

СОДЕРЖАНИЕ

Том 85, выпуск 8, 2020

Роль кисспептина в регуляции репродуктивной и иммунной функций (обзор) <i>О.Л. Горбунова, С.В. Шириев</i>	987
Современные представления о молекулярных механизмах нейтрофильной бронхиальной астмы и её терапии (обзор) <i>И.П. Шиловский, А.А. Никольский, О.М. Курбачёва, М.Р. Хаитов</i>	1004
Транслезионный синтез и ре-инициация синтеза ДНК в формировании устойчивости к химиотерапии (обзор) <i>Е.С. Шилкин, Е.О. Болдинова, А.Д. Столяренко, Р.И. Гончарова, Р.Н. Чупров-Неточин, М.П. Смаль, А.В. Макарова</i>	1021
Роль гидролаз семейства Nudix в метаболизме NAD и ADP-рибозы у млекопитающих (обзор) <i>В.А. Куликова, А.А. Никифоров</i>	1037
Синтез глутатиона в опухолевых клетках (обзор) <i>Е.В. Калинина, Л.А. Гаврилюк</i>	1051
Цинк как переключатель липоамиддегидрогеназы из сердца свиньи — предстационарная и стационарная кинетика диафоразной реакции <i>И.Г. Газарян, В.А. Щедрина, Н.Л. Клячко, А.А. Захарянц, С.В. Казаков, А.М. Браун</i>	1066
Идентифицированные в животных тканях изоформы 2-оксоадипатдегидрогеназы, кодируемой геном <i>DHATKD1</i> , не образуются при экспрессии <i>DHATKD1</i> человека в бактериальной или дрожжевой системах <i>А.И. Бойко, А.В. Артюхов, Т. Кэне, М. Луиджи ди Сальво, М.К. Бонаккорси ди Патти, Р. Контестабиле, А. Трамонти, В.И. Буник</i>	1080
Электрогенез во фракции плазматических мембран из галотолерантной микроводоросли <i>Dunaliella maritima</i> и эффекты <i>N,N'</i> -дициклогексилкарбодиимида <i>Л.Г. Попова, Д.А. Маталин, Ю.В. Балнокин</i>	1091
Непрерывная умеренная физическая нагрузка усиливает экспрессию FGF21 и KLB у мышей, страдающих ожирением <i>И. Сюн, Я. Чэнь, Я. Лю, Б. Чжан</i>	1100
Изменения процесса образования фибриногена и фибрина у больных с конечной стадией хронической болезни почек, находящихся на перитональном диализе <i>М. Баралич, Д. Робаджак, А. Пенезич, Г. Мильюш, М. Шундерич, Н. Глигорьевич, О. Недич</i>	1110
Электрические кабели клеток. II. Бактериальные электронные проводники (обзор) <i>В.В. Птушенко</i>	1120

CONTENTS

Vol. 85, Publ. 8, 2020

The Role of Kisspeptin in the Regulation of Reproductive and Immune Functions (Review) <i>O. L. Gorbunova and S. V. Shirshev</i>	987
Modern View on the Molecular Mechanisms of Neutrophilic Bronchial Asthma and Prospects of Its Therapy (Review) <i>I. P. Shilovskiy, A. A. Nikolskii, O. M. Kurbacheva, and M. R. Khaitov</i>	1004
Translesion Synthesis and Re-Initiation of DNA Synthesis in Chemotherapy Resistance (Review) <i>E. S. Shilkin, E. O. Boldinova, A. D. Stolyarenko, R. I. Goncharova, R. N. Chuprov-Netochin, M. P. Smal, and A. V. Makarova</i>	1021
The Role of NUDIX Hydrolases in NAD and ADP-Ribose Metabolism in Mammals (Review) <i>V. A. Kulikova and A. A. Nikiforov</i>	1037
Glutathione Synthesis in Cancer Cells (Review) <i>E. V. Kalinina and L. A. Gavriliuk</i>	1051
Zinc Switch in Pig Heart Lipoamide Dehydrogenase: Steady-State and Transient Kinetic Studies of the Diaphorase Reaction <i>I. G. Gazaryan, V. A. Shchedrina, N. L. Klyachko, A. A. Zakhariants, S. V. Kazakov, and A. M. Brown</i>	1066
Isoforms of the <i>DHTKD1</i> -Encoded 2-Oxoacid Dehydrogenase, Identified in Animal Tissues, Are Not Observed upon the Human <i>DHTKD1</i> Expression in Bacterial or Yeast Systems <i>A. I. Boyko, A. V. Artiukhov, T. Kaehne, M. L. di Salvo, M. C. Bonaccorsi di Patti, R. Contestabile, A. Tramonti, and V. I. Bunik</i>	1080
Electrogenesis in Plasma Membrane Fractions Isolated from Halotolerant Microalga <i>Dunaliella maritima</i> and <i>N,N'</i> -Dicyclohexylcarbodiimide Effects <i>L. G. Popova, D. A. Matalin, and Y. V. Balnokin</i>	1091
Moderate-Intensity Continuous Training Improves FGF21 and KLB Expression in Obese Mice <i>Yingzhe Xiong, Yan Chen, Yao Liu, and Bing Zhang</i>	1100
Modification of Fibrinogen and Fibrin Formation in Patients with an End-Stage Renal Disease Subjected to Peritoneal Dialysis <i>M. Baralić, D. Robajac, A. Penezić, G. Miljuš, M. Šunderić, N. Gligorijević, and O. Nedić</i>	1110
Electric Cables of Living Cells. II. Bacterial Electron Conductors (Review) <i>V. V. Ptushenko</i>	1120

