepys, M. B., and Hirschfield, G. M. (2003) C-reactive protein: A critical update, *J. Clin. Invest.*, **111**, 1805-1812.
12. Feng, Y., Ling, Y., Bai, T., Xie, Y. S., Huang, J., et al. (2020) COVID-19 with different severities: A multicenter study of clinical features, *Am. J. Respir. Crit. Care Med.*, **201**, 1380-1388.
13. Ruan, Q. R., Yang, K., Wang, W. X., Jiang, L. Y., and Song, J. X. (2020) Clinical predictors of mortality due to COVID-19 based on an analysis of data of 150 patients from Wuhan, China, *Intensive Care Med.*, **46**, 1294-1297.
14. Velavan, T. P., and Meyer, C. G. (2020) Mild versus severe COVID-19: Laboratory markers, *Int. J. Infect. Dis.*, **95**, 304-307.
15. Liu, B. M., Martins, T. B., Peterson, L. K., and Hill, H. R. (2021) Clinical significance of measuring serum cytokine levels as inflammatory biomarkers in adult and pediatric COVID-19 cases: A review, *Cytokine*, **142**, 155478, doi: 10.1016/j.cyto.2021.155478.
16. Buonaguro, F. M., Puzanov, I., and Ascierto, P. A. (2020) Anti-IL6R role in treatment of COVID-19-related ARDS, *J. Transl. Med.*, **18**, 165, doi: 10.1186/s12967-020-02333-9.
17. McGonagle, D., Sharif, K., O'Regan, A., and Bridgewood, C. (2020) The role of cytokines including interleukin-6 in COVID-19 induced pneumonia and macrophage activation syndrome-like disease, *Autoimmun. Rev.*, **19**, 102537, doi: 10.1016/j.autrev.2020.102537.
18. Jones, S. A., and Hunter, C. A. (2021) Is IL-6 a key cytokine target for therapy in COVID-19? *Nat. Rev. Immunol.*, **21**, 337-339.
19. Udomsinprasert, W., Jittikoon, J., Sangroongruangsri, S., and Chaikledkaew, U. (2021) Circulating levels of interleukin-6 and interleukin-10, but not tumor necrosis factor-alpha, as potential biomarkers of severity and mortality for COVID-19: Systematic review with meta-analysis, *J. Clin. Immunol.*, **41**, 11-22.
20. McElvaney, O. J., McEvoy, N. L., McElvaney, O. F., Carroll, T. P., Murphy, M. P., et al. (2020) Characterization of the inflammatory response to severe COVID-19 illness, *Am. J. Respir. Crit. Care Med.*, **202**, 812-821.
21. Dhama, K., Pateli, S. K., Pathak, M., Yatoo, M. I., Tiwari, R., et al. (2020) An update on SARS-CoV-2/COVID-19 with particular reference to its clinical pathology, pathogenesis, immunopathology and mitigation strategies, *Travel Med. Infect. Dis.*, **37**, 101755.
22. Chi, Y., Ge, Y. Y., Wu, B., Zhang, W. S., Wu, T., et al. (2020) Serum cytokine and chemokine profile in relation to the severity of coronavirus disease 2019 in China, *J. Infect. Dis.*, **222**, 746-754.
23. Bateman, A., and Bennett, H. P. J. (1998) Granulins: The structure and function of an emerging family of growth factors, *J. Endocrinol.*, **158**, 145-151.
24. Guo, Z. L., Li, Q. C., Han, Y., Liang, Y. J., Xu, Z. G., et al. (2012) Prevention of LPS-induced acute lung injury in mice by progranulin, *Mediators Inflamm.*, **2012**, 540794, doi: 10.1155/2012/540794.
25. Yin, F. F., Banerjee, R., Thomas, B., Zhou, P., Qian, L. P., et al. (2010) Exaggerated inflammation, impaired host defense, and neuropathology in progranulin-deficient mice, *J. Exp. Med.*, **207**, 117-128.
26. Rieder, M., Wirth, L., Pollmeier, L., Jeserich, M., Goller, I., et al. (2021) Serum protein profiling reveals a specific upregulation of the immunomodulatory protein progranulin in coronavirus disease 2019, *J. Infect. Dis.*, **223**, 775-784.
27. Yao, S., Luo, N., Liu, J., Zha, H., Ai, Y., et al. (2021) Elevated serum levels of progranulin and soluble vascular cell adhesion molecule-1 in patients with COVID-19, *J. Inflamm. Res.*, **14**, 4785-4794, doi: 10.2147/JIR.S330356.
28. Brandes, F., Borrmann, M., Buschmann, D., Meidert, A. S., Reithmair, M., et al. (2021) Progranulin signaling in sepsis, community-acquired bacterial pneumonia and COVID-19: A comparative, observational study, *Intens. Care Med. Exp.*, **9**, 1-22.
29. Gong, J., Dong, H., Xia, Q. S., Huang, Z. Y., Wang, D. K., et al. (2020) Correlation analysis между disease severity and inflammation-related parameters in patients with COVID-19: A retrospective study, *BMC Infect. Dis.*, **20**, 963, doi: 10.1186/s12879-020-05681-5.

HIGH SERUM PROGRANULIN LEVELS IN COVID-19 PATIENTS: A PILOT STUDY

F. B. Özgeriş[1]*, Ö. F. Koçak[2], N. Kurt[3], E. Parlak[4], N. Yüce[5], M. S. Keleş[6]

[1] *Department of Nutrition and Dietetics, Faculty of Health Sciences, Atatürk University, Erzurum, 25240 Turkey; e-mail: betul.ozgeris@atauni.edu.tr*

[2] *Department of Chemistry and Chemical Process Technologies, Erzurum Vocational College, Atatürk University, Erzurum, 25240 Turkey*

[3] *Department of Basic Medical Sciences, Faculty of Medicine, Erzincan Binali Yildirim University, Erzincan, 24002 Turkey*

[4] *Department of Infection Diseases, Faculty of Medicine, Atatürk University, Erzurum, 25240 Turkey*

[5] *Department of Medical Biochemistry, Faculty of Medicine, Atatürk University, Erzurum, 25240 Turkey*

[6] *Department of Medical Biochemistry, Faculty of Medicine, Uskudar University, İstanbul, 34662 Turkey*

In this study, we aimed to determine whether the progranulin level in serum predicts the course and severity of the disease in COVID-19 (+) patients and whether it can be used as a biomarker in these patients. Therefore, we sampled 61 people infected with COVID-19, and the cases were divided into the following groups: asymptomatic, noncomplicated, moderate, and severe. Concentrations of progranulin, TNF-α, IL-6 from in serum obtained from all participants were measured using commercially available ELISA kits, as well as WBC, PLT, NE, LY, ALT, AST, Hb, PCT, and CRP were examined with clinical analyzer. All measurements obtained for the patient samples were compared with those of 20 healthy individuals. The serum progranulin concentration was statistically higher in the COVID-19 (+) patient group than in the control group of healthy individuals [112.6 ± 54.8, 0.0 (0.0-54.2 pg/ml, respectively, $p = 0.000$)]. ROC analysis was performed to evaluate the progranulin potential as a biomarker for COVID-19 (+) patients. A larger AUC (0.931 ± 0.08) value and a more significant p-value for progranulin than for CRP ($p = 0.000$) was detected. As a result, we believe that progranulin reaches high levels in the COVID-19 disease and may be a determinant in diagnosis and prognosis, and may be a better biomarker than CRP.

Keywords: COVID-19, CRP, IL-6, progranulin

EDN: MZRWSH
БИОХИМИЯ, 2022, том 87, вып. 3, с. 387 – 399

УДК 577.2

ПРЕПАРАТИВНОЕ ПОЛУЧЕНИЕ И ОЧИСТКА РЕКОМБИНАНТНОГО ЦИКЛОФИЛИНА А ЧЕЛОВЕКА

© 2022 А.А. Калинина[1], А.В. Колесников[2], А.В. Козырь[2], Н.Л. Куликова[3], М.А. Замкова[1], Д.Б. Казанский[1], Л.М. Хромых[1]*

[1] *Федеральное государственное бюджетное учреждение «Национальный медицинский исследовательский центр онкологии имени Н.Н. Блохина» Министерства здравоохранения России, 115478 Москва, Россия; электронная почта: lkhromykh@list.ru*

[2] *Федеральное бюджетное учреждение науки «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии», 142279 п. Оболенск, Московская обл., Россия*

[3] *Открытое акционерное общество «Институт инженерной иммунологии», 142380 п. Любучаны, Московская обл., Россия*

Поступила в редакцию 26.01.2022
После доработки 15.02.2022
Принята к публикации 15.02.2022

Данное исследование посвящено разработке метода получения препаративного количества рекомбинантного циклофилина А человека (рчЦфА) из *Escherichia coli*. С тотальной мРНК Т-клеточной лимфомы человека Jurkat методом ПЦР с обратной транскрипцией амплифицировали полноразмерную кДНК, кодирующую ген ЦфА человека (*CYPA*). Далее провели оптимизацию нуклеотидной последовательности гена *CYPA* для обеспечения его высокоэффективной трансляции в *E. coli*. Рекомбинантную ДНК *CYPA* клонировали в вектор pET22b(+) и полученную экспрессионную плазмиду использовали для трансформации бактерий *E. coli* штамма BL21(DE3)Gold. Рекомбинантный клон-продуцент *E. coli* обеспечивал синтез рчЦфА в растворимом состоянии в цитоплазме бактерий. Эффективность синтеза рчЦфА составляла до 50% суммарного белка клетки, что позволяло получать рчЦфА в количестве до 1 г с литра культуры. Был отработан метод очистки рчЦфА, состоящий из одноэтапной тандемной анионообменной хроматографии на колонках DEAE- и Q-Sepharose. Чистота полученного белка составляла 95% по данным электрофореза (SDS-PAGE), а его контаминация эндотоксином не превышала 0,05 нг на 1 мг белка, что соответствует требованиям Европейской фармакопеи к инъекционным препаратам. Полученный рекомбинантный белок сохранял функциональные свойства нативного ЦфА, такие как изомеразная активность и хемокиновая активность, выявленная по усилению миграции стволовых кроветворных клеток костного мозга мыши *in vivo*. Полученный штамм *E. coli* является суперпродуцентом и может быть использован при проведении масштабных лабораторных исследований рчЦфА, а также для доклинических и клинических испытаний данного белка как лекарственного средства.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: циклофилин А, оптимизация гена, штамм-продуцент, изомеразная активность, хемокиновая активность.

DOI: 10.31857/S032097252203006X

ВВЕДЕНИЕ

В настоящее время большой спектр рекомбинантных белков, полученных с использованием *Escherichia coli* (*E. coli*) в качестве штамма-продуцента, имеет широкое применение в исследовательской и медицинской практике, и такие белки часто служат лекарственными средствами при различных патологиях. При проведении масштабных лабораторных исследований, доклинических и клинических испытаний исследователи часто сталкиваются с проблемой наработки препаративного количества целевого белка и, как следствие, поиска методических подходов, обеспечивающих высокий уровень его очистки при минимальном содержании бактериального липополисахарида (ЛПС, эндотоксин) в качестве примеси. Для этой цели проводят разработку препаративного или промышленного способа получения, отвечающего требованиям, обеспечивающим необходимое количество и качество целевого белка. Данная работа посвящена разработке метода масштабного получения и очистки рекомбинантного циклофилина А человека (рчЦфА) для его дальнейшего использования в доклинических и клинических испытаниях.

Циклофилин А (ЦфА, 18 кДа) является цис-транс-изомеразой, существует во внутриклеточ-

Принятые сокращения: чЦфА – циклофилин А человека; рчЦфА – рекомбинантный циклофилин А человека; *CYPA* – ген ЦфА; ЛПС – липополисахарид; ЦсА – циклоспорин А; ИПТГ – изопропил-β-d-1-тиогалактопиранозид; PMSF – фенилметилсульфонил фторид.

* Адресат для корреспонденции.

ной и секреторной формах [1] и обладает широким диапазоном различных функций. Внутриклеточный ЦфА участвует в фолдинге, транспорте и сборке белков [2], регуляции клеточной пролиферации [2], является лигандом для циклоспорина А (ЦсА), обусловливающим его иммуносупрессивное действие [3], обеспечивает передачу сигнала от Т-клеточного рецептора [4] и участвует в контроле баланса между Т-хелперами первого и второго типов, подавляя активность Т-хелперов типа 2 [4]. Секреторный ЦфА является провоспалительным фактором, обладает хемоаттрактивными свойствами, привлекая макрофаги [5], гранулоциты и активированные Т-лимфоциты [6] и формируя очаг воспаления. ЦфА, с одной стороны, участвует в иммунной защите организма [5], включая противораковую защиту [7, 8], а с другой стороны, является фактором патогенеза таких заболеваний, как ревматоидный артрит, диабет, онкологические заболевания и др. [1].

Многогранные свойства ЦфА лежат в основе возможности разработки различных лекарственных средств на его основе для дальнейшего клинического использования. В норме секреторный ЦфА присутствует в крови, молоке и тканевых жидкостях человека [9, 10] и является хемоаттрактантом для костномозговых предшественников различных ростков иммуногенеза и кроветворения (незрелых дендритных клеток, Т- и В-лимфоцитов, моноцитов и гранулоцитов) [11], участвуя в регенеративных процессах. ЦфА способствует привлечению стволовых клеток в очаг ишемии и может рассматриваться в качестве терапевтического средства при ишемии конечностей [12]. Способность ЦфА связываться с ЦсА предполагает его клиническое использование для устранения побочных эффектов, вызванных действием данного иммуносупрессанта. Нефротоксичность – один из самых серьезных побочных эффектов применения ЦсА. Было показано, что гиперэкспрессия ЦфА защищает от ЦсА-индуцированной нефротоксичности *in vivo* [3]. ЦфА может применяться при трансплантации аллогенных миобластов для предотвращения их апоптоза и блокировки дифференцировки, вызванной ЦсА [13]. Последний снижает минеральную плотность костей и способствует развитию остеопороза. ЦфА стимулирует дифференцировку остеобластов и подавляет активность остеокластов, что приводит к анаболическому эффекту, поэтому этот белок может найти перспективное применение как при нейтрализации эффектов ЦсА, так и при разработке новых лекарственных препаратов для лечения остеопороза [14]. Гиперэкспрессия ЦфА ингибирует репликацию вируса гриппа [15], что также потенциально может быть использовано в борьбе с данной инфекцией.

Кроме того, ЦфА является одним из основных факторов патогенности при аутоиммунных заболеваниях (ревматоидный артрит), диабете и др., для лечения которых данный белок может выступать в качестве мишени.

Выявленное многообразие свойств ЦфА показывает, что данный белок требует самого пристального изучения в процессах, имеющих место как в норме, так и при патологиях, и в перспективе может найти применение в клинической практике либо в качестве лекарственного средства, либо в качестве мишени воздействия. Тем не менее для всестороннего изучения биологических свойств данного белка, для проведения масштабных лабораторных исследований *in vivo*, производства лекарственной субстанции для доклинических и клинических испытаний или иммунизации животных для получения антител к ЦфА требуются значительные количества (граммы) высокоочищенного апирогенного белка.

Решению этой проблемы посвящена данная работа, в результате которой получен рекомбинантный штамм *E. coli*, являющийся высокоэффективным продуцентом рчЦфА. Разработана уникальная система очистки, позволяющая получить качественные характеристики рчЦфА на уровне европейских стандартов [16, 17]. Предлагаемый способ наработки рчЦфА обеспечивает сохранение функциональных свойств, характерных для природного ЦфА, – изомеразную активность и хемоаттрактивное действие, направленное на усиление миграции клеток костного мозга, а также гранулоцитов и активированных Т-лимфоцитов.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Конструирование оптимизированной последовательности гена *CYPA*. Для обеспечения высокоэффективной трансляции чЦфА в *E. coli* провели оптимизацию последовательности гена *CYPA*, кодирующей данный белок. На основе имеющихся баз данных по анализу вторичных структур мРНК и других особенностей последовательностей, модулирующих прокариотическую трансляцию (программный пакет GeneBee («RNA secondary structure prediction» http://www.genebee.msu.ru/services/rna2_reduced.html)) [18–20], в нативной последовательности гена *CYPA* были выявлены факторы, лимитирующие эффективность трансляции в *E. coli:* редкие, повторяющиеся и субоптимальные кодоны; большое число AG-богатых участков и вторич-

ные сайты инициации трансляции. Удаление этих участков ДНК проводили вручную путём подбора и замены на наиболее часто использующиеся в *E. coli* кодоны.

Выделение тотальной РНК и синтез кДНК клеток Jurkat. Клетки линии Jurkat (TIB-152, ATCC, США), представляющей собой Т-клеточную лимфому человека, поддерживали в культуре *in vitro*. Клетки помещали в TRI Reagent («MRC», США) и выделяли тотальную РНК согласно протоколу производителя. Перед синтезом кДНК проводили обработку выделенной РНК ферментом ДНКаза I («Invitrogen», США) для предотвращения контаминации образцов геномной ДНК. Затем проводили синтез кДНК с помощью коммерческого набора RevertAid First Strand cDNA Synthesis Kit («Thermo Fisher Scientific», США) согласно протоколу производителя. Полученную кДНК клеток Jurkat использовали в качестве матрицы при синтезе оптимизированного гена *CYPA* методом ПЦР.

Синтез оптимизированного гена *CYPA*. Оптимизированную последовательность гена *CYPA* синтезировали при помощи серии ПЦР с использованием набора перекрывающихся праймеров, расположенных в порядке от центральной части гена *CYPA* к его 5′- и 3′-концам (таблица). Набор олигонуклеотидов для синтеза конструировали при помощи программных пакетов «Oligo», «Vector NTI» и «GeneBee». Температуру ренатурации комплементарных участков олигонуклеотидов подбирали в диапазоне 58–60 °C для достижения оптимальной эффективности ПЦР-амплификации. В состав концевого прямого праймера (CPF5Nde) и концевого обратного праймера (CPR5Xho) (таблица) были введены сайты рестрикции NdeI и XhoI соответственно для обеспечения встраивания конструкта в векторные системы семейства pET [21]. ПЦР проводили с использованием смеси Taq- и Pfu-полимераз («Promega», США). Подбор оптимальных условий амплификации осуществляли при помощи градиентной функции амплификатора Mastercycler Nexus Gradient («Eppendorf», США). Используя кДНК клеток Jurkat, проводили первую амплификацию с праймерами CPF1 и CPR1 (таблица). Для этого ПЦР ставили параллельно при температурах отжига 57–64 °C, после чего аликвоты реакционной смеси наносили на агарозный или акриламидный гель (фрагменты длиной до 250 п.н.) и анализировали электрофоретически. Наиболее чистые продукты реакции нужной длины отбирали для дальнейшей стадии синтеза гена. ДНК частично экстрагировали из геля при нагревании до 55 °C в течение 30 мин в присутствии 1М ацетата калия. Полученный продукт первой амплификации использовали во втором раунде ПЦР с праймерами CPF2 и CPR2 (таблица). Аналогичным образом, последовательно используя пары перекрывающихся праймеров и продукт предшествующей ПЦР в качестве матрицы, амплифицировали полную последовательность гена *CYPA*. Корректность синтеза последовательности рекомбинантной ДНК *CYPA* верифицировали методом капиллярного секвенирования (ЗАО «Евроген», Россия).

Получение штамма *E. coli* BL21(DE3)Gold/pETCYPopti. По завершении синтеза рекомбинантный ген *CYPA (rCYPA)* очищали с использованием набора для очистки ПЦР-продуктов (PCR Purification Kit, «Qiagen», Германия), обрабатывали эндонуклеазами NdeI и XhoI («Thermo Fisher Scientific») и лигировали с вектором pET22b(+) («Novagen», США), предварительно линеаризованным этими же ферментами (рис. 1). Полученным лигатом pETCYPopti трансформировали электрокомпетентные клетки *E. coli* штамма BL21(DE3)Gold («Agilent», США), подготовленные в соответствии с протоколом производителя. Для электротрансформации использовали прибор BTX ECM 600 («Artisan Technology Group», США) в режиме 129 Ом, 2,5 кВ. Трансформанты высевали на агаризованную (1% агара) среду 2xYT («Difco», США), содержащую 50 мкг/мл ампициллина и 2% глюкозы, и выращивали в течение 18 ч при 37 °C. Выросшие колонии анализировали при помощи ПЦР с использованием праймеров CPF3 и CPR3 (таблица) на наличие фрагмента гена *rCYPA*. Бактериальные колонии, содержавшие нужный ген, выращивали в течение ночи в жидкой среде 2XYT. Плазмидную ДНК pETCYPopti выделяли при помощи коммерческого набора QIAfilter Plasmid MidiKit («Qiagen», США) согласно протоколу производителя. Выделенную плазмидную ДНК секвенировали (ЗАО «Евроген») для анализа точности встраивания фрагмента ДНК, кодирующего рчЦфА. Трансформанты, содержащие корректно собранные варианты вставки, использовали для дальнейшей работы.

Наработка аналитического количества рчЦфА. Для продукции рчЦфА в аналитическом количестве (до 4 л) единичную колонию трансформанта *E. coli* BL21(DE3)Gold/pETCYPopti помещали в 10 мл среды 2xYT, содержащей 2% глюкозы и 50 мкг/мл ампициллина, и выращивали 18 ч при 37 °C. По истечении времени инкубации 10 мл культуры переносили в 1 л среды 2xYT, содержащей 0,1% глюкозы и 50 мкг/мл ампициллина, разносили среду на 4 колбы (по 250 мл) и выращивали на термостатируемом

Последовательности олигонуклеотидов, использованные для синтеза оптимизированного гена *CYPA*

Название	Последовательность (5′→3′)
Прямой праймер 1 (CPF1)	TCATTCCGGGCTTCATGTGTCAGGGCGGTGACTTCACCCGCCACAATGGCACCGGTGGCAAGAGCATCTACGGTGAGAAGTTCGAAGAT
Обратный праймер 1 (CPR1)	CCATTGGTGTTCGGACCCGCGTTCGCCATGCTCAGGATGCCCGGACCGGTATGCTTCAGGATGAAGTTCTCATCTTCGAACTTCTCACC
Прямой праймер 2 (CPF2)	TGAGCACCGGTGAGAAAGGCTTTGGTTACAAGGGCAGCTGCTTTCACCGCATCATTCCGGGCTTCATGT
Обратный праймер 2 (CPR2)	TGCTTGCCATCCAGCCACTCGGTCTTCGCGGTGCAGATGAAAAACTGGCTACCATTGGTGTTCGGACCC
Прямой праймер 3 (CPF3)	GAGCTGTTCGCGGACAAGGTGCCGAAGACCGCCGAGAACTTTCGTGCCCTGAGCACCGGTGAGAAAG
Обратный праймер 3 (CPR3)	CATGGCCTCCACAATGTTCATGCCTTCCTTCACTTTGCCAAACACGACATGCTTGCCATCCAGCCAC
Прямой праймер 4 (CPF4)	GTTCTTTGATATCGCGGTGGACGGCGAGCCGCTGGGCCGTGTCAGCTTTGAGCTGTTCGCGGACAAG
Обратный праймер 4 (CPR4)	CAATGGTGATTTTCTTGCTGGTCTTGCCATTGCGGCTGCCAAAGCGCTCCATGGCCTCCACAATGTTC
Прямой праймер 5 (CPF5Nde)	TTTCTCTATATT**CATATG**GTCAACCCGACCGTGTTCTTTGATATCGCGGT
Обратный праймер 5 (CPR5Xho)	CGTTATT**CTCGAG**TTACAGCTGGCCACAGTCCGCAATGGTGATTTTCTTGC

Примечание. Сайты рестрикции NdeI и XhoI выделены полужирным начертанием.

шейкере при 37 °C с перемешиванием при 220 об./мин до оптической плотности (OD_{600}) 1,5 ОЕ. Выросшую культуру охлаждали до 28 °C, добавляли изопропил-β-d-1-тиогалактопиранозид (ИПТГ) («Thermo Fisher Scientific») до концентрации 0,5 мМ и продуцировали белок в течение 4 ч. Биомассу продуцента собирали центрифугированием (Centritech VP Pilot, «BioTechno Group», Россия) при 5000 об./мин в течение 10 мин и хранили в виде замороженных осадков при температуре –80 °C при добавлении 15% глицерина в качестве криопротектора.

Наработка препаративного количества рчЦфА. Получение биомассы продуцента *E. coli* BL21(DE3)Gold/pETCYPopti проводили методом ферментации в 50-литровом биореакторе («Infors», Швейцария) с электромагнитным импеллером и контроллером, обеспечивающим мониторинг уровня растворенного кислорода, значения pH, содержания определённых ионов, концентрации глюкозы и уровня пенообразования. Объём единичной ферментации составлял 30 л. Ферментацию проводили в среде 2xYT, содержащей 1% глюкозы, 50 мМ K_2HPO_4 и 0,5 мМ $MgCl_2$. Инокулят в количестве 2 л готовили в 5-литровом ферментёре LabFors («Infors») в среде 2xYT, содержащей 5% глицерина, 5% глюкозы, 80 мМ K_2HPO_4 и 3 мМ $MgCl_2$. Начальная концентрация ампициллина составляла 100 мкг/мл. Инокулят выращивали с использованием 100 мл первичной культуры, приготовленной в среде SOB («Difco») с добавлением 5% глюкозы. Первичную культуру готовили на основе единичной колонии продуцента, наращивая биомассу в течение 7 ч при концентрации ампициллина 100 мкг/мл. Значение pH среды при инокуляции составляло 7,6. В дальнейшем уровень pH поддерживали в диапазоне 7,0–7,2 титрованием 1 М раствором NaOH. Температура роста первичной культуры и инокулята составляла 37 °C. Инокулят вводили в предварительно разогретую до 37 °C культуральную среду в основном ферментёре и растили культуру в течение 8 ч при значениях pH в диапазоне от 7,0 до 7,2 и содержании растворенного кислорода 28–30%. При достижении оптической плотности культуры (OD_{600}) 1,5–2 ОЕ температуру в ферментере снижали до 28 °C и добавляли ИПТГ до конечной концентрации 0,5 мМ. После индукции экспрессии белка контролировали параметры культуры и при истощении добавляли смесь, содержащую 800 г/л глюкозы и 2 г/л

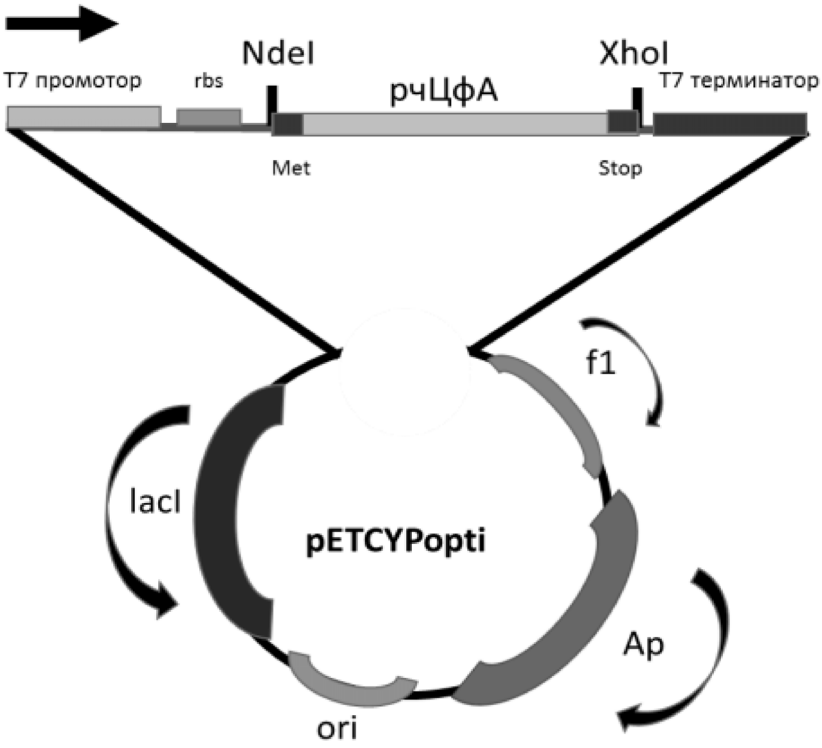


Рис. 1. Структура рекомбинантной плазмиды pETCYPopti. Рекомбинантная плазмида pETCYPopti имеет размер 5858 п.н. и содержит фрагмент XhoI-NdeI вектора pET22b(+), несущий ген устойчивости к ампициллину ampR, промотор и терминатор РНК-полимеразы фага T7 и полилинкер, в котором по сайтам XhoI и NdeI клонирован ген *CYPA* размером 498 п.н.

ампициллина. Через 1 ч после индукции инициировали систему пеногашения. Продукцию белка проводили в течение 12 ч. Далее отделяли биомассу с использованием проточной центрифуги, как описано выше, и хранили при –80 °С с добавлением 15% глицерина.

Выделение рчЦфА. Для выделения рчЦфА 100 г бактериальной биомассы суспендировали в 300 мл буфера, содержащего 20 мМ Tris-HCl (pH 8), 100 мМ NaCl и дополненного ингибитором сериновых протеаз PMSF (в конечной концентрации 1 мМ) («Thermo Fisher Scientific»), и обрабатывали лизоцимом (20 мкг/мл) («PanReac Applichem», Испания) при 4 °С в течение 30 мин. Лизис клеток проводили добавлением детергента Triton X-100 («Sigma-Aldrich», США) до концентрации 0,5%. К лизату добавляли $MgCl_2$ до концентрации 1 мМ и разрушали геномную ДНК *E. coli* ДНКазой (10 мкг/мл, «Sigma-Aldrich») в течение 15 мин при 20 °С, затем добавляли ЭДТА до концентрации 5 мМ. Полученный лизат центрифугировали (Centritech VP Pilot, «BioTechno Group», Россия) в течение 20 мин при 18 000 *g* и супернатант, содержащий целевой белок, порционно высаливали сульфатом аммония из расчета половина объема насыщенного раствора сульфата аммония на один объем лизата. Осажденный лизат (25% сульфата аммония) инкубировали при 4 °С в течение 1 ч для формирования осадка. Осадок удаляли центрифугированием в течение 15 мин при 18 000 *g*. Для осаждения целевого белка из супернатанта использовали насыщенный сульфат аммония из расчета 3 объема раствора сульфата аммония на 1 объем супернатанта, смесь инкубировали при 4 °С в течение ночи. Образовавшийся осадок собирали центрифугированием в течение 60 мин при 18 000 *g* и растворяли в буфере, содержащем 30 мМ Na_3PO_4 (pH 8). Полученный раствор центрифугировали в течение 30 мин при 18 000 *g* для удаления нерастворенных частиц и примесей и диализовали трижды по 4 ч при 4 °С против раствора 30 мМ Na_3PO_4 в соотношении 1 : 10. После диализа раствор целевого белка центрифугировали в течение 30 мин при 18 000 *g* для удаления частиц и агрегатов.

Очистка рчЦфА. Одноэтапную очистку рчЦфА проводили методом тандемной анионообменной хроматографии на колонках DEAE-сефароза и Q-сефароза («GE Healthcare», США). В препаративном варианте использова-

ли колонку HiScale 50/40 («GE Healthcare»), упакованную 300 мл DEAE-сефарозы, и HiScale 50/20 («GE Healthcare»), упакованную 200 мл Q-сефарозы. Перед нанесением белка колонки уравновешивали буфером, содержащим 30 мМ Na_3PO_4 (pH 8). Нанесение белка вели при скорости потока 5 мл/мин и собирали фракцию после прохождения обеих колонок. Собранный раствор рчЦфА стерилизовали фильтрацией через стерильный фильтр с диаметром пор 0,22 мкм («Millipore», «Merck», США), обладающий низкой сорбцией белка, и хранили при 4 °C.

Электрофорез в полиакриламидном геле (SDS-PAGE). Для выявления наиболее эффективного штамма-продуцента рчЦфА уровень продукции рчЦфА определяли с помощью SDS-PAGE в денатурирующих условиях в 12% полиакриламидном геле по методу Лэммли [22]. Аликвоты жидкой культуры продуцента центрифугировали (Centritech VP Pilot) при 5000 об./мин в течение 5 мин; осажденные клетки растворяли в 100 мкл лизирующего буфера с добавлением красителя бромфенолового синего («VWR Life Science AMRESCO», Австрия), обрабатывали 20 с ультразвуком, нагревали 3 мин при 100 °C и наносили на гель. После проведения электрофореза гель окрашивали Кумасси R-250 («Thermo Fisher Scientific») по стандартной методике и сканировали с помощью денситометра Shimadzu CS-930 («DMS», Франция). В качестве калибровочных значений использовали данные денситограмм очищенного рчЦфА, концентрация которого была предварительно определена по методу Бредфорда [23]. При определении стабильности рчЦфА в качестве маркера дополнительно использовали бычий сывороточный альбумин (БСА, «Amresco», Англия) и маркер молекулярной массы белков («Thermo Fisher Scientific», кат. № 26619).

Определение содержания эндотоксина. Оценку содержания бактериальных эндотоксинов в очищенных образцах рчЦфА проводили с помощью ЛАЛ-теста, используя количественный гель-тромб тест, основанный на способности лизата амебоцитов мечехвоста *Limulus polyphemus* специфически реагировать с эндотоксинами грамотрицательных бактерий (ЛПС). Анализы проводили на базе ООО «НПО «ЛАЛ-центр» (Москва, Россия) в соответствии с инструкцией производителя («Charles River Endosafe», США).

Определение пептидил-пролил цис-транс-изомеразной активности рчЦфА. Изомеразную активность рчЦфА измеряли в сравнительном анализе с химотрипсином. В качестве субстрата использовали *N*-сукцинил-Ala-Ala-Pro-Phe-*p*-нитроанилид (20 М, «Sigma-Aldrich») в 100 мМ натрий-фосфатном буфере (pH 7,8) [24]. Для постановки теста к 1 мл очищенного рчЦфА (100 нМ) в 50 мМ буфере Tris-HCL, pH 7,8 (рабочий буфер), добавляли субстрат химотрипсина до конечной концентрации 0,1 мМ. Субстрат предварительно растворяли в диметилсульфоксиде (сток 2 мг/мл) («Sigma-Aldrich»). Реакцию проводили при 10 °C. Смесь инкубировали 15 мин, затем добавляли 2 мкл химотрипсина (сток 2 мг/мл) («Sigma-Aldrich»), растворенного в рабочем буфере, и перемешивали. Интенсивность окраски измеряли на спектрофотометре UV300 («Amersham», Великобритания) при длине волны 390 нм. Измерения вели с периодичностью в 2 с в течение 200 с. В качестве отрицательного контроля использовали рабочий буфер. Блокирующее влияние ЦсА («Sigma-Aldrich») на изомеразную активность рчЦфА оценивали, добавляя к исходной реакционной смеси 10 мкл раствора ЦсА (сток 10 мкМ в этаноле) до конечной концентрации 100 нМ.

Животные. Самок мышей C57BL/6 (14–16 недель) получали из экспериментально-биологической лаборатории НИИ экспериментальной диагностики и терапии опухолей Федерального государственного бюджетного учреждения «Национальный медицинский исследовательский центр онкологии имени Н.Н. Блохина» (ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина») Минздрава России. Экспериментальные группы состояли из 10 животных. Мышей содержали при 12-часовом световом цикле при температуре 20–24 °C и 40% относительной влажности. Работу с животными проводили в соответствии с протоколом этической комиссии ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России.

Облучение мышей в сублетальной дозе 4,5 Гр осуществляли на гамма-терапевтической установке Co-60 «Агат-Р» (Россия) с начальной мощностью $1{,}9 \times 10^{14}$ Бк.

Оценка биологической активности рчЦфА *in vivo*. Оценку хемоаттрактивной активности рчЦфА по отношению к стволовым кроветворным клеткам костного мозга проводили посредством определения числа селезеночных эндоколоний после сублетального облучения мышей по методу Till & McCullough [25]. Через 24 ч после облучения опытным мышам в хвостовую вену вводили очищенный рчЦфА в дозе 100 мкг/мышь. Одной группе контрольных животных вводили адекватный объем натрий-фосфатного буфера, в котором был растворен рчЦфА. Второй группе контрольных животных вводили раствор липополисахарида (ЛПС, «Sigma-Aldrich») в том же буфере в концентрации, адекватной количеству ЛПС, содержащему-

ся в растворе 100 мкг рчЦфА (4 пг/мышь). Через семь дней после введения рчЦфА мышей умерщвляли методом цервикальной дислокации, селезенки извлекали и помещали в фиксирующую жидкость, состоящую из ледяной уксусной кислоты и абсолютного спирта в соотношении 1 : 3. Через 4 ч проводили визуальный подсчет эндогенных колоний в каждой селезенке.

Статистический анализ. Данные представлены как среднее ± стандартная ошибка среднего (M ± SEM). Статистический анализ проводили с использованием программного обеспечения Statistica for Windows 6.0 («StatSoft», США). Для сравнения внутри группы использовали парный выборочный *t*-критерий Стьюдента, а для межгруппового сравнения – независимый *t*-критерий Стьюдента. Различия признавали значимыми при $p \le 0{,}05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

Оптимизация последовательности гена *CYPA* и создание штамма-продуцента рчЦфА. Ранее при создании штамма-продуцента *E. coli* для получения рчЦфА использовали оригинальную последовательность гена *CYPA*, которая содержит спектр кодонов, характерных для транскрипции генов в организме человека [26]. Этот спектр существенно отличается от спектра кодонов, используемых для продукции активно экспрессирующихся белков в *E. coli*. В результате тРНК, содержащая редкие для *E. coli* антикодоны, титровалась высоким уровнем транскрипции гетерологичного белка, затрудняя работу аппарата трансляции, продукцию целевого белка и общий рост клеточной массы.

Современные методы повышения продукции рекомбинантных белков основываются не только на подборе адекватной системы транскрипции-трансляции и условий культивирования, но и на адаптации последовательности ДНК, кодирующей целевой белок, – «кодонной оптимизации» [27, 28] для продукции в конкретном организме-хозяине [29]. Для этого в данной работе был проведен дизайн последовательности гена *CYPA*, который включал в себя замены некоторых кодонов нативного гена на кодоны, наиболее часто встречающиеся в генах белков с высоким уровнем продукции у *E. coli*. При этом учитывали перспективы стабильности конечной мРНК, отсутствие препятствий трансляции в виде чрезмерной структурированности мРНК, отсутствие гомополимерных участков [18, 19] и особенности проведения высокоэффективной терминации трансляции, поскольку рибосомы могут «проскакивать» «слабые» терминирующие кодоны (TGA), особенно если они представлены в единственном числе.

Анализ последовательности нативного гена *CYPA* выявил достаточно многочисленные элементы, негативно влияющие на эффективность транскрипции и трансляции гена чЦфА в *E. coli*. В последовательности *CYPA* обнаружено несколько кодонов, тРНК для которых весьма слабо представлены в *E. coli* (рис. 2, *а*, выделены серым), и «субоптимальных» кодонов, для которых частота встречаемости тРНК относительно невысока (рис. 2, *а*, подчеркнуты). Кроме того, выявлено несколько пар повторяющихся друг за другом кодонов (рис. 2, *а*, выделены курсивом и подчеркнуты), что также может вызывать паузы в трансляции. В нативной последовательности гена *CYPA* был обнаружен участок «упрощённой структуры» ДНК (GAGAGA, рис. 2, *б*), который мог стать фактором нестабильности РНК и в котором возможно присутствие сайтов внутреннего связывания с рибосомой [18], потенциально обусловливающих трансляционные паузы [19, 20]. Кроме того, нативная последовательность гена *CYPA* содержала относительно большое число AG-богатых участков, которые могли распознаваться рибосомами и вызывать паузы в трансляции (рис. 2, *б*).

Анализ вторичной структуры исходной последовательности показал её значительную нестабильность: в наиболее энергетически выгодной конформации присутствует протяжённая петля, не содержащая комплементарных пар оснований (рис. 2, *г*). Присутствие данной петли могло способствовать ускоренной деградации мРНК и снижению уровня трансляции.

При дизайне из последовательности гена *CYPA* удалили гомополимерные и AG-богатые участки (рис. 2, *б*), а также провели замену редко встречающихся и повторяющихся кодонов (рис. 2, *а*). Кроме того, были удалены участки, потенциально способные к вторичной инициации трансляции (рис. 2, *в*), и создан новый сайт терминации трансляции, состоящий из двух последовательных кодонов TAA, являющихся наиболее «сильными». Также были удалены сайты для узнавания гексануклеотидными эндонуклеазами рестрикции для облегчения переноса синтетического гена в различные экспрессионные системы. В результате анализа и оптимизации была создана рекомбинантная последовательность гена *CYPA* (*rCYPA*), оптимизированная для транскрипции и трансляции в *E. coli* (рис. 2, *д*). Анализ вторичной структуры *rCYPA* показал, что оптимизированная ДНК этого гена лишена указанных выше недостатков (рис. 2, *г*).