УДК 577.171.52

РОЛЬ КИССПЕПТИНА В РЕГУЛЯЦИИ РЕПРОДУКТИВНОЙ И ИММУННОЙ ФУНКЦИЙ

Обзор

© 2020 О.Л. Горбунова*, С.В. Ширшев

Институт экологии и генетики микроорганизмов УрО РАН – филиал Пермского федерального исследовательского центра УрО РАН, 614081 Пермь, Россия; электронная почта: olia15_77@mail.ru

Поступила в редакцию 17.02.2020

После доработки 09.06.2020

Принята к публикации 14.06.2020

Работа посвящена физиологической роли гормона кисспептина, который продуцируется нейронами передней зоны гипоталамуса и является ключевым регулятором процессов репродукции. Рассматривается значение гормона в передаче информации о метаболической активности и индукции секреции гонадотропин-рилизинг-гормона (Гн-РГ) гипоталамусом, определяющего процессы гестации, включая оплодотворение, плацентацию, развитие плода и рождение ребенка. Обобщены и проанализированы данные литературы, касающиеся механизмов молекулярного действия и эффектов кисспептина на репродуктивную систему, включая процесс инициирования пубертатного периода. Кроме того, уделяется внимание гормон-опосредованным изменениям сердечно-сосудистой системы у беременных женщин. Впервые в обзоре рассмотрено влияние кисспептина на функциональную активность клеток иммунной системы с расшифровкой молекулярных механизмов трансдукции гормонального сигнала на уровне лимфоидных клеток, приводящее к формированию иммунной толерантности. В заключение представлена концептуальная модель, определяющая роль кисспептина как интегратора репродуктивной и иммунной функций в период физиологически протекающей беременности.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: кисспептин, беременность, гонадотропин-рилизинг-гормон, иммунная толерантность.

DOI: 10.31857/S0320972520080011

ВВЕДЕНИЕ

Кисспептины представляют собой семейство пептидов, предшественник которых закодирован в гене *KISS-1*. *KISS-1* впервые был обнаружен в 1996 г. как ген, продукты трансляции которого супрессировали метастазирование меланомы [1]. Открытие состоялось в Государ-

ственном медицинском колледже г. Херши (США), где находится известная шоколадная фабрика «The Hershey Company», производящая шоколад «Hersheys Kisses». Благодаря географическому расположению лаборатории, первооткрыватели гена назвали его *KISS-1*. Однако данное название имеет под собой и научное обоснование, поскольку включение *-SS-* (suppressor

Принятые сокращения: ГГ – вторичный (гонадотропный) гипогонадизм; ГГГО – гипоталамо-гипофизарно-гонадная ось; Гн-РГ – гонадотропин-рилизинг-гормон; ЛГ – лютеинизирующий гормон; ПОЗ – преоптическая зона гипоталамуса; ФСГ – фолликулостимулирующий гормон; ХГ – хорионический гонадотропин; ЦНС – центральная нервная система; Ас – аденилатциклаза; АМРК – АМР-активируемая протеинкиназа; АР-1 – активирующий белок 1; СаМ – кальмодулин; СаММКК2 – Са²⁺/СаМ-зависимая протеинкиназа 2; CREB – белок, связывающий с АМР-чувствительный элемент; DAG – диацилглицерол; DC – дендритные клетки; Е₂ – эстрадиол; ERK1/2 – киназа, регулируемая внеклеточными сигналами; ERα – эстрогеновые рецепторы α; FOXp3 – транскрипционный фактор регуляторных Т-клеток (Forkhead box P3); *GnRH* – ген Гн-РГ; GPCR – рецептор, сопряженный с G-белком; GPR54 (G protein receptor 54) или *KISS-1R* – рецептор кисспептинов; HSP – белки теплового шока; IDO – индоламин-2,3-диоксигеназа; IL – интерлейкин; IL-10R1/2 – рецептор IL-10; IP₃ – инозитол-1,4,5-трифосфат; iTreg – индуцибельные регуляторные Т-клетки; *KISS-1* – ген кисспептинов; *KISS-1R* – ген рецептора кисспептинов; MAPK – митоген-активируемые протеинкиназы; MMP – матриксная металлопротеиназа; mTOR – мишень рапамицина у млекопитающих (mammalian target of rapamycin); NF-κB – ядерный фактор κB; NK – естественные клетки-киллеры; P₄ – прогестерон; PIP₂ – фосфатидилинозитол-4,5-дифосфат; PKA – протеинкиназа А; PKC – протеинкиназа С; PLC – фосфолипаза С; RORC – retinoid-related orphan nuclear receptor; Stat – передатчик сигнала и активатор транскрипции; TGF-β1 – трансформирующий рост фактор β1; Th – Т-лимфоцит хелпер; TIMP – тканевой ингибитор металлопротеиназ; TNF-α – фактор некроза опухоли α; TSLP-R – рецептор к тимусному стромальному лимфопоэтину; VEGF – фактор роста эндотелия сосудов.

* Адресат для корреспонденции.

sequence) в название означает, что ген кодирует супрессорную последовательность [1]. Позже, в 1999 г. был обнаружен рецептор для белковых продуктов данного гена, относящийся к классу G-белок сопряженных рецепторов (GPCR), ассоциированных с $G\alpha_q$. Из-за структурного сходства с галаниновыми рецепторами вновь открытый рецептор первоначально был отнесен к семейству рецепторов галанина. Однако позже было установлено, что он не способен связывать сам галанин [2, 3].