Сравнение природной и оптимизированной последовательностей гена *CYPA* показало, что

а

ATG GTC AAC CCC ACC GTG *TTC TTC* GAC ATT GCC GTC GAC GGC GAG
CCC TTG GGC CGC GTC TCC TTT GAG CTG TTT GCA GAC AAG GTC CCA
AAG ACA GCA GAA AAT TTT CGT GCT CTG AGC ACT GGA GAG AAA GGA
TTT GGT TAT AAG GGT TCC TGC TTT CAC AGA *ATT ATT* CCA GGG TTT
ATG TGT CAG *GGT GGT* GAC TTC ACA CGC CAT AAT GGC ACT GGT GGC
AAG TCC ATC TAT GGG GAG AAA TTT GAA GAT GAG AAC TTC ATC CTA
AAG CAT ACG GGT CCT GGC ATC TTA TCG ATG GCA AAT GCT GGA CCC
AAC ACA AAT GGT TCC CAG TTT TTC ATC TGC ACT GCC AAG ACT GAG
TGG TTG GAT GGC AAG CAT *GTG GTG* TTT GGC AAA GTG AAA GAA GGC
ATG AAT ATT GTG GAG GCC ATG GAG CGC TTT GGG TCC AGG AAT GGC
AAG ACC AGC *AAG AAG* ATC ACC ATT GCT GAC TGT GGA CAA CTC TGA

б

ATGGTCAACCCCACCGTGTTCTTCGACATTGCCGTCGACGGCGAGCCCTTG
GGCCGCGTCTCCTTTGAGCTGTTTGCAGACAAGGTCCCAAAGACAGCAGA
AAATTTTCGTGCTCTGAGCACTGGAGAGAAAGGATTTGGTTATAAGGGTTC
CTGCTTTCACAGAATTATTCCAGGGTTTATGTGTCAGGGTGGTGACTTCAC
ACGCCATAATGGCACTGGTGGCAAGTCCATCTATGGGGAGAAATTTGAAG
ATGAGAACTTCATCCTAAAGCATACGGGTCCTGGCATCTTATCGATGGCAA
ATGCTGGACCCAACACAAATGGTTCCCAGTTTTTCATCTGCACTGCCAAGA
CTGAGTGGTTGGATGGCAAGCATGTGGTGTTTGGCAAAGTGAAAGAAGGC
ATGAATATTGTGGAGGCCATGGAGCGCTTTGGGTCCAGGAATGGCAAGAC
CAGCAAGAAGATCACCATTGCTGACTGTGGACAACTCTGA

в

ATGGTCAACCCCACCGTGTTCTTCGACATTGCCGTCGACGGCGAGCCCTTG
GGCCGCGTCTCCTTTGAGCTGTTTGCAGACAAGGTCCCAAAGACAGCAGA
AAATTTTCGTGCTCTGAGCACTGGAGAGAAAGGATTTGGTTATAAGGGTTC
CTGCTTTCACAGAATTATTCCAGGGTTTATGTGTCAGGGTGGTGACTTCAC
ACGCCATAATGGCACTGGTGGCAAGTCCATCTATGGGGAGAAATTTGAAG
ATGAGAACTTCATCCTAAAGCATACGGGTCCTGGCATCTTATCGATGGCAA
ATGCTGGACCCAACACAAATGGTTCCCAGTTTTTCATCTGCACTGCCAAGA
CTGAGTGGTTGGATGGCAAGCATGTGGTGTTTGGCAAAGTGAAAGAAGGC
ATGAATATTGTGGAGGCCATGGAGCGCTTTGGGTCCAGGAATGGCAAGAC
CAGCAAGAAGATCACCATTGCTGACTGTGGACAACTCTGA

д

ATG GTC AAC CCG ACC GTG TTC TTT GAT ATC GCG GTG GAC GGC GAG
CCG CTG GGC CGT GTC AGC TTT GAG CTG TTC GCG GAC AAG GTG CCG
AAG ACC GCC GAG AAC TTT CGT GCC CTG AGC ACC GGT GAG AAA GGC
TTT GGT TAC AAG GGC AGC TGC TTT CAC CGC ATC ATT CCG GGC TTC
ATG TGT CAG GGC GGT GAC TTC ACC CGC CAC AAT GGC ACC GGT GGC
AAG AGC ATC TAC GGT GAG AAG TTC GAA GAT GAG AAC TTC ATC CTG
AAG CAT ACC GGT CCG GGC ATC CTG AGC ATG GCG AAC GCG GGT CCG
AAC ACC AAT GGT AGC CAG TTT TTC ATC TGC ACC GCG AAG ACC GAG
TGG CTG GAT GGC AAG CAT GTC GTG TTT GGC AAA GTG AAG GAA GGC
ATG AAC ATT GTG GAG GCC ATG GAG CGC TTT GGC AGC CGC AAT GGC
AAG ACC AGC AAG AAA ATC ACC ATT GCG GAC TGT GGC CAG CTG

г

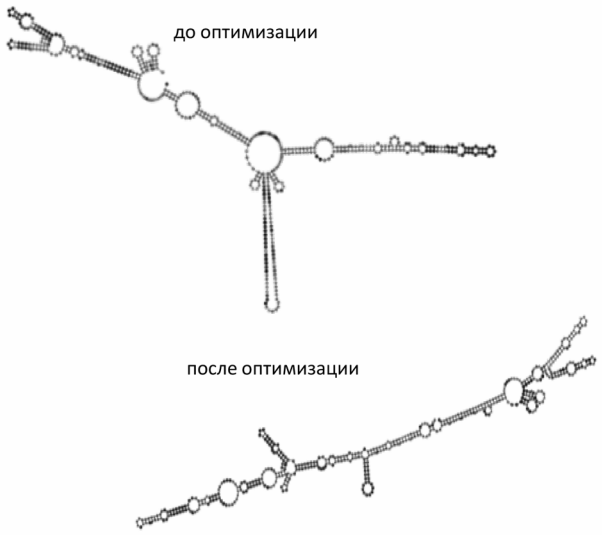


Рис. 2. Особенности нативной последовательности гена *CYPA*, ограничивающие эффективность продукции чЦфА в *E. coli*. *а* – Нативная последовательность гена *CYPA* с указанием факторов, лимитирующих эффективность трансляции: редкие кодоны выделены серым, повторяющиеся – курсивом и подчеркнуты, субоптимальные – подчеркнуты. *б* – Гомополимерные и AG-богатые участки в составе нативной последовательности (выделены серым). *в* – Участки, потенциально способные к вторичной инициации трансляции (выделены серым). *г* – Вторичная структура РНК гена *CYPA* до (сверху) и после (снизу) оптимизации. *д* – Оптимизированная последовательность гена *CYPA*

степень их идентичности составила ~ 80%. Разработанную последовательность ДНК *CYPA* синтезировали при помощи серии ПЦР с перекрывающимися праймерами (таблица). В последнюю пару праймеров были введены сайты эндонуклеаз рестрикции NdeI и XhoI (CPF5Nde и CPR5Xho, таблица) для последующего клонирования полноразмерной ДНК оптимизированного гена *CYPA* в плазмидный вектор pET22b(+) («Novagen», США). В результате была получена экспрессионная плазмида pETCYPopti размером 5858 п.н., которая содержала клонированный ген *CYPA* размером 498 п.н. (рис. 1). Этой плазмидой трансформировали штамм *E. coli* BL21(DE3)Gold, в результате чего был получен штамм-продуцент рчЦфА *E. coli* BL21(DE3)Gold/pETCYPopti [17].

Оценка продуктивности штамма-продуцента рчЦфА. На первом этапе проводили подбор оптимальных условий для максимальной продукции рчЦфА штаммом-продуцентом. Для этой цели была использована стандартная методика анализа зависимости продукции белка от уровня индуктора и температуры, при которой проводится индукция [30]. Продукцию рчЦфА индуцировали добавлением ИПТГ в конечной концентрации от 50 до 1000 мкМ при температурах 22, 25, 28, 30, 32 и 37 °С. Результаты сравнительного анализа показали, что добавление ИПТГ в конечной концентрации более 250 мкМ не увеличивало продукцию рчЦфА (данные не представлены). При температуре 25 °С удельный выход растворимого белка был максимальным в пересчёте на грамм биомассы,

однако при 28 °С общий выход биомассы был существенно выше, что приводило к накоплению большего количества растворимого белка в пересчёте на литр культуральной среды, чем при 25 °С (данные не представлены). Таким образом, была сформирована программа роста клеток-продуцентов рчЦфА, включающая стартовые условия для масштабирования роста в ферментёре: наращивание биомассы при 37 °С, индукцию продукции белка при 28 °С путём добавления ИПТГ до конечной концентрации 0,5 мМ. Электрофоретический анализ лизата бактериальной биомассы штамма-продуцента показал, что при подобранных условиях выращивания и индукции рчЦфА является доминирующим белком (рис. 3, *а*). Аналогичные результаты были получены при продукции рчЦфА в препаративном количестве (рис. 3, *б*, дорожка 2). По результатам денситометрических измерений количество рчЦфА составило 50% от общего количества клеточного белка бактерий.

Оптимизация способа очистки рчЦфА. Хроматографическую очистку рчЦфА проводили одноэтапно с использованием тандема колонок DEAE-Sepharose и Q-Sepharose в буфере, содержащем 30 мМ фосфата натрия (pH 8). Было показано, что существенным моментом эффективности такой очистки рчЦфА является объем образца, наносимого на колонку. В случае нанесения объемов образца, двукратно и более превышающих объем колонки DEAE-Sepharose, возможна контаминация очищенного белка примесями, слабо удерживаемыми носителем, которые медленно мигрируют вдоль колонки и выходят после окончания элюции целевого белка. Спектр поглощения белкового препарата, содержащего данные примеси, демонстрирует смещение максимума поглощения с длины волны 275–280 нм, характерной для препаратов белка, к длине волны 260 нм (данные не представлены).

Известно, что анионообменные смолы обладают высокой способностью к связыванию липополисахаридов и бактериального эндотоксина. В то же время ЦфА, обладающий высокой изоэлектрической точкой (pI 9,6) [31], не связывается с данными носителями. Концентрация рчЦфА при таком способе очистки составляла не менее 10 мг/мл при суммарном выходе очищенного белкового продукта не менее 0,5 г с литра культуры без ферментации и не менее 1 г с литра культуры, выращенной в ферментёре, что более чем в 5 раз превосходило уровень продукции в аналогичных условиях для неоптимизированного гена [32].

Чистота полученного рчЦфА стандартно составляла 95% по данным денситометрии (рис. 3, *б*, дорожки *3*–*7*). Анализ количества эндотоксина в образцах рчЦфА показал, что при разработанном способе очистки его содержание не превышало 0,04 нг на 1 мг белка, что соответствует требованиям Европейской фармакопеи к инъекционным препаратам [16].

Оценка активности рчЦфА. ЦфА, обладая пептидил-пролил цис-транс-изомеразной активностью, играет важную роль в формировании пространственной структуры белков [3]. Кроме того, ЦфА является лигандом для ЦсА, и их связывание подавляет ферментативную и биологическую активность ЦфА. Для подтверждения функционального соответствия полученного рекомбинантного белка природному ЦфА мы

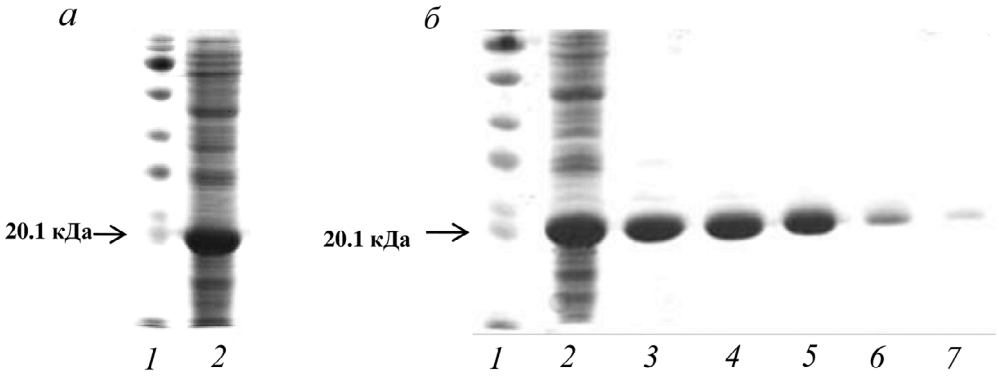


Рис. 3. Электрофоретический анализ чистоты рчЦфА. *а* – Аналитическая продукция рчЦфА в клетках BL21(DE3)Gold/pETCYPopti: *1* – маркер молекулярной массы Page Ruler Plus («Thermo Fisher Scientific», США); *2* – лизат бактериальной биомассы после продукции рчЦфА. *б* – Препаративная продукция рчЦфА в клетках BL21(DE3)Gold/pETCYPopti; SDS-PAGE электрофоретический анализ после очистки рчЦфА методом тандемной анионообменной хроматографии на колонках DEAE-Sepharose и Q-Sepharose: *1* – маркер молекулярной массы Page Ruler Plus; *2* – лизат бактериальной биомассы после осаждения сульфатом аммония и диализа; *3*–*7* – различные количества рчЦфА, очищенные при помощи тандемной анионообменной хроматографии (5,0; 3,0; 2,0; 0,5; 0,2 мкг соответственно)

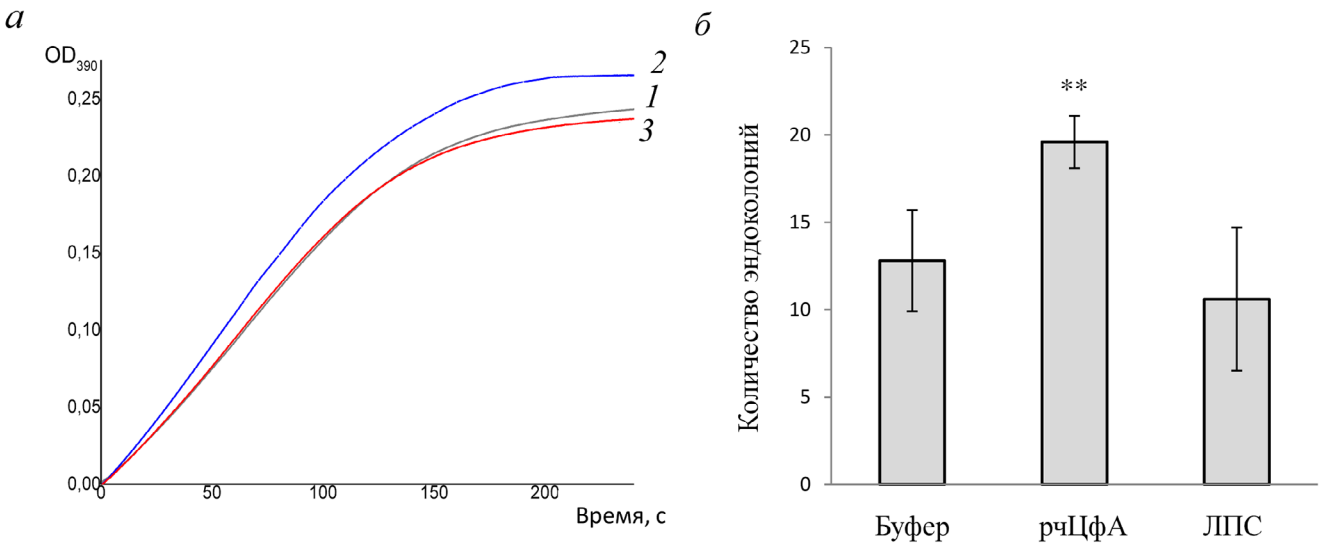


Рис. 4. Оценка активности рчЦфА. *а* – Анализ изомеразной активности рчЦфА: *1* – химотрипсин; *2* – рчЦфА + химотрипсин; *3* – рчЦфА + ЦсА + химотрипсин. *б* – Влияние рчЦфА на формирование эндоколоний стволовых клеток в селезенке сублетально облученных мышей линии C57BL/6. Представлены данные одного из двух репрезентативных экспериментов (M ± SEM), по 10 мышей в группе. ** $p \le 0{,}01$

оценили способность рекомбинантного белка проявлять изомеразную активность и влияние ЦсА на эту активность.

Было показано, что добавление рчЦфА в реакционную смесь химотрипсина и N-нитроанилида приводило к увеличению скорости образования изомерной формы р-нитроанилида (рис. 4, *а*, кривая *2*), что свидетельствовало о наличии изомеразной активности рчЦфА. Добавление ЦсА в реакционную систему приводило к нейтрализации данной активности (рис. 4, *а*, кривая *3*). Таким образом, было показано, что рчЦфА обладает функциональными свойствами природного ЦфА: проявляет изомеразную активность и является лигандом для ЦсА, сохраняя способность с ним связываться.

Известно, что природный ЦфА является хемоаттрактантом не только для нейтрофилов, эозинофилов, моноцитов и активированных Т-лимфоцитов [5–7], но и для незрелых клеток-предшественников гемопоэза из костного мозга [11]. Чтобы оценить хемотаксическую активность рчЦфА в отношении клеток костного мозга, белок вводили сублетально облученным мышам и через 7 дней после облучения производили подсчет эндоколоний, которые образовали гемопоэтические стволовые клетки костного мозга в селезенке мыши [11, 25]. Поскольку ЛПС также обладает способностью усиливать миграцию клеток костного мозга, в качестве дополнительного контроля отдельной группе животных вводили ЛПС в дозе 4 пг/мышь, что соответствовало его количеству в растворе рчЦфА (100 мкг/мышь), вводимом опытной группе животных.

Исследование показало, что после введения рчЦфА число образованных эндоколоний увеличивалось в 1,5 раза по сравнению с контрольной группой животных, которым вводили буфер, использованный для хроматографического выделения рчЦфА (рис. 4, *б*). ЛПС в используемой дозе не оказал влияния на миграцию клеток костного мозга мыши (рис. 4, *б*).

Таким образом, было показано, что рчЦфА обладает всеми функциональными свойствами природного белка, сохраняя изомеразную и хемоаттрактивную активности.

Оценка стабильности рчЦфА. Стерильные образцы полученного рчЦфА в различных концентрациях (2,5, 5 и 13 мг/мл) были заложены на хранение в холодильник при температуре 4 °С. По истечении трех лет хранения было отмечено, что полученный рчЦфА проявлял большую стабильность, поскольку даже при высоких концентрациях (13 мг/мл) раствор белка не терял прозрачность, белок сохранял растворимость, молекулярную стабильность (по результатам SDS-PAAG, рис. 5) и изомеразную активность, аналогичную показанной на рис. 4, *а* (данные не представлены). Было подтверждено, что такой белок сохраняет биологическую активность, являясь хемоаттрактантом для гранулоцитов и активированных Т-лимфоцитов [7]. Однако лучшую сохранность обеспечивает хранение данного белка в более низких концентрациях (3–5 мг/мл), т.к. в дальнейшем при хране-

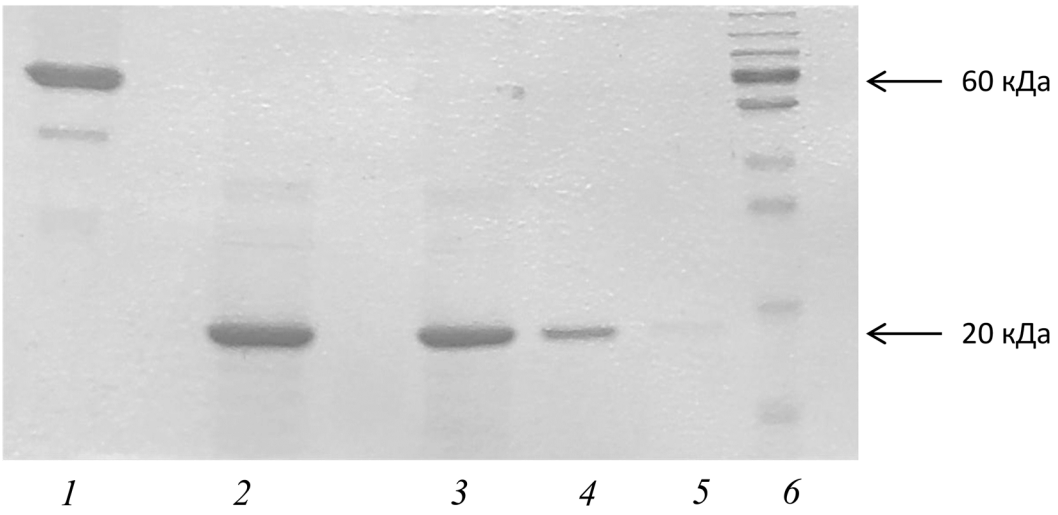


Рис. 5. Оценка молекулярной стабильности рчЦфА через 3 года после получения. *1* – БСА (10 мкг); *2–5* – рчЦфА в количестве 10, 5, 1 и 0,1 мкг соответственно; *6* – маркер молекулярной массы Page Ruler Plus («Thermo Fisher Scientific», США)

нии образцов более трех лет раствор белка в высоких концентрациях может мутнеть и выпадать в осадок.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В настоящем исследовании мы разработали и синтезировали последовательность ДНК *CYPA*, оптимизированную для особенностей белковой продукции в *E. coli*. Это позволило значительно увеличить продуктивность полученного штамма по сравнению с уже известными продуцентами рчЦфА [26, 32]. Существенным преимуществом разработанной технологии является простая и эффективная процедура очистки рчЦфА, позволяющая в значительной мере избавиться от примесей бактериального ЛПС. Оценка биологической активности рчЦфА показала, что полученный белок воспроизводит функциональные свойства природного ЦфА [7]. При описанном способе получения молекула рчЦфА обладает высокой стабильностью при хранении.

Таким образом, все перечисленные качества позволяют считать полученный рчЦфА перспективным для его использования при проведении фундаментальных исследований, для всестороннего изучения данного белка в качестве мишени при поиске подходов лечения различных заболеваний, а также для изучения возможности его медицинского применения как лекарственного средства [33].

Финансирование. Работа выполнена при финансовой поддержке Министерства промышленности и торговли Российской Федерации (грант № 12411.1008799.13.004).

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

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

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Nigro, P., Pompilio, G., and Capogrossi, M. C. (2013) Cyclophilin A is a key player for human disease, *Cell Death Dis.*, **4**, e888, doi: 10.1038/cddis.2013.410.
2. Wang, P., and Heitman, J. (2005) Cyclophilins, *Genome Biol.*, **6**, 226, doi: 10.1186/gb-2005-6-7-226
3. Honga, F., Leeb, J., Piaoa, Y. J., Jae, Y. K., Kim, Y. J., et al. (2004) Transgenic mice overexpressing cyclophilin A are resistant to cyclosporin A-induced nephrotoxicity via peptidyl-prolyl *cis–trans* isomerase activity, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **316**, 1073-1080, doi: 10.1016/j.bbrc.2004.02.160.
4. Colgan, J., Asmal, M., Neagu, M., Yu, B., Schneidkraut, J., et al. (2004) Cyclophilin A regulates TCR signal strength in $CD4^+$ T cells via a proline-directed conformational switch in Itk, *Immunity*, **21**, 189-201, doi: 10.1016/j.immuni.2004.07.005.
5. Arora, K., Gwinn, W. M., Bower, M. A., Watson, A., Okwumabua, I., et al. (2005) Extracellular cyclophilins

contribute to the regulation of inflammatory responses, *J. Immunol.*, **175**, 517-522, doi: 10.4049/jimmunol.175.1.517.
6. Dawar, F. U., Wu, J., Zhao, L., Khattak, M. N. K, Mei, J., et al. (2017) Updates in understanding the role of cyclophilin A in leukocyte chemotaxis, *J. Leukoc Biol.*, **101**, 823-826, doi: 10.1189/jlb.3RU1116-477R.
7. Kalinina, A. A., Silaeva, Yu. Yu., Kazansky, D. B., and Khromykh, L. M. (2019) The role of recombinant human cyclophilin A in the antitumor immune response, *Acta Naturae*, **11**, 63-67, doi: 10.32607/20758251-2019-11-2-63-67.
8. Ramachandran, S., Venugopal, A., Kutty, V., Vinitha, A., Divya, G., et al. (2014) Plasma level of cyclophilin A is increased in patients with type 2 diabetes mellitus and suggests presence of vascular disease, *Cardiovasc. Diabetol.*, **13**, 38, doi: 10.1186/1475-2840-13-38.
9. Kalinina, A., Golubeva, I., Kudryavtsev, I., Khromova, N., Antoshina, E., et al. (2021) Cyclophilin A is a factor of antitumor defense in the early stages of tumor development, *Int. Immunopharmacol.*, **94**, 107470, doi: 10.1016/j.intimp.2021.107470.
10. Spik, G., Haendler, B., Delmas, O., Mariller, C., Chamoux, M., et al. (1991) A novel secreted cyclophilin-like protein (SCYLP), *J. Biol. Chem.*, **266**, 10735-10738.
11. Khromykh, L. M., Kulikova, N. L., Anfalova, T. V., Muranova, T. A., Abramov, V. M., et al. (2007) Cyclophilin A produced by thymocytes regulates the migration of murine bone marrow cells, *Cell Immunol.*, **249**, 46-53, doi: 10.1016/j.cellimm.2007.11.002.
12. Perrucci, G., Straino, S., Corliano, M., Scopece, A., Napolitano, M., et al. (2016) Cyclophilin A modulates bone marrow-derived CD117(+) cells and enhances ischemia-induced angiogenesis via the SDF-1/CXCR4 axis, *Int. J. Cardiol.*, **212**,324-335, doi: 10.1016/j.ijcard.2016.03.082.
13. Hong, F., Lee, J., Song, J., Lee, S., Ahn, H., et al. (2002) Cyclosporin A blocks muscle differentiation by inducing oxidative stress and inhibiting the peptidyl-prolyl-*cis-trans* isomerase activity of cyclophilin A: cyclophilin A protects myoblasts from cyclosporin A-induced cytotoxicity, *FASEB J.*, **16**, 1633-1635, doi: 10.1096/fj.02-0060fje.
14. Guo, M., James, A., Kwak, J., Shen, J., Yokoyama, K., et al. (2016) Cyclophilin A (CypA) plays dual roles in regulation of bone anabolism and resorption, *Sci. Rep.*, **6**, 22378, doi: 10.1038/srep22378.
15. Liu, X., Zhao, Z., Xu, C., Sun, L., Chen, J., et al. (2012) Cyclophilin A restricts influenza A virus replication through degradation of the M1 protein, *PLoS One*, **7**, e31063, doi: 10.1371/journal.pone.0031063.
16. Malyala, P., and Singh, M. (2008) Endotoxin limits in formulations for preclinical research, *J. Pharm. Sci.*, **97**, 2041-2044, doi: 10.1002/jps.21152.
17. Khromykh, L. M., Kalinina, A. A., Kozyr, A. V., Kolesnikov, A. V., Silaeva, Yu. Yu., et al. (2016) The strain of *E*scherichia *coli* BL21(DE3)GoldpETCYPopti is the producer of recombinant human cyclophilin A. Patent # 2603283, Russian Federation.
18. Wu, X., Jörnvall, H., Berndt, K. D., and Oppermann, U. (2004) Codon optimization reveals critical factors for high level expression of two rare codon genes in *Escherichia coli*: RNA stability and secondary structure but not tRNA abundance, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **313**, 89-96, doi: 10.1016/j.bbrc.2003.11.091.
19. Li, G. W., Oh, E., and Weissman, J. S. (2012) The anti-Shine–Dalgarno sequence drives translational pausing and codon choice in bacteria, *Nature*, **484**, 538-541, doi: 10.1038/nature10965.
20. Jin, H., Zhao, Q., Gonzalez de Valdivia, E. I., Ardell, D. H., Stenström, M., et al. (2006) Influences on gene expression *in vivo* by a Shine–Dalgarno sequence, *Mol. Microbiol.*, **60**, 480-492, doi: 10.1111/j.1365-2958.2006.05110.x.
21. Studier, F. W., and Moffattm, B. A. (1986) Use of bacteriophage T7 RNA polymerase to direct selective high-level expression of cloned genes, *J. Mol. Biol.*, **189**, 113-130, doi: 10.1016/0022-2836(86)90385-2.
22. Laemmli, U. K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4, *Nature*, **227**, 680-685, doi: 10.1038/227680a0.
23. Bradford, M. M. (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding, Anal. Biochem., **72**, 248-254, doi: 10.1006/abio.1976.9999.
24. Kumawat, M., Karuna, I., Ahlawat, N., and Ahlawat, S. (2020) Identification of *Salmonella typhimurium* peptidyl-prolyl *cis-trans* isomerase B (PPIase B) and assessment of their role in the protein folding protein, *Pept. Lett.*, **27**, 744-750, doi: 10.2174/0929866527666200225124104.
25. Till, J. E., and McCullough, E. A. (1961) A direct measurement of the radiation sensitivity of normal mouse bone marrow cells, *Radiat. Res.*, **14**, 213-222, doi: 10.1667/rrav01.1.
26. Liu, J., Albers, M. W., Chen, C. M., Schreiber, S. L., and Walsh, C. T. (1990) Cloning, expression, and purification of human cyclophilin in *Escherichia coli* and assessment of the catalytic role of cysteines by site-directed mutagenesis, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **87**, 2304-2308, doi: 10.1073/pnas.87.6.2304.
27. Grosjean, H., and Fiers, W. (1982) Preferential codon usage in prokaryotic genes: the optimal codon–anticodon interaction energy and the selective codon usage in efficiently expressed genes, *Gene*, **18**, 199-209, doi: 10.1016/0378-1119(82)90157-3.
28. Hatfield, G. W., and Roth, D. A. (2007) Optimizing scale-up yield for protein production: computationally optimized DNA assembly (CODA) and translation engineering, *Biotechnol. Annu. Rev.*, **13**, 27-42, doi: 10.1016/S1387-2656(07)13002-7.
29. Jestin, J. L., and Kempf, A. (2009) Optimization models and the structure of the genetic code, *J. Mol. Evol.*, **69**, 452-457, doi: 10.1007/s00239-009-9287-5.
30. Sambrook, J., and Russell, D. W. (2001) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor, Cold Spring Harbor Laboratory Press, N. Y.
31. Handschumacher, R. E., Harding, M. W., Rice, J., Drugge, R. J., and Speicher, D. W. (1984) Cyclophilin: A specific cytosolic binding protein for cyclosporin A, *Science,* **226**, 544-547, doi: 10.1126/science.6238408.
32. Khromykh, L. M., Lazarev, V. N., Manuvera, V. A., Kalinina, A. A., Silaeva, Yu. Yu., et al. (2015) The strain of *E*scherichia *coli* BL21(DE3)Gold/pETmin-CypA is the producer of recombinant human cyclophilin A. Patent #2557305, Russian Federation.
33. Kalinina, A., Zamkova, M., Antoshina, E., Trukhanova, L., Gorkova, T., et al. (2019) Analyses of the toxic properties of recombinant human cyclophilin A in mice, *J. Immunotoxicol.*, **16**, 182-190, doi: 10.1080/1547691X.2019.1665597.

PREPARATIVE PRODUCTION AND PURIFICATION OF RECOMBINANT HUMAN CYCLOPHILIN A

A. A. Kalinina[1], A. V. Kolesnikov[2], A. V. Kozyr[2], N. L. Kulikova[3], M. A. Zamkova[1], D. B. Kazansky[1], and L. M. Khromykh[1]*

[1] *Federal State Budgetary Institution "N.N. Blokhin National Medical Research Center of Oncology" of the Ministry of Health of the Russian Federation, 115478 Moscow, Russia; e-mail: lkhromykh@list.ru*

[2] *Federal Budgetary Scientific Institution "State Research Center of Applied Microbiology and Biotechnology", 142279 Obolensk, Moscow Region, Russia*

[3] *Open Join-Stock Company "Institute of Immunological Engineering", 142380 Lyubuchany, Moscow Region, Russia*

In this work, we developed a method of preparative production of recombinant human cyclophilin A (rhCypA) in *Escherichia coli*. The full-length cDNA encoded the gene of human CypA (*CYPA*) was amplified by RT-PCR from the total RNA of human T cell lymphoma Jurkat. The nucleotide sequence of *CYPA* was optimized to provide highly effective translation in *E. coli*. Recombinant *CYPA* DNA was cloned into the pET22b(+) vector, and the resulted expression plasmid was used to transform *E. coli* strain BL21(DE3)Gold. The recombinant producer strain of *E. coli* produced soluble rhCypA in the cytoplasm of the bacteria. The synthesis efficiency of rhCypA was up to 50% of the total cell protein allowing to produce rhCypA in the amount of 1 g per liter of the culture. We also developed the method for rhCypA purification, consisting of single-step tandem anion exchange chromatography on DEAE- and Q-Sepharose columns. The protein purity was 95% according to electrophoresis (SDS-PAGE), and its contamination with the endotoxin did not exceed 0,05 ng per 1 mg of the protein that met the requirements of European Pharmacopoeia to injectable preparations. The produced recombinant protein exhibited functional features of native CypA, i.e., isomerase activity and chemokine activity as assessed by stimulation of migration of mouse bone marrow hematopoietic stem cells *in vivo*. The generated producer strain of *E. coli* is a super-producer and could be used for large-scale experimental studies of rhCypA and its preclinical and clinical trials as a drug.

Keywords: cyclophilin A, gene optimization, producer strain, isomerase activity, chemokine activity

EDN: UFDGXY
БИОХИМИЯ, 2022, том 87, вып. 3, с. 400 – 418

УДК 577.112.7;617.741

АГРЕГАЦИЯ БЕЛКОВ ПРИ КАТАРАКТЕ: РОЛЬ ВОЗРАСТНЫХ МОДИФИКАЦИЙ И МУТАЦИЙ α-КРИСТАЛЛИНОВ*

Обзор

© 2022 P. Budnar, R. Tangirala, R. Bakthisaran, Ch. M. Rao**

Centre for Cellular and Molecular Biology (CCMB), Council of Scientific and Industrial Research (CSIR), Uppal Road, Hyderabad 500007, India; e-mail: mohan@ccmb.res.in; mohan.ccmb@gmail.com

Поступила в редакцию 05.10.2021
После доработки 02.02.2022
Принята к публикации 02.02.2022

Катаракта является основной причиной слепоты. Из-за нарушения процесса обновления белков в хрусталике глаза накапливаются возрастные и экологические модификации белков, которые изменяют их нативную конформацию, что приводит к образованию склонных к агрегации промежуточных продуктов, а также нерастворимых и светорассеивающих агрегатов, снижающих прозрачность хрусталика. Белок хрусталика, α-кристаллин, является молекулярным шапероном, который предотвращает агрегацию белка, тем самым поддерживая прозрачность хрусталика. Однако мутации или посттрансляционные модификации, такие как окисление, деамидирование, усечение и перекрёстные сшивки, могут сделать α-кристаллины неэффективными и привести к обострению болезни. В настоящей работе нами описаны такие мутации и изменения, а также их последствия. Возрастные модификации α-кристаллинов влияют на их структуру, олигомеризацию и шаперонную функцию. Мутации α-кристаллинов могут привести к агрегации/внутриклеточным включениям, связанным с нарушением структуры и сборки олигомеров, что приводит к перестройке областей, склонных к агрегации. Такие структурные перестройки могут привести к обнажению до сих пор скрытых участков, склонных к агрегации, тем самым заполняя склонное к агрегации состояние (-я) и облегчая аморфную/амилоидную агрегацию и/или несоответствующие взаимодействия с клеточными компонентами. Изучение вызванных мутациями изменений в структуре, сборке олигомеров, механизмах агрегации и интерактомах α-кристаллинов будут полезны в борьбе с заболеваниями, связанными с агрегацией белков.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: катаракта, агрегация, α-кристаллин.

DOI: 10.31857/S0320972522030071

ВВЕДЕНИЕ

Неправильное сворачивание белков из-за мутаций, ковалентных модификаций или факторов окружающей среды приводит к потере функций и агрегации белков, которые губительны для клеток. Поэтому в клетках развились различные механизмы контроля качества для предотвращения агрегации (шапероны) или удаления белковых агрегатов (протеасомы и аутофагосомы). Однако нарушение нормальной работы механизмов контроля качества в связи со старением или мутациями приводит к прогрессивному накоплению белковых агрегатов и может вызвать ассоциированные с неправильным сворачиванием белков болезни, такие как нейродегенеративные заболевания (болезни Альцгеймера, Паркинсона, Хантингтона), боковой амиотрофический склероз, муковисцидоз, болезнь Гоше и катаракта.

КАТАРАКТА И АГРЕГАЦИЯ БЕЛКОВ

Катаракта является одной из основных причин слепоты [1]. Она возникает в результате патологического помутнения хрусталика, вызванного изменением его прозрачности и показателя преломления. Хрусталик глаза вместе с роговицей фокусируют падающий на сетчатку свет для формирования изображения. Для получения изображения без аберраций хрусталик должен быть прозрачным, с высоким показателем преломления и соответствующим градиентом показателя преломления. Чтобы соответствовать этим требованиям, хрусталик имеет уникальную

Принятые сокращения: ACD – α-кристаллиновый домен; CTE – *C*-концевое удлинение; NTD – *N*-концевой домен; sHsp – малый белок теплового шока.

* Статья опубликована в рамках специального выпуска «Неправильный фолдинг и агрегация белков при катаракте» (том 87, № 2, 2022).

** Адресат для корреспонденции.

структуру и состав. Он не содержит сосудов. Кроме того, волокнистые клетки, находящиеся в центральной части хрусталика (ядро), теряют органеллы, такие как ядра, митохондрии, эндоплазматический ретикулум и рибосомы. Более того, плотная организация волокнистых клеток уменьшает межклеточное пространство. Эти стратегии удаляют или уменьшают содержание светорассеивающих структур и обеспечивают прозрачность хрусталика [2].

Хрусталик состоит в основном из белков. Волокнистые клетки хрусталика характеризуются очень высоким содержанием белка (более 70% *w/v*). Во время дифференцировки волокнистых клеток происходит резкое повышение уровня экспрессии кристаллинов, и они составляют ~90% от всех белков клетки. Хрусталики позвоночных животных содержат три группы кристаллинов, а именно: α, β и γ [2]. Принято считать, что кристаллины являются структурными белками. Однако α-кристаллин является не только структурным белком. Он также обладает активностью молекулярного шаперона. Прозрачность хрусталика и высокий показатель преломления достигаются за счёт плотной и ближней систематической упаковки кристаллинов в высоких концентрациях с градиентом концентрации белка ~250–400 мг/мл от внешней коры к ядру [2, 3]. Показатель преломления высок в области ядра и снижается на периферии, в среднем до значения ~1,4 [2]. Разделение белкового матрикса на обогащенную и бедную белками фазы может вызвать рассеяние света. Этого можно избежать благодаря присутствию в хрусталике глаза белка – кристаллина, который образует контакты ближнего действия с другими кристаллинами [2]. Вероятность кристаллизации белков среди компонентов кристаллинов также снижается из-за высокой полидисперсности α-кристаллинов [2]. Поскольку в хрусталике нет обновления белков, кристаллины, синтезированные внутриутробно, сохраняются на всю жизнь. Следовательно, существует потребность в системе шаперонов для сохранения белков хрусталика в их нативной конформации и для предотвращения разделения фаз/осаждения. α-Кристаллины служат в качестве молекулярных шаперонов, которые связываются с частично развернутыми белками и предотвращают их неправильное сворачивание и агрегацию.

Для объяснения образования катаракты было предложено множество теорий. С точки зрения физической химии, пространственные различия плотности белка, которые вызывают помутнение хрусталика, могут быть связаны с эффектами осмотического давления на клеточном уровне. Benedek [4] предположил, что фазовое распределение лежит в основе молекулярных механизмов развития катаракты. При высоких концентрациях кристаллины и другие белки подвергаются самопроизвольному фазовому разделению на сосуществующие богатые и бедные белком фазы. Разделение фаз также зависит от изменений температуры, поэтому оно может быть индуцировано в интактных хрусталиках путём понижения температуры, что приводит к возникновению холодных катаракт [2]. Окислительное повреждение, индуцируемое множеством факторов, включая воздействие УФ-излучения, может вызывать образование ненативных дисульфидных связей между белковыми субъединицами, что приводит к образованию крупных необратимых агрегатов и в дальнейшем – катаракты [5]. В течение жизни кристаллины претерпевают различные необратимые ковалентные модификации, вызванные, например, УФ-облучением, дезамидированием, окислением, протеолизом и реакцией Майяра [6]. Эти ковалентные модификации приводят к дестабилизации нативной структуры кристаллинов, снижая шаперонную активность α-кристаллина и способствуя частичному разворачиванию βγ-кристаллинов, что обусловливает развитие возрастной катаракты [5, 6]. Имеются также данные об агрегации амилоидного типа в хрусталиках при катаракте [7–9].

α-КРИСТАЛЛИН: ФУНКЦИЯ ШАПЕРОНА И СТРУКТУРНЫЕ ОСОБЕННОСТИ

Кристаллины известны уже более 100 лет. Mörner в 1984 г. показал, что хрусталики глаза содержат четыре белковые фракции – нерастворимую форму, которую он назвал альбуминоидом, и три водорастворимые фракции, а именно: α-, β- и γ-кристаллины [10]. α-Кристаллин был выделен из хрусталика глаза в виде крупного полидисперсного олигомера, образованного двумя близкородственными белками (αA- и αB-кристаллины). Roy и Spector [11] обнаружили, что при старении низкомолекулярная фракция α-кристаллина исчезает из ядерного региона, хотя она присутствует в более молодых хрусталиках. Последующие исследования показали, что такие нерастворимые в воде фракции состоят из комплексов α-кристаллина с другими кристаллинами [12]. Ретроспективно, эти наблюдения можно рассматривать как указание на взаимодействие α-кристаллинов с другими белками и, вероятно, роль в возрастных изменениях, включая потерю прозрачности хрусталика. В клетках млекопитающих α-кристаллин существует в виде больших олигомеров, образован-

ных двумя генными продуктами: αA- и αB-кристаллинами. В хрусталиках большинства видов позвоночных соотношение этих белков равно 3 : 1. Однако это соотношение не постоянно и зависит от вида и возраста [2, 12]. α-Кристаллин является членом семейства малых белков теплового шока (sHsp). Он имеет характерный α-кристаллиновый доменом (ACD, ~80–100 консервативных а.о.), окружённый вариабельным *N*-концевым доменом (NTD) и *C*-концевым расширением (CTE) [13, 14]. αA- и αB-кристаллины имеют ~58% гомологии последовательности друг с другом и ~45% гомологии с другими sHsp человека, такими как HspB6 [13, 14].

α-Кристаллины были впервые признаны в качестве членов семейства белков sHsp в начале 1980 гг., когда была выявлена гомология их последовательности с белками sHsp *Drosophila* [15]. Удивительно, но за следующее десятилетие не было получено экспериментальных подтверждений этого наблюдения. Первые экспериментальные доказательства того, что α-кристаллин функционирует как sHsp/молекулярный шаперон, были получены в 1992 г. в исследованиях *in vitro* Horwitz [16], который показал, что α-кристаллин предотвращает термическую агрегацию βγ-кристаллинов и алкогольдегидрогеназы. Исследования в нашей лаборатории показали, что α-кристаллин хрусталика глаза предотвращает фотоагрегацию γ-кристаллина [17], а также индуцированную нагреванием агрегацию ζ-кристаллина и карбоангидразы [18], индуцированную дитиотрейтолом (DTT) агрегацию α-лактальбумина [19] и индуцированную рефолдингом агрегацию β-кристаллина [20]. Было показано, что гомоолигомеры αA- и αB-кристаллинов проявляют шаперонную активность в отношении различных белков-мишеней, хотя и в разной степени [21, 22]. В нашей лаборатории было впервые показано, что шаперонная активность α-кристаллина зависит от температуры, поскольку она очень низка при температурах ниже 30 °C и резко возрастает при температурах выше 30 °C [17]. По-видимому, такая зависимость активности от температуры является общей чертой среди Hsps, поскольку этим белкам необходимо функционировать при недопустимых температурах. Растворимость гидрофобного красителя пирена увеличивалась в присутствии α-кристаллина в зависимости от температуры, что указывает на то что повышение температуры способствует экспонированию гидрофобных поверхностей α-кристаллина [17]. Вызванное подъёмом температуры повышение шапероноподобной активности α-кристаллина обусловлено различными факторами, в том числе изменением четвертичной структуры, увеличением содержания или реорганизацией гидрофобных поверхностей, повышением скорости субъединичного обмена [18, 20]. Исследования нашей лаборатории также показали, что α-кристаллин связывается с расплавленными глобулами белков-мишеней [19] и способствует рефолдингу ранних интермедиатов [23].

Гомоолигомеры αA- и αB-кристаллинов показали различия в температурно-зависимой активности, так как структура αB-кристаллина более чувствительна к температуре, чем структуры αA-кристаллина или гетероолигомера α-кристаллина, выделенного из хрусталика [21]. Механизм шаперонной активности α-кристаллина в отношении белков-мишеней интенсивно изучается в нашей лаборатории и в других исследовательских группах. Наши исследования показали, что αA- и αB-кристаллины взаимодействуют с индуцированными нагреванием интермедиатами разворачивания цитратсинтазы двумя способами: 1) слабо с ранним разворачиванием интермедиатов, что облегчает рефолдинг фермента в его активное состояние, и 2) сильно и необратимо с более поздним разворачиванием интермедиата с образованием растворимых комплексов, предотвращающих агрегацию белков [22]. αA- и αB-кристаллины связываются с низкой аффинностью с компактными близкими к нативному состояниями и с большей аффинностью с более развернутыми состояниями белка-мишени. Результаты, полученные в других лабораториях с использованием модели агрегации белков, таких как α-кристаллин, лизоцим T4 и его мутанты, позволили предположить, что αA- и αB-кристаллины связываются с субстратами как с низким, так и с высоким сродством [24, 25]. Переход в высокоаффинный режим может быть вызван температурой, pH или фосфорилированием белка [26]. Было также показано, что α-кристаллин предотвращает амилоидную агрегацию аполипопротеина C-II и серпина, взаимодействуя с частично структурированными интермедиатами, что позволяет предположить ингибирование α-кристаллином стадии образования ядра при амилоидогенезе [27, 28]. Нами было показано, что αB-кристаллин предотвращает образование фибрилл $A\beta_{40}$ и $A\beta_{42}$, взаимодействуя с центрами образования фибрилл $A\beta_{40}$ [29]. С помощью методов кварцевого кристаллического микробаланса, аналитического ультрацентрифугирования и систем обнаружения одиночных молекул, таких как конфокальная двухцветная детекция совпадений и микроскопия полного внутреннего отражения, было показано, что αB-кристаллин предотвращает фибрилляцию Aβ за счёт связы-

ваясь с олигомерным и фибриллярным ядром Aβ [30, 31]. Нами и в других лабораториях также было показано, что αB-кристаллин также предотвращает фибрилляцию α-синуклеина [13].

Полидисперсная природа α-кристаллинов затруднила их кристаллизацию и структурные исследования. Однако можно получить кристаллы домена ACD и изучить его структуру с помощью методов рентгеновской дифракции. Было обнаружено, что домены ACD (~80 а.о.) в обоих кристаллинах характеризуются наличием β-цепей. В общей сложности семь β-цепей (β3–β9) расположены в виде иммуноглобулиноподобного β-сэндвича, в котором три цепи (β3–β9–β8) расположены антипараллельно остальным четырём β-цепям (β4–β5–β6–β7), соединённым короткой петлёй [13, 32]. С помощью биохимических методов было показано, что экспрессия ACD αA- или αB-кристаллинов приводит к образованию димеров и потере высокомолекулярных олигомеров [13, 32]. Домен NTD у αA и αB-кристаллинов образован ~65 а.о., обогащён гидрофобными а.о. и неупорядочен. Усечение NTD или делеция консервативных мотивов SRLFDQFFG и FLRAPSWF оказывали влияние на сборку олигомеров αB-кристаллина, приводя к превращению димеров в гексамеры или меньшие олигомеры [33, 34]. Исследования с использованием ЯМР твёрдого тела позволили понять структуру *N*-концевого участка. Было показано, что он содержит две короткие α-спирали (а.о. 14–17 и 27–31) и двухцепочечную антипараллельную β-складчатую структуру (а.о. 48–50 и 61–63), соединённые длинной петлёй [35]. Домен CTE в αA- и αB-кристаллинах содержит примерно 20 а.о. и является гибким и полярным участком. Он содержит высококонсервативный мотив IXI, который облегчает образование олигомеров, действуя как «якорная точка», тем самым способствуя полидисперсности α-кристаллина [13]. Несколько исследований показали, что делеция домена CTE из αA- и αB-кристаллинов влияет на четвертичную структуру и распределение олигомеров. Делеции или мутации в CTE αB-кристаллине уменьшают размер олигомеров и влияют на солюбилизацию субстратов [36, 37]. Поскольку было показано, что потеря шаперонной активности ассоциирована с патологиями, нами была предпринята попытка увеличить его активность, руководствуясь нашим наблюдением, что она может активироваться температурно-зависимыми структурными возмущениями. Нами получены генно-инженерные химерные белки со значительно более высокой шаперонной активностью, что свидетельствует о том, что структурная организация и шаперонная активность sHsps зависят от последовательности и длины CTE, NTD и консервативных мотивов [36, 38].

Основываясь на результатах ЯМР твердого тела, малоуглового рентгеновского рассеяния (SAXS) и электронной микроскопии (EM) была предложена модель полноразмерного αB-кристаллина в виде симметричного мультимера из 24 субъединиц, связанных через иерархию взаимодействий с участием ACD, CTE и NTD. Сначала два ACD связываются, образуя димер. Три димера связываются друг с другом с образованием гексамера за счёт взаимодействия консервативного мотива IXI *C*-конца в одном димере с гидрофобными карманами (цепи β4 и β8) другого димера [32, 39]. Гексамеры связываются в мультимеры более высокого порядка посредством различных взаимодействий с участием NTD [35, 39]. Эта модель согласуется со структурными данными. Однако предстоит ещё согласовать полидисперсность, которая часто упоминается в случае αB-кристаллина, с существованием симметричного 24-мера.

В хрусталике человека αA-кристаллин существует как в окисленной, так и в восстановленной форме благодаря наличию двух остатков цистеина. Kaiser et al. [40] исследовали структуру олигомеров αA-кристаллина в окисленном и восстановленном состояниях, использовав набор различных методов, таких как крио-EM, перекрёстные сшивки/масс-спектрометрия, ЯМР-спектроскопия, молекулярное моделирование. Они показали, что олигомеры αA-кристаллина в основном существуют в виде 12-, 16- и 20-мерных структур, которые можно преобразовать друг в друга путём добавления или вычитания тетрамеров. Процесс сборки происходит через образование тетрамеров, в которых два димера β7-интерфейса связываются друг с другом через *N*-концевые фрагменты. Тетрамерные звенья связываются далее через *N*-концевые взаимодействия с образованием ансамблей более высокого порядка. Усиленная динамика домена CTE приводит к обмену доменами между димерами и определяет гетерогенность олигомеров. Хотя αA- и αB-кристаллины обладают высокой гомологией и сходной длиной последовательности, они образуют разные олигомерные сборки, используя сходный тип взаимодействий. Димеризация происходит с участием β7-интерфейса, в то время как олигомеризация опосредована *N*-концевыми взаимодействиями и связыванием IXI с близлежащим промотором. Однако CTE αB-кристаллина участвует в формировании гексамерных частиц, тогда как CTE αA-кристаллина участвует в сборке олигомеров более высокого порядка в трёхмерной форме с обменом доме-

нов. Следовательно, *N*-концевые взаимодействия важны для образования олигомеров αA-кристаллина [40].

ВОЗРАСТНЫЕ МОДИФИКАЦИИ α-КРИСТАЛЛИНА И КАТАРАКТА

Кристаллины, включая α-кристаллин, являются долгоживущими белками хрусталика и поэтому подвержены возрастным модификациям. Эпидемиологические исследования показали, что экологические и профессиональные факторы повышают риск возникновения возрастных катаракт [41]. В большом числе исследований было показано, что нерастворимая в воде фракция увеличивается в хрусталике с возрастом и при развитии катаракты [42, 43]. В αA- и αB-кристаллинах из хрусталиков пожилых людей и при наличии катаракты были обнаружены многочисленные посттрансляционные модификации, такие как деамидирование, окисление, ацетидирование, метилирование, изомеризация, карбамоилирование и фосфорилирование (табл. 1).

УФ-облучение способствует развитию возрастной катаракты [47]. Хрусталик имеет УФ-фильтры на основе триптофана, такие как кинуренин, 3-гидроксикинуренин и глюкозид 3-гидроксикинуренин, которые поглощают УФ-излучение. Однако УФ-индуцированное фотовозбуждение приводит к образованию свободных радикалов и активных форм кислорода, которые окисляют метиониновые, триптофановые и цистеиновые остатки α-кристаллина и приводят к недисульфидной ковалентной сшивке и олигомеризации [48, 49]. Воздействие УФ-излучения вызывает существенные изменения вторичной и третичной структуры и нарушает шапероноподобную активность α-кристаллина [50].

Окисление является одной из наиболее частых причин посттрансляционной модификации, наблюдаемой в хрусталике, где оно обычно влияет на остатки метионина, триптофана, тирозина, цистеина и гистидина в α-кристаллине (табл. 1). При воздействии УФ-излучения в хрусталике глаза быка окислению подверглись остатки M1 и M168 в αA-кристаллине и остатки M1, W9, W60 и M68 – в αB-кристаллине [48]. В исследованиях *in vitro* было показано, что окисление αA- и αB-кристаллинов вызывает значительные изменения их вторичной и четвертичной структур и образование низкомолекулярных частиц, не обладающих шаперонной активностью [51].

Деамидирование представляет собой другой типичный пример посттрансляционной модификации, которая чаще наблюдается в нерастворимой в воде фракции нормального хрусталика и хрусталика при катаракте. Деамидирование превращает амид в боковой цепи остатков аспарагина и глутамина в остаток карбоновой кислоты и внедряет отрицательный заряд в молекулу белка, тем самым дестабилизируя его структуру. Масс-спектрометрические исследования показали, что деамидирование происходит в остатках Q6, Q50, Q90, N101, Q104, N123 и Q147 в αA-кристаллине и остатках N78, Q108, N146 – в αB-кристаллине (табл. 1). Было обнаружено,

Таблица 1. Посттрансляционные/возрастные изменения в α-кристаллинах

Посттрансляционная модификация	Затронутые аминокислотные остатки	Ссылки
Деамидирование	Q6, Q50, Q90, N101, Q104, N123, Q147 в αA-кристаллине; N78, Q108, N146 в αB-кристаллине	[44, 45]
Окисление	M1, W9, Y18, Y34, M138, C142 в αA-кристаллине; M1, H7, W9, Y48, W60, M68 в αB-кристаллине	[44, 45]
Ацетилирование	M1, K70, K78, K88, K145 в αA-кристаллине; M1, K92 в αB-кристаллине	[44, 45]
Метилирование	R21, K88 в αA-кристаллине R22, R50 в αB-кристаллине	[44, 45]
Изомеризация/эпимеризация	S20, D58, S59, S62, D151, S162 в αA-кристаллине; S19, S21, S53, S59, D62, S85, D109 в αB-кристаллине	[45]
Фосфорилирование	T13, S45, S122, T140 в αA-кристаллине; S19, S21, S43, S45, S53, S59, S76 в αB-кристаллине	[44, 45]
Карбамоилирование	K92 в αB-кристаллине	[45, 46]

что α-кристаллин хрусталика при катаракте сильно деамидирован по сравнению с белками нормального хрусталика. Влияние возрастного деамидирования на структурно-функциональные свойства α-кристаллина изучали с использованием различных имитирующих дезамидирование мутантов αA-кристаллина (N101D, N123D и N101D/N123D) и αB-кристаллина (N78D, N146D и N78D/N146D) [52]. Мутантные формы αA-кристаллина показали изменённую вторичную структуру и микроокружение; гомомеры с дезамидированием по остатку N123 показали значительное снижение шаперонной активности [52, 53]. Деамидирование остатка N146 повлияло на структуру и функции αB-кристаллина [54].

Другой посттрансляционной модификацией, которая возникает при старении хрусталика и при катаракте, является фосфорилирование α-кристаллина (табл. 1). Исследования α-кристаллина хрусталика человека и его модификаций с возрастом и при развитии катаракты с помощью метода MALDI-MS выявили повышенное количество фосфорилированного αB-кристаллина в кортикальных участках хрусталика пожилых людей [55]. Протеомный анализ хрусталика при врождённой катаракте показал, что фосфорилирование αA-кристаллина происходит по остаткам T13, S45, S122 и T140, а αB-кристаллина – по остаткам S19, S21, S43, S45, S53, S59 и S76 [56]. Фосфопротеомная характеристика нормального хрусталика и хрусталика при катаракте и последующий количественный анализ выявил более высокие уровни фосфорилирования α-кристаллина (T153 – в αA-кристаллине и S19, S76 – в αB-кристаллине) в хрусталике при катаракте [57]. Фосфорилирование αB-кристаллина с возрастом усиливается. Ему также способствуют стресс и болезни [58]. В ряде работ было проведено определение уровня фосфорилирования αB-кристаллина. Уровень фосфорилирования αB-кристаллина в культивированных тканях хрусталика крыс составил ~0,25 моль фосфата на моль белка [59]. Уровень фосфорилирования αB-кристаллина в хрусталике быка в первые три года жизни увеличивался до 0,25 моль фосфата на моль белка и далее оставался без изменений [59, 60]. αA-Кристаллин, напротив, может фосфорилироваться до уровня 0,5 моль фосфата на моль белка [59, 60]. Обычно фосфорилирование αB-кристаллина происходит по остаткам S19, S45 и S59. Фосфорилирование αB-кристаллина может быть как полезным, так и вредным в зависимости от его уровня. Фосфорилирование лишь одного остатка (это либо S45, либо S59) увеличивает шаперонную активность этого белка, в то время как гиперфосфорилирование по двум остаткам (S45 и S59) увеличивает его долю в нерастворимой фракции [58]. Мутантная форма αB-кристаллина R120G подвергается гиперфосфорилированию и переходит в нерастворимые фракции [61, 62]. Более раннее исследование в нашей лаборатории с использованием мутантов, имитирующих фосфорилирование, показало, что гиперфосфорилирование αB-кристаллина R120G (S19D/S45D/S59D-R120G αB-кристаллин или 3D-R120G αB-кристаллин) увеличивает его склонность к агрегации [58].

Другой часто наблюдаемой посттрансляционной модификацией в стареющих хрусталиках является рацемизация/изомеризация, при которой L-формы серина и аспарагиновой кислоты переходят в их D-формы. В табл. 1 перечислены аминокислотные остатки, повергающиеся изомеризации в αA- и αB-кристаллинах. αA-Кристаллин более подвержен изомеризации, чем αB-кристаллин, из-за высокого содержания остатков аспарагиновой кислоты [63]. При старении в αA-кристаллине подвергаются изомеризации остатки D58 и S59/62, и их D-изоформа чаще встречается в хрусталиках с катарактой, чем в нормальных хрусталиках [64, 65]. Изомеризация вызывает изменения структуры α-кристаллина. Так, изомеризация остатков D58, D84 и D151 αA-кристаллина, наблюдаемая в состарившемся хрусталике, приводит к нарушению его гетерополимерной структуры высокого порядка и снижению растворимости белка, что в конечном итоге вызывает развитие катаракты [64]. В αB-кристаллине изомеризация остатка D109 разрушает важный для белка солевой мостик с остатком R120 на поверхности димера, что приводит к аберрантной олигомеризации. Остатки S59 и D62 участвуют в образовании интерфейса, образуя кластер солевого мостика с R163 и E165 соседнего мономера [66]. Изомеризация остатка D62 влияет на фосфорилирование остатка S59, тем самым нарушая формирование солевого мостика и разрушая поверхность раздела, что изменяет динамику олигомеризации [66]. Эпимеризация остатка S162 существенно ослабляет межсубъединичное связывание [66]. При диабете гипергликемия способствует протеканию неферментативных реакций, таких как гликирование и окисление, что приводит к образованию конечных продуктов гликирования (AGE) и ускоряет реакции Майяра в кристаллинах хрусталика, приводя к развитию возрастной катаракты [67, 68].

Исследования хрусталиков быка и крысы *in vitro* показали, что гликирование по остаткам лизина повышает восприимчивость кристалли-

нов к сульфгидрильному окислению и приводит к образованию высокомолекулярных агрегатов с дисульфидными поперечными связями [69]. Хотя гликирование не вызывает заметных изменений структуры α-кристаллина, тем не менее оно способствует значительному снижению его шаперонной активности [70]. Усечение белка является одним из наиболее распространённых в хрусталиках видов модификации, когда удаление части аминокислотной последовательности как с *N*-, так и с *C*-концов приводит к образованию нескольких пептидных фрагментов. Модификации, такие как деамидирование и изомеризация, увеличивают вероятность усечения белковой молекулы. α-Кристаллины подвергаются нескольким усечениям в основном на *C*-конце: участки усечения включают остатки S172, S162, N101, D58 и L40 в αA-кристаллине и K174, T170, T40 и E34 – в αB-кристаллине (см. [43, 55] и обзор [71]). Было обнаружено, что в состарившихся хрусталиках *N*-концевой участок αA-кристаллина укорочен на 3 остатка, в то время как *N*-концевой участок αB-кристаллина может быть укорочен на 1 или 6 остатков [72]. В нашей лаборатории при сотрудничестве с группой Garland в хрусталике человека с катарактой выявили усечённую форму αB-кристаллина, у которой отсутствовал *C*-концевой остаток лизина [73]. Эта укороченная форма, обозначаемая как αB_g, обладала более кислыми свойствами и мигрировала немного ниже, чем полноразмерный белок в SDS-PAGE. Количество αB_g варьировало от 10 до 90% от общего количества αB-кристаллина. Исследования *in vitro* показали, что шаперонная активность αB_g была сравнима с активностью нормального αB-кристаллина [73]. Удаление *C*-концевых остатков в рекомбинантном укороченном (151 а.о.) αA-кристаллине влияло на его олигомеризацию и обмен субъединицами [44]. Мутантные формы αA- и αB-кристаллинов, у которых на *C*-конце были удалены 16 а.о., демонстрировали пониженную шаперонную активность [74]. Усечение α-кристаллина также приводит к образованию низкомолекулярных пептидов, которые обнаруживаются в состарившихся хрусталиках человека и ассоциируются с помутнением хрусталика и катарактой [75, 76]. Было показано, что пептид αA66-80 из αA-кристаллина связывается с растворимым α-кристаллином, ослабляет его шаперонную активность и вызывает его агрегацию [77]. Пептид αA66-80 также образовывал амилоидные фибриллы, способствовал появлению перекиси водорода и индуцировал апоптоз клеток [78].

Среди других видов модификации α-кристаллина следует отметить ацетилирование и карбамоилирование остатков лизина (табл. 1). В хрусталике человека ацетилирование происходит по остаткам K70 и K99 в αA-кристаллине и K92 и K166 – в αB-кристаллине [44]. Определение шаперонной активности мутантной формы K70Q α-кристаллина, имитирующей ацетилированную форму белка, выявило изменения структуры белка и различную шаперонную активность этого белка в зависимости от белка-клиента [79]. Было обнаружено, что карбамоилирование белков хрусталика, которое считается возрастным процессом, повышено в ядре хрусталика по сравнению с областью коры [71]. При катаракте наблюдалось карбамоилирование остатка K92 в αB-кристаллине [46].

С процессом агрегации белков, происходящим во время развития катаракты, ассоциированы белок-белковые перекрёстные сшивки. Усечение и посттрансляционные модификации, такие как окисление, деамидирование, и изомеризация, запускают процесс белок-белковых перекрёстных сшивок кристаллинов, в основе которых лежат различные механизмы (через дегидроаланин (DHA), промежуточное образование сукцинимида аспарагина и усечение или *C*-концевой промежуточный продукт янтарного ангидрида) [71]. Протеомные исследования показали, что α-кристаллин подвергается белок-белковому сшиванию, которое включает реакцию остатков лизина неферментативно усечённого белка с *C*-концевыми остатками аспартата [71, 80]. Этот двухфазный механизм включает в себя два спонтанных события – расщепление белка и перекрёстное сшивание. Расщепление белка может происходить при pH 5–7,4 и включает отщепление пептида на *C*-концевой стороне остатка аспарагиновой кислоты, который затем подвергается спонтанной циклизации с образованием *C*-концевого промежуточного продукта в виде ангидрида аспартата. Следующим этапом является сшивание, когда *C*-концевой промежуточный ангидрид Asp реагирует либо с водой с образованием аспартата, либо с нуклеофилом, таким как ε-аминогруппа лизина или *N*-концевая аминогруппа, с образованием ковалентной белок-белковой перекрёстной сшивки [80]. Протеомный анализ хрусталика при катаракте позволил выявить различные перекрёстные сшивки в αA-кристаллине, αB-кристаллине, γC/D-кристаллине и γS-кристаллине. Были идентифицированы следующие перекрёстные сшивки: αA-кристаллин K78–αA-кристаллин D58, αA-кристаллин D151–αB-кристаллин K82, αA-кристаллин D151–αB-кристаллин K150, αB-кристаллин D129–αB-кристаллин K82, αB-кристаллин D129–αB-кристаллин K90, αB-кристаллин D129–αB-кристал-

лин K121, αA-кристаллин D151–γC/γD-кристаллин G2 [71, 80]. Большинство сшивок представляли амидные связи между боковой цепью лизина пептида и *C*-концевым остатком аспарагиновой кислоты другого пептида. Интересно, что перекрёстная сшивка αA-кристаллин D151–γC/γD-кристаллин G2 включала амидную связь, образованную *N*-концевой группой γC/D-кристаллина с *C*-концевым аспартатом (D151) αA-кристаллина [71, 80].

Таким образом, при старении белки хрусталика, в том числе α-кристаллин, претерпевают множественные ковалентные модификации, усечения и сшивки. Эти модификации могут происходить одновременно или независимо друг от друга, и они могут влиять на структуру, олигомеризацию и шаперонную функцию α-кристаллина, вызывая снижение растворимости и усиливая агрегацию белка, и делая хрусталик склонным к развитию возрастной катаракты.

МУТАЦИИ α-КРИСТАЛЛИНА И КАТАРАКТА

Мутации в αA- и αB-кристаллинах могут приводить к развитию аутосомальных врождённых катаракт различного фенотипа (табл. 2 и 3). Связанные с катарактой мутации α-кристаллина могут быть миссенс-мутациями, сдвигом рамки считывания или нонсенс-мутациями. Большинство этих мутаций являются аутосомально-доминантными и вызывают врождённые катаракты, тогда как некоторые мутации являются рецессивными (табл. 2 и 3). Первой зарегистрированной мутацией α-кристаллина, вызывающей развитие катаракты, была одиночная миссенс-мутация R116C αA-кристаллина, которая индуцировала развитие аутосомально-доминантной катаракты [81]. Vicart et al. сообщил о втором случае, в котором катаракта и десмин-ассоциированная миопатия были вызваны миссенс-мутацией R120G в αB-кристаллине (табл. 3).

Таблица 2. Мутации αA-кристаллина, вызывающие катаракту (CRYAA)

Домен	Мутация	Болезнь	Морфология катаракты	Ссылки
NTD	W9X	CC (AR)	ядерная	[82]
	R12C	CC (AD)	задняя, полярная, ядерная и пластинчатая	[83, 84]
	R12L	CC(AD)	ядерная	[85]
	R21L	CC (AD)	центральная задняя	[83, 86]
	R21W	CC (AD)	пластинчатая ядерная, полярная, передняя полярная	[83, 84, 87]
	R21Q	CC (AD)	пластинчатая	[88]
	R49C	CC (AD)	ядерная, пластинчатая	[89]
	R54C	CC (AR/AD)	полная, ядерная	[84, 90]
	R54P	CC (AD)	помутнение Y-образного шва с вовлечением ядра	[91]
	R54L	CC (AD)	ядерная	[92]
	R65Q	ARC	неизвестно	[93]
	F71L	ARC (AR)	неизвестно	[94]
	G98R	PC (AD)	периферическая, кольцевидное помутнение	[95]
ACD	R116C	CC (AD)	поясничная центральная ядерная, ядерная	[81, 96, 97]
	R116H	CC (AD)	точечная, ядерная, полная	[83, 98, 99]
	p.116_118del	CC (AD)	неизвестно	[100]
	R117H/Y118del	CC (AD)	неизвестно	[101]
	R117del	CC (AD)	неизвестно	[102]
	R119H	ARC	неизвестно	[93]
CTE	A152del	CC	неизвестно	[103]

Примечание. Принятые сокращения: NTD – *N*-концевой домен; ACD – α-кристаллиновый домен; CTE – *C*-концевое удлинение; CC – врождённая катаракта; ARC – возрастная катаракта; PC – пресенильная (ранняя) катаракта (AD – аутосомально-доминантная; AR – аутосомально-рецессивная).

Таблица 3. Мутации αB-кристаллина, вызывающие заболевания (CRYAB)

Домен	Мутация	Болезнь	Морфология катаракты	Ссылки
NTD	R11H	CC (AD)	ядерная	[104]
	R11C	CC (AR)	ядерная	[105]
	R12C	CC (AR)	ядерная	[105]
	P20S	CC (AD)	задняя полярная	[106]
	P20R	CC (AD)	задняя полярная	[107]
	60delC (S21AfsX24)	MFM (AR)	неприменимо	[108]
	R56W	CC (AR)	плотная полная белая	[109]
ACD	R69C	CC (AD)	неизвестно	[101]
	D109A	CC, MFM(AD)	неизвестно	[110]
	D109G	AxM/RCM (AD)	неизвестно	[111]
	D109H	CC, MFM (AD)	задняя полярная	[112]
	R120G	DRM, CC (AD)	неизвестно	[113]
	D140N	CC (AD)	пластинчатая	[114]
CTE	Q151X	MFM (AD)	неприменимо	[115]
	G154S	DM	неприменимо	[116]
	R157H	DCM (AD)	неприменимо	[117]
	A171T	CC (AD)	пластинчатая	[84]
	450delA (K150NfsX35)	CC (AD)	задняя полярная	[118]
	464delCT (P155Rfs9)	MFM (AD)	неприменимо	[115]
	343delT (S115fs129X)	MFM (AR; infantile onset)	неприменимо	[119]
	514delG (Ala172ProfsTer14)	CC, MFM (AD)	неприменимо	[120]
	X176Wfs19	DCM, CC (AD)	неизвестно	[121]
	X176Yfs19	CC (AD)	задняя полярная	[122]

Примечание. Принятые сокращения: ACD – α-кристаллиновый домен; AxM/DM/MFM, axial/distal/myofibrillar myopathy – аксиальная/дистальная/миофибриллярная миопатия; CTE – *C*-концевое удлинение; CC – врождённая катаракта; DCM – дилатационная кардиомиопатия; DRM – миопатия, ассоциированная с десмином; NTD – *N*-концевой домен; RCM – рестриктивная кардиомиопатия (AD – аутосомально-доминантная; AR – аутосомально-рецессивная).

Большинство мутаций в домене NTD αA-кристаллина, вызывающих катаракту, являются доминантными миссенс-мутациями консервативного остатка аргинина. Одна нонсенс-мутация (W9X) вызывает появление укороченной формы αA-кристаллина, дающей начало рецессивной врождённой катаракте (табл. 2). Аналогично, мутации в домене NTD αB-кристаллина также являются миссенс-мутациями консервативных остатков аргинина (R11H, R12C, R56W) и пролина (P20R), что приводит к доминантной или рецессивной врождённым катарактам. Биофизические исследования мутаций в *N*-концевых участках, вызывающих катаракту (R11H, P20S R56W), показали, что мутант R11H образует более мелкие олигомеры, тогда как мутанты P20S и R56W образуют более крупные олигомеры, чем олигомеры, генерируемые αB-кристаллином дикого типа. Мутант P20S показал более низкую термостабильность, чем белок дикого типа. Мутанты P20S и R56W проявляли более низкую шаперонную активность, чем αB-кристаллин дикого типа, при тестировании против УФ-облученного β_L-кристаллина, используемого в качестве субстрата [123]. В αA- и αB-кристаллинах домен ACD участвует в процессе образования димера. Этот домен состоит из консервативных аминокислотных остатков, образующих β-сэндвич-домен. Мутации, вызывающие катаракту в ACD αA-кристаллина, за-

трагивают консервативные остатки глицина и аргинина (G98R и R116C соответственно; табл. 2). Рекомбинантный αA-кристаллин с мутацией R116C демонстрирует структурные изменения, приводящие к увеличению полидисперсности и снижению обмена субъединиц и активности шаперонов [124, 125]. Мутация G98R в αA-кристаллине вызывает пресенильную (раннюю) катаракту с дебютом в возрасте ~18 лет [95]. Исследования, проведённые в нашей лаборатории, показали, что мутант G98R претерпевает нарушение фолдинга, в результате чего происходит образование телец включения [126]. При солюбилизации и рефолдинге мутантный белок демонстрировал изменения вторичной, третичной и четвертичной структур и образовывал более крупные олигомеры, лишённые шаперонной активности [126]. Мутации в αB-кристаллине, ассоциированные с развитием катаракты и/или миопатии, происходят в домене ACD, затрагивая остатков аргинина и аспарагиновой кислоты (R69C, D109H, R120G и D140N; табл. 3). Биофизические и биохимические исследования мутантной формы R120G αB-кристаллина выявили изменения во вторичной и четвертичной структурах этого белка и пониженную шаперонную активность [125, 127]. Мутантная форма R120G αB-кристаллина аномально взаимодействовала с компонентами клетки (например, с десмином), в результате чего происходило образование белковых агрегатов, токсичных для клетки [128]. Изучение мутантных форм R69C и D109H выявило изменения в их структуре (вторичной, третичной и четвертичной), повышенную склонность к амилоидогенезу и снижение шапероноподобной активности [129]. Мутация D140N оказывала влияние на третичную/четвертичную структуру αB-кристаллина, что приводило к более крупным агрегатам и снижению термостабильности [114]. Мутант D140N лишён шапероноподобной активности и ингибирует шаперонную функцию αB-кристаллина дикого типа, проявляя себя как доминантно-негативный мутант [114]. Аминокислотные остатки D109, R120 и D140 являются высококонсервативными и образуют ключевую структуру домена типа β-сэндвич: поверхность димера образует основу общей бороздки с остатками R120, присутствующими на обоих концах, взаимодействующими с D109 с образованием солевого мостика, который помогает для создания общей интерфейсной бороздки в αB-кристаллине [130]. Доминантные мутации, такие как R120G или D109G, разрушают этот солевой мостик, тем самым нарушая структуру бороздки и конформацию расширенного домена типа β-сэндвич [112, 130]. Аналогичным образом, остаток D140, располагающийся на шпилечной петле, соединяющей β8–β9, образует солевой мостик с остатком H83, расположенным на дуге β3/β4 в β-сэндвич-домене [114, 130]. Следовательно, можно было ожидать, что все три мутации повлияют на ионно-парные взаимодействия, происходящие в петле и дуге и связанные с формой расширенного нижнего листа димера.

C-Концевой участок α-кристаллина важен для гибкости белковой молекулы и её растворимости. Доминантные мутации G154S и R157H в этом участке вызывают лёгкую кардиомиопатию без развития катаракты, тогда как мутация A171T вызывает врождённую пластинчатую катаракту (табл. 3). Исследование мутантных по *C*-концу форм (G154S, R157H и A171T) показало, что мутантная форма R157H образует более мелкие олигомеры, чем αB-кристаллин дикого типа. Мутанты проявляли более низкую термостабильность и образовывали агрегаты при более низкой температуре, чем белок дикого типа. Они также различались по образованию гетероолигомерных комплексов с HspB4 и HspB6. Шаперонная активность мутантных форм G154S и A171T была ниже, чем αB-кристаллина дикого типа [131]. Однако нонсенс-мутация A152del в αA-кристаллине [103] и мутации со сдвигом рамки считывания Ala172ProfsTer14, X176Wfs19 и X176Yfs19 в αB-кристаллине [121, 122] оказались связаны с аутосомально-доминантными врождёнными катарактами. Недавно была идентифицирована новая доминантная мутация со сдвигом рамки считывания – c.514delG (p.Ala172ProfsTer14), которая вызывает мультисистемное заболевание, характеризующееся врождёнными катарактами, гипотонией, миопатией, нарушением дыхания и дисфагией [120]. Эта новая мутация приводит к сдвигу рамки считывания в позиции Ala172, приводя к добавлению 12 новых а.о. и удлинению молекулы белка до 184 а.о. Биоинформационный анализ показал повышенную гидрофобность и снижение гибкости *C*-концевого домена мутантного белка, что в конечном итоге влияет на его растворимость и шаперонную активность [120]. Мутация p.X176Y приводит к потере стоп-кодона, приводя к добавлению 19 а.о. к αB-кристаллину дикого типа [122]. Биоинформатический анализ предсказал, что добавление 19 а.о. вызывает образование новых вторичных структур (α-спираль и случайный клубок) и образует удлинённую цепь в третичной структуре, что делает мутантный белок патогенным для клетки из-за повышения его гидрофобности и снижения его стабильности [122].

МУТАЦИИ α-КРИСТАЛЛИНА И ИХ ВЛИЯНИЕ НА АГРЕГАЦИЮ БЕЛКА

Большинство мутаций α-кристаллинов, представленных в табл. 2 и 3, являются аутосомно-доминантными негативными мутациями. Мутации α-кристаллинов могут индуцировать разворачивание белков и образование гомо- и гетероагрегатов, которые могут быть токсичными для клетки. Различные мутантные формы αA- и αB-кристаллинов при экспрессии в бактериях/клетках образуют агрегаты/тельца включения (табл. 4).

Как показано в табл. 4, различные ассоциированные с катарактой мутантные формы αA-кристаллина образуют тельца включения/агрегаты. Отдельные мутантные формы αA-кристаллинов (например, R49C и R54C) образуют агрегаты в ядре. Исследования на мышиной модели с нокаутом показали, что мутация R49C приводит к снижению растворимости и повышению гидрофобности белка. Мутантный белок агрегирует с образованием катаракты, вероятно, за счёт повышенной гидрофобности и связывания с β- и γ-кристаллинами [141].

Различные исследования, включая наши недавние результаты, показывают, что в мутантной форме R54C наблюдаются лишь небольшие структурные изменения, и её шаперонная активность сравнима с активностью белка дикого типа [133, 142]. Мы обнаружили, что, в отличие от диффузной локализации αA-кристаллина дикого типа в цитоплазме клеток эпителия хрусталика SRA01/04, мутантная форма R54C αA-кристаллина образует спеклы в цитоплазме и в ядре. Она также сильнее связывалась с нуклеосомными гистонами, чем белок дикого типа, и вызывала стрессоподобный ответ и апоптоз [133]. Изучение вызывающих врождённую катаракту мутаций остатка R54 (R54C, R54L, R54P) показало, что эти замены приводят к структурным изменениям, понижают термостабильность белка, снижают шаперонную активность и повышают склонности к амилоидогенезу [143].

Ранее нами было показано, что мутантная форма G98R αA-кристаллина, при её экспрессии в бактериальных клетках, образует агрегаты и тельца включения [126]. Она также проявляет изменённую шапероноподобную активность, которая модулируется ионами Cu^{2+} [126, 144, 145].

Аналогично, различные вызывающие болезни мутации αB-кристаллина приводят к образованию телец включения/агрегатов (табл. 4). Исследование Raju и Abraham [135], посвящённое изучению различных мутаций αB-кристаллина, вызывающих врождённую катаракту и кардиомиопатию в клетках млекопитающих, показало, что мутантные формы D109H, R120G, D140N и R157H образуют больше агрегатов, чем другие мутантные белки [135]. Однако следует отметить, что для мечения мутантных белков авторы использовали в своей работе жёлтый флуоресцентный белок (YFP). Поэтому нельзя исключить, что этот флуоресцентный белок, слитый с мутантным белком, мог бы влиять на его агрегацию. В различных экспериментах *in vitro*, *ex vivo* или *in vivo* (на трансгенных мышах) была показана агрегация и образование телец включения мутантной формой R120G αB-кристаллина, взаимодействующей с десмином [128, 137, 146].

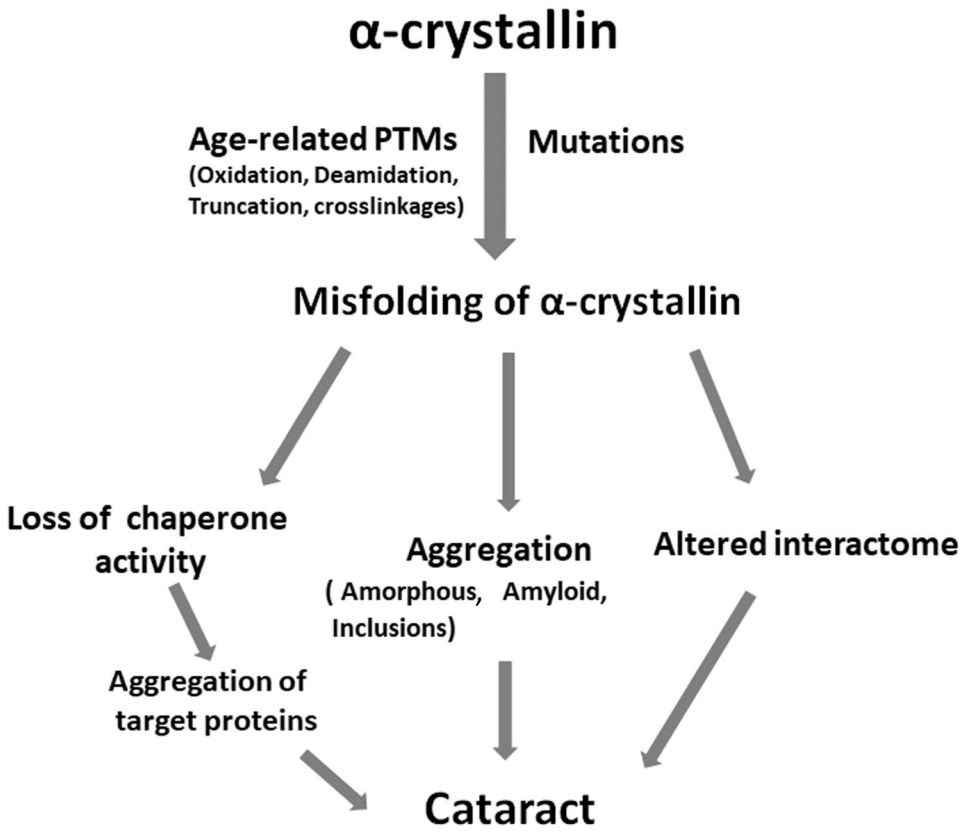
Существует два типа агрегации белка – аморфная и хорошо упорядоченная амилоидно-фибриллярная агрегация. Как было отмечено выше, амилоидные агрегаты были обнаружены в хрусталике глаза при катаракте. В исследованиях *in vitro* было показано, что кристаллины, включая α-кристаллин, образуют амилоидные агрегаты в денатурирующих условиях [147]. Возникает вопрос о том, могут ли при катаракте, кроме аморфной агрегации, также образовываться амилоиды? При агрегации белков действительно наблюдается конкуренция между аморфной и упорядоченной амилоидной агрегацией [148]. Изучение катаракт у мышей показало, что рекомбинантный мышиный мутантный белок $\gamma B^{пор}$ (усечённый белок, образованный в результате делеции 11 п.н. в третьем экзоне в позиции Ser138 и последующей вставки 4 п.н.) образовывал амилоидные фибриллы *in vitro* (в отличие от белка дикого типа) [149]. Анализ хрусталиков методом 2D-инфракрасной спектроскопии (2DIR) выявил амилоидные β-складчатые структуры в хрусталиках свиньи, облучённых УФ-излучением [7]. Аналогичные исследования хрусталиков человека при катаракте и без неё выявили присутствие амилоидной β-складчатой вторичной структуры в зрелых хрусталиках и при катаракте, в то время как в хрусталиках несовершеннолетних амилоидная структура отсутствовала [8]. Мутантная форма R120G αB-кристаллина *in vitro* образует амилоидные фибриллы более высокого порядка, чем белок дикого типа [150]. Недавнее исследование с использованием 2DIR-спектроскопии показало наличие амилоидоподобной структуры в хрусталиках мышей с нокаутом *Cryab*-R120G, что указывает на возможность образования α-кристаллином амилоидных агрегатов в условиях *in vivo* [9]. Было показано, что антитела против амилоидных олигомеров распознают агрегаты R120G αB-кристаллина в модели трансгенных мышей [137]. Эти исследования показывают, что как образование амилоида, так и аморфная агрегация могут иметь место во время развития

Таблица 4. Агрегаты, образуемые различными мутантными формами αA- и αB-кристаллинов

Мутантная форма	Морфология агрегатов (экспрессированы в бактериях/клеточных линиях)	Ссылки
R12L αA-кристаллин	большие цитоплазматические агрегаты и агресомы (клетки HeLa)	[132]
R12C αA-кристаллин	цитоплазматические агрегаты и агресомы (клетки HeLa)	[132]
R21L αA-кристаллин	цитоплазматические агрегаты и агресомы (клетки HeLa)	[132]
R21W αA-кристаллин	цитоплазматические агрегаты и агресомы (клетки HeLa)	[132]
R49C αA-кристаллин	цитоплазматические агрегаты и агресомы (клетки HeLa) ядерные спеклы в эпителиальных клетках хрусталика человека (HLE-B3)	[132] [89]
R54C αA-кристаллин	ядерные спеклы в эпителиальных клетках хрусталика человека (HLE-B3) ядерные агрегаты в эпителиальных клетках хрусталика человека (SRA 01/04)	[132] [133]
G98R αA-кристаллин	тельца включения при экспрессии в бактериальных клетках агрегаты в ЭР при экспрессии в эпителиальных клетках хрусталика человека (HLE-B3)	[126] [134]
R116C αA-кристаллин	цитоплазматические агрегаты и агресомы (клетки HeLa)	[132]
R116H αA-кристаллин	цитоплазматические агрегаты и агресомы (клетки HeLa)	[100]
p.116_118del αA-кристаллин	агрегаты в ядерной периферической мембране и ядре в эпителиальных клетках хрусталика человека (HLEpiCs)	[100]
R11H αB-кристаллин	цитоплазматические агрегаты в клетках HeLa	[135]
P20S αB-кристаллин	цитоплазматические агрегаты в клетках HeLa	[135]
D109G αB-кристаллин	цитоплазматические агрегаты в скелетных и сердечных миоцитах	[111]
D109H αB-кристаллин	цитоплазматические агрегаты в клетках HeLa	[135]
R120G αB-кристаллин	тельца включения (агресомы) в клетках PTK2, NIH-BT3 и CCL39 агрегаты агресомы в неонатальных кардиомиоцитах крысы цитоплазматические агрегаты в кардиомиоцитах и клетках COS-7 цитоплазматические агрегаты в клетках HeLa	[136] [137] [62] [135]
D140N αB-кристаллин	цитоплазматические агрегаты в клетках HeLa	[135]
Q151X αB-кристаллин	цитоплазматические агрегаты в кардиомиоцитах и клетках COS-7 цитоплазматические агрегаты в клетках MCF7	[62] [138]
G154S αB-кристаллин	цитоплазматические агрегаты в клетках HeLa	[135]
R157H αB-кристаллин	цитоплазматические агрегаты в клетках HeLa	[135]
A171T αB-кристаллин	цитоплазматические агрегаты в клетках HeLa	[135]
343delT αB-кристаллин	тельца включения при экспрессии в бактериальных клетках цитоплазматические агрегаты в мышечных и не мышечных клетках	[135] [139]
450delA αB-кристаллин	цитоплазматические агрегаты в клетках H9c2	[140]
464delCT αB-кристаллин	цитоплазматические агрегаты в кардиомиоцитах и клетках COS-7 цитоплазматические агрегаты в клетках H9c2 цитоплазматические агрегаты в клетках MCF7	[62] [140] [138]

катаракты. Поэтому было бы интересно понять механизмы агрегации α-кристаллинов *per se* и влияние вызывающих болезни мутаций на склонность кристаллинов к агрегации и на механизмы этого процесса.