В 2001 г. из плаценты человека был выделен белок, состоящий из 54 аминокислотных остатков (а.о.), который является продуктом *KISS-1* [4]. Поскольку данный белок обладал способностью ингибировать хемотаксис и инвазию клеток меланомы *in vitro*, он получил название метастин. Первое время метастин считали новым ингибитором метастатической активности опухолей, и основные исследования были направлены на изучение противоопухолевой активности данного белка [5]. В этом же году усилиями нескольких независимых групп ученых было показано, что белок, который ранее был отнесен к семейству рецепторов галанина, является естественным рецептором для метастина. Рецептор получил аббревиатуру GPR54 (G protein receptor 54) или KISS-1R [4, 6, 7]. В это же время была обнаружена экспрессия

KISS-1R в плаценте, аденогипофизе и гипоталамусе, что послужило основанием считать метастин фактором эндокринной регуляции [7]. В связи с этим метастин был переименован в кисспептин (продукт гена *KISS-1*), а обнаружение молекул KISS-1R на клетках трофобласта позволило сделать предположение о том, что кисспептин может играть роль гормона, регулирующего процессы гестации. Позже, в 2003 г., было показано наличие кисспептина в плазме крови человека и значительное повышение его концентрации при беременности [8]. В этом же году было обнаружено, что *KISS-1R* отсутствует или инактивирован вследствие мутации у пациентов, страдающих вторичным (гонадотропным) гипогонадизмом (ГГ) [3]. Использование в экспериментальной практике мышей с нокаутом *KISS-1R* позволило выявить ключевую роль этого рецептора и его лиганда — кисспептина для репродуктивной эндокринологии [9]. В 2004 г. на конференции Британского общества эндокринологии группа ученых под руководством Валита Дхилло из Лондонского имперского колледжа сделали доклад о кисспептине как о новом гормоне, способном вернуть фертильность бесплодным женщинам [10]. Было доказано, что ключевым регулятором секреции гонадотропин-рилизинг-гормона (Гн-РГ) является именно кисспептин [10, 11].

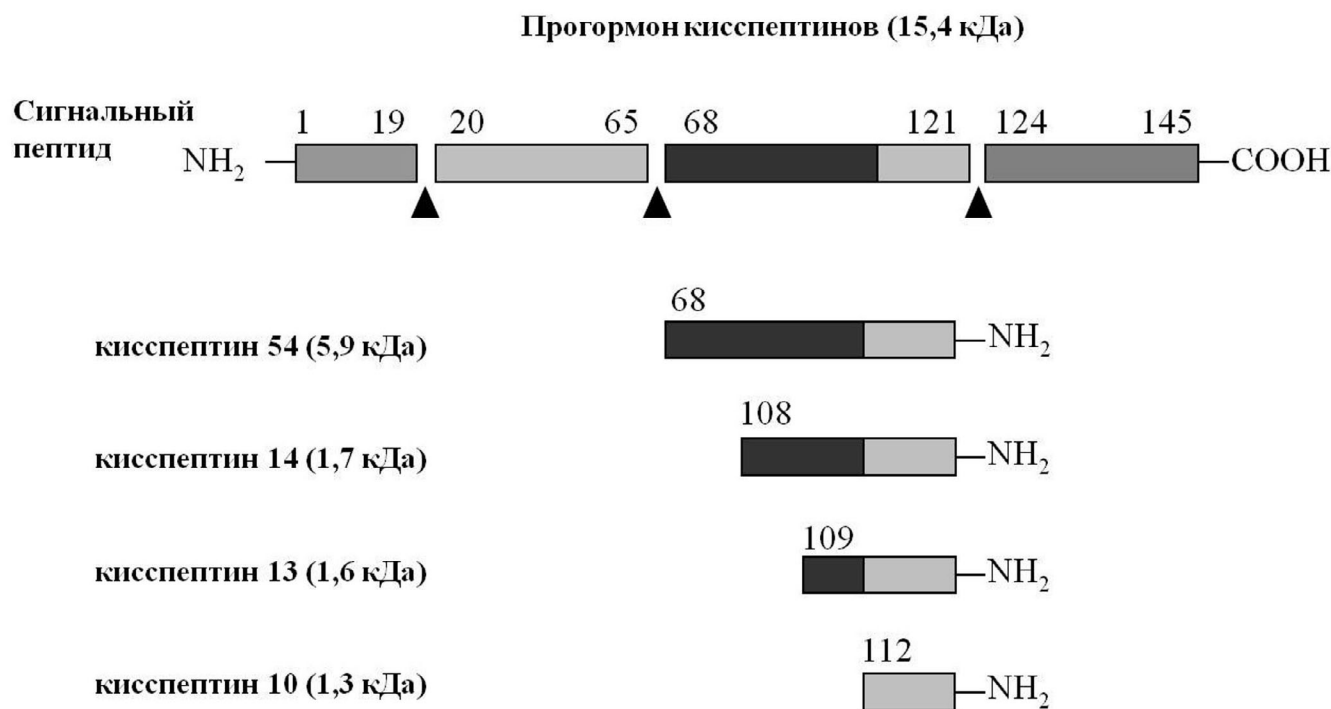


Рис. 1. Основные структурные особенности кисспептинов, образующихся в результате посттрансляционной модификации прогормона (адаптировано по [14])

СТРУКТУРНО-ФУНКЦИОНАЛЬНАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА КИССПЕПТИНА И ЕГО РЕЦЕПТОРА

У человека ген кисспептина расположен на длинном (q) плече хромосомы 1 (q32.3). *KISS-1* кодирует прогормон, состоящий из 145 а.о., который не обладает биологической активностью [12]. В ходе процессинга из прогормона образуются более короткие продукты прокисспептина, состоящие из 54, 14, 13 или 10 а.о. [4, 13, 14], которые содержат общий С-терминальный декапептид (кисспептин-10), необходимый для биологической активности [14] (рис. 1).