Необходимы дальнейшие исследования, чтобы проанализировать механизмы агрегации α-кристаллина, индуцированные мутациями, способствующими возникновению болезней. Возможно, нарушение нативной структуры в



Роль возрастных модификаций и мутаций α-кристаллина в развитии катаракты

результате мутаций приводит к обнажению уже существующих областей, склонных к агрегации, которые в противном случае скрыты или замаскированы в складчатой структуре, поскольку эти области являются важными факторами, способствующими не только агрегации, но и неадекватным взаимодействиям α-кристаллина с компонентами клетки. Таким образом, исследования, включающие экспериментальные перекрёстные сшивки для выявления белковых сегментов, участвующих в межмолекулярных взаимодействиях, изучение их изменений в результате мутаций, выявление нативных последовательностей/участков интерфейсов олигомеров и белковых фрагментов, образующихся в ходе процесса агрегации, будут способствовать нашему пониманию механизма агрегации α-кристаллина при формировании катаракты.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Исследования, проведённые в последние годы, показали, что α-кристаллин сохраняет кристаллическую природу и прозрачность хрусталиков глаза, участвуя в упаковке βγ-кристаллинов и предотвращая их агрегацию. На рисунке показано как посттрансляционные модификации и мутации могут привести к развитию катаракты. Различные возрастные модификации и мутации α-кристаллина или нарушают структуру этих белков, или снижают их шаперонную функцию, что приводит к агрегации белков-мишеней, образованию агрегатов (амилоиды, аморфные структуры, включения) и изменению интерактома. Эти процессы могут протекать одновременно или независимо друг от друга, приводя к токсичности для клеток и развитию катаракты (рисунок). Мутации в αA-кристаллине часто приводят к развитию врождённых катаракт. Поскольку экспрессия αB-кристаллина происходит повсеместно, мутации αB-кристаллина могут привести не только к катаракте, но к и другим заболеваниям, таким как миопатии. Поэтому разработка стратегий предотвращения агрегации или образования включений из-за возрастных модификаций или мутаций имеет значение для лечения и профилактики катаракты и болезней, ассоциированных с агрегацией белков. Некоторые стеролы показали многообещающие эффекты в лечении катаракты у экспериментальных животных [151, 152]. Интересно, что пептиды, полу-

ченные из шаперонных участков αA- и αB-кристаллинов (так называемые мини-шапероны) проявляют терапевтический потенциал в отношении катаракты и других болезней, связанных с агрегацией белков [153]. Идентификация сегментов, которые участвуют в межмолекулярных взаимодействиях (как нативные интерфейсы олигомеров, так и области, опосредующие агрегацию), и выяснение эффектов мутаций на эти взаимодействия будут полезны при разработке подходов к предотвращению возникновения и/или прогрессирования катаракты.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

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

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Chou, C. F., Cotch, M. F., Vitale, S., Zhang, X., Klein, R., et al. (2013) Age-related eye diseases and visual impairment among U.S. adults, *Am. J. Prev. Med.*, **45**, 29-35, doi: 10.1016/j.amepre.2013.02.018.
2. Bloemendal, H., de Jong, W., Jaenicke, R., Lubsen, N. H., Slingsby, C., et al. (2004) Ageing and vision: structure, stability and function of lens crystallins, *Prog. Biophys. Mol. Biol.*, **86**, 407-485, doi: 10.1016/j.pbiomolbio.2003.11.012.
3. Delaye, M., and Tardieu, A. (1983) Short-range order of crystallin proteins accounts for eye lens transparency, *Nature*, **302**, 415-417, doi: 10.1038/302415a0.
4. Benedek, G. B. (1971) Theory of transparency of the eye, *Appl. Opt.*, **10**, 459-473, doi: 10.1364/AO.10.000459.
5. Hanson, S. R., Hasan, A., Smith, D. L., and Smith, J. B. (2000) The major *in vivo* modifications of the human water-insoluble lens crystallins are disulfide bonds, deamidation, methionine oxidation and backbone cleavage, *Exp. Eye Res.*, **71**, 195-207, doi: 10.1006/exer.2000.0868.
6. Harding, J. J. (2002) Viewing molecular mechanisms of ageing through a lens, *Ageing Res. Rev.*, **1**, 465-479, doi: 10.1016/s1568-1637(02)00012-0.
7. Zhang, T. O., Alperstein, A. M., and Zanni, M. T. (2017) Amyloid beta-sheet secondary structure identified in UV-induced cataracts of porcine lenses using 2D IR spectroscopy, *J. Mol. Biol.*, **429**, 1705-1721, doi: 10.1016/j.jmb.2017.04.014.
8. Alperstein, A. M., Ostrander, J. S., Zhang, T. O., and Zanni, M. T. (2019) Amyloid found in human cataracts with two-dimensional infrared spectroscopy, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **116**, 6602-6607, doi: 10.1073/pnas.1821534116.
9. Alperstein, A. M., Molnar, K. S., Dicke, S. S., Farrell, K. M., Makley, L. N., et al. (2021) Analysis of amyloid-like secondary structure in the Cryab-R120G knock-in mouse model of hereditary cataracts by two-dimensional infrared spectroscopy, *PLoS One*, **16**, e0257098, doi: 10.1371/journal.pone.0257098.
10. Mörner, C. T. (1894) Untersuchung der Proteïnsubstanzen in den leichtbrechenden Medien des Auges I [in German], *bchm*, **18**, 61-106, doi: 10.1515/bchm1.1894.18.1.61.
11. Roy, D., and Spector, A. (1976) Absence of low-molecular-weight alpha crystallin in nuclear region of old human lenses, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **73**, 3484-3487, doi: 10.1073/pnas.73.10.3484.
12. Horwitz, J., Bova, M. P., Ding, L. L., Haley, D. A., and Stewart, P. L. (1999) Lens alpha-crystallin: Function and structure, *Eye (Lond)*, **13 (Pt. 3b)**, 403-408, doi: 10.1038/eye.1999.114.
13. Bakthisaran, R., Tangirala, R., and Rao, Ch. M. (2015) Small heat shock proteins: Role in cellular functions and pathology, *Biochim. Biophys. Acta*, **1854**, 291-319, doi: 10.1016/j.bbapap.2014.12.019.
14. Kappe, G., Franck, E., Verschuure, P., Boelens, W. C., Leunissen, J. A., et al. (2003) The human genome encodes 10 alpha-crystallin-related small heat shock proteins: HspB1-10, *Cell Stress Chaperones*, **8**, 53-61, doi: 10.1379/1466-1268(2003)8<53:thgecs>2.0.co;2.
15. Ingolia, T. D., and Craig, E. A. (1982) Four small Drosophila heat shock proteins are related to each other and to mammalian alpha-crystallin, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **79**, 2360-2364, doi: 10.1073/pnas.79.7.2360.
16. Horwitz, J. (1992) Alpha-crystallin can function as a molecular chaperone, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **89**, 10449-10453, doi: 10.1073/pnas.89.21.10449.
17. Raman, B., and Rao, C. M. (1994) Chaperone-like activity and quaternary structure of alpha-crystallin, *J. Biol. Chem.*, **269**, 27264-27268.
18. Raman, B., Ramakrishna, T., and Rao, C. M. (1995) Temperature dependent chaperone-like activity of alpha-crystallin, *FEBS Lett.*, **365**, 133-136, doi: 10.1016/0014-5793(95)00440-k.
19. Rajaraman, K., Raman, B., Ramakrishna, T., and Rao, C. M. (1998) The chaperone-like alpha-crystallin forms a complex only with the aggregation-prone molten globule state of alpha-lactalbumin, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **249**, 917-921, doi: 10.1006/bbrc.1998.9242.
20. Raman, B., and Rao, C. M. (1997) Chaperone-like activity and temperature-induced structural changes of alpha-crystallin, *J. Biol. Chem.*, **272**, 23559-23564, doi: 10.1074/jbc.272.38.23559.
21. Datta, S. A., and Rao, C. M. (1999) Differential temperature-dependent chaperone-like activity of alphaA- and alphaB-crystallin homoaggregates, *J. Biol. Chem.*, **274**, 34773-34778, doi: 10.1074/jbc.274.49.34773.
22. Rajaraman, K., Raman, B., Ramakrishna, T., and Rao, C. M. (2001) Interaction of human recombinant alphaA- and alphaB-crystallins with early and late unfolding intermediates of citrate synthase on its thermal denaturation, *FEBS Lett.*, **497**, 118-123, doi: 10.1016/s0014-5793(01)02451-6.
23. Goenka, S., Raman, B., Ramakrishna, T., and Rao, C. M. (2001) Unfolding and refolding of a quinone oxidoreductase: alpha-crystallin, a molecular chaperone, assists its reactivation, *Biochem. J.*, **359**, 547-556, doi: 10.1042/0264-6021:3590547.
24. Sathish, H. A., Koteiche, H. A., and McHaourab, H. S. (2004) Binding of destabilized betaB2-crystallin mutants to alpha-crystallin: the role of a folding intermediate, *J. Biol. Chem.*, **279**, 16425-16432, doi: 10.1074/jbc.M313402200.
25. McHaourab, H. S., Dodson, E. K., and Koteiche, H. A. (2002) Mechanism of chaperone function in small heat shock proteins. Two-mode binding of the excited states of T4 lysozyme mutants by alphaA-crystallin, *J. Biol. Chem.*, **277**, 40557-40566, doi: 10.1074/jbc.M206250200.

26. Koteiche, H. A., and McHaourab, H. S. (2003) Mechanism of chaperone function in small heat-shock proteins. Phosphorylation-induced activation of two-mode binding in alphaB-crystallin, *J. Biol. Chem.*, **278**, 10361-10367, doi: 10.1074/jbc.M211851200.
27. Hatters, D. M., Lindner, R. A., Carver, J. A., and Howlett, G. J. (2001) The molecular chaperone, alpha-crystallin, inhibits amyloid formation by apolipoprotein C-II, *J. Biol. Chem.*, **276**, 33755-33761, doi: 10.1074/jbc.M105285200.
28. Devlin, G. L., Carver, J. A., and Bottomley, S. P. (2003) The selective inhibition of serpin aggregation by the molecular chaperone, alpha-crystallin, indicates a nucleation-dependent specificity, *J. Biol. Chem.*, **278**, 48644-48650, doi: 10.1074/jbc.M308376200.
29. Raman, B., Ban, T., Sakai, M., Pasta, S. Y., Ramakrishna, T., et al. (2005) AlphaB-crystallin, a small heat-shock protein, prevents the amyloid fibril growth of an amyloid beta-peptide and beta2-microglobulin, *Biochem. J.*, **392**, 573-581, doi: 10.1042/BJ20050339.
30. Shammas, S. L., Waudby, C. A., Wang, S., Buell, A. K., Knowles, T. P., et al. (2011) Binding of the molecular chaperone alphaB-crystallin to Abeta amyloid fibrils inhibits fibril elongation, *Biophys. J.*, **101**, 1681-1689, doi: 10.1016/j.bpj.2011.07.056.
31. Narayan, P., Meehan, S., Carver, J. A., Wilson, M. R., Dobson, C. M., et al. (2012) Amyloid-beta oligomers are sequestered by both intracellular and extracellular chaperones, *Biochemistry*, **51**, 9270-9276, doi: 10.1021/bi301277k.
32. Haslbeck, M., Peschek, J., Buchner, J., and Weinkauf, S. (2016) Structure and function of alpha-crystallins: Traversing from *in vitro* to *in vivo*, *Biochim. Biophys. Acta*, **1860**, 149-166, doi: 10.1016/j. bbagen. 2015.06.008.
33. Santhoshkumar, P., Murugesan, R., and Sharma, K. K. (2009) Deletion of (54)FLRAPSWF(61) residues decreases the oligomeric size and enhances the chaperone function of alphaB-crystallin, *Biochemistry*, **48**, 5066-5073, doi: 10.1021/bi900085v.
34. Pasta, S. Y., Raman, B., Ramakrishna, T., and Rao, Ch. M. (2003) Role of the conserved SRLFDQFFG region of alpha-crystallin, a small heat shock protein. Effect on oligomeric size, subunit exchange, and chaperone-like activity, *J. Biol. Chem.*, **278**, 51159-51166, doi: 10.1074/jbc.M307523200.
35. Jehle, S., Vollmar, B. S., Bardiaux, B., Dove, K. K., Rajagopal, P., et al. (2011) N-terminal domain of alphaB-crystallin provides a conformational switch for multimerization and structural heterogeneity, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **108**, 6409-6414, doi: 10.1073/pnas.1014656108.
36. Pasta, S. Y., Raman, B., Ramakrishna, T., and Rao, Ch., M. (2002) Role of the C-terminal extensions of alpha-crystallins. Swapping the C-terminal extension of alpha-crystallin to alphaB-crystallin results in enhanced chaperone activity, *J. Biol. Chem.*, **277**, 45821-45828, doi: 10.1074/jbc.M206499200.
37. Treweek, T. M., Ecroyd, H., Williams, D. M., Meehan, S., Carver, J. A., and Walker, M. J. (2007) Site-directed mutations in the C-terminal extension of human alphaB-crystallin affect chaperone function and block amyloid fibril formation, *PLoS One*, **2**, e1046, doi: 10.1371/journal.pone.0001046.
38. Kumar, L. V., and Rao, C. M. (2000) Domain swapping in human alpha A and alpha B crystallins affects oligomerization and enhances chaperone-like activity, *J. Biol. Chem.*, **275**, 22009-22013, doi: 10.1074/jbc.M003307200.
39. Peschek, J., Braun, N., Franzmann, T. M., Georgalis, Y., Haslbeck, M., et al. (2009) The eye lens chaperone alpha-crystallin forms defined globular assemblies, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **106**, 13272-13277, doi: 10.1073/pnas.0902651106.
40. Kaiser, C. J. O., Peters, C., Schmid, P. W. N., Stavropoulou, M., Zou, J., et al. (2019) The structure and oxidation of the eye lens chaperone alphaA-crystallin, *Nat. Struct. Mol. Biol.*, **26**, 1141-1150, doi: 10.1038/s41594-019-0332-9.
41. McCarty, C. A., and Taylor, H. R. (2002) A review of the epidemiologic evidence linking ultraviolet radiation and cataracts, *Dev. Ophthalmol.*, **35**, 21-31, doi: 10.1159/000060807.
42. Kamei, A. (1990) Characterization of water-insoluble proteins in normal and cataractous human lens, *Jpn. J. Ophthalmol.*, **34**, 216-224.
43. Harrington, V., McCall, S., Huynh, S., Srivastava, K., and Srivastava, O. P. (2004) Crystallins in water soluble-high molecular weight protein fractions and water insoluble protein fractions in aging and cataractous human lenses, *Mol. Vis.*, **10**, 476-489.
44. Sharma, K. K., and Santhoshkumar, P. (2009) Lens aging: Effects of crystallins, *Biochim. Biophys. Acta*, **1790**, 1095-1108, doi: 10.1016/j.bbagen.2009.05.008.
45. Wilmarth, P. A., Tanner, S., Dasari, S., Nagalla, S. R., Riviere, M. A., et al. (2006) Age-related changes in human crystallins determined from comparative analysis of post-translational modifications in young and aged lens: Does deamidation contribute to crystallin insolubility? *J. Proteome Res.*, **5**, 2554-2566, doi: 10.1021/pr050473a.
46. Lapko, V. N., Smith, D. L., and Smith, J. B. (2001) *In vivo* carbamylation and acetylation of water-soluble human lens alphaB-crystallin lysine 92, *Protein Sci.*, **10**, 1130-1136, doi: 10.1110/ps.40901.
47. Taylor, H. R., West, S. K., Rosenthal, F. S., Munoz, B., Newland, H. S., et al. (1988) Effect of ultraviolet radiation on cataract formation, *N. Engl. J. Med.*, **319**, 1429-1433, doi: 10.1056/NEJM198812013192201.
48. Korlimbinis, A., Hains, P. G., Truscott, R. J., and Aquilina, J. A. (2006) 3-Hydroxykynurenine oxidizes alpha-crystallin: Potential role in cataractogenesis, *Biochemistry*, **45**, 1852-1860, doi: 10.1021/bi051737+.
49. Anbaraki, A., Ghahramani, M., Muranov, K. O., Kurganov, B. I., and Yousefi, R. (2018) Structural and functional alteration of human alphaA-crystallin after exposure to full spectrum solar radiation and preventive role of lens antioxidants, *Int. J. Biol. Macromol.*, **118**, 1120-1130, doi: 10.1016/j.ijbiomac.2018.06.136.
50. Lin, S. Y., Ho, C. J., and Li, M. J. (1999) UV-B-induced secondary conformational changes in lens alpha-crystallin, *J. Photochem. Photobiol. B*, **49**, 29-34, doi: 10.1016/S1011-1344(99)00010-X.
51. Rajan, S., Horn, C., and Abraham, E. C. (2006) Effect of oxidation of alphaA- and alphaB-crystallins on their structure, oligomerization and chaperone function, *Mol. Cell. Biochem.*, **288**, 125-134, doi: 10.1007/s11010-006-9128-4.
52. Chaves, J. M., Srivastava, K., Gupta, R., and Srivastava, O. P. (2008) Structural and functional roles of deamidation and/or truncation of N- or C-termini in human alpha A-crystallin, *Biochemistry*, **47**, 10069-10083, doi: 10.1021/bi8001902.
53. Gupta, R., and Srivastava, O. P. (2004) Deamidation affects structural and functional properties of human alphaA-crystallin and its oligomerization with alphaB-crystallin, *J. Biol. Chem.*, **279**, 44258-44269, doi: 10.1074/jbc.M405648200.
54. Gupta, R., and Srivastava, O. P. (2004) Effect of deamidation of asparagine 146 on functional and structural properties of human lens alphaB-crystallin, *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.*, **45**, 206-214, doi: 10.1167/iovs.03-0720.
55. Grey, A. C., and Schey, K. L. (2009) Age-related changes in the spatial distribution of human lens alpha-crystallin products by MALDI imaging mass spectrometry, *Invest.*

Ophthalmol. Vis. Sci., **50**, 4319-4329, doi: 10.1167/iovs.09-3522.
56. MacCoss, M. J., McDonald, W. H., Saraf, A., Sadygov, R., Clark, J. M., et al. (2002) Shotgun identification of protein modifications from protein complexes and lens tissue, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **99**, 7900-7905, doi: 10.1073/pnas.122231399.
57. Huang, C. H., Wang, Y. T., Tsai, C. F., Chen, Y. J., Lee, J. S., et al. (2011) Phosphoproteomics characterization of novel phosphorylated sites of lens proteins from normal and cataractous human eye lenses, *Mol. Vis.*, **17**, 186-198.
58. Bakthisaran, R., Akula, K. K., Tangirala, R., and Rao, Ch., M. (2016) Phosphorylation of alphaB-crystallin: Role in stress, aging and patho-physiological conditions, *Biochim. Biophys. Acta*, **1860**, 167-182, doi: 10.1016/j.bbagen.2015.09.017.
59. Muranova, L. K., Sudnitsyna, M. V., and Gusev, N. B. (2018) AlphaB-crystallin phosphorylation: advances and problems, *Biochemistry (Moscow)*, **83**, 1196-1206, doi: 10.1134/S000629791810005X.
60. Carver, J. A., Nicholls, K. A., Aquilina, J. A., and Truscott, R. J. (1996) Age-related changes in bovine alpha-crystallin and high-molecular-weight protein, *Exp. Eye Res.*, **63**, 639-647, doi: 10.1006/exer.1996.0158.
61. Den Engelsman, J., Gerrits, D., de Jong, W. W., Robbins, J., Kato, K., et al. (2005) Nuclear import of {alpha}B-crystallin is phosphorylation-dependent and hampered by hyperphosphorylation of the myopathy-related mutant R120G, *J. Biol. Chem.*, **280**, 37139-37148, doi: 10.1074/jbc.M504106200.
62. Simon, S., Fontaine, J. M., Martin, J. L., Sun, X., Hoppe, A. D., et al. (2007) Myopathy-associated alphaB-crystallin mutants: Abnormal phosphorylation, intracellular location, and interactions with other small heat shock proteins, *J. Biol. Chem.*, **282**, 34276-34287, doi: 10.1074/jbc.M703267200.
63. Lyon, Y. A., Sabbah, G. M., and Julian, R. R. (2018) Differences in alpha-Crystallin isomerization reveal the activity of protein isoaspartyl methyltransferase (PIMT) in the nucleus and cortex of human lenses, *Exp. Eye Res.*, **171**, 131-141, doi: 10.1016/j.exer.2018.03.018.
64. Takata, T., and Fujii, N. (2016) Isomerization of Asp residues plays an important role in alphaA-crystallin dissociation, *FEBS J.*, **283**, 850-859, doi: 10.1111/febs.13635.
65. Hooi, M. Y., Raftery, M. J., and Truscott, R. J. (2013) Age-dependent racemization of serine residues in a human chaperone protein, *Protein Sci.*, **22**, 93-100, doi: 10.1002/pro.2191.
66. Lyon, Y. A., Collier, M. P., Riggs, D. L., Degiacomi, M. T., Benesch, J. L. P., et al. (2019) Structural and functional consequences of age-related isomerization in alpha-crystallins, *J. Biol. Chem.*, **294**, 7546-7555, doi: 10.1074/jbc.RA118.007052.
67. Lyons, T. J., Silvestri, G., Dunn, J. A., Dyer, D. G., and Baynes, J. W. (1991) Role of glycation in modification of lens crystallins in diabetic and nondiabetic senile cataracts, *Diabetes*, **40**, 1010-1015, doi: 10.2337/diab.40.8.1010.
68. Thorpe, S. R., and Baynes, J. W. (1996) Role of the Maillard reaction in diabetes mellitus and diseases of aging, *Drugs Aging*, **9**, 69-77, doi: 10.2165/00002512-199609020-00001.
69. Stevens, V. J., Rouzer, C. A., Monnier, V. M., and Cerami, A. (1978) Diabetic cataract formation: Potential role of glycosylation of lens crystallins, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **75**, 2918-2922, doi: 10.1073/pnas.75.6.2918.
70. Kumar, P. A., Kumar, M. S., and Reddy, G. B. (2007) Effect of glycation on alpha-crystallin structure and chaperone-like function, *Biochem. J.*, **408**, 251-258, doi: 10.1042/BJ20070989.
71. Schey, K. L., Wang, Z., Friedrich, M. G., Garland, D. L., and Truscott, R. J. W. (2020) Spatiotemporal changes in the human lens proteome: Critical insights into long-lived proteins, *Prog. Retin. Eye Res.*, **76**, 100802, doi: 10.1016/j.preteyeres.2019.100802.
72. Kamei, A., Iwase, H., and Masuda, K. (1997) Cleavage of amino acid residue(s) from the N-terminal region of alpha A- and alpha B-crystallins in human crystalline lens during aging, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **231**, 373-378, doi: 10.1006/bbrc.1997.6105.
73. Jimenez-Asensio, J., Colvis, C. M., Kowalak, J. A., Duglas-Tabor, Y., Datiles, M. B., et al. (1999) An atypical form of alphaB-crystallin is present in high concentration in some human cataractous lenses. Identification and characterization of aberrant N- and C-terminal processing, *J. Biol. Chem.*, **274**, 32287-32294, doi: 10.1074/jbc.274.45.32287.
74. Takemoto, L., Emmons, T., and Horwitz, J. (1993) The C-terminal region of alpha-crystallin: involvement in protection against heat-induced denaturation, *Biochem. J.*, **294 (Pt. 2)**, 435-438, doi: 10.1042/bj2940435.
75. Santhoshkumar, P., Udupa, P., Murugesan, R., and Sharma, K. K. (2008) Significance of interactions of low molecular weight crystallin fragments in lens aging and cataract formation, *J. Biol. Chem.*, **283**, 8477-8485, doi: 10.1074/jbc.M705876200.
76. Su, S. P., McArthur, J. D., and Andrew Aquilina, J. (2010) Localization of low molecular weight crystallin peptides in the aging human lens using a MALDI mass spectrometry imaging approach, *Exp. Eye Res.*, **91**, 97-103, doi: 10.1016/j.exer.2010.04.010.
77. Kannan, R., Santhoshkumar, P., Mooney, B. P., and Sharma, K. K. (2013) The alphaA66-80 peptide interacts with soluble alpha-crystallin and induces its aggregation and precipitation: a contribution to age-related cataract formation, *Biochemistry*, **52**, 3638-3650, doi: 10.1021/bi301662w.
78. Raju, M., Santhoshkumar, P., and Sharma, K. K. (2017) Lens endogenous peptide alphaA66-80 generates hydrogen peroxide and induces cell apoptosis, *Aging Dis.*, **8**, 57-70, doi: 10.14336/AD.2016.0805.
79. Nagaraj, R. H., Nahomi, R. B., Shanthakumar, S., Linetsky, M., Padmanabha, S., et al. (2012) Acetylation of alphaA-crystallin in the human lens: effects on structure and chaperone function, *Biochim. Biophys. Acta*, **1822**, 120-129, doi: 10.1016/j.bbadis.2011.11.011.
80. Wang, Z., Friedrich, M. G., Truscott, R. J. W., and Schey, K. L. (2019) Cleavage C-terminal to Asp leads to covalent crosslinking of long-lived human proteins, *Biochim Biophys Acta Proteins Proteom.*, **1867**, 831-839, doi: 10.1016/j.bbapap.2019.06.009.
81. Litt, M., Kramer, P., LaMorticella, D. M., Murphey, W., Lovrien, E. W., and et al. (1998) Autosomal dominant congenital cataract associated with a missense mutation in the human alpha crystallin gene CRYAA, *Hum. Mol. Genet.*, **7**, 471-474, doi: 10.1093/hmg/7.3.471.
82. Pras, E., Frydman, M., Levy-Nissenbaum, E., Bakhan, T., Raz, J., et al. (2000) A nonsense mutation (W9X) in CRYAA causes autosomal recessive cataract in an inbred Jewish Persian family, *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.*, **41**, 3511-3515.
83. Hansen, L., Yao, W., Eiberg, H., Kjaer, K. W., Baggesen, K., et al. (2007) Genetic heterogeneity in microcornea-cataract: five novel mutations in CRYAA, CRYGD, and GJA8, *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.*, **48**, 3937-3944, doi: 10.1167/iovs.07-0013.
84. Devi, R. R., Yao, W., Vijayalakshmi, P., Sergeev, Y. V., Sundaresan, P., et al. (2008) Crystallin gene mutations in Indian families with inherited pediatric cataract, *Mol. Vis.*, **14**, 1157-1170.

85. Song, Z., Si, N., and Xiao, W. (2018) A novel mutation in the CRYAA gene associated with congenital cataract and microphthalmia in a Chinese family, *BMC Med. Genet.*, **19**, 190, doi: 10.1186/s12881-018-0695-5.
86. Graw, J., Klopp, N., Illig, T., Preising, M. N., and Lorenz, B. (2006) Congenital cataract and macular hypoplasia in humans associated with a de novo mutation in CRYAA and compound heterozygous mutations in P, *Graefes Arch. Clin. Exp. Ophthalmol.*, **244**, 912-919, doi: 10.1007/s00417-005-0234-x.
87. Hansen, L., Mikkelsen, A., Nurnberg, P., Nurnberg, G., Anjum, I., et al. (2009) Comprehensive mutational screening in a cohort of Danish families with hereditary congenital cataract, *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.*, **50**, 3291-3303, doi: 10.1167/iovs.08-3149.
88. Laurie, K. J., Dave, A., Straga, T., Souzeau, E., Chataway, T., et al. (2013) Identification of a novel oligomerization disrupting mutation in CRYAlphaA associated with congenital cataract in a South Australian family, *Hum. Mutat.*, **34**, 435-438, doi: 10.1002/humu.22260.
89. Mackay, D. S., Andley, U. P., and Shiels, A. (2003) Cell death triggered by a novel mutation in the alphaA-crystallin gene underlies autosomal dominant cataract linked to chromosome 21q, *Eur. J. Hum. Genet.*, **11**, 784-793, doi: 10.1038/sj.ejhg.5201046.
90. Khan, A. O., Aldahmesh, M. A., and Meyer, B. (2007) Recessive congenital total cataract with microcornea and heterozygote carrier signs caused by a novel missense CRYAA mutation (R54C), *Am. J. Ophthalmol.*, **144**, 949-952, doi: 10.1016/j.ajo.2007.08.005.
91. Su, D., Guo, Y., Li, Q., Guan, L., Zhu, S., et al. (2012) A novel mutation in CRYAA is associated with autosomal dominant suture cataracts in a Chinese family, *Mol. Vis.*, **18**, 3057-3063.
92. Yang, Z., Su, D., Li, Q., Ma, Z., Yang, F., et al. (2013) A R54L mutation of CRYAA associated with autosomal dominant nuclear cataracts in a Chinese family, *Curr. Eye Res.*, **38**, 1221-1228, doi: 10.3109/02713683.2013.811260.
93. Patel, R., Zenith, R. K., Chandra, A., and Ali, A. (2017) Novel mutations in the crystallin gene in age-related cataract patients from a North Indian population, *Mol. Syndromol.*, **8**, 179-186, doi: 10.1159/000471992.
94. Bhagyalaxmi, S. G., Srinivas, P., Barton, K. A., Kumar, K. R., Vidyavathi, M., et al. (2009) A novel mutation (F71L) in alphaA-crystallin with defective chaperone-like function associated with age-related cataract, *Biochim. Biophys. Acta*, **1792**, 974-981, doi: 10.1016/j.bbadis.2009.06.011.
95. Santhiya, S. T., Soker, T., Klopp, N., Illig, T., Prakash, M. V., et al. (2006) Identification of a novel, putative cataract-causing allele in CRYAA (G98R) in an Indian family, *Mol. Vis.*, **12**, 768-773.
96. Vanita, V., Singh, J. R., Hejtmancik, J. F., Nuernberg, P., Hennies, H. C., et al. (2006) A novel fan-shaped cataract-microcornea syndrome caused by a mutation of CRYAA in an Indian family, *Mol. Vis.*, **12**, 518-522.
97. Li, F. F., Yang, M., Ma, X., Zhang, Q., Zhang, M., et al. (2010) Autosomal dominant congenital nuclear cataracts caused by a CRYAA gene mutation, *Curr. Eye Res.*, **35**, 492-498, doi: 10.3109/02713681003624901.
98. Gu, F., Luo, W., Li, X., Wang, Z., Lu, S., et al. (2008) A novel mutation in AlphaA-crystallin (CRYAA) caused autosomal dominant congenital cataract in a large Chinese family, *Hum. Mutat.*, **29**, 769, doi: 10.1002/humu.20724.
99. Richter, L., Flodman, P., Barria von-Bischhoffshausen, F., Burch, D., Brown, S., et al. (2008) Clinical variability of autosomal dominant cataract, microcornea and corneal opacity and novel mutation in the alpha A crystallin gene (CRYAA), *Am. J. Med. Genet. A*, **146A**, 833-842, doi: 10.1002/ajmg.a.32236.
100. Li, L., Fan, D. B., Zhao, Y. T., Li, Y., Kong, D. Q., et al. (2017) Two novel mutations identified in ADCC families impair crystallin protein distribution and induce apoptosis in human lens epithelial cells, *Sci. Rep.*, **7**, 17848, doi: 10.1038/s41598-017-18222-z.
101. Sun, W., Xiao, X., Li, S., Guo, X., and Zhang, Q. (2011) Mutation analysis of 12 genes in Chinese families with congenital cataracts, *Mol. Vis.*, **17**, 2197-2206.
102. Kong, X. D., Liu, N., Shi, H. R., Dong, J. M., Zhao, Z. H., et al. (2015) A novel 3-base pair deletion of the CRYAA gene identified in a large Chinese pedigree featuring autosomal dominant congenital perinuclear cataract, *Genet. Mol. Res.*, **14**, 426-432, doi: 10.4238/2015.
103. Berry, V., Ionides, A., Pontikos, N., Georgiou, M., Yu, J., et al. (2020) The genetic landscape of crystallins in congenital cataract, *Orphanet. J. Rare Dis.*, **15**, 333, doi: 10.1186/s13023-020-01613-3.
104. Chen, Q., Ma, J., Yan, M., Mothobi, M. E., Liu, Y., et al. (2009) A novel mutation in CRYAB associated with autosomal dominant congenital nuclear cataract in a Chinese family, *Mol. Vis.*, **15**, 1359-1365.
105. Jiao, X., Khan, S. Y., Irum, B., Khan, A. O., Wang, Q., et al. (2015) Missense mutations in CRYAB are liable for recessive congenital cataracts, *PLoS One*, **10**, e0137973, doi: 10.1371/journal.pone.0137973.
106. Liu, M., Ke, T., Wang, Z., Yang, Q., Chang, W., et al. (2006) Identification of a CRYAB mutation associated with autosomal dominant posterior polar cataract in a Chinese family, *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.*, **47**, 3461-3466, doi: 10.1167/iovs.05-1438.
107. Xia, X. Y., Wu, Q. Y., An, L. M., Li, W. W., Li, N., et al. (2014) A novel P20R mutation in the alpha-B crystallin gene causes autosomal dominant congenital posterior polar cataracts in a Chinese family, *BMC Ophthalmol.*, **14**, 108, doi: 10.1186/1471-2415-14-108.
108. Del Bigio, M. R., Chudley, A. E., Sarnat, H. B., Campbell, C., Goobie, S., et al. (2011) Infantile muscular dystrophy in Canadian aboriginals is an alphaB-crystallinopathy, *Ann. Neurol.*, **69**, 866-871, doi: 10.1002/ana.22331.
109. Khan, A. O., Abu Safieh, L., and Alkuraya, F. S. (2010) Later retinal degeneration following childhood surgical aphakia in a family with recessive CRYAB mutation (p.R56W), *Ophthalmic Genet.*, **31**, 30-36, doi: 10.3109/13816810903452047.
110. Fichna, J. P., Potulska-Chromik, A., Miszta, P., Redowicz, M. J., Kaminska, A. M., et al. (2017) A novel dominant D109A CRYAB mutation in a family with myofibrillar myopathy affects alphaB-crystallin structure, *BBA Clin.*, **7**, 1-7, doi: 10.1016/j.bbacli.2016.11.004.
111. Brodehl, A., Gaertner-Rommel, A., Klauke, B., Grewe, S. A., Schirmer, I., et al. (2017) The novel alphaB-crystallin (CRYAB) mutation p.D109G causes restrictive cardiomyopathy, *Hum. Mutat.*, **38**, 947-952, doi: 10.1002/humu.23248.
112. Sacconi, S., Feasson, L., Antoine, J. C., Pecheux, C., Bernard, R., et al. (2012) A novel CRYAB mutation resulting in multisystemic disease, *Neuromuscul. Disord.*, **22**, 66-72, doi: 10.1016/j.nmd.2011.07.004.
113. Vicart, P., Caron, A., Guicheney, P., Li, Z., Prevost, M. C., et al. (1998) A missense mutation in the alphaB-crystallin chaperone gene causes a desmin-related myopathy, *Nat. Genet.*, **20**, 92-95, doi: 10.1038/1765.
114. Liu, Y., Zhang, X., Luo, L., Wu, M., Zeng, R., et al. (2006) A novel alphaB-crystallin mutation associated with autosomal dominant congenital lamellar cataract, *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.*, **47**, 1069-1075, doi: 10.1167/iovs.05-1004.

115. Selcen, D., and Engel, A. G. (2003) Myofibrillar myopathy caused by novel dominant negative alpha B-crystallin mutations, *Ann. Neurol.*, **54**, 804-810, doi: 10.1002/ana.10767.
116. Reilich, P., Schoser, B., Schramm, N., Krause, S., Schessl, J., et al. (2010) The p. G154S mutation of the alpha-B crystallin gene (CRYAB) causes late-onset distal myopathy, *Neuromuscul. Disord.*, **20**, 255-259, doi: 10.1016/j.nmd.2010.01.012.
117. Inagaki, N., Hayashi, T., Arimura, T., Koga, Y., Takahashi, M., et al. (2006) Alpha B-crystallin mutation in dilated cardiomyopathy, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **342**, 379-386, doi: 10.1016/j.bbrc.2006.01.154.
118. Berry, V., Francis, P., Reddy, M. A., Collyer, D., Vithana, E., et al. (2001) Alpha-B crystallin gene (CRYAB) mutation causes dominant congenital posterior polar cataract in humans, *Am. J. Hum. Genet.*, **69**, 1141-1145, doi: 10.1086/324158.
119. Forrest, K. M., Al-Sarraj, S., Sewry, C., Buk, S., Tan, S. V., et al. (2011) Infantile onset myofibrillar myopathy due to recessive CRYAB mutations, *Neuromuscul. Disord.*, **21**, 37-40, doi: 10.1016/j.nmd.2010.11.003.
120. Marcos, A. T., Amoros, D., Munoz-Cabello, B., Galan, F., Rivas Infante, E., et al. (2020) A novel dominant mutation in CRYAB gene leading to a severe phenotype with childhood onset, *Mol. Genet. Genomic Med.*, **8**, e1290, doi: 10.1002/mgg3.1290.
121. Van der Smagt, J. J., Vink, A., Kirkels, J. H., Nelen, M., ter Heide, H., et al. (2014) Congenital posterior pole cataract and adult onset dilating cardiomyopathy: Expanding the phenotype of alphaB-crystallinopathies, *Clin. Genet.*, **85**, 381-385, doi: 10.1111/cge.12169.
122. Yu, Y., Xu, J., Qiao, Y., Li, J., and Yao, K. (2021) A new heterozygous mutation in the stop codon of CRYAB (p. X176Y) is liable for congenital posterior pole cataract in a Chinese family, *Ophthalmic Genet.*, **42**, 139-143, doi: 10.1080/13816810.2020.1855665.
123. Muranova, L. K., Strelkov, S. V., and Gusev, N. B. (2020) Effect of cataract-associated mutations in the N-terminal domain of alphaB-crystallin (HspB5), *Exp. Eye Res.*, **197**, 108091, doi: 10.1016/j.exer.2020.108091.
124. Cobb, B. A., and Petrash, J. M. (2000) Structural and functional changes in the alpha A-crystallin R116C mutant in hereditary cataracts, *Biochemistry*, **39**, 15791-15798, doi: 10.1021/bi001453j.
125. Kumar, L. V., Ramakrishna, T., and Rao, C. M. (1999) Structural and functional consequences of the mutation of a conserved arginine residue in alphaA and alphaB crystallins, *J. Biol. Chem.*, **274**, 24137-24141, doi: 10.1074/jbc.274.34.24137.
126. Singh, D., Raman, B., Ramakrishna, T., and Rao, Ch. M. (2006) The cataract-causing mutation G98R in human alphaA-crystallin leads to folding defects and loss of chaperone activity, *Mol. Vis.*, **12**, 1372-1379.
127. Bova, M. P., Yaron, O., Huang, Q., Ding, L., Haley, D. A., et al. (1999) Mutation R120G in alphaB-crystallin, which is linked to a desmin-related myopathy, results in an irregular structure and defective chaperone-like function, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **96**, 6137-6142, doi: 10.1073/pnas.96.11.6137.
128. Perng, M. D., Wen, S. F., van IJssel, P., Prescott, A. R., and Quinlan, R. A. (2004) Desmin aggregate formation by R120G alphaB-crystallin is caused by altered filament interactions and is dependent upon network status in cells, *Mol. Biol. Cell*, **15**, 2335-2346, doi: 10.1091/mbc.e03-12-0893.
129. Ghahramani, M., Yousefi, R., Krivandin, A., Muranov, K., Kurganov, B., et al. (2020) Structural and functional characterization of D109H and R69C mutant versions of human alphaB-crystallin: The biochemical pathomechanism underlying cataract and myopathy development, *Int. J. Biol. Macromol.*, **146**, 1142-1160, doi: 10.1016/j.ijbiomac.2019.09.239.
130. Clark, A. R., Lubsen, N. H., and Slingsby, C. (2012) sHSP in the eye lens: crystallin mutations, cataract and proteostasis, *Int. J. Biochem. Cell Biol.*, **44**, 1687-1697, doi: 10.1016/j.biocel.2012.02.015.
131. Gerasimovich, E. S., Strelkov, S. V., and Gusev, N. B. (2017) Some properties of three alphaB-crystallin mutants carrying point substitutions in the C-terminal domain and associated with congenital diseases, *Biochimie*, **142**, 168-178, doi: 10.1016/j.biochi.2017.09.008.
132. Raju, I., and Abraham, E. C. (2011) Congenital cataract causing mutants of alphaA-crystallin/sHSP form aggregates and aggresomes degraded through ubiquitin–proteasome pathway, *PLoS One*, **6**, e28085, doi: 10.1371/journal.pone.0028085.
133. Ahsan, S. M., Bakthisaran, R., Tangirala, R., and Rao, C. M. (2021) Nucleosomal association and altered interactome underlie the mechanism of cataract caused by the R54C mutation of alphaA-crystallin, *Biochim. Biophys. Acta Gen. Subj.*, **1865**, 129846, doi: 10.1016/j.bbagen.2021.129846.
134. Gong, B., Zhang, L. Y., Pang, C. P., Lam, D. S., and Yam, G. H. (2009) Trimethylamine N-oxide alleviates the severe aggregation and ER stress caused by G98R alphaA-crystallin, *Mol. Vis.*, **15**, 2829-2840.
135. Raju, I., and Abraham, E. C. (2013) Mutants of human alphaB-crystallin cause enhanced protein aggregation and apoptosis in mammalian cells: Influence of co-expression of HspB1, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **430**, 107-112, doi: 10.1016/j.bbrc.2012.11.051.
136. Chavez Zobel, A. T., Loranger, A., Marceau, N., Theriault, J. R., Lambert, H., et al. (2003) Distinct chaperone mechanisms can delay the formation of aggresomes by the myopathy-causing R120G alphaB-crystallin mutant, *Hum. Mol. Genet.*, **12**, 1609-1620, doi: 10.1093/hmg/ddg173.
137. Sanbe, A., Osinska, H., Saffitz, J. E., Glabe, C. G., Kayed, R., et al. (2004) Desmin-related cardiomyopathy in transgenic mice: a cardiac amyloidosis, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **101**, 10132-10136, doi: 10.1073/pnas.0401900101.
138. Hayes, V. H., Devlin, G., and Quinlan, R. A. (2008) Truncation of alphaB-crystallin by the myopathy-causing Q151X mutation significantly destabilizes the protein leading to aggregate formation in transfected cells, *J. Biol. Chem.*, **283**, 10500-10512, doi: 10.1074/jbc.M706453200.
139. Mitzelfelt, K. A., Limphong, P., Choi, M. J., Kondrat, F. D., Lai, S., et al. (2016) The human 343delT HSPB5 chaperone associated with early-onset skeletal myopathy causes defects in protein solubility, *J. Biol. Chem.*, **291**, 14939-14953, doi: 10.1074/jbc.M116.730481.
140. Zhang, H., Rajasekaran, N. S., Orosz, A., Xiao, X., Rechsteiner, M., et al. (2010) Selective degradation of aggregate-prone CryAB mutants by HSPB1 is mediated by ubiquitin-proteasome pathways, *J. Mol. Cell. Cardiol.*, **49**, 918-930, doi: 10.1016/j.yjmcc.2010.09.004.
141. Andley, U. P., Hamilton, P. D., and Ravi, N. (2008) Mechanism of insolubilization by a single-point mutation in alphaA-crystallin linked with hereditary human cataracts, *Biochemistry*, **47**, 9697-9706, doi: 10.1021/bi800594t.
142. Kore, R., Hedges, R. A., Oonthonpan, L., Santhoshkumar, P., Sharma, K. K., et al. (2012) Quaternary structural parameters of the congenital cataract causing mutants of alphaA-crystallin, *Mol. Cell Biochem.*, **362**, 93-102, doi: 10.1007/s11010-011-1131-8.