В головном мозге кисспептин вырабатывается двумя основными популяциями нейронов, локализованными в преоптической зоне (ПОЗ) и аркуатном ядре гипоталамуса. Кисспептин, продуцируемый нейронами головного мозга, не попадает в системный кровоток, а проявляет свое биологическое действие на уровне гипоталамо-гипофизарной системы [11, 15].

Как уже было отмечено (в 2003 г.), впервые было определено наличие кисспептина в плазме крови мужчин и небеременных женщин в очень низких концентрациях. Источник его в настоящее время не известен, хотя высказывается предположение, что это могут быть эндотелиальные клетки [8]. Значительное повышение кисспептина наблюдается при беременности вследствие продукции данного гормона плацентой [8, 15, 16]. Хроматографический анализ плазмы крови небеременных и беременных женщин выявил, что основная форма циркулирующего кисспептина — это кисспептин-54 [6, 8]. Установлено, что *in vitro* кисспептины-54, -14 и -10 секретируются клетками плаценты человека, а именно синцитиотрофобластом [8, 16, 17]. Средние концентрации кисспептина-54 в материнской плазме составляют 1,3 пМ в первом, 4,6 пМ — во втором и 9,6 пМ — в третьем триместрах беременности [8]. К 5 дню после родов концентрации кисспептина-54 в плазме возвращаются к уровням небеременных женщин. Период полувыведения кисспептина-54 составляет 28 мин [11]. Установлена связь между низким уровнем циркулирующего кисспептина во время беременности и повышенным риском выкидыша, поэтому концентрация кисспептина в плазме крови является важным потенциальным маркером успешной беременности [16]. Так выявлено, что уровень кисспептина-10 был значительно снижен у женщин с преэклампсией по сравнению с женщинами с нормально протекающей беременностью [18].

Помимо беременности повышение в плазме крови концентрации кисспептинов наблюдает-

ся при целом спектре связанных с беременностью пролиферативных аномалий трофобласта, включающих в себя различные варианты пузырного заноса, хориокарциному, эпителиоидную трофобластическую опухоль, трофобластическую опухоль плацентарной ножки [19].

Реализация эффектов гормона осуществляется путем связывания его молекулы со своим специфическим рецептором *KISS-1R* [3, 4, 6, 7]. У человека ген *KISS-1R* состоит из пяти экзонов и кодирует полипептидную цепь, состоящую из 398 а.о. (у мышей — 395 и у крыс — 396) [4]. Рецептор кисспептина экспрессируется в гипоталамусе, гипофизе, поджелудочной железе, плаценте, лейкоцитах периферической крови, гладких мышцах некоторых кровеносных сосудов, яичках, селезенке, тимусе, надпочечниках и лимфатических узлах [4, 7]. Кроме этого, *KISS-1R* экспонируется на синцитиотрофобласте, ворсинчатых и инвазирующих экстраворсинчатых трофобластах [17]. В головном мозге взрослых людей экспрессия обнаруживается в верхней фронтальной извилине, хвостом ядре, поясной извилине, гиппокампе, медуллярном мосте, а также гипоталамусе [6].

ЗНАЧЕНИЕ КИССПЕПТИНА В СТАНОВЛЕНИИ И ФУНКЦИОНИРОВАНИИ РЕПРОДУКТИВНОЙ СИСТЕМЫ

Интерес к кисспептину среди эндокринологов значительно вырос после выхода в свет двух публикаций 2003 г. [3, 20], в которых было продемонстрировано, что у пациентов, страдающих ГГ, *KISS-1R* отсутствует или инактивирован вследствие мутации. Использование в экспериментальной практике мышей с нокаутом *KISS-1R* позволило выявить ключевую роль этого рецептора и его лиганда — кисспептина для репродукции [9].

Как известно, репродуктивная система человека и млекопитающих работает по иерархическому принципу и состоит из нескольких уровней организации: ЦНС, гипоталамус, гипофиз, гонады и периферические органы/ткани-мишени. Вся система строго сбалансирована благодаря обратным связям, что определяет гомеостаз гипоталамо-гипофизарно-гонадной оси (ГГГО). Ключевым моментом инициации пубертатного периода является т.н. «секреторный скачок» гонадотропинов, суть которого заключается в активации ГГГО [21, 22]. Первая активация данной системы впервые происходит внутриутробно в начале беременности, затем в раннем постнатальном периоде. Пубертатная секреция гор-

монов является процессом реактивации ГГГО. Запуск этих изменений происходит в результате увеличения импульсной секреции Гн-РГ, который является основным гипоталамическим фактором, регулирующим репродуктивную функцию, стимулируя гонадотрофы гипофиза к высвобождению лютеинизирующего (ЛГ) и фолликулостимулирующего (ФСГ) гормонов [21, 22]. Гонадотропины, в свою очередь, побуждают гонады к синтезу половых стероидных гормонов: эстрадиола (E_2) прогестерона (P_4) или тестостерона, которые необходимы для оогенеза и сперматогенеза соответственно [21, 22]. Между железами внутренней секреции существует согласованный механизм взаиморегуляции, включающий в себя отрицательные и положительные обратные связи, которые уравнивают избыточные эффекты одних и стимулируют недоста-

точные функции других эндокринных желез в пределах ГГГО (рис. 2) [11, 13, 22, 23].

В последнее время установлено, что физиологическим регулятором секреции Гн-РГ является кисспептин [11, 24]. Экспериментально показано, что введение кисспептина человеку [11, 25], грызунам [26, 27, 28], овцам и обезьянам [29, 30] приводит к выработке гонадотропных гормонов гипофиза, и этот эффект опосредуется благодаря активации секреции Гн-РГ гипоталамусом [31]. У человека и животных нейроны, продуцирующие кисспептин и Гн-РГ, локализованы в одних и тех же областях – от преоптической области в направлении аркуатного ядра и ядер воронки гипоталамуса. Аксоны кисспептиновых нейронов образуют перикапиллярные сплетения в области стебля воронки, т.е. в месте секреции Гн-РГ [32]. В данной области мозга

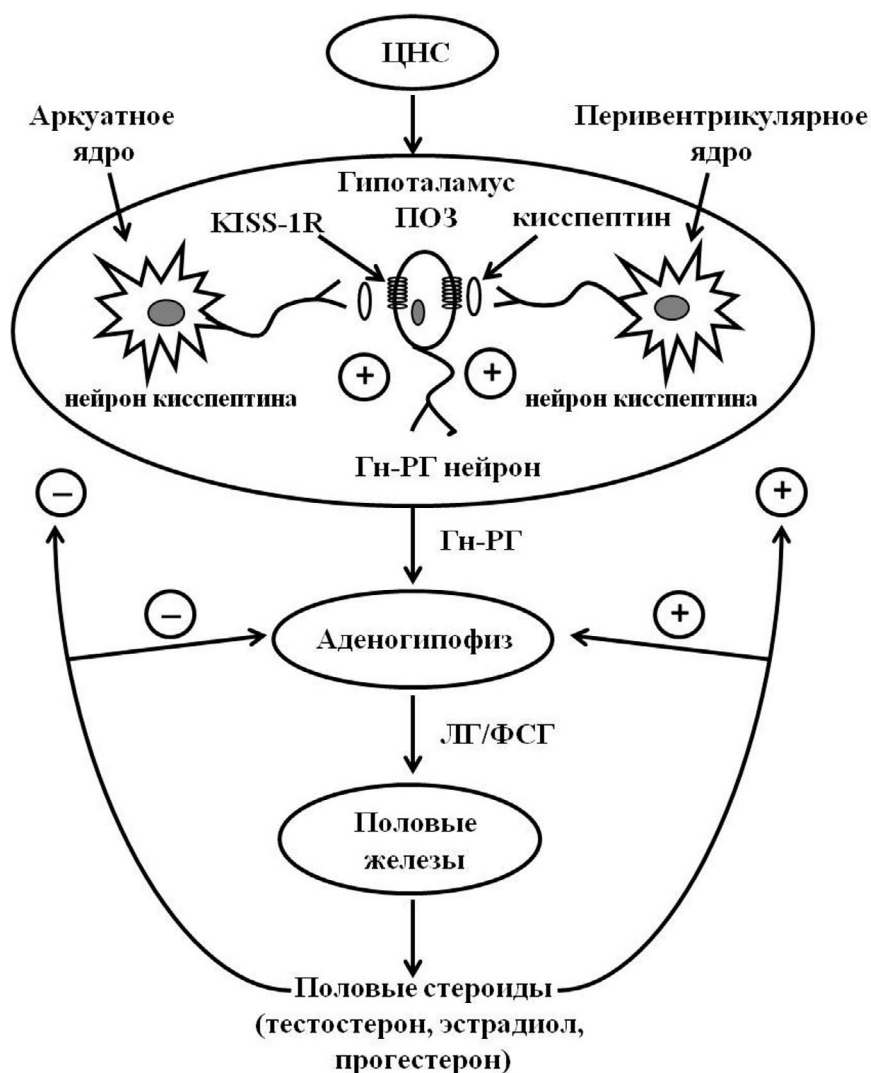


Рис. 2. Структура гипоталамо-гипофизарно-гонадной оси и ее регуляция кисспептином (адаптировано по [23]). Примечание: (–) – отрицательная обратная связь; (+) – положительная обратная связь

грызунов, овец и обезьян обнаружены аксосоматические, аксодендритные и аксоаксональные контакты между кисспептиновыми аксонами и Гн-РГ нейронами [32, 33]. При этом установлено, что Гн-РГ нейроны экспрессируют мРНК рецептора *KISS-1R* [34]. Кисспептин-продуцирующие нейроны преоптической зоны обеспечивают преовуляторный пик Гн-РГ, а клетки аркуатного ядра – импульсный характер секреции Гн-РГ. Выделение кисспептинов нейронами, в свою очередь, избирательно регулируется половыми стероидами, обеспечивая механизм, через который эстрогены могут регулировать секрецию Гн-РГ. Положительная обратная связь осуществляется преимущественно через эстрогеновые рецепторы α ($ER\alpha$), экспрессия которых отсутствует в Гн-РГ нейронах в отличие от *KISS-1*-содержащих нейронов. Таким образом, эстрогены реализуют свое центральное действие через $ER\alpha$, которые экспрессируются *KISS-1*⁺ нейронами, что приводит к продукции кисспептина и, как следствие, секреции Гн-РГ [34, 35, 36]. Пониженный уровень половых стероидов, напротив, ведет к усилению экспрессии рецепторов к Гн-РГ на гонадотрофах гипофиза и способствует повышенной секреции ЛГ в овуляцию, сопровождаемой возросшей концентрацией эстрогенов [13, 34].