143. Khoshaman, K., Yousefi, R., Tamaddon, A. M., Abolmaali, S. S., Oryan, A., et al. (2017) The impact of different mutations at Arg54 on structure, chaperone-like activity and oligomerization state of human alphaA-crystallin: the pathomechanism underlying congenital cataract-causing mutations R54L, R54P and R54C, *Biochim. Biophys. Acta Proteins Proteom.*, **1865**, 604-618, doi: 10.1016/j.bbapap.2017.02.003.
144. Murugesan, R., Santhoshkumar, P., and Sharma, K. K. (2007) Cataract-causing alphaAG98R mutant shows substrate-dependent chaperone activity, *Mol. Vis.*, **13**, 2301-2309,
145. Singh, D., Tangirala, R., Bakthisaran, R., and Chintalagiri, M. R. (2009) Synergistic effects of metal ion and the pre-senile cataract-causing G98R alphaA-crystallin: Self-aggregation propensities and chaperone activity, *Mol. Vis.*, **15**, 2050-2060.
146. Wang, X., Osinska, H., Klevitsky, R., Gerdes, A. M., Nieman, M., et al. (2001) Expression of R120G-alphaB-crystallin causes aberrant desmin and alphaB-crystallin aggregation and cardiomyopathy in mice, *Circ. Res.*, **89**, 84-91, doi: 10.1161/hh1301.092688.
147. Meehan, S., Berry, Y., Luisi, B., Dobson, C. M., Carver, J. A., et al. (2004) Amyloid fibril formation by lens crystallin proteins and its implications for cataract formation, *J. Biol. Chem.*, **279**, 3413-3419, doi: 10.1074/jbc.M308203200.
148. Lee, C. F. (2009) Self-assembly of protein amyloids: a competition between amorphous and ordered aggregation, *Phys. Rev. E Stat. Nonlin. Soft Matter Phys.*, **80**, 031922, doi: 10.1103/PhysRevE.80.031922.
149. Sandilands, A., Hutcheson, A. M., Long, H. A., Prescott, A. R., Vrensen, G., et al. (2002) Altered aggregation properties of mutant gamma-crystallins cause inherited cataract, *EMBO J.*, **21**, 6005-6014, doi: 10.1093/emboj/cdf609.
150. Meehan, S., Knowles, T. P., Baldwin, A. J., Smith, J. F., Squires, A. M., et al. (2007) Characterisation of amyloid fibril formation by small heat-shock chaperone proteins human alphaA-, alphaB- and R120G alphaB-crystallins, *J. Mol. Biol.*, **372**, 470-484, doi: 10.1016/j.jmb.2007.06.060.
151. Makley, L. N., McMenimen, K. A., DeVree, B. T., Goldman, J. W., McGlasson, B. N., et al. (2015) Pharmacological chaperone for alpha-crystallin partially restores transparency in cataract models, *Science*, **350**, 674-677, doi: 10.1126/science.aac9145.
152. Zhao, L., Chen, X. J., Zhu, J., Xi, Y. B., Yang, X., et al. (2015) Lanosterol reverses protein aggregation in cataracts, *Nature*, **523**, 607-611, doi: 10.1038/nature14650.
153. Raju, M., Santhoshkumar, P., and Sharma, K. (2016) Alpha-crystallin-derived peptides as therapeutic chaperones, *Biochim. Biophys. Acta*, **1860**, 246-251, doi: 10.1016/j.bbagen.2015.06.010.

PROTEIN AGGREGATION AND CATARACT: ROLE OF AGE-RELATED MODIFICATIONS AND MUTATIONS IN α-CRYSTALLINS*

Review

P. Budnar, R. Tangirala, R. Bakthisaran, and Ch. M. Rao**

Centre for Cellular and Molecular Biology (CCMB), Council of Scientific and Industrial Research (CSIR), Uppal Road, Hyderabad 500007, India; e-mail: mohan@ccmb.res.in; mohan.ccmb@gmail.com

Cataract is a major cause of blindness. Due to the lack of protein turnover, lens proteins accumulate age-related and environmental modifications that alter their native conformation, leading to the formation of aggregation-prone intermediates, as well as insoluble and light-scattering aggregates, thus compromising lens transparency. The lens protein, α-crystallin, is a molecular chaperone that prevents protein aggregation, thereby maintaining lens transparency. However, mutations or post-translational modifications, such as oxidation, deamidation, truncation and crosslinking, can render α-crystallins ineffective and lead to the disease exacerbation. Here, we describe such mutations and alterations, as well as their consequences. Age-related modifications in α-crystallins affect their structure, oligomerization, and chaperone function. Mutations in α-crystallins can lead to the aggregation/intracellular inclusions attributable to the perturbation of structure and oligomeric assembly and resulting in the rearrangement of aggregation-prone regions. Such rearrangements can lead to the exposure of hitherto buried aggregation-prone regions, thereby populating aggregation-prone state(s) and facilitating amorphous/amyloid aggregation and/or inappropriate interactions with cellular components. Investigations of the mutation-induced changes in the structure, oligomer assembly, aggregation mechanisms, and interactomes of α-crystallins will be useful in fighting protein aggregation-related diseases.

Keywords: cataract, aggregation, α-crystallin

EDN: HHPRWK
БИОХИМИЯ, 2022, том 87, вып. 3, с. 419 – 429

УДК 577.112.7;617.741

ВЛИЯНИЕ СОРБИТОЛА НА СТРУКТУРУ И ФУНКЦИЮ АЛЬФА-КРИСТАЛЛИНА

© 2022 Ch.U. Kumar[1], U. Suryavanshi[1], V. Sontake[1], P.Y. Reddy[1], R.S. Sankhala[2], M.J. Swamy[2], G.B. Reddy[1]*

[1] *Biochemistry Division, National Institute of Nutrition, Hyderabad 500007, India; e-mail: reddyg.bp@icmr.gov.in; geereddy@yahoo.com*

[2] *School of Chemistry, University of Hyderabad, Hyderabad 500046, India*

Поступила в редакцию 21.09.2021
После доработки 13.01.2022
Принята к публикации 29.01.2022

Потеря прозрачности хрусталика глаза вследствие катаракты является основной причиной слепоты во всем мире. В то время как агрегация кристаллинов хрусталика является самой распространенной конечной точкой развития различных типов катаракты, шапероноподобная активность («chaperone-like activity», CLA) α-кристаллина, предотвращающая агрегацию белков, считается важной для поддержания прозрачности хрусталика глаза. Полагают, что осмотический стресс является одним из механизмов развития диабетической катаракты вследствие повышенного накопления сорбитола в условиях гипергликемии. Кроме того, сообщалось о нарушении CLA α-кристаллина при диабетической катаракте. Однако влияние сорбитола на структуру и функцию α-кристаллина еще не исследовано. Поэтому в настоящем пилотном исследовании мы описали влияние различных концентраций сорбитола на структуру и функцию α-кристаллина. Очищенный α-кристаллин, полученный из хрусталика крысы, инкубировали с различными концентрациями сорбитола в темноте в стерильных условиях до 5 дней. В конце инкубации оценивали структурные свойства и CLA с помощью спектроскопических методов анализа. Стоит отметить, что разные концентрации сорбитола показали различные результаты: при низких концентрациях (5 и 50 мМ) наблюдалось снижение CLA и незначительные изменения вторичной и третичной структуры, а при более высоких концентрациях (500 мМ) таких эффектов отмечено не было. Полученные результаты проливают свет на влияние сорбитола в контексте структуры и функций α-кристаллина, тем не менее необходимы дальнейшие исследования, чтобы понять механизм наблюдаемых эффектов и их влияние на катарактогенез.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: альфа-кристаллин, катаракта, шапероноподобная активность, сорбитол, структура.
DOI: 10.31857/S0320972522030083

ВВЕДЕНИЕ

Катаракта (помутнение хрусталика глаза) является основной причиной слепоты во всем мире [1, 2]. Несмотря на значительный прогресс, достигнутый в области хирургии катаракты, эта болезнь продолжает оставаться проблемой общественного здравоохранения и главной причиной ухудшения зрения [3]. Среди многих факторов риска, ускоряющих развитие катаракты, основными остаются диабет и старение [4]. Сообщалось, что степень гипергликемии и продолжительность диабета ассоциированы с повышением риска развития катаракты [2, 4]. В настоящее время сахарный диабет – одна из самых сложных проблем со здоровьем, с которой сталкивается весь мир. Сейчас около 470 млн взрослых во всем мире страдают диабетом, при этом ожидается, что к 2045 г. их число возрастет до 700 млн [5]. С ростом заболеваемости сахарным диабетом пропорционально увеличилась и частота его осложнений, в том числе диабетической катаракты, которые вносят весомый вклад в статистику заболеваемости и смертности во всем мире.

Кристаллины являются основными структурными белками хрусталика глаза; структура кристаллинов, их стабильность и короткодействующие взаимодействия чрезвычайно важны для обеспечения прозрачности хрусталика [6, 7]. Примерно 90% всех растворимых белков хрусталика состоят из трех различных кристаллинов: α-, β- и γ-кристаллинов [6, 8]. α-Кристаллин, член семейства малых белков теплового шока, составляет основную часть цитоплазмы хрусталика глаза и существует в виде гетероолигомера с двумя субъединицами, αA и αB [7, 9]. Несмотря на то что α-кристаллин первоначально счита-

Принятые сокращения: АР – альдозоредуктаза; КД – круговой дихроизм; ДСК – дифференциальная сканирующая калориметрия; CLA – шапероноподобная активность.

* Адресат для корреспонденции.

ли структурным белком, подобно другим кристаллинам, во многих последующих исследованиях сообщалось, что он также действует как шаперон, предотвращая в различных условиях агрегацию многочисленных белков-клиентов, включая другие кристаллины хрусталика [7, 10]. Считается, что шапероноподобная активность (CLA) α-кристаллина играет незаменимую роль в поддержании прозрачности хрусталика глаза [7, 10]. В поддержку этого предположения можно привести результаты исследований, показывающие, что катаракта может быть результатом снижения CLA α-кристаллина [11–15].

С возрастом белки хрусталика, в том числе α-кристаллин, претерпевают различные посттрансляционные модификации, большинство из которых приводит к их агрегации [10, 16, 17]. Многие из этих модификаций, которые, как было показано, зависимы от возраста, ускоряются в условиях гипергликемии вследствие диабета. Среди них неферментативное гликирование считается одним из механизмов, ответственных как за возрастную, так и за диабетическую катаракту [18, 19]. Ранее мы описали влияние гликирования на структуру и CLA α-кристаллина и его вклад в формирование диабетической катаракты [10, 16, 20]. Окислительное повреждение, осмотический стресс и накопление конечных продуктов гликирования являются среди многих других основными механизмами, которые влияют на прозрачность хрусталика, что в конечном итоге приводит к формированию катаракты [21]. Аномальная или избыточная глюкоза при диабете преобразуется в ее спиртовую форму, сорбитол, под действием фермента альдозоредуктазы (AP) в полиольном пути [22]. Поскольку сорбитол не проникает через клеточные мембраны, его накопление внутри клеток приводит к нарушению метаболического гомеостаза, что приводит к изменению осмотического давления и окислительно-восстановительного состояния [22]. Следовательно, накопление сорбитола связано с развитием диабетической катаракты [22, 23]. Стоит отметить, что было показано снижение CLA α-кристаллина из хрусталиков крысы и человека, больных диабетом; данный факт указывает на то, что пониженная CLA α-кристаллина может быть вовлечена в формирование диабетических катаракт [14, 24, 25]. Хотя ранее сообщалось о влиянии различных катарактогенных повреждений, таких как окислительный стресс, конечные продукты гликирования и многие другие посттрансляционные модификации, на структуру и функцию α-кристаллина, прямое влияние сорбитола на α-кристаллин не изучалось. Таким образом, в настоящем пилотном исследовании мы сообщаем о влиянии сорбитола на структуру и функции α-кристаллина.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Материалы. Акриламид, бис-акриламид, персульфат аммония, 2-меркаптоэтанол, SDS, BSA и сорбитол были приобретены у компании «Sigma-Aldrich» (США). Набор для анализа белка BCA (бицинхониновой кислоты) был приобретен в компании «Thermo Scientific» (США). Sephacryl S-300HR, Superose-6 10/30 и маркеры SDS/PAGE были приобретены в «GE Healthcare» (США). Все другие используемые химические реагенты обладали самой высокой степенью чистоты и были получены от местных поставщиков.

Выделение кристаллинов из хрусталиков крыс. Двухмесячных самцов крыс линии Wistar (WNIN) получили из вивария института, работа с ними проводилась согласно соответствующим правилам ухода за животными и протоколам, одобренным Институциональным комитетом по работе с лабораторными животными. Хрусталики выделяли из глазных яблок с помощью заднего доступа. Из 6–8 хрусталиков готовили 10%-ный гомогенат в 0,025 M Tris-буфере, pH 8,0, содержащем 0,1 M NaCl, 0,5 мМ ЭДТА и 0,01% NaN_3, и центрифугировали при 10 000 *g* в течение 30 мин при 4 °C для получения супернатанта. Супернатант наносили на колонку для гель-фильтрации Sephacryl S-300 HR (100 см × × 1,5 см), соединенную с системой очистки «Duo Flow» («Bio-Rad Laboratories», США). Колонку уравновешивали вышеуказанным буфером, элюировали кристаллины тем же буфером со скоростью потока 0,25 мл/мин и раздельно собирали фракции, соответствующие α-, β_L- и γ-кристаллинам [16]. Объединенные фракции кристаллинов подвергали экстенсивному диализу против 20 мМ натрий-фосфатного буфера (pH 7,4), чистоту анализировали с помощью SDS-PAGE. Концентрацию белка оценивали с использованием BCA; образцы белка хранили при температуре –80 °C до использования.

Инкубация α-кристаллина с сорбитолом. Очищенный α-кристаллин (полученный, как описано выше, из хрусталика крысы) инкубировали с различными концентрациями сорбитола (5–500 мМ) или без него в 50 мМ натрий-фосфатном буфере, pH 7,4, содержащем 100 мМ NaCl, при 37 °C в темноте в стерильных условиях в течение 5 дней. По окончании инкубации образцы тщательно диализовали против 20 мМ натрий-фосфатного буфера (pH 7,4) и оценивали содержание белка.

Шапероноподобная активность. Шапероноподобную активность нативного α-кристаллина или α-кристаллина, инкубированного с сорбитолом, измеряли по способности этих белков предотвращать индуцированную нагреванием агрегацию белков-субстратов, как описано ранее [14]. Вкратце, 0,25 мг/мл β_L-кристаллина или γ-кристаллина (очищенных из хрусталика крысы, как описано выше) в 50 мМ натрий-фосфатном буфере, pH 7,4, содержащем 100 мМ NaCl, в отсутствие или в присутствии 0,025 мг/мл α-кристаллина (нативного или инкубированного с сорбитолом) подвергали нагреванию при 62 °С в течение 60 мин. С помощью спектрофотометра «Lambda-35» («Perkin Elmer», США) проводили контроль рассеяния света вследствие агрегации β_L-кристаллина при тепловой денатурации, измеряя видимое поглощение при длине волны 360 нм в зависимости от времени. Относительную шаперонную активность нативного α-кристаллина или α-кристаллина, инкубированного с сорбитолом, рассчитывали как процент защищенного от агрегации по формуле: % защиты = $((A_o - A)/A_o) \times 100$, где A_o и A представляют собой кажущееся поглощение насыщения (обычно через 50–60 мин) в отсутствие и в присутствии α-кристаллина соответственно.

Вторичная и третичная структура. Для оценки вторичных и третичных структурных изменений α-кристаллина, вызванных воздействием сорбитола, спектры кругового дихроизма (КД) в дальнем и ближнем УФ-диапазоне регистрировали при 25 °С на спектрополяриметре «Jasco J-810» («Jasco», Япония) [16]. Все спектры были получены усреднением 6 измерений и зарегистрированы с использованием ячеек с длиной оптического пути 0,1 и 0,5 см для КД дальнего и ближнего УФ соответственно. Концентрация белка, используемая для измерений КД в дальнем и ближнем УФ, составляла 0,15 и 1,0 мг/мл соответственно. Собственную флуоресценцию триптофана контролировали с использованием 0,15 мг/мл белка в 20 мМ натрий-фосфатном буфере, pH 7,4, на спектрофлуориметре «Jasco FP-6500» с возбуждением при 280 нм, регистрируя эмиссию флуоресценции в диапазоне 300–400 нм.

Гидрофобность α-кристаллина. Для оценки поверхностной гидрофобности α-кристаллина (нативного или инкубированного с сорбитолом) белок (0,1 мг/мл) инкубировали с 50 мкМ 8-анилинонафталин-1-сульфокислоты (АНС) в течение 30 мин при комнатной температуре в темноте; флуоресценцию связанного с белком красителя измеряли при возбуждении на 390 нм, а эмиссию в диапазоне 450–550 нм на спектрофлуориметре «Jasco FP-6500» [16].

Гель-фильтрационная хроматография. Молекулярную массу α-кристаллина, инкубированного с сорбитолом или без него, определяли с использованием колонки для гель-фильтрации «Superose-6 10/30», соединенной с системой очистки белков «Duo Flow» («Bio-Rad Laboratories») при скорости потока 0,5 мл/мин.

Дифференциальная сканирующая калориметрия. Термическую стабильность α-кристаллина исследовали методом дифференциальной сканирующей калориметрии (ДСК) на приборе «VP-DSC» («MicroCal LLC», США), как описано ранее [26]. α-Кристаллин инкубировали с различными концентрациями сорбитола (5–500 мМ) или без него, как описано выше. Образцы инкубированного белка подвергали интенсивному диализу против 20 мМ калий-фосфатного буфера (pH 7,4), содержащего 100 мМ хлорида калия и 1 мМ ДТТ. И диализат, и белковые растворы перед сканированием тщательно дегазировали в вакууме при комнатной температуре. Термограммы ДСК образцов белка (1 мг/мл) регистрировали при температуре от 10 до 100 °С при скорости сканирования 60°С/ч [26]. Также были получены термограммы при скорости сканирования 30 и 90 °С/ч для проверки зависимости скорости сканирования от теплового развертывания. Данные анализировали с использованием программного обеспечения для анализа ДСК «Origin 7.0 DSC», предоставленного производителем.

Статистический анализ. Если не указано иное, данные представлены как среднее значение трех экспериментов. Данные были проанализированы с использованием программного обеспечения «SPSS» версии 19.0. Для количественной оценки шаперонной активности данные представлены как среднее значение ± стандартное отклонение. Статистическую значимость различия между контролем и кристаллином, обработанным сорбитолом, определяли с помощью *t*-критерия Стьюдента. Значения, характеризуемые $p < 0,05$, определены как значимые.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Повышенная активность АР и повышенная выработка сорбитола вовлечены в катарактогенез у людей с диабетом и экспериментальных моделях диабета [22, 27]. Исследования *in vitro* и *in vivo* в целом подчеркнули значение α-кристаллина в биологии хрусталика глаза и, в частности, указали на то, что его CLA предотвращает агрегацию других белков в хрусталике и, как следствие, образование катаракты [10]. Следует также отметить нарушение шаперонной функ-

ции α-кристаллина у крыс и людей, больных диабетом [14, 24, 25]. Данные наблюдения предполагают наличие связи между снижением CLA α-кристаллина и диабетической катарактой. Кроме того, ряд исследований на экспериментальных животных показывает, что соединения, ингибирующие AP, могут быть эффективны для предотвращения диабетических осложнений, включая диабетическую катаракту [28–30]. Следует отметить, что исследований, в которых изучалось бы прямое влияние сорбитола на α-кристаллин, пока не опубликовано. Поэтому в настоящей работе мы изучили прямое влияние сорбитола на CLA α-кристаллина и связанные с этим структурные изменения при инкубации с сорбитолом.

Влияние шапероноподобной активности α-кристаллина, инкубированного с сорбитолом в течение 5 дней, на индуцированную нагреванием агрегацию β_L-кристаллина зависело от концентрации сорбитола и оценивалось в сравнении с немодифицированным α-кристаллином (рис. 1). α-Кристаллин, инкубированный с сорбитолом в концентрации 5 и 50 мМ, показал снижение CLA, в то время как α-кристаллин, инкубированный с 500 мМ сорбитола, показал такое же или немного более высокое значение CLA по сравнению с α-кристаллином, инкубированным без сорбитола в тех же условиях. Таким образом, оказалось, что влияние сорбитола на активность шаперона может варьировать в зависимости от концентрации, что, вероятно, связано с тонкими структурными изменениями в белке-шапероне, о чем свидетельствуют наблюдаемые изменения вторичной и третичной структуры. Аналогичные результаты мы наблюдали при агрегации γ-кристаллина под воздействием тепла (данные не показаны).

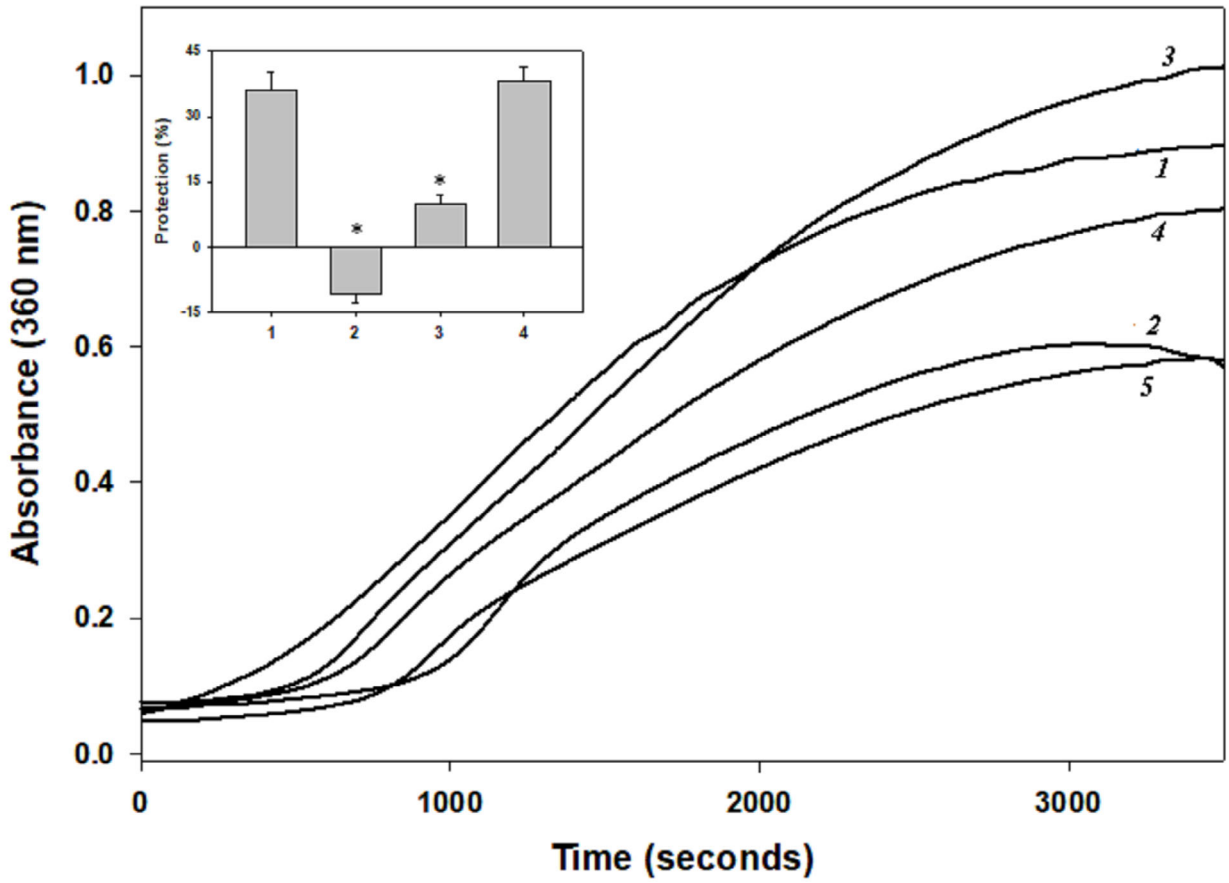


Рис. 1. Шапероноподобная активность α-кристаллина. Индуцированную нагреванием агрегацию β_L-кристаллина при 62 °C контролировали спектрофотометрически при 360 нм в отсутствие (*1*) или в присутствии 0,05 мг/мл нативного α-кристаллина (*2*) или α-кристаллина, инкубированного с 5 мМ (*3*), 50 мМ (*4*) и 500 мМ сорбитола (*5*). Врезка: относительная шаперонная активность α-кристаллина. Относительную шаперонную активность (процент защиты) определяли, принимая за 100% агрегацию β_L-кристаллинов в отсутствие α-кристаллинов. Столбцы: 1) нативный α-кристаллин, 2) α-кристаллин, инкубированный с 5 мМ сорбитола, 3) α-кристаллин, инкубированный с 50 мМ сорбитола, 4) α-кристаллин, инкубированный с 500 мМ сорбитола. Данные представлены как среднее значение ± стандартное отклонение ($n = 3$). Звездочка над столбцами указывает на достоверное различие ($p < 0,05$) по сравнению с нативным α-кристаллином

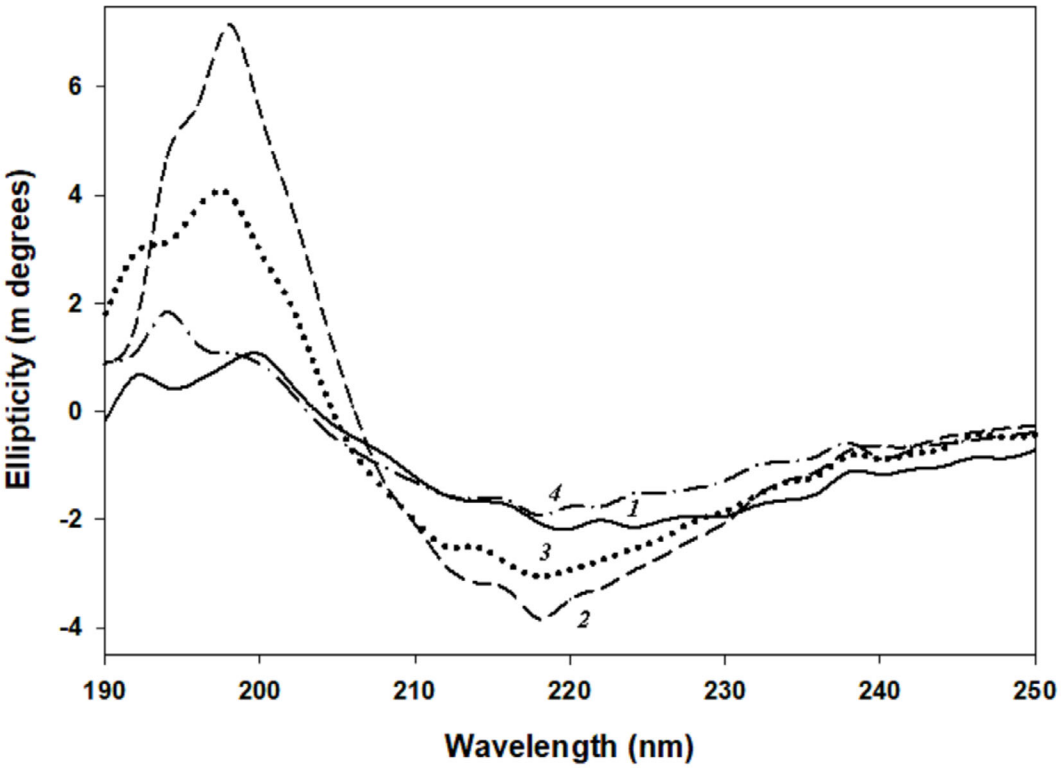


Рис. 2. Вторичная структура α-кристаллина, полученная с помощью кругового дихроизма в дальнем УФ. Кривые: *1* – нативный α-кристаллин; *2–4* – α-кристаллин, инкубированный с 5, 50 и 500 мМ сорбитолом соответственно. Данные представлены как среднее значение трех измерений

Чтобы получить представление о влиянии разных концентраций сорбитола на CLA α-кристаллина мы оценили, есть ли какие-либо изменения во вторичной и третичной структуре, используя КД и флуоресцентную спектроскопию. Как сообщалось ранее [14, 16], нативный α-кристаллин имел типичную структуру β-листа с максимальной отрицательной эллиптичностью в диапазоне 215–218 нм (рис. 2). Следует отметить, что α-кристаллин, инкубированный с сорбитолом, демонстрировал изменения во вторичной структуре, такие как увеличение отрицательной эллиптичности при 215–218 нм и усиление положительного сигнала около 200 нм; при этом максимальные изменения были зарегистрированы при концентрации 5 мМ, меньшие – при 50 мМ, и минимальные изменения или их отсутствие наблюдались для образцов, инкубированных с 500 мМ сорбитола (рис. 2). Эти изменения вторичной структуры отражаются в уменьшении CLA α-кристаллина при более низкой концентрации сорбитола в отличие от более высокой концентрации.

Такие изменения были характерны и для третичной структуры, анализируемой с помощью КД в диапазоне 250–300 нм; самые серьезные изменения происходили при концентрации 5 мМ, затем – при 50 мМ, а минимальные изменения наблюдались при концентрации сорбитола 500 мМ (рис. 3). Самые значительные изменения в третичной структуре были отмечены в ароматической области, что свидетельствует о конформационных изменениях на третичном структурном уровне за счет участия ароматических остатков. Аналогичный характер изменения флуоресценции триптофана при разных концентрациях сорбитола (рис. 4) дополнительно подтверждает характер изменений в третичной структуре после воздействия сорбитола.

В дополнение к другим определяющим факторам, CLA α-кристаллина в подавлении агрегации белков-клиентов, как полагают, опосредуется взаимодействием между гидрофобными участками на его поверхности и экспонированными гидрофобными участками частично развернутого белка-субстрата [7, 31, 32]. Поэтому мы также оценили гидрофобность α-кристаллина с точки зрения его связывания с АНС, гидрофобным зондом. Интенсивность флуоресценции АНС, связанного с α-кристаллином, была почти одинаковой для нативного белка и белка, инкубированного с 5–500 мМ сорбитола (данные не представлены). Эти наблюдения свидетельствуют о том, что сорбитол не влияет на гидрофобную

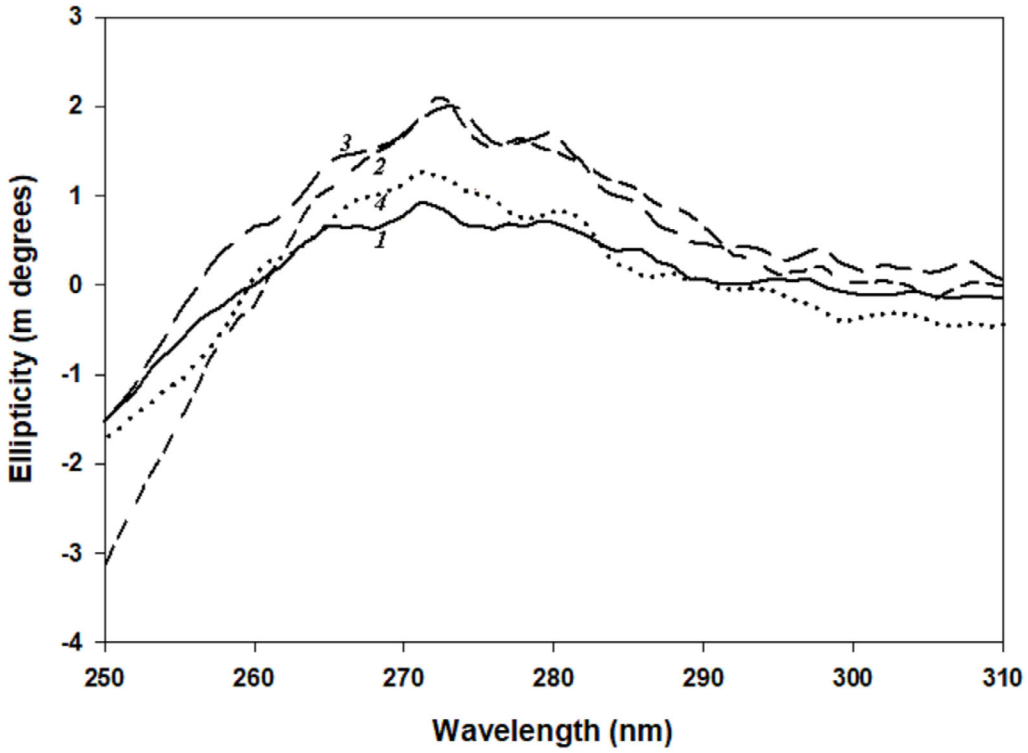


Рис. 3. Третичная структура α-кристаллина, полученная с помощью кругового дихроизма в ближнем УФ. Кривые: *1* – нативный α-кристаллин; *2–4* – α-кристаллин, инкубированный с 5, 50 и 500 мМ сорбитола соответственно. Данные представлены как среднее значение трех измерений

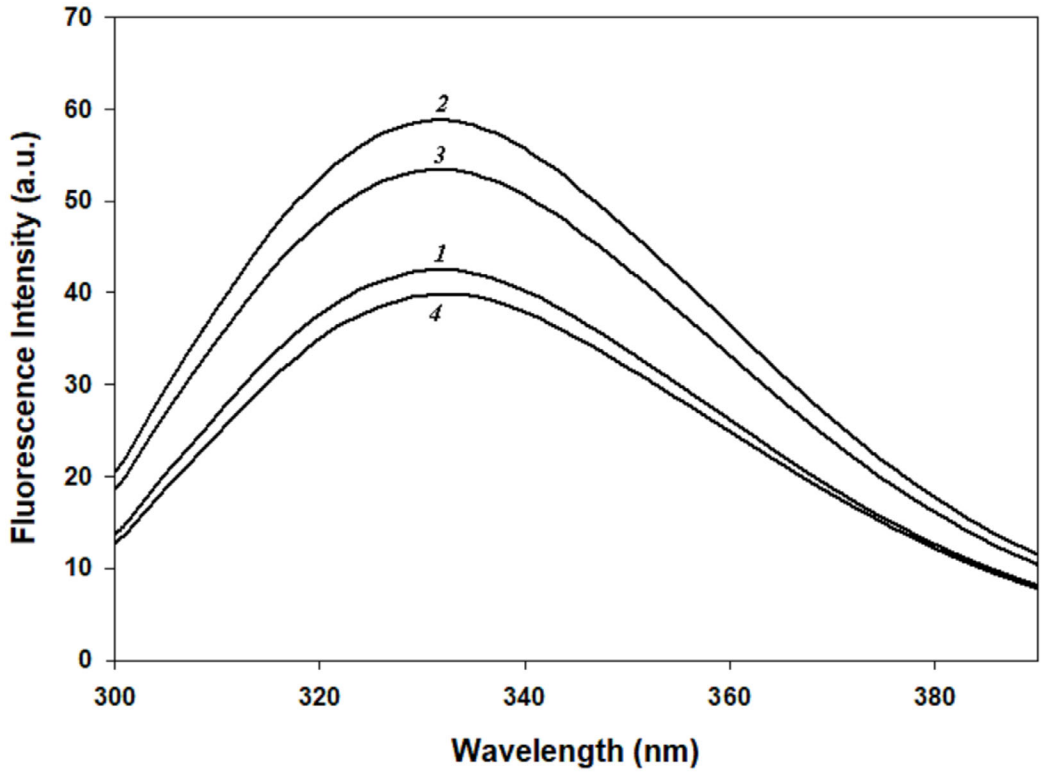


Рис. 4. Спектры флуоресценции триптофана в α-кристаллине. Кривые: *1* – нативный α-кристаллин; *2–4* – α-кристаллин, инкубированный с 5, 50 и 500 мМ сорбитолом соответственно. Данные представлены как среднее значение трех измерений

поверхность α-кристаллина ни при более низких, ни при более высоких концентрациях. Поскольку сообщалось, что размер олигомеров α-кристаллина влияет на его CLA [7, 16, 20], мы также определили молекулярную массу (размер олигомеров) α-кристаллина методом эксклюзионной хроматографии. Инкубация α-кристаллина с сорбитолом (5–500 мМ) не приводила к изменению размера его олигомеров (рис. 5).

Стабильность α-кристаллина также имеет решающее значение для его CLA при исследовании агрегации. При использовании ДСК мы анализировали термостабильность α-кристаллина, инкубированного с сорбитолом. Анализ термограмм ДСК показал лишь незначительные изменения термостабильности α-кристаллина, инкубированного с различными концентрациями (5–500 мМ) сорбитола. Несмотря на то что для образцов, инкубированных с низкими концентрациями сорбитола, не наблюдалось значительных изменений термодинамических параметров, для образца, инкубированного с 500 мМ, все же наблюдалось небольшое увеличение T_m (~1 °C) и примерно 10%-ное увеличение энтальпии и энтропии перехода (рис. 6 и таблица). Кроме того, не наблюдалось существенных различий при проведении ДСК при 30 и 90 °C/ч, что указывает на то, что результаты не зависели от скорости сканирования (данные не показаны).

В совокупности эти результаты указывают на то, что α-кристаллин, инкубированный с различными концентрациями сорбитола, демонстрировал едва различимые друг от друга, но все-таки разные результаты. В частности, инкубация с более низкими концентрациями (5 и 50 мМ) сорбитола приводила к потере CLA и изменениям вторичной и третичной структур. Напротив, не наблюдалось существенного влияния ни на CLA, ни на структуру, ни на стабильность образцов, инкубированных с более высокими концентрациями (500 мМ) сорбитола. Скорее наблюдался мягкий стабилизирующий эффект при концентрации сорбитола 500 мМ в отношении термического разворачивания. Следует отметить, что в то время как концентрация сорбитола в хрусталике глаза крыс с нормогликемией находится в диапазоне 0,1–0,2 мМ, у крыс с диабетом его уровень может повышаться до 0,5–10 мМ в зависимости от степени гипергликемии [29, 33, 34]. Следовательно, эффекты, наблюдаемые при 5 или 50 мМ сорбитола в настоящем исследовании, могут быть связаны с гипергликемическими состояниями в хрусталике

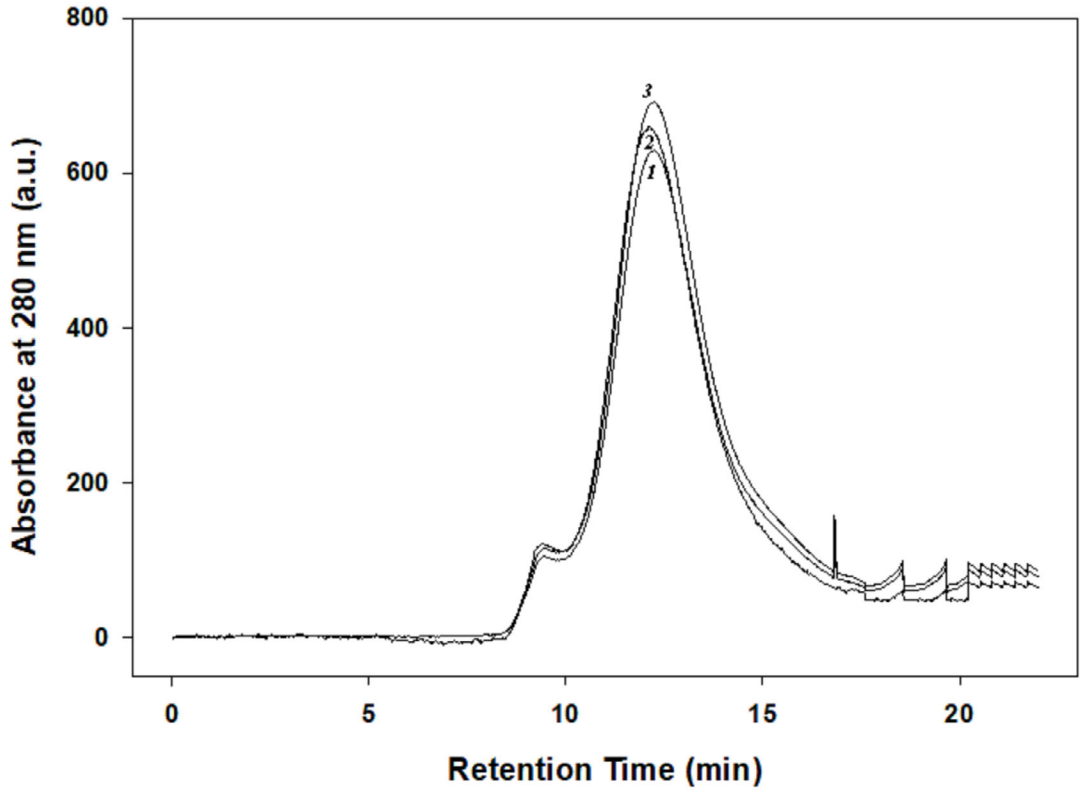


Рис. 5. Молекулярная масса α-кристаллина. Время удерживания при ВЭЖХ нативного (*1*) или α-кристаллина, инкубированного с 5 (*2*) и 500 мМ сорбитола (*3*)

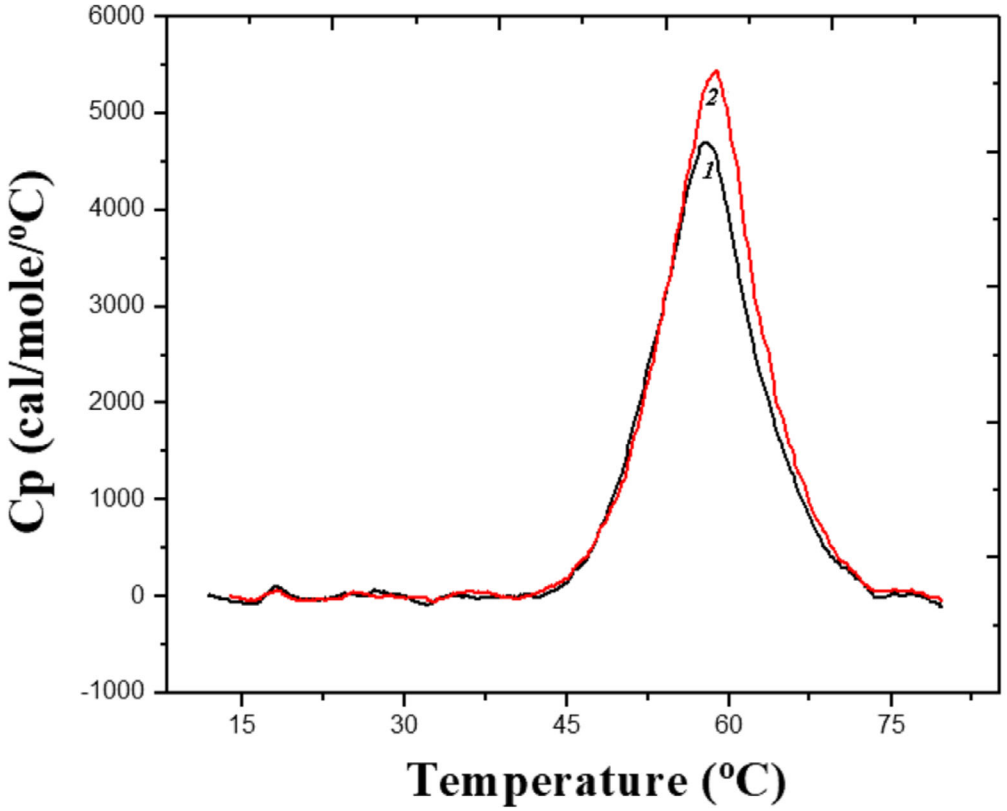


Рис. 6. Влияние обработки сорбитолом на термостабильность α-кристаллина. Дифференциальная сканирующая калориметрическая термограмма нативного α-кристаллина (*1*) и после воздействия 500 мМ сорбитола (*2*)

диабетических крыс, тогда как супрафизиологическая концентрация 500 мМ связана с концентрациями типичных осмолитов (0,5–1,0 М), используемых в качестве агентов, стабилизирующих белок, или в качестве консервирующих агентов.