Взаимодействие кисспептина с *KISS-1R* приводит к активации фосфолипазы C (PLC) β , которая конвертирует фосфотидилинозитол-4,5-дифосфат (PIP_2) до диацилглицерола (DAG) и инозитол-1,4,5-трифосфата (IP_3). Это приводит к повышению цитоплазматического Ca^{2+} ($[Ca^{2+}]_i$) и последующей активацией протеинкиназы C (PKC), которая фосфорилирует каскад митоген-активируемых протеинкиназ (MAPK), включающий в себя киназу, регулируемую внеклеточными сигналами (ERK1/2) и p38 [31, 37, 38]. В конечном итоге каскад ферментативных реакций, сопровождающий передачу внешнего сигнала от клеточной поверхности в ядро через регуляцию сигнал-зависимых транскрипционных факторов, приводит к активации гена *GnRH* (рис. 3) [38, 39].

Важным аспектом в действии кисспептинов является их участие в индукции пубертатного периода у человека и млекопитающих. Так, экспериментально установлено, что постоянное введение кисспептина-10 неполовозрелым крысам-самкам способствует открытию влагалища уже на 5-й день от начала инъекций [40], а повторяющееся введение кисспептина-10 неполовозрелым приматам индуцирует каскад преждевременных Гн-РГ импульсов, схожих с теми, которые происходят в период полового созревания [40]. Кроме этого, выявлено, что экспрес-

сия *KISS-1* и *KISS-1R* повышается в период полового созревания у млекопитающих и человека [41].

Таким образом, начало пубертатного периода прямо связано с повышением уровня кисспептинов. В то же время для физиологически детерминированной активации Гн-РГ в пубертатный период недостаточно только лишь повышенной экспрессии генов кисспептина и его рецептора, необходимы и другие функционально-анатомические трансформации. Установлено, что чувствительность Гн-РГ нейронов к кисспептинам также изменяется во время полового развития. У взрослых мышей кисспептины вызывают быструю деполяризацию более 90% Гн-РГ нейронов и только ~ 30% нейронов у неполовозрелых животных, хотя экспрессия *KISS-1R* между возрастными группами схожа [41]. Это различие в чувствительности Гн-РГ нейронов было подтверждено *in vivo* при интрацеребровен-трикулярном введении низких доз кисспептина мышам, что приводило к выбросу ЛГ только у половозрелых животных [40]. Таким образом, повышенная чувствительность Гн-РГ нейронов к кисспептинам также является важным фактором, регулирующим репродукцию.

Еще одним необходимым условием активации Гн-РГ в пубертатный период является образование минимального количества жировой ткани в организме. Известно, что возраст менархе напрямую коррелирует с массой тела, так как при недостатке жировых клеток пубертат не наступает. Метаболический гормон лептин, подавляющий аппетит, действует на уровне гипоталамуса, контролирует чувство голода, регулирует потребление пищи, метаболизм жировой ткани, энергетический гомеостаз, процессы роста и развития [42]. Было сделано предположение, что лептин, продуцируемый жировой тканью, действует как важный фактор в пубертатном развитии. У грызунов лептин может влиять на начало пубертатного периода, поскольку его введение снижает возраст, в котором происходит половое созревание у крыс и мышей [43]. Была выдвинута гипотеза о том, что лептин участвует в передаче метаболической информации, поступающей с периферии в Гн-РГ-продуцирующие нейроны. Однако данная гипотеза не подтвердилась, поскольку Гн-РГ нейроны не экспрессируют рецепторы лептина [44]. Вскоре несколько групп исследователей показали, что кисспептин является не только фактором наступления половой зрелости, но и участвует в контроле метаболизма [45], поскольку 40% кисспептин-продуцирующих нейронов аркуатного ядра экспрессируют рецепторы лептина [44]. Та-