Известно, что низкомолекулярные осмолиты, в том числе сахарные спирты, такие как сорбитол, стабилизируют трехмерную структуру многих белков в нестабильных или жестких условиях за счет изменения структуры белка и движения молекул воды, что приводит к большей стабильности [35, 36]. Помимо применения в промышленности и фармацевтике, осмолиты накапливаются *in vivo* в условиях стресса и влияют на стабильность белков в живых клетках [37]. Осмолиты контролируют стабильность белка, влияя на стерические, ван-дер-ваальсовые, гидрофобные и электростатические взаимодействия белка с самим собой и со всеми компонентами раствора [38]. Напротив, накопление сорбитола в хрусталике глаза связано с развитием катаракты, которая является преимущественно нарушением агрегации белков. Было показано, что гипергликемия, вызванная хроническим неконтролируемым диабетом, усугубляет диабетические осложнения, включая диабетическую катаракту, которая, как полагают, в основном связана с осмотическим стрессом (накопление сорбитола внутри клеток) через полиоловый путь и связанный с ним окислительный

Термодинамические параметры, полученные при исследовании α-кристаллина методом ДСК до и после инкубации с сорбитолом

Образец	T_m (°C)	ΔH_t (ккал/моль)	ΔS_t (кал/моль/K)
α-кристаллин	57,9	55,2 ± 0,1	167 ± 1,8
α-кристаллин, инкубированный с 5 мМ сорбитолом	58,2	58,5 ± 0,2	174 ± 1,8
α-кристаллин, инкубированный с 50 мМ сорбитолом	58,4	60,1 ± 0,3	180 ± 2,1
α-кристаллин, инкубированный с 500 мМ сорбитолом	58,7	61,3 ± 0,2	185 ± 2,2

Примечание. Данные представлены как среднее значение ± стандартное отклонение (n = 3).

стресс [39, 40]. В дополнение к полиоловому пути и связанному с ним окислительному стрессу преобладающим биохимическим механизмом, приписываемым диабетической катаракте, является неферментативное гликирование. Исследования, проведенные в нашей и других лабораториях, показали, что неферментативное гликирование α-кристаллина *in vitro* приводит к снижению CLA [16, 20, 41, 42]. Также было показано, что окислительный стресс приводит к снижению CLA α-кристаллина [41, 43, 44]. Однако исследований, в которых изучалось прямое влияние сорбитола на α-кристаллин, до сих пор не проводилось.

Количество сорбитола, накапливающегося в диабетическом хрусталике глаза, в частности, крысы, не превышает 5–10 мМ, что значительно ниже концентраций (100–1000 мМ) осмолитов, используемых в качестве стабилизаторов белка. Поэтому в этом исследовании мы изучали влияние различных концентраций сорбитола (0,5–500 мМ) на α-кристаллин. Интересно, что лишь при относительно низких концентрациях (5 и 50 мМ) сорбитола наблюдалось снижение CLA по сравнению с более высокими (500 мМ) концентрациями. Фактически в концентрациях, которые обычно используются для стабилизации белка или в качестве консерванта, сорбитол не влиял на CLA α-кристаллина. Одновременно со снижением CLA наблюдались незначительные, но воспроизводимые изменения вторичной и третичной структуры после инкубации с 5 мМ и 50 мМ сорбитола, тогда как после инкубации с 500 мМ сорбитола изменения во вторичной и третичной структуре отсутствовали или были минимальны. Кроме того, ни при каких концентрациях сорбитола (5–500 мМ) заметных различий в молекулярной массе, размере олигомеров и стабильности α-кристаллина продемонстрировано не было.

Хотя известно, что осмолиты стабилизируют нативную конформацию глобулярных белков, их влияние на стабильность и агрегацию внутренне неупорядоченных белков находится в стадии тщательного изучения [45, 46]. Стабилизирующий эффект осмолитов на белки при высоких концентрациях объясняется гидратацией (исключением осмолита из белка), как правило, без изменения структуры нативного белка или в пользу естественно неупорядоченной структуры по сравнению с нативной структурой, в то время как при более низких концентрациях предпочтительными могут быть взаимодействия с белками, приводящие к изменению структурных и функциональных свойств [36]. Тем не менее действие осмолита может быть реализовано только в присутствии самого осмолита. Поэтому мы также исследовали структурно-функциональные свойства α-кристаллина в прямом присутствии различных концентраций сорбитола (без диализа), но результаты были практически аналогичны результатам, полученным после удаления сорбитола с помощью диализа. Это очень интригующе, потому что теоретически после диализа эффекты низких и высоких концентраций сорбитола не должны различаться. Однако даже после анализа данных, полученных в настоящем исследовании, не ясно, каким образом более низкие концентрации сорбитола оказывают некоторое влияние на α-кристаллин, а высокие концентрации сорбитола – не оказывают даже после диализа. Поэтому необходимы дополнительные углубленные исследования для определения вероятного механизма наблюдаемых эффектов.

Что еще более важно, необходимо изучить влияние осмолитов, включая сорбитол, на агрегацию β- и γ-кристаллинов, которые используются не только в качестве белков-субстратов при исследовании CLA, но также являются основными мишенями защитного действия α-кристаллина в хрусталике. В этом контексте следует отметить, что индуцированная теплом и УФ-излучением агрегация растворимой фракции (всех трех основных кристаллинов) из хрусталика глаза крысы со спонтанным ожирением была выше по сравнению с их стройными собратьями [47], что было в основном связано с гипераккумуляцией сорбитола в хрусталике глаза у крыс с ожирением по сравнению с контрольной группой, состоящей из худых особей [33]. Однако мало что известно о влиянии сорбитола на кристаллины в отдельности, исследования в этом направлении ведутся в настоящее время. Несмотря на обширные исследования касательно вклада сорбитола в развитие диабетической катаракты, не было предпринято никаких попыток проанализировать влияние сорбитола на структурные и функциональные аспекты кристаллинов. Предварительные результаты, представленные в настоящем исследовании, позволяют с большой долей уверенности предположить, что хроническое воздействие сорбитола на белки хрусталика, включая α-кристаллин, при диабете делает их более восприимчивыми к агрегации и снижению CLA, тем самым предрасполагая хрусталик к образованию катаракты наряду с осмотическим стрессом.

Благодарности. Работа GBR поддерживается грантами Индийского совета медицинских исследований, Департамента биотехнологии и Совета по научным и инженерным исследованиям правительства Индии. Исследования, проведен-

ные в Университете Хайдарабада, были поддержаны Комиссией по университетским грантам (Индия) в рамках программ UPE-II и CAS, а также Министерством науки и технологий (Индия) в рамках программ PURSE и FIST. Работа CUK и US поддерживается исследовательской стипендией Индийского совета медицинских исследований, а VS – исследовательской стипендией Совета научных и промышленных исследований правительства Индии.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Соблюдение этических норм. Соблюдались все применимые международные, национальные и/или институциональные рекомендации по уходу и использованию животных.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Pascolini, D., and Mariotti, S. P. (2012) Global estimates of visual impairment: 2010, *Br. J. Ophthalmol.*, **96**, 614-618, doi: 10.1136/bjophthalmol-2011-300539.
2. Congdon, N. G., Friedman, D. S., and Lietman, T. (2003) Important causes of visual impairment in the world today, *JAMA*, **290**, 2057-2060, doi: 10.1001/jama.290.15.2057.
3. Asbell, P. A., Dualan, I., Mindel, J., Brocks, D., Ahmad, M., et al. (2005) Age-related cataract, *Lancet*, **365**, 599-609, doi: 10.1016/S0140-6736(05)17911-2.
4. Drinkwater, J. J., Davis, W. A., and Davis, T. M. E. (2019) A systematic review of risk factors for cataract in type 2 diabetes, *Diabetes Metab. Res. Rev.*, **35**, e3073, doi: 10.1002/dmrr.3073.
5. International Diabetes Federation (2019) *IDF Diabetes Atlas 2019*, 9th Edn., World Health Organisation, URL: https://diabetesatlas.org/upload/resources/material/20200302_133351_IDFATLAS9e-final-web.pdf.
6. Wistow, G. J., and Piatigorsky, J. (1988) Lens crystallins: The evolution and expression of proteins for a highly specialized tissue, *Annu. Rev. Biochem.*, **57**, 479-504, doi: 10.1146/annurev.bi.57.070188.002403.
7. Reddy, G. B., Kumar, P. A., and Kumar, M. S. (2006) Chaperone-like activity and hydrophobicity of alpha-crystallin, *IUBMB Life*, **58**, 632-641, doi: 10.1080/15216540601010096.
8. Reddy, V. S., and Reddy, G. B. (2016) Role of crystallins in diabetic complications, *Biochim. Biophys. Acta*, **1860**, 269-277, doi: 10.1016/j.bbagen.2015.05.009.
9. Srinivas, P. N., Reddy, P. Y., and Reddy, G. B. (2008) Significance of alpha-crystallin heteropolymer with a 3 : 1 alphaA/alphaB ratio: Chaperone-like activity, structure and hydrophobicity, *Biochem. J.*, **414**, 453-460, doi: 10.1042/BJ20080544.
10. Kumar, P. A., and Reddy, G. B. (2009) Modulation of alpha-crystallin chaperone activity: A target to prevent or delay cataract? *IUBMB life*, **61**, 485-495, doi: 10.1002/iub.176.
11. Horwitz, J. (2003) Alpha-crystallin, *Exp. Eye Res.*, **76**, 145-153, doi: 10.1016/s0014-4835(02)00278-6.
12. Yan, H., Harding, J. J., Hui, Y. N., and Li, M. Y. (2003) Decreased chaperone activity of alpha-crystallin in selenite cataract may result from selenite-induced aggregation, *Eye*, **17**, 637-645, doi: 10.1038/sj.eye.6700419.
13. Kelley, M. J., David, L. L., Iwasaki, N., Wright, J., and Shearer, T. R. (1993) alpha-Crystallin chaperone activity is reduced by calpain II *in vitro* and in selenite cataract, *J. Biol. Chem.*, **268**, 18844-18849.
14. Kumar, P. A., Suryanarayana, P., Reddy, P. Y., and Reddy, G. B. (2005) Modulation of alpha-crystallin chaperone activity in diabetic rat lens by curcumin, *Mol. Vis.*, **11**, 561-568.
15. Huang, F. Y., Ho, Y., Shaw, T. S., and Chuang, S. A. (2000) Functional and structural studies of alpha-crystallin from galactosemic rat lenses, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **273**, 197-202, doi: 10.1006/bbrc.2000.2924.
16. Kumar, P. A., Kumar, M. S., and Reddy, G. B. (2007) Effect of glycation on alpha-crystallin structure and chaperone-like function, *Biochem. J.*, **408**, 251-258, doi: 10.1042/BJ20070989.
17. Bloemendal, H., de Jong, W., Jaenicke, R., Lubsen, N. H., Slingsby, C., et al. (2004) Ageing and vision: Structure, stability and function of lens crystallins, *Progr. Biophys. Mol. Biol.*, **86**, 407-485, doi: 10.1016/j.pbiomolbio.2003.11.012.
18. Abraham, E. C., Swamy, M. S., and Perry, R. E. (1989) Nonenzymatic glycosylation (glycation) of lens crystallins in diabetes and aging, *Progr. Clin. Biol. Res.*, **304**, 123-139.
19. Brownlee, M., Vlassara, H., and Cerami, A. (1984) Nonenzymatic glycosylation and the pathogenesis of diabetic complications, *Ann. Int. Med.*, **101**, 527-537, doi: 10.7326/0003-4819-101-4-527.
20. Kumar, M. S., Reddy, P. Y., Kumar, P. A., Surolia, I., and Reddy, G. B. (2004) Effect of dicarbonyl-induced browning on alpha-crystallin chaperone-like activity: Physiological significance and caveats of *in vitro* aggregation assays, *Biochem. J.*, **379**, 273-282, doi: 10.1042/BJ20031633.
21. Chitra, P. S., Chaki, D., Boiroju, N. K., Mokalla, T. R., Gadde, A. K., et al. (2020) Status of oxidative stress markers, advanced glycation index, and polyol pathway in age-related cataract subjects with and without diabetes, *Exp. Eye Res.*, **200**, 108230, doi: 10.1016/j.exer.2020.108230.
22. Kumar, P. A., and Reddy, G. B. (2007) Focus on molecules: Aldose reductase, *Exp. Eye Res.*, **85**, 739-740, doi: 10.1016/j.exer.2006.08.002.
23. Varma, S. D., Kumar, S., and Richards, R. D. (1979) Light-induced damage to ocular lens cation pump: Prevention by vitamin C, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **76**, 3504-3506, doi: 10.1073/pnas.76.7.3504.
24. Thampi, P., Zarina, S., and Abraham, E. C. (2002) alpha-Crystallin chaperone function in diabetic rat and human lenses, *Mol. Cell. Biochem.*, **229**, 113-118, doi: 10.1023/a:1017980713089.
25. Cherian, M., and Abraham, E. C. (1995) Diabetes affects alpha-crystallin chaperone function, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **212**, 184-189, doi: 10.1006/bbrc.1995.1954.
26. Srinivas, P., Narahari, A., Petrash, J. M., Swamy, M. J., and Reddy, G. B. (2010) Importance of eye lens alpha-crystallin heteropolymer with 3:1 alphaA to alphaB ratio: Stability, aggregation, and modifications, *IUBMB Life*, **62**, 693-702, doi: 10.1002/iub.373.
27. Snow, A., Shieh, B., Chang, K. C., Pal, A., Lenhart, P., et al. (2015) Aldose reductase expression as a risk factor for cataract, *Chem. Biol. Interact.*, **234**, 247-253, doi: 10.1016/j.cbi.2014.12.017.
28. Pfeifer, M. A., Schumer, M. P., and Gelber, D. A. (1997) Aldose reductase inhibitors: the end of an era or the need for different trial designs? *Diabetes*, **46 Suppl. 2**, S82-S89, doi: 10.2337/diab.46.2.s82.
29. Suryanarayana, P., Saraswat, M., Petrash, J. M., and Reddy, G. B. (2007) Emblica officinalis and its enriched

tannoids delay streptozotocin-induced diabetic cataract in rats, *Mol. Vis.*, **13**, 1291-1297.
30. Akileshwari, C., Raghu, G., Muthenna, P., Mueller, N. H., Suryanaryana, P., et al. (2014) Bioflavonoid ellagic acid inhibits aldose reductase: Implications for prevention of diabetic complications, *J. Funct. Foods*, **6**, 374-383, doi: 10.1016/j.jff.2013.11.004.
31. Kumar, M. S., Kapoor, M., Sinha, S., and Reddy, G. B. (2005) Insights into hydrophobicity and the chaperone-like function of alphaA- and alphaB-crystallins: An isothermal titration calorimetric study, *J. Biol. Chem.*, **280**, 21726-21730, doi: 10.1074/jbc.M500405200.
32. Das, K. P., and Surewicz, W. K. (1995) Temperature-induced exposure of hydrophobic surfaces and its effect on the chaperone activity of alpha-crystallin, *FEBS Lett.*, **369**, 321-325, doi: 10.1016/0014-5793(95)00775-5.
33. Reddy, P. Y., Giridharan, N. V., and Reddy, G. B. (2012) Activation of sorbitol pathway in metabolic syndrome and increased susceptibility to cataract in Wistar-Obese rats, *Mol. Vis.*, **18**, 495-503.
34. Randazzo, J., Zhang, P., Makita, J., Blessing, K., and Kador, P. F. (2011) Orally active multi-functional antioxidants delay cataract formation in streptozotocin (type 1) diabetic and gamma-irradiated rats, *PLoS One*, **6**, e18980, doi: 10.1371/journal.pone.0018980.
35. Haque, I., Singh, R., Moosavi-Movahedi, A. A., and Ahmad, F. (2005) Effect of polyol osmolytes on DeltaG(D), the Gibbs energy of stabilisation of proteins at different pH values, *Biophys. Chem.*, **117**, 1-12, doi: 10.1016/j.bpc.2005.04.004.
36. Xie, G., and Timasheff, S. N. (1997) Mechanism of the stabilization of ribonuclease A by sorbitol: Preferential hydration is greater for the denatured then for the native protein, *Protein Sci.*, **6**, 211-221, doi: 10.1002/pro.5560060123.
37. Khan, S. H., Ahmad, N., Ahmad, F., and Kumar, R. (2010) Naturally occurring organic osmolytes: From cell physiology to disease prevention, *IUBMB Life*, **62**, 891-895, doi: 10.1002/iub.406.
38. Ferreira, L. A., Uversky, V. N., and Zaslavsky, B. Y. (2017) Role of solvent properties of water in crowding effects induced by macromolecular agents and osmolytes, *Mol. bioSystems*, **13**, 2551-2563, doi: 10.1039/c7mb00436b.
39. Beeley, L. (1983) Assessing new drugs, *Practitioner*, **227**, 1527-1534.
40. Williamson, J. (2012) Linking diabetic complications to sorbitol oxidation, oxidative stress and metabolic suppression, *J. Diab. Metab.*, **3**, 219, doi: 10.4172/2155-6156.1000219.
41. Cherian, M., and Abraham, E. C. (1995) Decreased molecular chaperone property of alpha-crystallins due to post-translational modifications, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **208**, 675-679, doi: 10.1006/bbrc.1995.1391.
42. Plater, M. L., Goode, D., and Crabbe, M. J. (1997) Ibuprofen protects alpha-crystallin against posttranslational modification by preventing protein cross-linking, *Ophthalm. Res.*, **29**, 421-428, doi: 10.1159/000268043.
43. Peluso, G., Petillo, O., Barbarisi, A., Melone, M. A., Reda, E., et al. (2001) Carnitine protects the molecular chaperone activity of lens alpha-crystallin and decreases the post-translational protein modifications induced by oxidative stress, *FASEB J.*, **15**, 1604-1606, doi: 10.1096/fj.00-0727fje.
44. Rajan, S., Horn, C., and Abraham, E. C. (2006) Effect of oxidation of alphaA- and alphaB-crystallins on their structure, oligomerization and chaperone function, *Mol. Cell. Biochem.*, **288**, 125-134, doi: 10.1007/s11010-006-9128-4.
45. Verma, G., Singh, P., and Bhat, R. (2020) Disorder under stress: Role of polyol osmolytes in modulating fibrillation and aggregation of intrinsically disordered proteins, *Biophys. Chem.*, **264**, 106422, doi: 10.1016/j.bpc.2020.106422.
46. Aravindan, S., Chen, S., Choudhry, H., Molfetta, C., Chen, K. Y., et al. (2020) Osmolytes dynamically regulate mutant Huntingtin aggregation and CREB function in Huntington's disease cell models, *Sci. Rep.*, **10**, 15511, doi: 10.1038/s41598-020-72613-3.
47. Reddy, P. Y., Giridharan, N. V., Balakrishna, N., Validandi, V., Pullakhandam, R., et al. (2013) Increased risk of cataract development in WNIN-obese rats due to accumulation of intralenticular sorbitol, *IUBMB Life*, **65**, 472-478, doi: 10.1002/iub.1163.

EFFECT OF SORBITOL ON ALPHA-CRYSTALLIN STRUCTURE AND FUNCTION

Ch. U. Kumar[1], U. Suryavanshi[1], V. Sontake[1], P. Y. Reddy[1], R. S. Sankhala[2], M. J. Swamy[2], and G. B. Reddy[1]*

[1] *Biochemistry Division, National Institute of Nutrition, Hyderabad 500007, India; e-mail: reddyg.bp@icmr.gov.in; geereddy@yahoo.com*

[2] *School of Chemistry, University of Hyderabad, Hyderabad 500046, India*

Loss of eye lens transparency due to cataract is the leading cause of blindness all over the world. While aggregation of lens crystallins is the most common endpoint in various types of cataracts, chaperone-like activity (CLA) of α-crystallin preventing protein aggregation is considered to be important for maintaining the eye lens transparency. Osmotic stress due to increased accumulation of sorbitol under hyperglycemic conditions is believed to be one of the mechanisms for diabetic cataract. In addition, compromised CLA of α-crystallin in diabetic cataract has been reported. However, the effect of sorbitol on the structure and function of α-crystallin has not been elucidated yet. Hence, in the present exploratory study, we described the effect of varying concentrations of sorbitol on the structure and function of α-crystallin. Alpha-crystallin purified from the rat lens was incubated with varying concentrations of sorbitol in the dark under sterile conditions for up to 5 days. At the end of incubation, structural properties and CLA were evaluated by spectroscopic methods. Interestingly, different concentrations of sorbitol showed contrasting results: at lower concentrations (5 and 50 mM) there was a decrease in CLA and subtle alterations in secondary and tertiary structure but not at higher concentrations (500 mM). Though, these results shed a light on the effect of sorbitol on α-crystallin structure–function, further studies are required to understand the mechanism of the observed effects and their implication to cataractogenesis.

Keywords: alpha-crystallin, cataract, chaperone-like activity, sorbitol, structure

EDN: RDVZLH
БИОХИМИЯ, 2022, том 87, вып. 3, с. 430 – 441

УДК 615;616-05

ХИМЕРНЫЙ АГОНИСТ РЕЦЕПТОРА ГАЛАНИНА GALR2 УМЕНЬШАЕТ ПОВРЕЖДЕНИЕ СЕРДЦА КРЫС ПРИ СТРЕПТОЗОТОЦИН-ИНДУЦИРОВАННОМ ДИАБЕТЕ

© 2022 И.М. Студнева, О.М. Веселова, И.В. Доброхотов, Л.И. Серебрякова, М.Е. Палькеева, А.С. Молокоедов, А.А. Азьмуко, М.В. Овчинников, М.В. Сидорова, О.И. Писаренко*

ФГБУ «НМИЦ кардиологии» Минздрава РФ, 121552 Москва, Россия; электронная почта: olpi@live.ru

Поступила в редакцию 15.02.2022
После доработки 28.02.22
Принята к публикации 28.02.2022

Нейропептид галанин и его *N*-концевые фрагменты снижают образование активных форм кислорода и нормализуют метаболическое и антиоксидантное состояния миокарда при экспериментальной кардиомиопатии и ишемическом/реперфузионном повреждении. Целью настоящего исследования было выяснение влияния фармакологического агониста WTLNSAGYLLGPβAH-OH (G) рецептора галанина GalR2 на повреждение сердца, вызванные введением стрептозотоцина (STZ) крысам. Пептид G получали твердофазным пептидным синтезом с использованием Fmoc-стратегии и очищали препаративной ВЭЖХ. Его структура была определена с помощью ^{1}H-ЯМР-спектроскопии и MALDI-TOF-масс-спектрометрии. Животные были рандомизированы в пять групп: K – контроль; S, SG10 и SG50, которым вводили STZ, STZ + G (10 нмоль/кг/сут.) и STZ + G (50 нмоль/кг/сут.); и G – здоровые животные, получавшие G (50 нмоль/кг/сут.) Введение G предотвращало гипергликемию у крыс группы SG50. К окончанию эксперимента содержание ATP, общего фонда аденинуклеотидов, фосфокреатина и отношение PCr/ATP в миокарде животных группы SG50 было достоверно выше этих показателей в группе S. Одновременно в группах SG50 и SG10 содержание лактата и отношение лактат/пируват в миокарде крыс было снижено, а глюкозы – увеличено по сравнению с этими показателями в группе S. Обе дозы G снижали повышенную активность креатинкиназы-MB и лактатдегидрогеназы и уменьшали концентрацию тиобарбитуратных кислотно-активных продуктов в плазме крови крыс, получавших STZ, до значений не отличающихся от контроля. Полученные результаты свидетельствуют о том, что G обладает кардиопротекторными свойствами при сахарном диабете 1-го типа. Обсуждены возможные механизмы действия пептида G при STZ-индуцированном диабете.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: галанин, сердце, стрептозотоцин, метаболизм миокарда, перекисное окисление липидов, мембраны кардиомиоцитов.

DOI: 10.31857/S0320972522030095

ВВЕДЕНИЕ

Сахарный диабет (СД) 1-го типа – хроническое аутоиммунное заболевание, связанное с избирательной деструкцией инсулин-продуцирующих β-клеток поджелудочной железы. Дисфункция и потеря β-клеток приводят к дефициту инсулина и гипергликемии. Несмотря на применение препаратов, снижающих сахар, СД и сопутствующие осложнения остаются серьёзной проблемой здравоохранения во всём мире [1]. СД, вызванный стрептозотоцином (STZ), является общепризнанной экспериментальной моделью, которая используется для изучения новых терапевтических методов [2]. Одной из особенностей STZ является то, что это соединение может быть токсичным для других органов, включая сердце. Результаты исследования диабета у пациентов и на лабораторных животных свидетельствуют о том, что нарушения энергетического обмена в кардиомиоцитах способствуют развитию дисфункции сердца [3, 4]. Окислительный стресс также участвует в патогенезе СД. Увеличение образования активных форм кислорода (АФК) при СД обусловлено ау-

Принятые сокращения: АФК – активные формы кислорода; ПОЛ – перекисное окисление липидов; СД – сахарный диабет; βAH-OH – карнозин; CK-MB – креатинкиназа-MB; Cr – креатин; GLUT4 – переносчик глюкозы 4; LDH – лактатдегидрогеназа; STZ – стрептозотоцин; PCr – фосфокреатин; TBARS – тиобарбитуратные кислотно-активные продукты (2-tiobarbituric acid reacting substances); WTLNSAGYLL-NH2 – *N*-концевой фрагмент галанина (2–11); WTLNSAGYLLGPHA-OH – *N*-концевой фрагмент галанина (2–15); WTLNSAGYLLGPβAH-OH (G) – модифицированный аналог галанина (2–15); ΣAN – общий фонд аденинуклеотидов (ATP + ADP + AMP); ΣCr – общий креатин (PCr + Cr).

* Адресат для корреспонденции.

тоокислением глюкозы, неферментативным гликированием белков и последующей окислительной деградацией гликозилированных белков [5]. Избыточное образование АФК, перекисное окисление липидов мембран и недостаточная антиоксидантная защита хорошо документированы у пациентов с диабетом и в эксперименте [6]. В связи с этим стратегии, улучшающие образование энергии в митохондриях сердца и снижающие окислительный стресс, могут быть перспективными для защиты миокарда от повреждающего действия СД.

Нейропептид галанин, состоящий из 29 а.о. (30 а.о. – у человека), широко распространён в центральной и периферической нервных системах и экспрессируется в различных тканях и органах [7]. Галанин проявляет свою биоактивность через три различных рецептора, связанных с G-белками, GalR1, GalR2 и GalR3, все они находятся в сердце. Ранее мы показали, что экзогенный галанин и его *N*-концевые фрагменты ослабляют повреждение сердца при доксорубицин-индуцированной кардиомиопатии и ишемическом/реперфузионном стрессе. В частности, *N*-концевые фрагменты галанина (2–11) и (2–15), WTLNSAGYLL-NH2 и WTLNSAGYLLGPHA-OH соответственно, обладающие высоким сродством к подтипу рецептора GalR2, повышают жизнеспособность клеток, ингибируют апоптоз и образование супероксида и пероксида водорода в митохондриях кардиомиобластов крыс линии H9c2 при гипоксии/реоксигенации [8, 9]. Внутривенное введение этих пептидов крысам после регионарной ишемии миокарда уменьшает размер инфаркта и активность маркёров некроза в плазме крови при реперфузии [10]. Эти эффекты сопровождаются снижением образования аддуктов гидроксильных радикалов в интерстиции зоны риска при реперфузии и меньшим образованием продуктов перекисного окисления липидов (ПОЛ) в реперфузированном миокарде [11]. Химически модифицированный аналог *N*-концевого фрагмента галанина (2–15) – химерный агонист рецептора GalR2 WTLNSAGYLLGPβAH-OH (G) – также уменьшает дисфункцию левого желудочка и улучшает энергетическое состояние и функции митохондрий в сердце крыс с доксорубициновой кардиомиопатией [12]. Кроме того, введение G предотвращает ПОЛ в повреждённом сердце за счёт повышения активности Cu,Zn-супероксиддисмутазы (Cu,Zn-СОД) и глутатионпероксидазы (GSH-Px) [13].

Известно, что галанин играет важную роль в поддержании чувствительности к инсулину и ингибировании секреции инсулина для уменьшения гиперинсулинемии при СД 2-го типа [14]. Предполагается, что этот эндогенный пептид может регулировать чувствительность к инсулину, увеличивая экспрессию переносчика глюкозы 4 (GLUT4) и способствуя транслокации GLUT4 к плазматической мембране кардиомиоцитов для увеличения поглощения глюкозы [15]. Животные с нарушением метаболизма галанина особенно склонны к развитию СД 2-го типа, сопровождающегося инсулинорезистентностью [16]. Хотя эти экспериментальные факты указывают на терапевтический потенциал галанина при СД, влияние его экзогенных *N*-концевых фрагментов при этой патологии остаётся неизученным. Целью данной работы было изучение эффективности пептида G, представляющего последовательность галанина (2–13), дополненную дипептидом карнозин (βAH-OH), для снижения метаболических нарушений миокарда на модели STZ-диабета у крыс. Мы сосредоточились на влиянии этого пептида на уровень глюкозы в крови и ткани сердца, показателях энергетического состояния миокарда и повреждениях мембран кардиомиоцитов. Наши результаты показывают, что введение G может значительно уменьшать развитие метаболических нарушений и повреждений мембран кардиомиоцитов, вызванных STZ.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Модифицированный фрагмент галанина G. Пептид G WTLNSAGYLLGPβAH-OH был получен путём ступенчатого твердофазного синтеза с использованием Fmoc-методологии [17]. Он был очищен методом высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ) на обращённой фазе, его структура охарактеризована с помощью ^{1}H-ЯМР-спектроскопии и времяпролётной масс-спектрометрии с матрично-ассоциированной лазерной десорбцией/ионизацией (MALDI-TOFF). Характеристика G представлена в табл. 1.

Животные. В работе использовали крыс-самцов линии Вистар массой 290–310 г. Крыс содержали в индивидуальных клетках при температуре 20–25 °C с естественным циклом свет-темнота; они имели свободный доступ к стандартному гранулированному корму («Aller Petfood», Санкт-Петербург, Россия) и воде.

Дизайн исследования. Перед исследованием всех крыс взвешивали и после 24-часового голодания у пяти животных брали кровь из хвостовой вены для определения исходной концентрации глюкозы, активности креатинкиназы-МВ (CK-MB), лактатдегидрогеназы (LDH) и тиобарбитуратных кислотно-активных продук-

Таблица 1. Характеристика пептида G

Последовательность	Мол. масса, г/моль	Выход*, %	MALDI-TOF, m/z	Растворимость в воде, мг/мл	ВЭЖХ **	
					R_t, мин	Чистота, %
WTLNSAGYLLGP-β**AH**-OH	1499,67	46,3	1499,76 $[M + H]^+$, 1521,73 $[M + Na]^+$ 1537,72 $[M + K]^+$	> 20	14,66	98,2

Примечание. Замена аминокислот показана жирным шрифтом. R_t – время удерживания.
* Выход пептида приведён в расчёте на стартовую аминокислоту, присоединённую к полимерному носителю.
** Аналитическую ВЭЖХ проводили на хроматографе Knauer («Wissenschaftlich-Technische Werkstatten GmbH», Германия) на колонке (4,6 × 250 мм) Kromasil 100-5 C18 («AkzoNobel», Швеция), размер частиц сорбента – 5 мкм, размер пор – 100 Å. В качестве элюентов использовали: буфер А – 0,1%-ная трифторуксусная кислота, буфер Б – 80% ацетонитрила в буфере А, элюцию проводили со скоростью 1 мл/мин в градиенте концентрации буфера Б в буфере А от 20 до 80% за 30 мин, детекцию осуществляли при 220 нм.

тов (TBARS) в плазме. У пяти крыс, анестезированных 2,2,2-трибромэтанолом (авертин, 1 мг/кг внутрибрюшинно (в/б); «Acros Organic», Бельгия), извлекали сердце и замораживали в жидком азоте с помощью зажима Волленбергера для оценки содержания метаболитов в миокарде (исходное состояние). Остальные крысы были рандомизированы в пять групп по 10 крыс в каждой: контрольная (K), STZ (S), STZ + G10 (SG10), STZ + G50 (SG50) и галаниновая (G). Крысы получали одну в/б инъекцию STZ («Sigma-Aldrich», США) в дозе 35 мг/кг. STZ растворяли в 0,1 M цитратном буфере (pH 4,5) перед использованием. Умеренная доза STZ была выбрана для того, чтобы исключить гибель животных и ежедневные инъекции инсулина [18]. Животным контрольной группы (K) в первый день вводили в/б такой же объём 0,1 M цитратного буфера (pH 4,5), а в последующие дни в течение 4 недель в/б вводили физиологический раствор. Животные группы SG10 получали одну в/б инъекцию STZ (35 мг/кг) и в/б инъекции G в дозе 10 нмоль/кг/сут. в течение 4 недель. Животные группы SG50 получали одну в/б инъекцию STZ (35 мг/кг) и в/б инъекции G в дозе 50 нмоль/кг/сут. в течение 4 недель. Первую инъекцию G делали через 2 ч после введения STZ. Животным группы галанина (G) ежедневно вводили в/б G в дозе 50 нмоль/кг/сут. в течение 4 недель. Пептид G растворяли в физиологическом растворе непосредственно перед использованием. Дозы G были выбраны на основании доступных в литературе данных [15] и собственных пилотных исследований. У крыс всех групп еженедельно определяли массу тела и концентрацию глюкозы в крови после 24-часового голодания. После 4-недельного исследования у всех животных забирали кровь из хвостовой вены для определения активности CK-MB, LDH и содержания TBARS в плазме. У пяти крыс каждой группы, наркотизированных 2,2,2-трибромэтанолом (1 мг/кг в/б, «Acros Organic»), извлекали сердце и замораживали в жидком азоте с помощью зажима Волленбергера для анализа метаболитов.

Обработка ткани миокарда и анализ метаболитов. Замороженные сердца гомогенизировали в охлаждённой 6%-ной $HClO_4$ (1/10, *w/v*) с использованием гомогенизатора Ultra-Turrax T-25 («Janke & Kunkel IKA-labortechnik», Германия). Гомогенаты центрифугировали при 2000 *g* в течение 20 мин при 4 °C на центрифуге Sorvall RT1 («Thermo Scientific», США). Супернатанты нейтрализовали раствором 5 M K_2CO_3 до pH 7,4; после охлаждения экстракты центрифугировали для удаления осадка $KClO_4$. Массу сухой ткани определяли путём взвешивания тканевого осадка после экстракции 6%-ной $HClO_4$ и сушки в течение ночи при 110 °C. Концентрации ATP, ADP, AMP, фосфокреатина (PCr), креатина (Cr), лактата, пирувата и глюкозы в нейтрализованных безбелковых тканевых экстрактах определяли модифицированными ферментативными методами на спектрофотометре UV-1800 («Shimadzu», Япония) [19]. Концентрацию глюкозы в крови натощак измеряли глюкометром Accu-Check Instant («Boehringer Mannheim», Германия). Набор «TBARS Assay Kit» («Cayman Chemicals», США) использовали для спектрофотометрического измерения продуктов ПОЛ TBARS в плазме крови.

Оценка повреждения клеточных мембран. Плазму образцов крови, собранных в исходном состоянии и в конце эксперимента, получали центрифугированием при 4 °C и 1500 *g* в течение 10 мин в гепаринизированных пробирках и да-

лее хранили при –80 °C. Активность LDH в плазме определяли ферментативно с пируватом в качестве субстрата на спектрофотометре Shimadzu UV-1800 при λ = 340 нм [20]. Активность CK-MB в плазме оценивали методом иммуноингибирования с использованием стандартных наборов «Creatine kinase-MB» («BioSystems S.A.», Испания).

Статистическая обработка данных. Использован пакет программ SigmaPlot 11.2 («SysStat», США). Данные представлены в виде среднего значения ± стандартная ошибка среднего (M ± SEM). При сравнении нескольких групп с контролем использовали *t*-критерий Стьюдента с поправкой Бонферрони. Статистически значимыми отличия считали при $p < 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

Масса тела крыс и уровень глюкозы в крови. Достоверных различий в исходной массе тела животных между группами не было (табл. 2). В контроле наблюдалось прогрессирующее увеличение массы тела в течение периода наблюдения. Напротив, у животных группы S отмечено выраженное нарушение прироста массы на протяжении всего исследования. В конце эксперимента средняя масса тела в этой группе была на 20% ниже, чем у животных контрольной группы ($p < 0,001$). Совместное введение STZ и G в дозе 10 или 50 нмоль/кг/сут. в течение 4 недель достоверно увеличивало прирост массы тела по сравнению с диабетической группой S к концу эксперимента. При этом достоверных различий между группой SG50 и контролем после 4-недельного эксперимента не наблюдалось. На протяжении всего периода наблюдения прирост массы тела здоровых крыс, получавших G в дозе 50 нмоль/кг/сут. в течение 4 недель, был таким же, как и у контрольных животных.

Введение STZ значительно повышало уровень глюкозы в крови, отобранной натощак, по сравнению с этим показателем в контрольной группе в течение всего эксперимента (табл. 2). После 4-недельного исследования концентрация глюкозы в крови у животных группы S составила 12,9 ± 2,6 мМ по сравнению с исходным уровнем 5,3 ± 0,2 мМ ($p < 0,001$). Совместное введение STZ и обеих доз пептида G заметно снижало уровень глюкозы в крови по сравнению с группой S. Разница в концентрации глюкозы в крови между группами S и SG50 была статистически значимой с первой недели исследования. К концу 4 недели концентрация глюкозы в крови в группе SG50 была в 1,8 раза ниже, чем в группе S ($p < 0,05$), и достоверно не отличалась от значения в контроле. Достоверных различий в уровне глюкозы в группе G по сравнению с контролем в ходе всего эксперимента не наблюдалось.

Таблица 2. Изменения массы тела крыс и концентрации глюкозы в крови в исследуемых группах в течение 4-недельного эксперимента

Группа	Исходное состояние	Первая неделя	Четвёртая неделя
Масса тела, г			
K	299,0 ± 4,9	318,6 ± 6,0$^{\#}$	397,6 ± 5,1$^{\#}$
S	294,8 ± 6,5	295,6 ± 6,4*	323,1 ± 11,2$^{*,\#}$
SG10	298,4 ± 4,3	293,2 ± 5,2*	355,6 ± 8,0$^{\#,+}$
SG50	299,0 ± 4,0	305,6 ± 8,3	370,6 ± 12,3$^{\#,+}$
G	302,2 ± 3,8	325,3 ± 5,6$^{\#,+}$	411,5 ± 7,4$^{\#,+}$
Концентрация глюкозы, мМ			
K	5,6 ± 0,3	6,8 ± 0,7	6,7 ± 0,5
S	5,3 ± 0,2	11,6 ± 1,8$^{*,\#}$	12,9 ± 2,6$^{*,\#}$
SG10	4,9 ± 0,9	8,4 ± 0,9$^{\#}$	8,0 ± 0,6$^{\#}$
SG50	4,9 ± 0,6	7,6 ± 0,2$^{\#,+}$	7,3 ± 0,5$^{\#,+}$
G	5,7 ± 0,6	6,4 ± 0,4	6,9 ± 0,6

Примечание. Данные представлены как M ± SEM для групп из 10 животных. Достоверное отличие $p < 0,05$ от: * (контроля), # (исходного состояния), + (группы S).

Маркёры окислительного стресса и повреждения мембран. Измерение в плазме TBARS (низкомолекулярных конечных продуктов окислительного повреждения) является удобной оценкой интенсивности ПОЛ при STZ-индуцированном диабете [21]. Через 4 недели исследования концентрация TBARS в плазме крови крыс контрольной группы не изменялась по сравне-

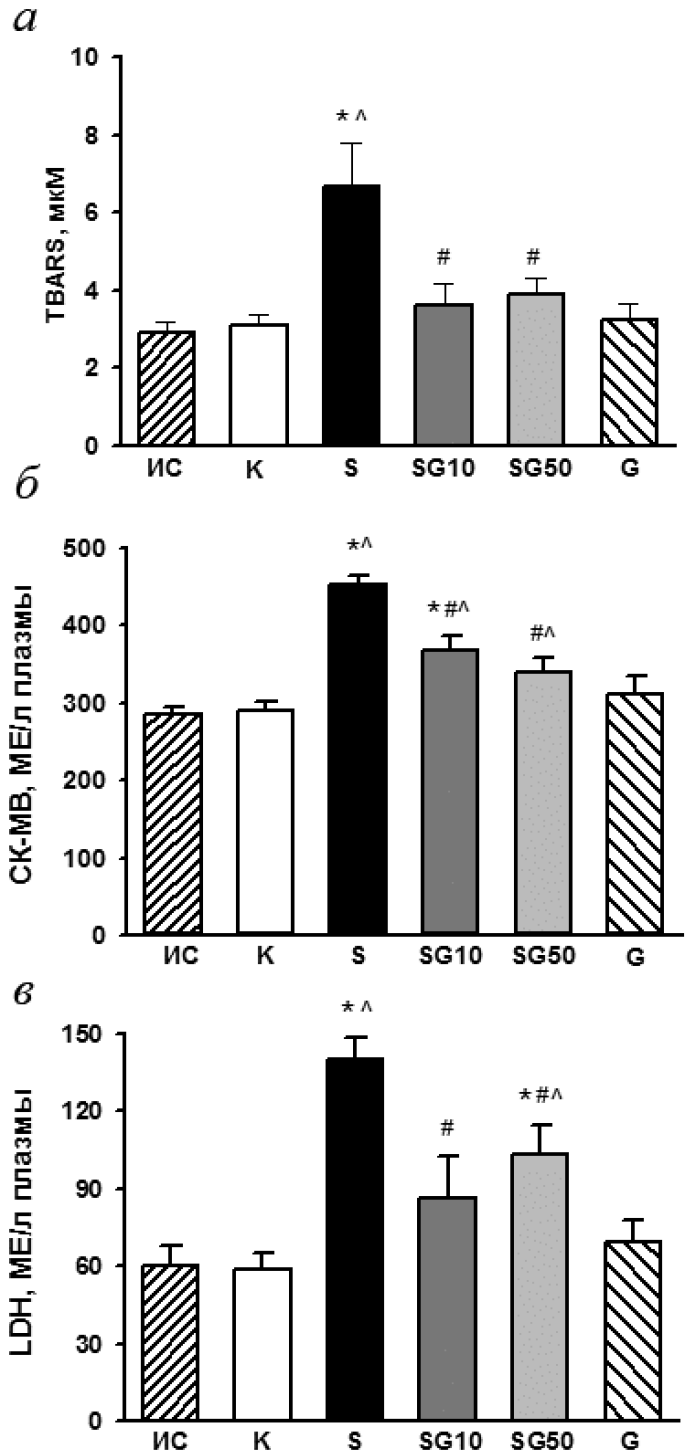


Рис. 1. Влияние пептида G на содержание тиобарбитуратных кислотно-активных продуктов (TBARS) (*а*) и активности СК-МВ (*б*) и LDH (*в*) в плазме крови крыс после 4-недельного эксперимента. ИС – исходное состояние, К – контроль, S – STZ, SG10 – STZ + G (10 нмоль/кг/сут.), SG50 – STZ + G (50 нмоль/кг/сут.), G – пептид G в дозе 50 нмоль/кг/сут. Данные представлены как M ± SEM для групп из 5 животных. Достоверное отличие ($p < 0,05$) от: * К, # S, ^ ИС

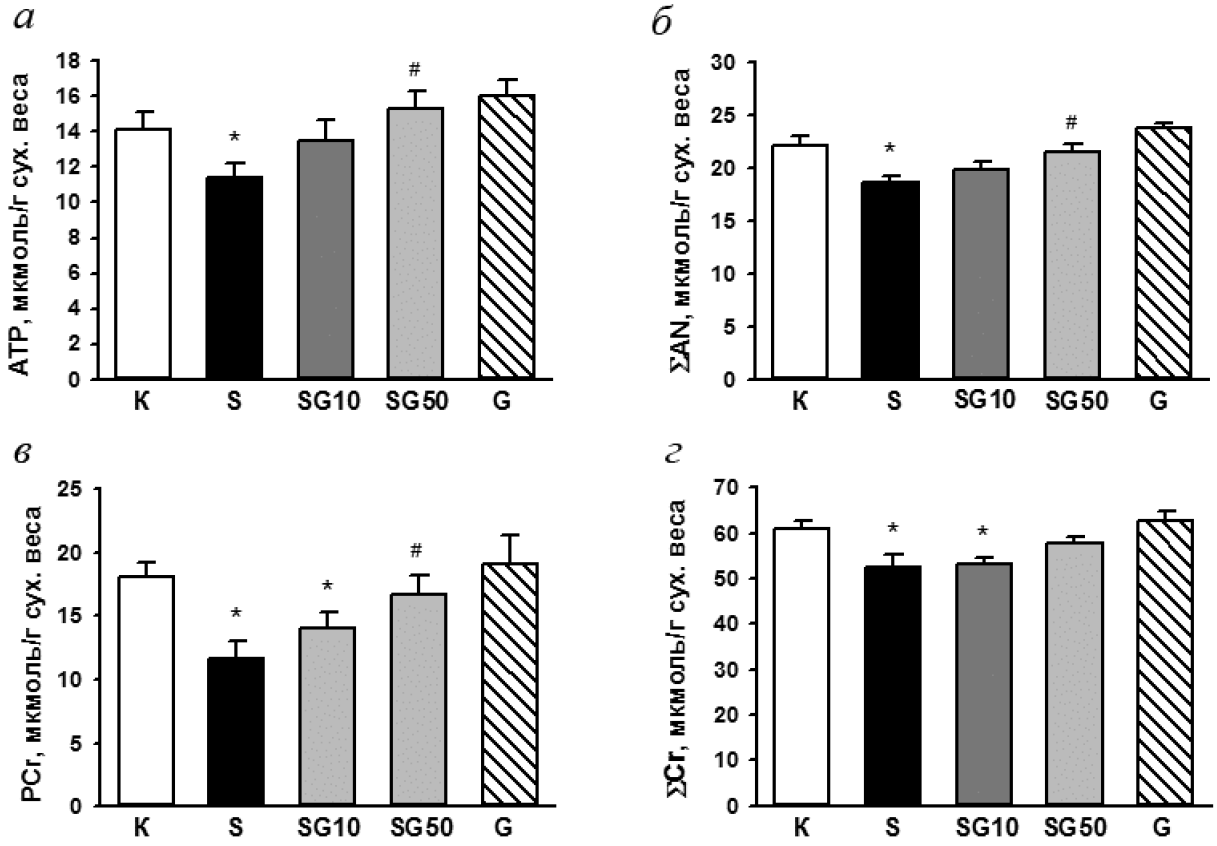


Рис. 2. Влияние пептида G на содержание ATP (*а*), ΣAN (*б*), PCr (*в*) и ΣCr (*г*) в миокарде крыс в конце 4-недельного эксперимента. K – контроль, S – STZ, SG10 – STZ + G (10 нмоль/кг/сут.), SG50 – STZ + G (50 нмоль/кг/сут.), G – пептид G (50 нмоль/кг/сут.). Данные представлены как M ± SEM для групп из 5 животных. Достоверное отличие ($p < 0,05$) от: * K, # S

нию с исходным значением (рис. 1, *а*). Напротив, у крыс группы S этот показатель увеличился более чем в 2 раза, что свидетельствовало об активации ПОЛ. STZ-индуцированное увеличение образования TBARS снижалось под воздействием пептида G. К концу 4-недельного исследования уровень TBARS в группах SG10 и SG50 не отличался от исходного, а разница между обеими пептидными группами (SG10 и SG50) и диабетической группой S была статистически значимой. Введение животным G в дозе 50 нмоль/кг/сут. в течение 4 недель не влияло на уровень TBARS в плазме по сравнению с исходным значением.

Активность LDH и CK-MB в плазме крыс, получавших STZ, была значительно увеличена после 4-недельного исследования по сравнению с исходными и контрольными значениями (рис. 1, *б* и *в*). Совместное введение обеих доз G и STZ уменьшало повреждение клеточных мембран, о чём свидетельствовало достоверное снижение активности обоих ферментов в плазме по сравнению с этими показателями в группе S. Ежедневное введение G (50 нмоль/кг/сут. в течение 4 недель) не влияло на активность LDH и CK-MB в плазме по сравнению с контролем и исходными значениями.

Метаболическое состояние миокарда. Для оценки влияния G на метаболизм миокарда, повреждённого STZ, мы сравнили содержание метаболитов энергетического обмена и гликолитических интермедиатов (глюкозы, лактата и пирувата) в исследуемых группах (рис. 2 и 3). После 4-недельного эксперимента содержание этих метаболитов в миокарде контрольной группы достоверно не отличалось от исходных значений. Под действием STZ наблюдали снижение содержания ATP и общего фонда аденинуклеотидов (ΣAN) (в среднем до 20% от исходного) при практически неизменном суммарном содержании ADP и AMP и потерю общего креатина (ΣCr = PCr + Cr), вызванную главным образом значительным снижением содержания PCr. Отношение PCr/ATP, характеризующее энергообеспечение сердца, было достоверно ниже в группе S по сравнению с этим показателем в контро-

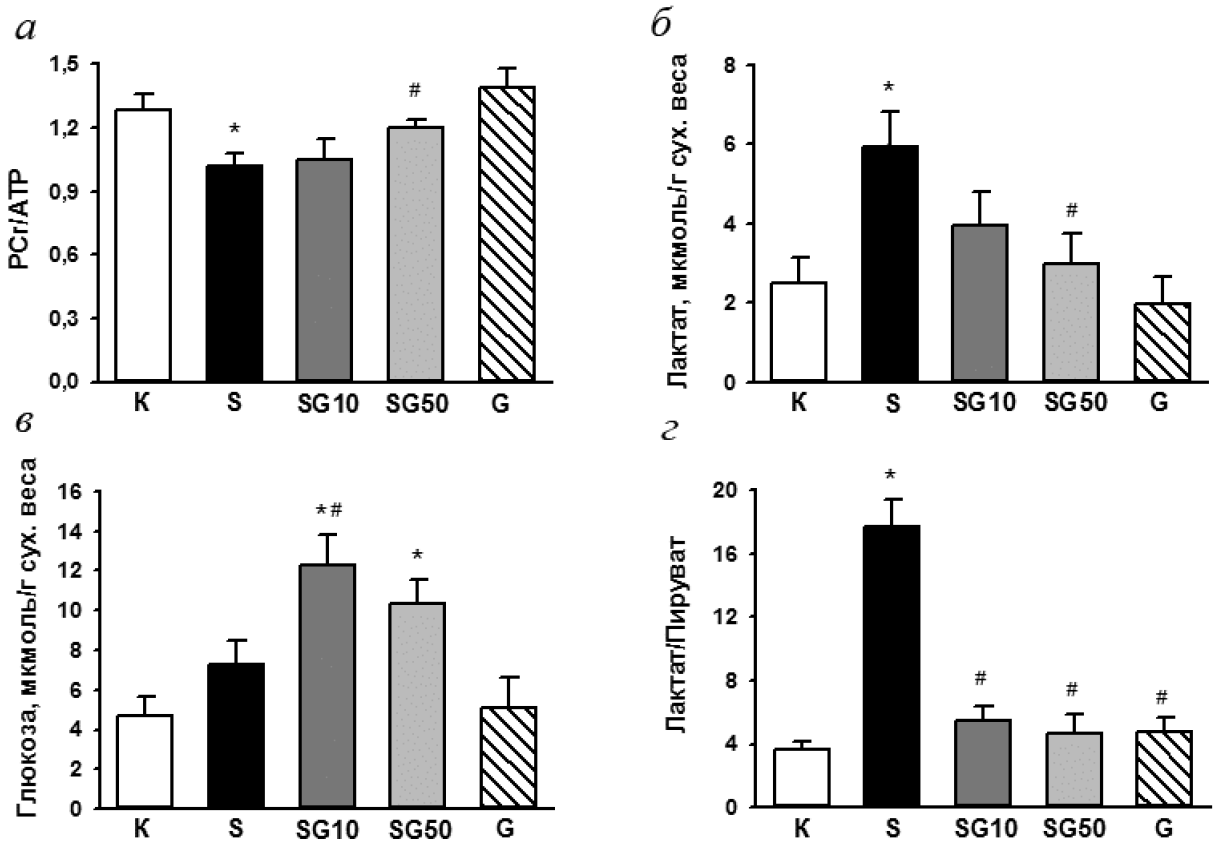


Рис. 3. Влияние пептида G на отношение PCr/ATP (*а*), содержание лактата (*б*), глюкозы (*в*) и отношение лактат/пируват (*г*) в миокарде крыс в конце 4-недельного эксперимента. K – контроль, S – STZ, SG10 – STZ + G (10 нмоль/кг/сут.), SG50 – STZ + G (50 нмоль/кг/сут.), G – пептид G (50 нмоль/кг/сут.). Данные представлены как M ± SEM для групп из 5 животных. Достоверное отличие ($p < 0,05$) от: * K, # S

ле (рис. 3, *а*). Содержание лактата в миокарде крыс, получавших STZ, было в 2,5 раза выше, чем в контроле ($p = 0,015$), глюкозы – повышено в 1,5 раза ($p = 0,143$), а отношение лактат/пируват было почти в 5 раз выше, чем в контроле. Эти сдвиги соответствовали снижению аэробного образования энергии, ингибированию гликолитического потока и пируватдегидрогеназы [22].

Введение крысам G в дозе 50 нмоль/кг/сут. в течение 4 недель после введения STZ достоверно повышало содержание ATP, ΣAN и PCr, предотвращало потерю ΣCr и восстанавливало отношение PCr/ATP до значения, не отличающегося от контрольного. Сходный, но недостоверный эффект на эти показатели оказывало введение G в дозе 10 нмоль/кг/сут. Одновременно в группе SG50 отмечено достоверное снижение накопление лактата до значений в контроле. В группе SG10 уровень глюкозы в миокарде был достоверно выше, чем у животных, получавших только STZ. Отметим, что измеренное в наших опытах содержание глюкозы в ткани сердца отражает её суммарное содержание в кардиомиоцитах и в крови. Однако, несмотря на существенное снижение уровня глюкозы в крови крыс групп SG10 и SG50 по сравнению с группой S (табл. 2), содержание глюкозы в сердце крыс групп SG10 и SG50 было выше, чем у диабетических животных. Этот факт предполагает её повышенное поглощение кардиомиоцитами под действием пептида G. В группах SG10 и SG50 отношение лактат/пируват в сердце было достоверно ниже, чем в диабетической группе S (рис. 3, *г*), указывая на снижение отношения $NADH/NAD^+$ в цитозоле. Ежедневное введение G (50 нмоль/кг/сут. в течение 4 недель) не оказывало достоверного влияния на содержание указанных метаболитов в сердце по сравнению с этими показателями в контрольной возрастной группе.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Действие G при STZ-индицированном СД у крыс. В настоящей работе впервые показано за-

щитное действие модифицированного *N*-концевого фрагмента галанина WTLNSAGYLLGPβAH на модели СД 1-го типа, вызванного введением STZ крысам. Поскольку STZ вызывает разрушение β-клеток в островках поджелудочной железы, приводящее к дефициту биосинтеза и секреции инсулина, глюкоза крови становится недоступной в качестве метаболического топлива для тканей, чувствительных к инсулину [23]. В этих условиях гипергликемия и низкая прибавка массы тела являются типичными признаками животных, получавших STZ. Соответственно, в наших опытах у крыс группы S наблюдалось снижение увеличения массы тела и стойкая гипергликемия в течение 4-недельного исследования. Совместное введение G и STZ увеличивало прибавку массы тела крыс в обеих пептидных группах SG10 и SG50 и снижало уровень глюкозы в крови в группе SG50 к концу эксперимента практически до значений в контроле. Улучшение гликемического контроля под действием G свидетельствует о большей утилизации глюкозы клетками инсулин-чувствительных тканей (преимущественно жировой и мышечной ткани), которые играют важную роль в поддержании гомеостаза глюкозы.

Гипергликемия, приводящая к избыточной продукции АФК и окислительному стрессу, является ведущей причиной осложнений, связанных с работой сердца, при СД [24, 25]. В частности, показано, что снижение эффективности окислительного фосфорилирования, происходящее в ответ на гликирование и окислительный стресс, может предшествовать развитию диабетической кардиомиопатии [26, 27]. Несмотря на то что нарушения энергетики в диабетическом сердце изучаются давно [26, 28], при СД 1-го типа они полностью не охарактеризованы и различаются в зависимости от модели [29], а действие пептидов галанина практически не изучено. Недавнее исследование метаболомики в сердце крыс с диабетом, вызванным STZ, проведённое с помощью ^{1}H-ЯМР, показало, что, наряду с ингибированием гликолиза, цикла трикарбоновых кислот и усилением липидного обмена, происходит снижение пулов ATP и Cr [30]. Результаты настоящей работы указывают, что STZ-индуцированный диабет у крыс вызывает также значительное снижение ΣAN, PCr и ΣCr и уменьшение отношения PCr/ATP в сердце. Согласно данным Нью-Йоркской кардиологической ассоциации (NYHA) по взаимосвязи между показателями биоэнергетики сердца и классами хронической сердечной недостаточности, низкое отношение PCr/ATP в миокарде человека может быть предиктором смертности от сердечно-сосудистых заболеваний [31]. Ранее мы оценили дыхательные параметры митохондрий в пермеабилизованных сапонином волокнах миокарда крыс, получавших STZ, используя в качестве субстратов глутамат и малат [32]. Оказалось, что у диабетических крыс максимальное ADP-стимулированное дыхание и дыхательный контроль вдвое снижены. Эти изменения митохондриального дыхания соответствовали снижению продукции ATP и ухудшению энергетического состояния кардиомиоцитов. Напротив, крысы, получавшие STZ и галанин, обнаруживали отсутствие снижения дыхательного контроля за счёт увеличения дыхания в состоянии 3, увеличение содержания ATP и PCr в миокарде и предотвращение потери внутриклеточного ΣCr. Принципиально сходные метаболические эффекты, связанные со снижением нарушений энергетического обмена в сердце, показаны в настоящей работе для химерного агониста рецепторов галанина G. Они проявлялись в достоверно более высоком содержании ATP, ΣAN, PCr и отношении PCr/ATP в сердце диабетических животных, защищённых ежедневным введением высокой дозы G (50 нмоль/кг/сут.) в течение 4 недель. В дополнение, в группе SG50 наблюдалось снижение потерь ΣCr, отражающее меньшие повреждения сарколеммы [33]: к окончанию эксперимента этот показатель достоверно не отличался от такового в контроле. Эти данные указывают на способность фармакологического агониста рецептора GalR2 воспроизводить влияние полноразмерного галанина, связывающегося со всеми тремя подтипами рецепторов GalR1–3, на энергетику миокарда, повреждённого STZ.

Известно, что карбонильный стресс, вызванный гипергликемией, приводит к усилению ПОЛ и окислительного повреждения из-за увеличения образования перокси- и гидроксильных радикалов [27, 34]. Участие ПОЛ в патогенезе природного и индуцированного диабета хорошо подтверждено в многочисленных работах, а образование TBARS используется как наиболее распространённый индикатор ПОЛ при моделировании СД [21, 35]. В настоящем исследовании у крыс группы S наблюдалось значительное повышение уровня TBARS в плазме. Однако введение G снижало этот показатель в группах SG10 и SG50 до значений, не отличающихся от исходного. Эти данные предполагают, что G может оказывать защитный эффект, ослабляя окислительный стресс, вызванный гипергликемией. В настоящей работе о повреждении мембран кардиомиоцитов при STZ-индуцированном диабете свидетельствовали не только потери ΣCr, но и повышение активности CK-MB – специфического сердечного биомаркёра – в плазме крови. Ежедневное введение G

в дозе 10 и 50 нмоль/кг/сут. поддерживало целостность мембран кардиомиоцитов у диабетических животных, вероятно, за счёт улучшения энергетического состояния миокарда и снижения ПОЛ, что подтверждает кардиопротекторную эффективность этого пептида в использованной модели. В целом ряде работ показано, что активности циркулирующих в крови CK-MB и LDH повышены в моделях STZ-индуцированной диабетической кардиомиопатии [36] и у пациентов с диабетом и могут служить маркёрами сердечно-сосудистого риска и повреждения сердечной мышцы [37]. В конце 4-недельного эксперимента мы обнаружили значительное повышение активности LDH в плазме крови крыс, получавших STZ, по сравнению с нормальными животными. Это свидетельствовало о цитотоксическом действии STZ не только на сердце, но и на другие органы и ткани крыс. Важно, что под действием пептида G активность обоих маркёров в плазме крови снижалась, что соответствовало уменьшению уровня TBARS и, следовательно, интенсивности окислительного стресса.

Возможные механизмы действия G при СД. Имеются данные о том, что галанин участвует в регуляции чувствительности к инсулину и усвоении глюкозы при СД 2-го типа [14–16]. Мыши с нокаутом гена галанина характеризуются нарушением утилизации глюкозы из-за сниженного ответа на инсулин и независимой от инсулина элиминации глюкозы [38]. У здоровых добровольцев и пациентов с диабетом наблюдается положительная корреляция секреции галанина с уровнем глюкозы в крови, что тесно связано с чувствительностью к инсулину [39]. Более того, галанин способен повышать чувствительность к инсулину за счёт увеличения экспрессии переносчика GLUT4 в кардиомиоцитах и адипоцитах животных с диабетом 2-го типа [15, 38]. Это способствует смещению GLUT4 в сарколемму, стимулируя поглощение глюкозы клетками. Увеличение содержания глюкозы в миокарде диабетических крыс, вызванное введением пептида G в наших опытах, косвенно подтверждает эту возможность. Запуск этого механизма критически важен, поскольку экспрессия GLUT4 в сердце животных с диабетом и диабетических пациентов снижена [40]. Следовательно, поддержание концентрации белка GLUT4 должно способствовать нормализации метаболизма и функций сердца [41]. Хорошо известно, что коактиватор γ-рецептора, активируемого пролифератором пероксисом 1α (PGC-1α), является важным регулятором метаболизма глюкозы и экспрессии GLUT4 [42]. Недавние исследования показали, что активация рецепторов галанина GalR2 агонистом M1145 снижает резистентность к инсулину и способствует поглощению и метаболизму глюкозы в скелетных мышцах, сердце и адипоцитах посредством активации сигнального пути PGC-1α/GLUT4 [38, 43]. Учитывая принципиально сходный характер действия галанина на модели диабета, вызванного STZ, у крыс [32], можно предположить, что перечисленные механизмы могут быть приложимы к эффектам пептида G – фармакологического агониста рецептора галанина GalR2, наблюдавшимся в настоящей работе.

Важным свойством пептидов галанина является их влияние на окислительный стресс. В последние годы антиоксидантные свойства галанина и его *N*-концевых фрагментов наблюдались в различных экспериментальных моделях *in vitro* и *in vivo*. Фрагменты галанина (2–11) WTLNSAGYLL-NH2 и (2–15) WTLNSAGYLL-GPHA-OH ингибировали апоптоз и избыточное образование АФК в митохондриях в ответ на окислительный стресс в кардиомиобластах крыс H9c2 [8, 9]. Внутривенное введение галанина, фрагмента галанина WTLNSAGYLL-GPHA-OH или фармакологического агониста WTLNSAGYLLGPβAH-OH (G) крысам после окклюзии коронарной артерии снижало образование спиновых аддуктов гидроксильных радикалов и TBARS в зоне риска левого желудочка сердца при реперфузии [44]. Этот эффект сочетался с ограничением размера инфаркта и меньшим повреждением мембран кардиомиоцитов [10]. Кроме того, галанин, его природный *N*-концевой фрагмент WTLNSAGYLLGPHA-OH и синтетический агонист G ингибировали Cu^{2+}-индуцированное свободнорадикальное окисление липопротеинов низкой плотности человека *in vitro* [11]. Введение пептида G крысам с доксорубицин-индуцированной кардиомиопатией ослабляло ПОЛ в повреждённом миокарде за счёт повышения активности Cu,Zn-супероксиддисмутазы и глутатионпероксидазы, уменьшало дисфункцию митохондрий сердца и улучшало энергетическое состояние кардиомиоцитов [12, 13]. Вполне вероятно, что антиоксидантная активность G могла быть причиной снижения окислительного повреждения у крыс, получавших STZ, в наших экспериментах.

Наконец, активация путей передачи сигнала при связывании пептида G с рецепторами GalR1–3 также могла способствовать уменьшению повреждения клеток при СД [45]. Активация рецепторов GalR1 и GalR2 стимулирует сигнальные пути, инициируемые митоген-активируемыми протеинкиназами (MEK1/2 и ERK1/2), что приводит к ингибированию открытия митохондриальной поры временной

проницаемости (mPTP) и, таким образом, способствует выживанию клеток [46]. В дополнение, фосфорилирование ERK способствует повышенной экспрессии рецепторов, активируемых пероксисомными пролифераторами (PPAR), контролирующими энергетический метаболизм, включая и экспрессию PPARγ, стимулирующего поглощение и окисление глюкозы кардиомиоцитами [47]. Связывание рецептора GalR2 с белком Gq/11 активирует фосфолипазу C и посредством гидролиза фосфатидилинозитолдифосфата регулирует гомеостаз Ca^{2+}, что улучшает инотропное состояние сердца. Нижние звенья этого сигнального пути вызывают фосфорилирование протеинкиназы B (Akt) и ингибирование проапоптотических белков BAD/BAX, каспазы-3 и каспазы-9 [45]. Хотя сигналинг, инициируемый G в клетках сердца, остаётся неизученным, эти гипотетические механизмы способны усиливать адаптационную защиту диабетического миокарда.

Это исследование предоставляет доказательства того, что химерный агонист рецепторов галанина GalR2 WTLNSAGYLLGPβAH (G) обладает рядом противодиабетических свойств у крыс, получавших STZ. Введение G снижает гипергликемию и окислительный стресс, уменьшает метаболические нарушения миокарда и повреждение мембран кардиомиоцитов. Мы считаем, что использование протеолитически устойчивых модифицированных агонистов рецепторов галанина может быть многообещающей фармакологической стратегией защиты сердца при диабете.

Финансирование. Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (гранты №№ 18-015-0008-а и 18-015-0009-а) и Министерства здравоохранения РФ (рег. № НИОКТР 121031700143-1).

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Соблюдение этических норм. Исследование выполнено в соответствии с международными и/или институциональными принципами ухода и использования животных.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Varma, U., Koutsifeli, P., Benson, V. L., Mellor, K. M., and Delbridge, L. M. D. (2018) Molecular mechanisms of cardiac pathology in diabetes – experimental insights, *Biochim. Biophys. Acta*, **1864**, 1949-1959, doi: 10.1016/j.bbadis.2017.10.035.
2. Boudina, S., and Dale Abel, E. (2007) Diabetic cardiomyopathy revisited, *Circulation*, **115**, 3213-3223, doi: 10.1161/CIRCULATIONAHA.106.679597.
3. Verma, S. K., Garikipati, V. N. S., and Kishore, R. (2017) Mitochondrial dysfunction and its impact on diabetic heart, *Biochim. Biophys. Acta*, **1863**, 1098-1105, doi.org/10.1016/j.bbadis.2016.08.021.
4. Maritim, A. C., Sanders, R. A., and Watkins, J. B. (2003) Diabetes, oxidative stress and antioxidants. A Review, *J. Biochem. Mol. Toxicol.*, **17**, 24-38, doi: 10.1002/jbt.10058.
5. Ullah, A., Khan, A., and Khan, I. (2016) Diabetes mellitus and oxidative stress – a concise review, *Saudi Pharmaceut. J.*, **24**, 547-553, doi: 10.1016/j.jsps.2015.03.013.
6. Raza, H., Prabu, S. K., John, A., and Avadhani, N. G. (2011) Impaired mitochondrial respiratory functions and oxidative stress in streptozotocin-induced diabetic rats, *Internat. J. Mol. Sci.*, **12**, 3133-3147, doi: 10.3390/ijms12053133.
7. Webling, K. E. B., Runesson, J., Bartfai, T., and Langel, Ü. (2012) Galanin receptors and ligands, *Front. Endocrinol.*, **3**, 146, doi: 10.3389/fendo.2012.00146.
8. Timotin, A., Pisarenko, O., Sidorova, M., Studneva, I., Shulzhenko, V., et al. (2017) Myocardial protection from ischemia/reperfusion injury by exogenous galanin fragment, *Oncotarget*, **8**, 21241-21252, doi: 10.18632/oncotarget.15071.
9. Pisarenko, O., Timotin, A., Sidorova, M., Studneva, I., Shulzhenko, V., et al. (2017) Cardioprotective properties of *N*-terminal galanin fragment (2-15) in experimental ischemia/reperfusion injury, *Oncotarget*, **8**, 101659-101671, doi: 10.18632/oncotarget.21503.
10. Serebryakova, L., Pal'keeva, M., Studneva, I., Molokoedov, A., Veselova, O., et al. (2019) Galanin and its *N*-terminal fragments reduce acute myocardial infarction in rats, *Peptides*, **111**, 127-131, doi: 10.1016/j.peptides.2018.05.001.
11. Pisarenko, O. I., Studneva, I. M., Serebryakova, L. I., Timoshin, A. A., Konovalova, G. G., et al. (2021) Antioxidant properties of galanin and its *N*-terminal fragments in *in vitro* and *in vivo* oxidative stress modeling, *Biochemistry (Moscow)*, **86**, 496-505, doi: 10.1134/S0006297921040106.
12. Studneva, I., Palkeeva, M., Veselova, O., Molokoedov, A., Ovchinnikov, M., et al. (2019) Protective effects of a novel agonist of galanin receptors against doxorubicin-induced cardiotoxicity in rats, *Cardiovasc. Toxicol.*, **19**, 136-146, doi: 10.1007/s12012-018-9483-x.
13. Studneva, I. M., Veselova, O. M., Bahtin, A. A., Konovalova, G. G., Lankin, V. Z., et al. (2020) The mechanisms of cardiac protection using a synthetic agonist of galanin receptors during chronic administration of doxorubicin, *Acta Naturae*, **12**, 20-29, doi: 10.32607/20758251-2020-12-1-89-98.
14. Fang, P., Sun, J., Wang. X., Zhang, Z., Bo, P., et al. (2013) Galanin participates in the functional regulation of the diabetic heart, *Life Sci.*, **92**, 628-632, doi: 10.1016/j.lfs.2013.01.024.
15. He, B., Shi, M., Zhang, L., Li, G., Fang, P., et al. (2011) Beneficial effect of galanin on insulin sensitivity in muscle

of type 2 diabetic rats, *Physiol. Behav.*, **103**, 284-289, doi: 10.1016/j.physbeh.2011.02.023.
16. Legakis, I. N. (2005) The role of galanin in metabolic disorders leading to type 2 diabetes mellitus, *Drug News Pers.*, **18**, 173-177, doi: 10.1358/dnp.2005.18.3.892762.
17. Азьмуко А. А., Веселова О. М., Молокоедов А. С., Овчинников М. В., Палькеева М. Е. и др. (2018) Тетрадекапептиды, улучшающие восстановительную функцию сердечно-сосудистой системы при ишемии, Патент № 2648846.
18. Reaven, G. M., and Ho, H. (1991) Low-dose streptozotocin-induced diabetes in the spontaneously hypertensive rat, *Metabolism*, **40**, 335-337, doi: 10.1016/0026-0495(91)90141-i.
19. Bergmeyer, H. U. (1974) *Methods of Enzymatic Analysis*. New York, Academic Press, pp. 1196-1200, 1475-1478, 1772-1776, 1777-1781, 2101-2110.
20. Vanderlinde, R. E. (1985) Measurement of total lactate dehydrogenase activity, *Ann. Clin. Lab. Sci.*, **15**, 13-31.
21. Gulen, S., and Dincer, S. (2007) Effects of leptin on oxidative stress in healthy and streptozotocin-induced diabetic rats, *Mol. Cell. Biochem.*, **302**, 59-65, doi: 10.1007/s11010-007-9426-5.
22. Stanley, W. C., Lopaschuk, G. D., James, G., and McCormack, J. G. (1997) Regulation of energy substrate metabolism in the diabetic heart, *Cardiovasc. Res.*, **34**, 25-33.
23. Saltiel, A. R., and Kahan, C. R. (2001) Insulin signaling and the regulation of glucose and lipid metabolism, *Nature*, **414**, 799-806, doi: 10.1038/414799a.
24. Dos Santos J. M., Tewari S., and Mendes R. H. (2019) The role of oxidative stress in the development of diabetes mellitus and its complications, *J. Diabetes Res.*, **2019**, 4189813, doi: 10.1155/2019/4189813.
25. Varma, U., Koutsifeli, P., Benson, V. L., Mellor, K. M., and Delbridge, L. M. D. (2018) Molecular mechanisms of cardiac pathology in diabetes – experimental insights, *Biochim. Biophys. Acta Mol. Basis Dis.*, **1864**, 1949-1959, doi: 10.1016/j.bbadis.2017.10.035.
26. Verma, S. K., Garikipati, V. N. S., and Kishore, R. (2017) Mitochondrial dysfunction and its impact on diabetic heart, *Biochim. Biophys. Acta Mol. Basis Dis.*, **1863**, 1098-1105, doi: 10.1016/j.bbadis.2016.08.021.
27. Raza, H., Prabu, S.K., John, A., and Avadhani, N. G. (2011) Impaired mitochondrial respiratory functions and oxidative stress in streptozotocin-induced diabetic rats, *Int. J. Mol. Sci.*, **12**, 3133-3147, doi: 10.3390/ijms12053133.
28. Ferreira, F.M., Palmeira, C. M., Seica, R., Moreno, A. J., and Santos, M. S. (2003) Diabetes and mitochondrial bioenergetics: alterations with age, *J. Biochem. Mol. Toxicol.*, **17**, 214-222, doi: 10.1002/jbt.10081.
29. Marciniak, C., Marechal, X., Montaigne, D., Neviere, M., and Lancel, S. (2014) Cardiac contractile function and mitochondrial respiration in diabetes-related mouse models, *Cardiovasc. Diabetol.*, **13**, 118, doi: 10.1186/s12933-014-0118-7.
30. Zhao, L., Dong, M., Xu, C., Zheng, H., Wei, T., et al. (2018) Identification of energy metabolism changes in diabetic cardiomyopathy rats using a metabonomic approach, *Cell. Physiol. Biochem.*, **48**, 934-946, doi: 10.1159/000491960.
31. Lygate, C. A., and Neubauer, S. (2014) Metabolic flux as a predictor of heart failure prognosis, *Circ. Res.*, **114**, 1228-1230, doi: 10.1161/CIRCRESAHA.114.303551.
32. Gataulin, R., Veselova, O., Studneva, I., Dobrokhotov, I., et al. (2021) Cardioprotective effects of galanin in a streptozotocin-induced diabetes mellitus rat model. 36th Annual Meeting of the International Society for Heart Research – European Section. Turin, Italy, Frontiers Event Abstracts, pp. 129-130, doi: 10.3389/978-2-88971-002-7.
33. Zervou, S., Whittington, H. J., Russell, A. J., and Lygate, C. A. (2016) Augmentation of creatine in the heart, *Mini Rev. Med. Chem.*, **16**, 19-28, doi: 10.2174/1389557515666150722102151.
34. Maritim, A. C., Sanders, R. A., and Watkins, J. B. (2003) Diabetes, oxidative stress and antioxidants. A Review, *J. Biochem. Mol. Toxicol.*, **17**, 24-38, doi: 10.1002/jbt.10058.
35. Bayanes, J. W., and Thrope, S. R. (1999) Role of oxidative stress in diabetic complications: a new perspective on an old paradigm, *Diabetes*, **48**, 1-9, doi: 10.2337/diabetes.48.1.1.
36. Hall, R. L. (1991) Clinical pathology of laboratory animals, in *Animal Models in Toxicology* (Gad, S. C., and Chengelis, C. P., eds.) New York, Marcel Dekker Inc., pp. 765-811.
37. Huang, E., Kuo, W., Chen, Y., Chen, T., Chang, M., et al. (2006) Homocysteine and other biochemical parameters in type 2 diabetes mellitus with different diabetic duration or diabetic retinopathy, *Clin. Chim. Acta*, **366**, 293-298, doi: 10.1016/j.cca.2005.10.025.
38. Fang, P., He, B., Yu, M., Shi, M., Zhu, Y., et al. (2018) Central galanin receptor 2 mediates galanin action to promote systemic glucose metabolism of type 2 diabetic rats, *Biochem. Pharmacol.*, **156**, 241-247, doi: 10.1016/j.bcp.2018.08.036.
39. Legalkis, I. N., Mantzouridis, T., and Mountokalakis, T. (2007) Positive correlation of galanin with glucose in healthy volunteers during an oral glucose tolerance test, *Horm. Metab. Res.*, **39**, 53-55, doi: 10.1055/s-2006-957346.
40. Gray, S., and Kim, J. K. (2011) New insights into insulin resistance in the diabetic heart, *Trends Endocrinol. Metabol.*, **22**, 394-403, doi: 10.1016/j.tem.2011.05.001.
41. Tian, R., and Abel, E. D. (2001) Responses of GLUT4-deficient hearts to ischemia underscore the importance of glycolysis, *Circulation*, **103**, 2961-2966, doi: 10.1161/01.CIR.103.24.2961.
42. Wu, H., Deng, X., Shi, Y., Su, Ye, Wie, J., et al. (2016) PGC-1α, glucose metabolism and type 2 diabetes mellitus, *J. Endocrinol.*, **229**, R99-R115, doi: 10.1530/JOE-16-0021.
43. Fang, P., Shib, M., Guo, L., He, B., Wang, Q., et al. (2014) Effect of endogenous galanin on glucose transporter 4 expression in cardiac muscle of type 2 diabetic rats, *Peptides*, **62**, 159-163, doi: 10.1016/j.peptides.2014.10.001.
44. Serebryakova, L., Studneva, I., Timoshin, A., Veselova, O., Pal'keeva, M., et al. (2021) Galanin peptides alleviate myocardial ischemia/reperfusion injury by reducing reactive oxygen species form, *Inter. J. Peptide Res. Ther.*, **27**, 2039-2048, doi: 10.1007/s10989-021-10231-x.
45. Lang, R., Gundlach, A. L., Holmes, F. E., Hobson, S. A., Wynick, D., et al. (2015) Physiology, signaling, and pharmacology of galanin peptides and receptors: three decades of emerging diversity, *Pharmacol. Rev.*, **67**, 118-175, doi: 10.1124/pr.112.006536.
46. Hausenloy, D. J., and Yellon, D. M. (2013) Myocardial ischemia-reperfusion injury: a neglected therapeutic target, *J. Clin. Invest.*, **123**, 92-100, doi: 10.1172/JCI62874.
47. Jay, M. A., and Ren, J. (2007) Peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR) in metabolic syndrome and type 2 diabetes mellitus, *Curr. Diab. Rev.*, **3**, 33-39, doi: 10.2174/157339907779802067.

CHIMERIC AGONIST OF GALANIN RECEPTOR GALR2 REDUCES HEART DAMAGE IN RATS WITH STREPTOZOTOCIN-INDUCED DIABETES

I. M. Studneva, O. M. Veselova, I. V. Dobrokhotov, L. I. Serebryakova, M. E. Palkeeva, A. S. Molokoedov, A. A. Azmuko, M. V. Ovchinnikov, M. V. Sidorova, and O. I. Pisarenko*

National Medical Research Center for Cardiology, 121552 Moscow, Russia; e-mail: olpi@live.ru

The neuropeptide galanin and its N-terminal fragments reduce the formation of reactive oxygen species and normalize the metabolic and antioxidant state of the myocardium in experimental cardiomyopathy and ischemia/reperfusion injury. This study aims to elucidate effect of WTLNSAGYLLGPβAH-OH (G), a pharmacological agonist of galanin receptor GalR2, on cardiac injury induced by administration of streptozotocin (STZ) to rats. Peptide G was prepared by solid phase peptide synthesis using the Fmoc strategy and purified by preparative HPLC. Its structure was determined using ^{1}H-NMR spectroscopy and MALDI-TOF mass spectrometry. Animals were randomized into five groups: C, control; S, SG10 and SG50 treated with STZ, STZ + G (10 nmol/kg/day) and STZ + G (50 nmol/kg/day) and G healthy animals treated with G (50 nmol/kg/day). Administration of G prevented hyperglycemia in SG50 rats. By the end of the experiment, the content of ATP, the total adenine nucleotide pool, phosphocreatine (PCr) and the ratio of PCr/ATP in the myocardium of animals of the SG50 group were significantly higher than these values in the S group. Simultaneously, in the SG50 and SG10 groups, the content of lactate and lactate/pyruvate ratio in rat myocardium were reduced, while glucose content increased compared with those in group S. Both doses of G reduced increased activity of creatine kinase-MB and lactate dehydrogenase and reduced the concentration of thiobarbiturate acid-active products in the blood plasma of rats treated with STZ up to values not different from control. Taken together, these results suggest that G has cardioprotective properties in type 1 diabetes mellitus. Possible mechanisms of action of peptide G in STZ-induced diabetes are discussed.

Keywords: galanin, heart, streptozotocin, myocardial metabolism, lipid peroxidation, cardiomyocyte membranes

EDN: OWWAKK
БИОХИМИЯ, 2022, том 87, вып. 3, с. 442 – 448

ДИСКУССИИ

УДК 577.71;576.385;575.113;612.67;575.1

ВАРИАБЕЛЬНОСТЬ СМЕРТНОСТИ: ДОПОЛНИТЕЛЬНАЯ ИНФОРМАЦИЯ О ХОДЕ КРИВЫХ ВЫЖИВАНИЯ В НОРМЕ И ПРИ ПАТОЛОГИИ

(комментарий к статье А.Г. Малыгина, *Биохимия*, 86, вып. 12, с. 1798–1807)

© 2022 Г.А. Шиловский[1,2,3]

[1] *НИИ физико-химической биологии им. А.Н. Белозерского, Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, 119991 Москва, Россия; электронная почта: gregory_sh@list.ru, grgerontol@gmail.com*

[2] *Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, биологический факультет, 119234 Москва, Россия*

[3] *Институт проблем передачи информации им. А.А Харкевича РАН, 127051 Москва, Россия*

Поступила в редакцию 27.01.2022
После доработки 23.02.2022
Принята к публикации 23.02.2022

Анализ демографических данных свидетельствует о неравномерном распределении смертности в течение года, месяца и даже в течение недели. Это имеет важное прикладное значение, например для работы медицинских учреждений, в том числе отделений реанимации, и позволяет рассчитывать экономическую и трудовую нагрузку на медучреждения соответствующего профиля, что особенно актуально в эпоху пандемии COVID-19. Малыгин показал наличие колебаний смертности у мужчин при диабете 2-го типа, имеющих периодичность около одного-двух в неделю. Высота максимумов таких колебаний определяется, как предполагается, двумя параметрами: закономерным – указывающим их положение на оси продолжительности жизни, и случайным – высотой, отражающей степень неблагоприятного воздействия на организм внешней среды и степень периодически возникающего резкого снижения неспецифической резистентности организма. В комментарии рассматриваются результаты последних исследований в области малых (полунедельных, недельных, месячных и сезонных) колебаний смертности. На основе большого массива накопленных данных можно сказать, что снижение сезонной вариабельности смертности сопутствует увеличению ожидаемой продолжительности жизни. Изучение особенностей колебаний смертности позволяет перейти от воздействия биоритмов (Большие биологические часы) на развитие процессов острого и хронического феноптоза непосредственно к изучению паттернов самих ритмов детерминированной смертности (ритмов феноптоза).

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: кривые смертности, старение, неравномерность продолжительности жизни, феноптоз, острый феноптоз, биоритмы, хронобиология.

DOI: 10.31857/S0320972522030101

ВВЕДЕНИЕ

Известно, что еженедельные показатели смертности предоставляют возможность детализированной оценки масштабов краткосрочных пиков смертности во времени и пространстве [1]. О происхождении, функциональной значимости, адаптивном значении, синхронизации и потенциальной клинической значимости недельных и полунедельных биоритмов известно гораздо меньше, чем о циркадных и годовых ритмах. Тем не менее эти биоритмы обнаруживаются на разных уровнях организации у разных видов – от одноклеточных морских водорослей до растений, насекомых, рыб, птиц и млекопитающих как в естественных, так и в искусственных условиях [1]. Цель таких исследований заключается в том, чтобы на основе статистики смертности, учитывая причины, оценить неравномерность распределения смертности.