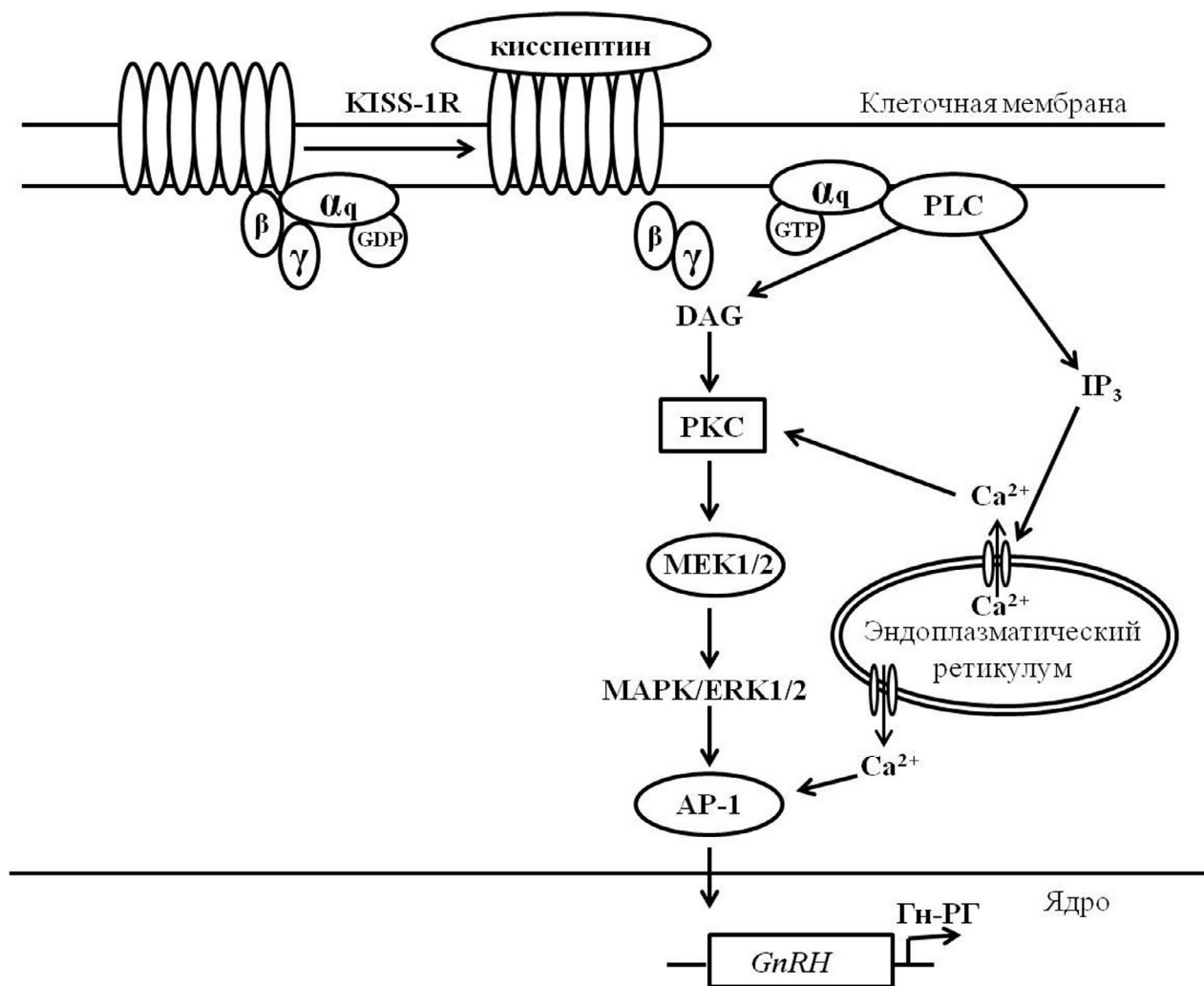


Рис. 3. Предполагаемая схема трансдукции гормонального сигнала кисспептина на уровне нейронов головного мозга (адаптировано по [38])

ким образом, репродуктивные эффекты лептина реализуются через кисспептин, который является связующим звеном, посредством которого лептин может проявлять свои биологические функции. KISS-1R, рецепторы лептина и Гн-РГ коэкспрессированы и колокализованы в аркуатном ядре и некоторых других областях гипоталамуса, т.е. представляют собой единую функциональную подсистему, напрямую связанную с процессом размножения [46, 47]. Действие кисспептина и лептина на репродуктивную функцию соподчинены: кисспептин напрямую стимулирует экспрессию *GnRH* и повышает секрецию Гн-РГ гипоталамусом, что ускоряет наступление половой зрелости, тогда как лептин действует опосредованно через кисспептин [48]. Поэтому кисспептин является не только важнейшим фактором становления пубертатного периода, но и является необходимым звеном

для передачи метаболической информации, которая поступает с периферии в Гн-РГ-продуцирующие нейроны.

Функциональный антагонист лептина — пептидный гормон грелин, также участвует в регулировании энергетического гомеостаза и репродуктивной системы [49]. Грелин синтезируется преимущественно в париетальных клетках желудка, заметно меньше в ЦНС. Грелин-продуцирующие нейроны обнаружены в аркуатном ядре гипоталамуса и гипофизе [42]. Согласно исследованиям *in vitro*, введение грелина ингибирует секрецию Гн-РГ и ЛГ [50, 51]. Введение грелина, а также гипергрелинемия, вызванная ограничением пищи, приводят к снижению экспрессии гена *KISS-1* и импульсной активности Гн-РГ нейронов [52, 53]. Эти результаты показывают, что вызванное грелином снижение гипоталамической экспрессии *KISS-1* может

быть одним из ключевых факторов ингибирования репродуктивной функции [53]. Таким образом, лептин, сигнализирующий об избытке энергии и подавляющий аппетит, стимулирует Гн-РГ посредством связывания со своим рецептором и, тем самым, активирует выработку кисспептина ядрами гипоталамуса. Тогда как грелин, сигнализирующий об энергетической недостаточности, подавляет секрецию Гн-РГ и снижает экспрессию мРНК кисспептина в аркуатном ядре гипоталамуса [54]. Таким образом, оба гормона – лептин и грелин, составляющие антагонистическую пару, реализуют свои эффекты через повышение или понижение кисспептина.

Все это свидетельствует о непосредственном участии кисспептина в индукции секреции Гн-РГ – ключевого регулятора процессов репродукции. Без кисспептина наступление пубертатного периода и последующая полноценная реализация половой функции невозможна.

РЕГУЛЯЦИЯ КИССПЕПТИНОМ ПРОЦЕССА БЕРЕМЕННОСТИ

Процесс беременности представляет собой сложную цепь событий, включающую в себя оплодотворение с последующим формированием и имплантацией бластоцисты, плацентацию, развитие плаценты, плода и рождение ребенка. На каждом из указанных этапов функционирует сложный комплекс внутрисистемных взаимодействий, благодаря которому происходит успешное формирование эмбриона (плода). Основную роль в этих процессах играют гормоны и белки беременности [21, 22]. Поскольку в период беременности в центральном кровотоке концентрация кисспептина значительно повышается благодаря плацентарному синтезу, по сравнению с небеременными женщинами [8], то кисспептин, несомненно, оказывает влияние на все этапы развития беременности. Уже на 7-е сутки после оплодотворения начинаются процессы формирования плаценты. Рост трофобласта и его внедрение в децидуальную оболочку матки имеет решающее значение для развития плаценты и плода [55]. Как и раковые клетки, трофобласт секретирует протеазы разрушающие белки внеклеточного матрикса для проникновения в подлежащие ткани. Экстраворсинчатый трофобласт экспрессирует белки теплового шока (HSP) 27, что коррелирует с активностью матриксных металлопротеиназ (ММР) 2 [56]. Исходное содержание HSP27 в раковых клетках значительно выше, чем в нормальных клетках, что определяет устойчивость к апоптозу раковых