В связи с этим большой интерес и оживлённую дискуссию вызвала работа А.Г. Малыгина «Запрограммированные риски смерти у мужчин, больных сахарным диабетом» [2], в которой он рассматривает количество и местонахождение локальных максимумов на кривой смертности мужчин 53–79 лет, страдающих сахарным диабетом 2-го типа. Верификация полученных данных о наличии пиков смертности проводилась за счёт сопоставления результатов, полученных при различных способах разбиения изучаемой группы пациентов. Эта работа [2] является про-

Принятые сокращения: АД – артериальное давление; ДИ – доверительный интервал; ПЖ – продолжительность жизни; ЧСС – частота сердечных сокращений; IRR – коэффициент заболеваемости (incidence rate ratio); MCE – затраты на медицинское обслуживание (medical care expenditure); MINOCA – инфаркт миокарда без обструктивного поражения коронарных артерий (myocardial infarction with non-obstructive coronary arteries).

должением серии публикаций (см. список литературы), посвящённых немонотонности кривой смертности. Работы автора неоднократно публиковались в журнале *Biochemistry (Moscow)* [2–5] и в других журналах, докладывались на конференциях; их важная научная и потенциальная прикладная значимость не подвергается сомнению, а новые работы из этой серии, в свою очередь, открывают новые области и возможности применения разрабатываемой автором теории.

В настоящем комментарии описаны некоторые (не указанные в статье [2]) инструменты, применяемые для исследования краткосрочных колебаний смертности. Также приведены результаты ряда международных исследований в этой области, полученные с использованием баз данных с большими объёмами выборки (таблица).

ВРЕМЕННЫ́Е КОЛЕБАНИЯ СМЕРТНОСТИ

Немонотонность тренда смертности. Для геронтологов важно наличие тренда повышения риска смерти с возрастом. Известно, что модель Гомпертца не всегда адекватно описывает поведение кривых выживания в начальном и конечном участках [6]. Важным её недостатком является учёт смертности лишь на уровне популяции. Для всех людей в одном возрастном интервале вероятность гибели считается одинаковой. Действительно, все исследования дополнительных демографических показателей, в том числе и рассматриваемых, например, Баудиш, Вопелем и Кольхеро (см. обзор Skulachev et al. [7]), начались с осознания того, что существуют иные методы, позволяющие получить новую информацию о ходе смертности.

Ещё одним недостатком метода Гомпертца является усреднение по годовым интервалам. Есть основания предполагать, что краткосрочные колебания смертности несут дополнительную информацию о мере неупорядоченности смертности в самых разных масштабах (недельной, месячной, квартальной смертности). Достаточно подчеркнуть то обстоятельство, что, в отличие от любого типа гладкого тренда, реальная зависимость риска смерти характеризуется неслучайными скачками. Видимо, это связано с тем, что в онтогенезе периоды повышенной резистентности закономерным образом сменяются упадком сопротивляемости [7].

В обсуждаемой работе Малыгина изучается именно гладкость тренда, независимо от того, гомпертцев он или нет, и наложенные на него пики смертности [2]. Проведённое исследование не обсуждает корреляцию с общим трендом. В отличие от силы смертности, являющейся относительной скоростью вымирания, Малыгин исследует характер изменения абсолютной скорости вымирания мужчин с сахарным диабетом [2]. Группы представлены условными когортами со всеми вытекающими из этого плюсами и минусами. Дело в том, что полученные ритмические колебания, как и любые периодические колебания, характеризуются не только пиками (т.е. максимумами). Важнейшими характеристиками колебания являются также его период и амплитуда. Например, изучая такую периодическую функцию, сначала следует провести верификацию, аналогично проведённой в статье [2], а именно: убрав нечётные максимумы, убедиться, что чётные сохранятся; и убрав левую половину значений, убедиться, что сохранятся пики справа. Однако, если ограничиться вычислением лишь числа пиков, то можно столкнуться с ситуацией, когда (например, в результате применения какой-либо терапевтической процедуры) мощность числа пиков останется прежней (каждому пику из исходного графика будет соответствовать ровно один пик из нового графика, однако из-за того, что интервал наблюдения ограничен (53–79 лет – в обсуждаемой работе), может быть сделан неточный вывод об уменьшении числа пиков (т.е. интервалов уязвимости жизнеспособности, хрупкости (frailty) организма). Вследствие временно́го масштабирования (растяжения графика) число отображаемых пиков уменьшится (по причине замедления смертности, а не из-за уменьшения в онтогенезе числа интервалов с повышенной уязвимостью). Аналогично, без проверки амплитуды колебания (а лишь числа максимумов) существует риск либо опять-таки «потерять» часть пиков (т.е. сделать вывод об их отсутствии, когда они на самом деле есть) при слишком высоком пороге, либо (в случае порога слишком низкого) определить как пики некие выбросы «белого шума». Ещё одной важной характеристикой является наличие наклона существующего тренда. Действительно, сравнивая, например уровень смертности весной и осенью, следует учитывать, что даже при отсутствии межсезонных колебаний осенью люди в любом случае стали на полгода старше (и вероятность их гибели, соответственно, выше). Ввиду относительно небольших выборок, наложения стохастических «шумов» и дискретности событий смерти абсолютная скорость вымирания в обсуждаемой работе [2] испытывает значительные колебания из-за особенностей численного дифференцирования подобного рода зависимостей. Вероятно, наибольшим недостатком метода служит игнорирование того, что с увеличением возраста уменьшается доля доживших до этого возраста. Это приводит к дополнительно-

му увеличению «дробового эффекта», когда в малой выборке даже малое изменение приводит к заметному скачку производной. Поэтому из общих соображений, никак не связанных с фенoптозом, надо ожидать увеличения числа пиков с увеличением возраста. Можно предложить проводить расчёты, вычисляя пики (т.е. локальные максимумы производной) силы смертности (с учётом уменьшения доли доживших), тогда как автором используются абсолютные показатели смертности [2]. Абсолютные показатели не позволяют, например сравнивать значения, полученные в разных работах. Также важен учёт масштаба колебаний смертности (во-первых, гибель нескольких особей из тысячи или из 10 млн будет иметь разную значимость (например, для оценки силы эпидемии)). Во-вторых, при не очень большой выборке (менее 3000) нужно усреднять (сглаживать) данные, начиная с достаточно большого интервала, а не с минимального (как делал автор [2]). Величину этого интервала можно определить экспериментально, постепенно увеличивая ширину интервала и наблюдая за стабильностью полученных результатов. Когда наступит стабилизация, можно остановиться. Если же стабилизация не наступит, то полученный результат недостаточно достоверен, и нужно увеличивать объём рассматриваемой выборки. В-третьих, чтобы проверить то, что уже сделано автором, можно провести моделирование на случайных данных. Весьма возможно, что если на случайных данных повторять действия автора (без предлагаемых улучшений), то картина получится приблизительно такая же, как на рисунках в данной статье [2].

В целом, методы моделирования удобно использовать для симуляции будущего поведения демографических процессов на основе имеющихся данных с целью выявления постоянных и дополнительных ритмов. Так, например построение вейвлет-спектрограммы даёт возможность расчёта матрицы синхронизации исследуемых параметров, расчёта величины и синхронности (одновременности), синфазности (совпадения по фазе) и когерентности (взаимосвязи) исследуемых параметров изучаемых биоритмов. Статистическую значимость ритмов оценивают путём многократной случайной перестановки уровней исходного временно́го ряда [8]. Разложение по сезонам и трендам с использованием метода Лоесса (Seasonal and Trend decomposition using Loess, STL) используется для анализа сезонных колебаний риска смертности, затрат на медицинское обслуживание (medical care expenditure, MCE) и даже уровня госпитализации. Метод STL разлагает данные по выживанию на долгосрочный тренд, сезонную вариацию и оставшуюся вариацию, которая не связана с долгосрочным трендом или сезонными вариациями [9]. Долгосрочная тенденция метода STL отражает ряд возможных внешних факторов, которые постепенно меняются с течением времени, таких как увеличение среднего возраста популяции, повышение риска вдовства, изменения в политике здравоохранения и инфляция [10].

Результаты некоторых исследований ритмов заболеваемости и смертности. Известно, что уровень смертности пожилых людей меняется в зависимости от сезона [10]. В умеренном климате он наиболее высок зимой (на 21% выше, чем летом) [11]. Сезонные колебания смертности более выражены у мужчин и людей, проживающих в учреждениях интернатного типа [10]. Даже расходы на медицинское обслуживание демонстрируют сезонные колебания [10]. Кроме этого, существует и глобальный тренд: размах сезонных колебаний смертности существенно снизился во многих странах в течение XX века. Тем не менее уменьшение «энтропии смертности», способствующее повышению ожидаемой продолжительности жизни (ПЖ), существенно варьирует в разных странах и популяциях (таблица). Так, сезонность смертности от всех причин у людей в возрасте 60 лет и старше изменилась в Швеции в период с 1860 по 1995 г. Для шведов, достигших возраста ≥ 59 лет, рождённых в 1800 г., риск умереть в зимний период был почти вдвое выше, чем риск смерти летом. Для когорт 1900-х гг. рождения относительное увеличение зимней смертности составило лишь около 10% [11].

Сердечно-сосудистая система. Показано, что изменения артериального давления (АД) и частоты сердечных сокращений (ЧСС), а также многие острые сердечно-сосудистые состояния, такие как инфаркт миокарда (ИМ), описываются недельными (циркасептанными) и полунедельными (циркасемисептанными) ритмами, включая скачок АД по понедельникам [12, 13]. Амбулаторный мониторинг систолического АД (САД) и диастолического (ДАД) является важным инструментом диагностики и лечения гипертонии [12]. Так, средние значения АД повышены у пациентов с депрессией (САД: 129,2 против 124,5 мм рт. ст.; $p = 0{,}034$; ДАД: 79,0 против 76,5 мм рт. ст.; $p = 0{,}041$). Среднее значение ЧСС за 7 дней не отличалось у пациентов с депрессией и без таковой. Суточные замеры АД также показывают наличие всплеска по понедельникам. В группе пациентов с депрессией АД характеризуется явно выраженным недельным ритмом [12]. Также у пациентов с терминальной стадией почечной недостаточности, в дополнение к значительному относительному увеличению смертности в зимний период, наблюдаются

Колебания смертности при хронических возрастных заболеваниях

Объект исследования	Ритмы смертности и заболеваемости	Ссылки
Нидерландцы 65 лет и старше (2007–2010 гг.) (n = 61495)	показатели смертности пожилых людей значительно различаются в зависимости от сезона и на 21% выше зимой, чем летом; МСЕ увеличивается с лета до зимы на 13%; эта сезонная разница выше для не умерших, чем для умерших (14% против 6%); сезонные колебания смертности более выражены у людей, проживающих в учреждениях интернатного типа, и у мужчин по сравнению с женщинами; сезонная изменчивость МСЕ более выражена у женщин; зимой темпы госпитализации значительно выше, в другие сезоны значительных всплесков не наблюдается	[10]
Шведы (1800–1901 г. р., старше 59 лет)	масштабы сезонных колебаний уровня смертности существенно снизились в период с 1860 по 1995 г.; для когорты рождённых в 1800 г. риск умереть в зимний период был почти вдвое выше, чем риск смерти летом; для когорты рождённых в 1900 г. относительное увеличение зимней смертности составило лишь 10%.; ожидаемая ПЖ когорты в возрасте 60 лет увеличилась за этот век на на 4,3 г., что составило примерно 40% от этого увеличения средней ПЖ	[11]
Шведы (2003–2013 гг.) (9092 чел. С MINOCA из 19 9163 госпитализированных с ИМ); средний возраст = 65,5 лет	средний возраст = 65,5 лет, 62,0% составляли женщины; риск MINOCA оказался наиболее высок утром (IRR = 1,70; 95% ДИ: 1,63–1,84) с пиком в 08:00 (IRR = 2,25; 95% ДИ: 1,96–2,59) и по понедельникам (IRR = 1,28; 95% ДИ: 1,18–1,38); не обнаружили изменения риска в разные сезоны, в рождественские и новогодние праздники или во время празднования шведского летнего солнцестояния; не было связи между временем начала MINOCA и краткосрочным или долгосрочным прогнозом	[13]
Японцы (~50 000) (1988–2003 гг. зарегистрировано 169 случаев САК)	летальность в течение 28 дней для САК выше в будние дни (51,7%), чем в выходные (32,6%; отношение шансов 2,19; 95% ДИ: 1,10–4,49); различия в уровне летальности сохранялись после введения поправки на возраст, пол, тяжесть, семейный анамнез инсульта и анамнез пациентов с гипертонией, сахарным диабетом, дислипидемией, употреблением алкоголя и курением; наблюдали суточные колебания смертности от САК с более высокими показателями смертности в будние дни в исследуемой популяции	[15]
Японцы (2001–2003 гг. 217 чел.; средний возраст: 56,8 ± 11,3 г.)	шкалы оценки депрессии были получены для 192 из 217 человек, участвовавших в этом исследовании; баллы депрессии были выше пяти у 72 испытуемых; средние значения систолического АД (САД) и диастолического (ДАД) были статистически значимо выше у пациентов с депрессией (САД: 129,2 против 124,5 мм рт. ст.; p = 0,034; ДАД: 79,0 против 76,5 мм рт. ст.; p = 0,041); среднее значение ЧСС за 7 дней не отличалось между субъектами с оценкой депрессии < 5 (нет депрессии) или > 5 (есть депрессия); в группе с депрессией вариабельность ЧСС (оцениваемая по SD ЧСС) была выше во время каникул и ниже по понедельникам; суточные замеры АД показали эффект новизны и всплеск по понедельникам; в группе с депрессией выявлен явный циркасептанный ритм АД	[12]
Пациенты с хронической стадией почечной недостаточности (обзор)	в отличие от физиологической изменчивости, характеризующейся постоянной структурой, увеличение случайной изменчивости таких параметров, как АД, также связано с более высоким риском смертности; получение постоянных траекторий факторов риска обладает прогностической силой, превосходящей таковую при регулярных однократных измерениях; это может улучшить расчёт профиля риска и предоставить «окно возможностей» для более своевременных вмешательств	[14]
Метаанализ данных медицинских центров США, Англии и Канады	более высокая смертность («эффект выходных») может быть объяснена более высоким уровнем тяжести заболевания у пациентов, госпитализированных в выходные дни, и/или более низким качеством медицинской помощи, связанным с нехваткой персонала, меньшим опытом персонала и ограниченной доступностью терапевтических и диагностических процедур	[19]

Примечание: АД – артериальное давление, ДИ – доверительный интервал, ИМ – инфаркт миокарда, ЧСС – частота сердечных сокращений; САК – субарахноидальное кровоизлияние; IRR – коэффициенты заболеваемости (incidence rate ratio); МСЕ – затраты на медицинское обслуживание (medical care expenditure); SD – стандартное отклонение.

сезонные колебания АД. Кроме того, показано, что прогностическим значением обладают недельные колебания и других клинических и лабораторных параметров, таких как температура тела и уровень сывороточного альбумина [14].

Инфаркт. Наступление инфаркта миокарда без обструктивного поражения коронарных артерий (myocardial infarction with non-obstructive coronary arteries, MINOCA) демонстрирует недельные и полунедельные ритмы с повышенным риском рано утром и в понедельник, что позволяет предположить, что его пусковые механизмы связаны со стрессом [13]. Средний возраст 9092 пациентов, участвовавших в исследовании, составлял 65,5 лет (62,0% из них составляли женщины; у 16,6% из них диагностировали MINOCA). Не было обнаружено связи между временем начала MINOCA и прогнозом клинического исхода, что указывает на то, что основные патологические механизмы MINOCA и результат лечения схожи при разном времени наступления инфаркта, но пусковой механизм может быть более активным рано утром и в понедельник [13]. Риск MINOCA оказался наибольшим утром (IRR = 1,70; 95% доверительный интервал (ДИ): 1,63–1,84) с пиком в 08:00 (IRR = 2,25; 95% ДИ: 1,96–2,59) и по понедельникам (IRR = 1,28; 95% ДИ: 1,18–1,38). Никакого изменения риска не было обнаружено в разные сезоны, в рождественские и новогодние праздники или во время празднования шведского летнего солнцестояния. Не было выявлено связи между временем начала MINOCA и краткосрочным или долгосрочным прогнозом клинического исхода [13]. Тем не менее в праздничные дни имело место традиционное повышение числа инфарктов миокарда, но по MINOCA никакого увеличения не наблюдали.

Инсульт. Исследовали недельные колебания числа летальных исходов с помощью 4-недельных (28-дневных) интервалов у пациентов с субарахноидальным кровоизлиянием (САК) в разные дни недели (по данным реестра инсультов Такашима) с 1988 по 2003 г. [15]. На ~50 000 японцев зарегистрировано 169 (имевших место впервые) случаев САК, которые были разделены на две группы в зависимости от того, произошло ли САК в выходные или в будние дни [15]. Летальность в течение 28 дней при САК была выше в будние дни (51,7%), чем в выходные (32,6%; отношение шансов 2,19; 95% ДИ: 1,10–4,49). Различия в уровне летальности сохранялись после поправки на возраст, пол, тяжесть, семейный анамнез инсульта и анамнез пациентов с гипертонией, сахарным диабетом, дислипидемией, употреблением алкоголя и курением [15].

Ритмы смертности, выявленные Малыгиным у мужчин при диабете 2-го типа, имеют периодичность около одного-двух в неделю [2], т.е. относятся либо к циркасептанным, либо к циркасемисептанным колебаниям. Для более точной дифференциации необходимы дополнительные исследования.

COVID-19. Затянувшаяся пандемия COVID-19 стимулировала интерес учёных, лиц, принимающих решения, и широкой общественности к краткосрочным колебаниям смертности, вызванным эпидемиями и другими природными или техногенными катастрофами. Опубликованы еженедельные подсчёты и коэффициенты смертности в разбивке по возрасту и полу для 38 стран и регионов [16]. Самый надёжный подход к количественной оценке времени смертности от краткосрочных факторов риска основан на оценке еженедельных дополнительных смертей. Этот подход более надёжен, чем мониторинг смертей с помощью диагностики COVID-19 или расчёта показателей заболеваемости или летальности, несущих многочисленные методологические проблемы, такие как охват тестированием и сопоставимость диагностических подходов [17]. Кроме того, новый метод позволяет пользователям просматривать данные о еженедельной смертности и избыточной смертности по годам и странам. В настоящее время для более оперативной разработки стратегий быстрого и экстренного реагирования создана первая международная база данных, предоставляющая в открытом доступе согласованные, унифицированные и полностью задокументированные данные о еженедельной смертности от всех причин. База данных «Краткосрочные колебания смертности» (Short-Term Mortality Fluctuations Data series, STMF, доступна на www.mortality.org) содержит еженедельные подсчёты и коэффициенты смертности в разбивке по возрасту и полу для 38 стран и регионов [16, 17].

Недельные (~7 сут.), месячные (~30 сут.) и сезонные (~3 мес.) ритмы рассматриваются как генетически детерминированные особенности организмов, давшие в ходе эволюции функциональные преимущества отдельным организмам и имеющие ценность для выживания вида в целом [1]. Предполагается, что структура биоритмов у человека имеет эндогенное происхождение и синхронизирована с социокультурными факторами, связанными с субботним или воскресным днём отдыха. Также предполагается, что такие ритмы отражают, по крайней мере частично, биологическую потребность в отдыхе и восстановлении в течение одного дня каждые 7 дней точно так же, как циркадные ритмы частично отражают биологическую потребность в отдыхе и восстановлении каждые 24 часа [1]. Более того, исследования на людях и даже на насе-

комых, проводимые в контролируемых постоянных условиях, лишённых экологических, социальных и других временны́х ориентиров, сообщают о сохранении семидневных ритмов, но с немного другим (свободным) периодом (τ), что также указывает на то, что источник их формирования является эндогенным.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Изучение колебаний смертности позволяет решать следующие задачи: оценивать качество и сопоставимость статистических данных о смертности (в целом и по причинам смерти); сопоставлять изменения ПЖ на национальном уровне с изменениями на уровне отдельных регионов; определять, в каких регионах изменение ПЖ достоверно выше или ниже общенационального; анализировать динамику изменений регионального «неравенства» (inequality) в ПЖ и её связь с динамикой ПЖ в стране в целом; оценивать вклад отдельных возрастных групп и причин смерти в межрегиональное «неравенство» в ПЖ в различных регионах и изменение этого вклада со временем; выявлять характеристики смертности для отдельных групп и причин смерти и оценить степень «неравенства» в ПЖ в различных регионах [7, 17]. Пандемия COVID-19 выявила существенные пробелы в охвате и качестве в существующих международных и национальных системах статистического мониторинга. Получение своевременных, точных и сопоставимых данных по странам для адекватного реагирования на неожиданные эпидемиологические угрозы является очень сложной задачей. Возобновился интерес к изучению связи колебаний смертности и здоровья с колебаниями экономических условий. Традиционная точка зрения, согласно которой экономический спад снижает здоровье и повышает смертность, сменилась представлением, что смертность характеризуется периодическими колебаниями [18]. Даже возникновение инфарктов и инсультов неравномерно в течение недели. Пик, наблюдаемый в понедельник, возможно, связан с ролью стресса, вызванного началом рабочей недели. Кроме того, повышенный уровень смертности в понедельник наблюдается у пациентов, госпитализированных с обострением сердечно-сосудистых и других заболеваний по выходным. Этот эффект, известный также как «эффект выходных», может быть объяснён более высоким уровнем тяжести заболевания среди пациентов, госпитализированных в выходные дни, и/или более низким качеством медицинской помощи, связанным с нехваткой или меньшим опытом персонала и ограниченной доступностью терапевтических и диагностических процедур [19]. Результаты исследования Otsuka et al. [12] указывают на клиническую важность наблюдения за пациентами с депрессией, особенно с точки зрения мониторинга вариабельности АД и ЧСС (т.е. аномального «хронома» АД и ЧСС). Нарушения физиологической изменчивости, например частоты сердечных сокращений, характеризующиеся потерей фрактальных (повторяющихся во времени) структур, также связаны с повышенной смертностью [14]. Анализ изменений различных сердечно-сосудистых, пищевых и воспалительных показателей до того, как возникнет необходимость в госпитализации или наступит летальный исход, показал, что изменения могут иметь место уже в течение нескольких месяцев или даже 1–2 лет до события, что, вероятно, даёт возможность для более ранних вмешательств [12].

В целом можно сказать, что снижение сезонных колебаний смертности сопутствовало увеличению ожидаемой ПЖ в течение последних 150 лет [11]. Новые методы, основанные на зависящем от времени анализе изменчивости, тенденций и взаимодействий множества физиологических и лабораторных параметров, для которых может потребоваться машинное обучение, вероятно, помогут клиницистам в будущем. Также в предстоящих исследованиях необходимо оценить, имеют ли динамические закономерности, наблюдаемые в крупных эпидемиологических исследованиях, значение для индивидуального профиля риска пациента [14]. С точки зрения геронтологии, изучение особенностей колебаний смертности позволяет от изучения воздействия биоритмов (Большие биологические часы) на развитие процессов острого и хронического феноптоза [7] переходить непосредственно к изучению паттернов самих ритмов детерминированной смертности (ритмов феноптоза).

Конфликт интересов. Автор заявляет об отсутствии конфликта интересов.

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

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Reinberg, A. E., Dejardin, L., Smolensky, M. H., and Touitou, Y. (2017) Seven-day human biological rhythms: An expedition in search of their origin, synchronization, functional advantage, adaptive value and clinical relevance, *Chronobiol. Int.*, **34**, 162-191, doi: 10.1080/07420528.2016.1236807.

2. Malygin, A. G. (2021) The programmed risks of dying at men of patients with the diabetes, *Biochemistry (Moscow)*, **86**, 1798-1807, doi: 10.31857/s0320972521120046.
3. Malygin, A. G. (2013) Age fluctuations in mortality of mice with mutation causing growth retardation, *Biochemistry (Moscow)*, **78**, 1033-1042, doi: 10.1134/S0006297913090095.
4. Malygin, A. G. (2017) New data on programmed risks of death in normal mice and mutants with growth delay, *Biochemistry (Moscow)*, **82**, 834-843, doi: 10.1134/S0006297917070094.
5. Malygin, A. G. (2018) Reproducible peak clusters on differential mouse mortality curves and their relation to the Gompertz model, *Biochemistry (Moscow)*, **83**, 836-845.
6. Vaupel, J. W., Carey, J. R., Christensen, K., Johnson, T. E., Yashin, A. I., et al. (1998) Biodemographic trajectories of longevity, *Science*, **280**, 855-860, doi: 10.1126/science.280.5365.855.
7. Skulachev, V. P., Shilovsky, G. A., Putyatina, T. S., Popov, N. A., Markov, A. V., et al. (2020) Perspectives of *Homo sapiens* lifespan extension: Focus on external or internal resources? *Aging (Albany NY)*, **12**, 55665584, doi: 10.18632/aging.102981.
8. Hainaut, D., and Denuit, M. (2020) Wavelet-based feature extraction for mortality projection, *ASTIN Bull.*, **50**, 675-707, doi: 10.1017/asb.2020.18.
9. Ebmeier, S., Thayabaran, D., Braithwaite, I., Bénamara, C., Weatherall, M., et al. (2017) Trends in international asthma mortality: analysis of data from the WHO Mortality Database from 46 countries (1993-2012), *Lancet*, **390**, 935-945, doi: 10.1016/S0140-6736(17)31448-4.
10. Rolden, H. J., Rohling, J. H., van Bodegom, D., and Westendorp, R. G. (2015) Seasonal variation in mortality, medical care expenditure and institutionalization in older people: evidence from a Dutch cohort of older health insurance clients, *PLoS One*, **10**, e0143154, doi: 10.1371/journal.pone.0143154.
11. Ledberg, A. (2020) A large decrease in the magnitude of seasonal fluctuations in mortality among elderly explains part of the increase in longevity in Sweden during 20th century, *BMC Public Health*, **20**, 1674, doi: 10.1186/s12889-020-09749-4.
12. Otsuka, K., Yamanaka, G., Shinagawa, M., Murakami, S., Yamanaka, T., et al. (2004) Chronomic community screening reveals about 31% depression, elevated blood pressure and infradian vascular rhythm alteration, *Biomed. Pharmacother.*, **58 Suppl. 1**, 48-55, doi: 10.1016/s0753-3322(04)80010-6.
13. Nordenskjöld, A. M., Eggers, K. M., Jernberg, T., Mohammad, M. A., Erlinge, D., et al. (2019) Circadian onset and prognosis of myocardial infarction with non-obstructive coronary arteries (MINOCA), *PLoS One*, **14**, e0216073, doi: 10.1371/journal.pone.0216073.
14. Kooman, J. P., Usvyat, L. A., Dekker, M. J. E., Maddux, D. W., et al. (2019) Cycles, arrows and turbulence: Time patterns in renal disease, a path from epidemiology to personalized medicine? *Blood Purif.*, **47**, 171-184, doi: 10.1159/000494827.
15. Turin, T. C., Kita, Y., Rumana, N., Takashima, N., Ichikawa, M., et al. (2010) Circaseptan variation in case-fatality rate for patients with acute subarachnoid hemorrhage (Takashima Stroke Registry 1988-2003), *J. Clin. Neurosci.*, **17**, 869-873, doi: 10.1016/j.jocn.2009.11.004.
16. Németh, L., Jdanov, D. A., and Shkolnikov, V. M. (2021) An open-sourced, web-based application to analyze weekly excess mortality based on the Short-term Mortality Fluctuations data series, *PLoS One*, **16**, e0246663, doi: 10.1371/journal.pone.0246663.
17. Jdanov, D. A., Galarza, A. A., Shkolnikov, V. M., Jasilionis, D., Németh, L., et al. (2021) The short-term mortality fluctuation data series, monitoring mortality shocks across time and space, *Sci. Data*, **8**, 235, doi: 10.1038/s41597-021-01019-1.
18. Edwards, R. (2008) Who is hurt by procyclical mortality? *Soc. Sci. Med.*, **67**, 2051-2058, doi: 10.1016/j.socscimed.2008.09.032.
19. Gallerani, M., Pala, M., and Fedeli, U. (2017) Circaseptan periodicity of cardiovascular diseases, *Heart Fail. Clin.*, **13**, 703-717, doi: 10.1016/j.hfc.2017.05.007.

VARIABILITY OF MORTALITY: ADDITIONAL INFORMATION ON THE COURSE OF MORTALITY AND MORBIDITY CURVES [Commentary on the article by A. G. Malygin entitled "Programmed Risks of Death in Male Patients with Diabetes" published in *Biokhimiya*, vol. 86, no. 12, pp. 1798-1807 (2021)]

G. A. Shilovsky[1,2,3]

[1] *Belozersky Institute of Physico-Chemical Biology, Lomonosov Moscow State University, 119991 Moscow, Russia; E-mail: gregory_sh@list.ru, grgerontol@gmail.com*

[2] *Faculty of Biology, Lomonosov Moscow State University, 119234 Moscow, Russia*

[3] *Institute for Information Transmission Problems, Russian Academy of Sciences, 127051 Moscow, Russia*

An analysis of demographic data indicates an uneven distribution of mortality throughout the year, month, and even within a week. This is of great practical importance, for example, for the operation of medical institutions, including intensive care units, and makes it possible to calculate the economic and labor load on medical institutions of the corresponding profile. All of the above is especially relevant in modern conditions in the era of the COVID-19 pandemic. Malygin showed the presence of fluctuations in mortality in men with type 2 diabetes, with a frequency of about one to two per week. The height of peaks of such fluctuations is determined, as expected, by two parameters: regular – indicating their position on the axis of life expectancy and random – height, reflecting the degree of adverse effects on the body of the external environment and the degree of a sharp decrease in the nonspecific resistance of the body that occurs periodically. The commentary discusses the results of recent research in the field of small (semi-weekly, weekly, monthly and seasonal) fluctuations of mortality. Based on a large array of accumulated data, it can be said that a decrease in seasonal variability of mortality accompanies an increase in life expectancy. The study of the characteristics of mortality fluctuations makes it possible to move from the impact of biorhythms (Master clock) on the development of acute and chronic phenoptosis processes, directly to the study of the patterns of the mortality rhythms themselves (rhythms of phenoptosis).

Keywords: mortality curves, aging, lifespan inequality, phenoptosis, acute phenoptosis, biorhythms, chronobiology

БИОХИМИЯ, 2022, том 87, вып. 3, с. 449 – 456

ПРАВИЛА ДЛЯ АВТОРОВ

1. Общие положения

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

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

1.3. К публикации принимаются законченные оригинальные работы, содержащие новые экспериментальные результаты; методические работы, включающие описание новых методов биохимических исследований; материалы теоретического характера с изложением новых принципов, подходов для решения тех или иных биохимических задач.

Раздел **«Краткие сообщения»** публикует короткие экспериментальные статьи заявочного, приоритетного характера, требующие скорейшей публикации. В сопроводительном письме в редакцию авторам следует мотивировать необходимость ускоренного прохождения материала. Срок публикации таких сообщений 3–4 месяца.

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

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

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

1.5. Правила для авторов и информацию о журнале можно найти на сайтах журнала http://protein.bio.msu.ru/biokhimiya и https://biochemistrymoscow.com, а также на порталах издательств Pleiades http://pleiades.online/ru/journal/biochmsc/ и Springer https://link.springer.com/journal/10541. На сайте журнала на английском языке представлены содержания всех выпусков, начиная с 1996 г., с резюме статей, ключевыми словами и адресами авторов. В свободном доступе также находятся две-три лучшие полнотекстовые статьи каждого выпуска, а также в полном объеме тематические выпуски журнала, посвященные наиболее актуальным проблемам биохимии. Кроме того, в рубрике «Papers in Press» размещаются до выхода в свет принятые к публикации рукописи, получившие высшие оценки при рецензензировании.

1.6. Импакт-фактор Biochemistry (Moscow) в 2020 г. составил 2.487, импакт-фактор РИНЦ для «Биохимии» – 3.038. По данным Scopus журнал находится во 2-й квартили (Q2) среди журналов биохимического и медико-биологического профилей.

1.7. Для увеличения охвата читательской аудитории и повышения цитируемости своей работы вы можете опубликовать статью в Biochemistry (Moscow) в режиме открытого доступа (Open Access). В этом случае в статье необходимо указать тип лицензии Creative Commons. Всю информацию о публикации статьи в свободном доступе можно найти на сайте издательства: http://pleiades.online/ru/authors/openaccess/.

2. Порядок подачи рукописей

2.1. Редакция принимает на рассмотрение рукописи, присланные по электронной почте в форме присоединенных файлов (attachment) на адреса редакции: editorial@biochemistrymoscow.com или ozrina@bio.chem.msu.ru.

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

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

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

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

2.4. При подаче рукописи авторам следует прислать в редакцию **сопроводительное письмо**, в котором надо указать, что: 1) представленный материал (или его части) не был ранее нигде опубликован и не находится на рассмотрении на предмет публикации в других изданиях; 2) авторы ознакомились с этическими нормами, предписанными международными соглашениями о публикациях научных статей, и соблюдают их; 3) авторами представлена информация о потенциальных конфликтах интересов; 4) авторы ознакомились с правилами проведения исследований с участием человека и/или животных и соблюдают их; 5) каждый соавтор сообщает о своем согласии на авторство в статье (см. соответствующие Положения на сайтах журнала и на порталах Springer и Pleiades).

3. Требования к оформлению рукописей

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

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

Индекс УДК выделяется *курсивом* и ставится в верхнем левом углу первой страницы.

Заглавие должно быть максимально кратким, информативным и без сокращений.

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

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

Ключевых слов – не более 7.

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

Текст статьи следует разбить на разделы: 1) Введение, 2) Методы исследования, 3) Результаты исследования, 4) Обсуждение результатов (объединенный раздел «Результаты и их обсуждение» допускается в тех случаях, когда обсуж-

дение невелико по объему), 5) Список литературы; 6) Резюме на английском языке.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

5) Если статья содержит персональную информацию об участниках исследования, то необходимо включить следующее положение в раздел «Информированное согласие»: «От всех участников, чья персональная информация содержится в этой статье, получено дополнительное письменное добровольное согласие».

Список цитируемой *литературы* должен быть максимально кратким (не более 100 ссылок), но содержащим ссылки на все принципиально важные последние публикации по данному вопросу. В журнале принята последователь-

ная нумерационная система цитирования, т.е. по ходу изложения указывается порядковый номер процитированного источника (в квадратных скобках), соответствующий номеру в Списке литературы. Авторам следует очень внимательно проверить последовательность нумерации ссылок в тексте и соответствие номера каждой ссылки в тексте и списке литературы. **Не допускается** включение в список литературы ссылок на веб-сайты, необходимо ссылаться на публикации авторов, предлагающих эти электронные ресурсы (программы/базы данных). Если такие публикации отсутствуют, ссылкадается в тексте так же, как на другие неопубликованные материалы (например, База данных структур бактериальных углеводов, csdb/glycoscience.ru/bacterial).

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

1. Beltrami, C., Besnier, M., Shantikumar, S., Shearn, A.I.U., Rajakaruna, C., et al. (2017) Human pericardial fluid contains exosomes enriched with cardiovascular-expressed microRNAs and promotes therapeutic angiogenesis, *Mol. Ther.*, **25**, 679-693, doi: 10.1016/j.ymthe.2016. 12.022.
2. Sloan-Dennison, S., and Schultz, Z.D. (2018) Label-free plasmonic nanostar probes to illuminate *in vitro* membrane receptor recognition, *Chem. Sci.*, **10**, 1807-1815, doi: 10.1039/c8sc05035j.
3. Анисимов В.Н. (2008) *Молекулярные и физиологические механизмы старения*, Наука, СПб.
4. Sambrook, J., and Russell, D.W. (2001) *Molecular cloning: a laboratory manual*, Cold Spring Harbor, Cold Spring Harbor Laboratory Press, N.Y.
5. Tanphaichitr, V. (2001) in *Handbook of vitamins* (Rucker, R., and Suttie, J., eds), Marcell Dekker, N.Y., pp. 275-316.
6. Гендролис А.А., Серебрянников Н.В., Гандель В.Г. (1978) В кн. *Простагландины* (под. ред. Ажгихина И.С.), Медицина, Москва, с. 332-347.
7. Гандельман О.А. (1992) *Кинетика и механизм биолюминесцентного окисления люциферина светляков*. Дис. канд. хим. наук, МГУ, Москва.
8. Rosenkranz, A.A., Slastnikova, T.A., Durymanov, M.O., and Sobolev, A.S. (2013) Malignant melanoma and melanocortin 1 receptor, *Biochemistry (Moscow)*, **11**, 1228-1237, doi: 10.1134/S00062979-13110035.

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

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

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

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

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

Стиль оформления текстового материала должен быть простым: **без запрограммированных заголовков, вставок, шаблонов, ссылок на литературные источники (гиперссылок)**; без увеличения межстрочных и межбуквенных интервалов; без использования шаблонов – в окне «стиль» должно быть «обычный»). Особенно это относится к «Списку литературы», т.к. запрограммированные порядковые номера при переносе в издательскую программу исчезают.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Общие требования к подготовке графиков, диаграмм и формул:

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

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

– если рисунок состоит из нескольких частей (диаграмм, графиков, схем, структур белков, фотографий, в т.ч. электрофореграмм), их нужно обозначить строчными *курсивными* буквами (*а*, *б*, *в* и т.д.) гарнитурой Times, размером большим, чем основной текст, и поместить эти бук-

вы в верхних левых углах соответствующих частей. В подрисуночной подписи следует дать пояснение к каждой части рисунка;

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

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

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

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

Обращаем внимание на общие условия публикации иллюстраций:

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

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

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

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

– подготовленные рисунки желательно распечатать, чтобы убедиться, что они хорошо вы-

глядят в напечатанном виде: все элементы рисунка должны быть хорошо видны на распечатке, фон должен быть чистым, надписи и цифры должны легко читаться. Зачастую бывает достаточно сложно оценить качество рисунка только по тому, как он выглядит на экране компьютера.

– подписи к рисункам следует сгруппировать в последовательном порядке и оформить как отдельный раздел в конце рукописи;

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

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

3.3.5. Дополнительные материалы к статьям. Для более полного описания исследования к статье могут прилагаться дополнительные материалы (аудио- и видеофайлы, презентации, дополнительные таблицы, рисунки и пр.) при условии, что автор является правообладателем прилагаемых материалов, и автором ранее не были переданы авторские права на их использование иным (кроме издателя) лицам, либо автор имеет письменное разрешение правообладателя на их использование в целях опубликования и распространения в журнале. Дополнительные материалы публикуются только в электронной версии журнала на сайте: http://link.springer.com, а также на сайте журнала: http://protein.bio.msu.ru/biokhimiya/. При наличии дополнительных материалов в тексте необходимо разместить ссылку на Приложение к статье.

3.3.6. Все **физические величины** рекомендуется приводить в международной системе СИ.

4. Порядок работы с рукописями (рецензирование, редакционная подготовка, корректура)

4.1. Поступившей в редакцию правильно оформленной рукописи присваивается регистрационный номер и фиксируется дата поступления, о чем редакция информирует авторов по электронной почте. **Рукописи, оформленные не по правилам, возвращаются авторам без рассмотрения.**

4.2. Рецензирование. При подаче рукописи авторы могут указать двух потенциальных рецензентов (ФИО, адрес электронной почты) из числа специалистов в данной области исследований, а также тех, чье участие в рецензировании нежелательно.

Все рукописи рассматривает Ответственный ученый секретарь (Executive Editor-in-Chief) и направляет Ответственному Редактору по соответствующей конкретной области исследований; он, в свою очередь, указывает двух-трех специалистов для рецензирования рукописи. Список Ответственных Редакторов и членов редколлегии размещен на сайте журнала, а также на сайтах Biochemistry (Moscow) на порталах Pleiades и Springer.

На основании экспертных заключений редколлегия определяет дальнейшую судьбу рукописи и в спорных случаях привлекает дополнительных рецензентов. По решению редколлегии рукопись может быть принята к публикации в представленном виде, отправлена авторам на доработку или отклонена. Основанием для отклонения рукописи являются недостаточно высокие оценки при рецензировании вследствие несоответствия профилю или уровню публикаций журнала.

Рукопись, получившая высшую оценку двух независимых рецензентов, печатается со специальной пометкой **«Ускоренная публикация»** (срок публикации – 3–4 месяца).

В случае необходимости рукопись направляется авторам на доработку по замечаниям рецензентов и редакторов, после чего она повторно рецензируется, и редколлегия вновь решает вопрос о приемлемости рукописи для публикации. В начале публикуемой статьи приводятся даты первоначального поступления рукописи в редакцию, поступления после окончательной доработки и принятия к публикации.

Переработанная рукопись должна быть возвращена в редакцию в течение трех месяцев после получения авторами отзывов; в противном случае рукопись рассматривается как вновь поступившая – ей присваивается новый регистрационный номер и ставится новая дата поступления в редакцию.

В журнале принято «одностороннее слепое рецензирование» (single blind review), т.е. авторам недоступны имена рецензентов, и редакция строго соблюдает конфиденциальность рецензентов. Все редакционные письма авторам идут за подписью Ответственного ученого секретаря журнала.

4.3. С 2003 г. редакция приступила к практике предварительной публикации рукописей (***Papers in Press***) на сайте ***Biochemistry* (*Moscow*)** (http://protein.bio.msu.ru/biokhimiya) **до выхода в свет** статьи.

На сайте размещаются экспериментальные статьи на английском языке, получившие высшие оценки при рецензировании и принятые к публикации.

4.4. На всех стадиях работы с рукописями, а также для общения с авторами, редакторами и рецензентами редакция использует электронно-почтовую связь, поэтому авторы должны быть очень внимательны к указанному в рукописи адресу электронной почты и должны своевременно сообщать о произошедших изменениях.

4.5. Через месяц после сдачи очередного выпуска журнала в печать редакция рассылает авторам по электронной почте корректуру статьи в виде PDF-файла и инструкцию по работе с ней.

На стадии корректуры не допускаются замены текста, рисунков или таблиц. Если все же это необходимо, то вопрос решается редколлегией; в крайнем случае, статья переносится в другой номер.

5. Англоязычный вариант журнала

5.1. Каждый выпуск журнала готовится одновременно на русском и английском языках.

Перевод статей осуществляет группа высококвалифицированных переводчиков-биохимиков. В ходе работы у переводчиков часто возникает необходимость связаться с авторами и устранить неточности в русском тексте статьи. Согласованные с авторами исправления вносятся и в русский, и в английский тексты на стадии корректуры.

Авторы, достаточно хорошо владеющие профессиональным английским языком, представляют в редакцию свой **аутентичный** перевод статьи.

5.2. Переводы редактируются английской редакцией журнала, и подготовленный текст направляется авторам для корректировки.

5.3. После выхода журнала в свет редакция рассылает авторам оттиски русского и английского вариантов статей в виде PDF-файлов.