клеток [57]. Это прямо связано с метастатическим потенциалом раковых клеток [58]. ММРs представляют собой семейство Zn- и Ca²⁺-зависимых эндопептидаз, которые после активации разрушают компоненты межклеточного матрикса, что приводит к инвазии клеток трофобласта или раковых клеток [59], поэтому повышенная экспрессия ММРs определяет патогенез многих заболеваний [59, 60, 61]. Инвазия трофобласта в стенку матки имеет некоторое сходство с прорастанием опухолевых клеток в подлежащие ткани: увеличение клеточной пролиферации, снижение гибели клеток, повышенное кровоснабжение и инвазия окружающих тканей [62], но отличается от нее жесткой регулируемостью процесса. В число регуляторных механизмов, ограничивающих трофобластную инвазию, входят паракринные и аутокринные факторы, синтезируемые трофобластом и децидуальной оболочкой. Среди последних основная роль принадлежит трансформирующему фактору роста $\beta 1$ (TGF- $\beta 1$), который продуцируется в I триместре децидуальными клетками [63, 64] и ограничивает плацентарную инвазию благодаря усилению секреции тканевых ингибиторов металлопротеиназ (TIMPs) клетками цитотрофобласта, ингибируя их способность к миграции [63, 65]. В индукцию ингибирования инвазии трофобласта наряду с Гн-РГ [64] и фактором некроза опухоли TNF- α , продуцируемого децидуальными макрофагами [66] и хорионом [67, 68], вовлечен в полной мере и кисспептин [17, 64].

Учитывая, что кисспептин одновременно является индуктором плацентарного Гн-РГ, то эффект контроля инвазии трофобластов значительно усиливается. Участие кисспептинов в контроле плацентарной инвазии подтверждается тем, что экспрессия *KiSS-1* и *KISS-1R* понижена в клетках хориокарциномы [66], но наиболее выражена в клетках трофобласта в I триместре беременности [17, 69, 70]. Известно, что многие плацентарные патологии, ассоциированные с аномальной инвазией, происходят именно в этот период беременности [69, 71]. В ряде исследований было показано, что кисспептины контролируют инвазию трофобласта [72] посредством снижения активности некоторых ММРs [14, 16, 73], в частности, К. Yoshioka et al. впервые показали, что кисспептин-54 снижает экспрессию ММР-2 [60]. С помощью анализа миграции и инвазии клеток трофобласта было выявлено, что добавление кисспептина-10 приводит к снижению экспрессии ММР-2 в первичных клетках трофобласта и, как следствие, к уменьшению миграционной способности клеток трофобласта [74]. В этом же исследовании

авторами было продемонстрировано, что кисспептин-10 ингибировал экспрессию MMP-1, 3, 7, 9, 10 и 14 и повышал экспрессию TIMP 1 и 3 в клетках трофобласта. Исследования на опухолевых клетках, а также на клетках трофобласта, показали, что кисспептин ингибирует активность MMP-2 и MMP-9, блокируя транслокацию ядерного фактора κB (NF- κB), вследствие чего уменьшается сродство NF- κB с промоторм MMP-2 и MMP-9, участвующих в распаде внеклеточного матрикса путем деградации коллагенов IV и V типов. Таким образом, кисспептин способствует снижению экспрессии MMP-2 и MMP-9, что, в свою очередь, ингибирует способность опухолевых клеток образовывать метастазы, а у клеток трофобласта снижает миграционную способность [75]. Помимо ингибирования инвазивной способности, кисспептины снижают подвижность клеток и их адгезию [4]. Кроме того, кисспептин является фактором, который вместе с другими провоспалительными цитокинами, например TNF- α , сдерживает рост трофобласта посредством активации апоптоза [76]. Показано, что введение кисспептина индуцирует апоптоз в плацентарных эксплантах, причем данный эффект зависит от дозы гормона [77, 78].

Другим важным эффектом кисспептина, сдерживающим инвазивный рост гемохориальной плаценты, является супрессия неоваскулярных процессов. Установлено, что кисспептин ингибирует экспрессию фактора роста эндотелия сосудов (VEGF), таким образом, контролируя образование эмбриональных сосудов и рост новых сосудов в уже существующей сосудистой системе [74]. На крысах с синдромом гиперстимуляции яичников показано, что введение кисспептина-10 приводит к снижению проницаемости сосудов за счет активации *KISS-1R* и ингибирования VEGF [79]. Кроме этого, выявлено, что кисспептин оказывает выраженное сосудосуживающее действие на гладкомышечные клетки сосудов матери посредством изменения синтеза эйкозаноидов, предшественником которых является арахидоновая кислота, и может играть физиологическую и/или патологическую роль в регуляции тонуса сосудов [80].

В период беременности в организме женщины наблюдаются существенные изменения, касающиеся деятельности сердечно-сосудистой системы. Эта система в период беременности работает с увеличенной нагрузкой, что обусловлено ускорением метаболизма, увеличением общего объема циркулирующей крови, развитием дополнительного круга кровообращения (плацентарно-маточного), а также ростом плода и увеличением массы тела матери. Установлено,

что рецепторы кисспептина в большом количестве экспрессированы на поверхности аорты, коронарных артериях и пуповине [81]. На мышцах было продемонстрировано, что кисспептин-10 является мощным вазоконстриктором и ингибитором ангиогенеза [82]. В гладкомышечных клетках аорты человека кисспептин-10 значительно подавляет индуцированную ангиотензином II миграцию, пролиферацию клеток и усиливает апоптоз [81, 82]. Таким образом, кисспептин является важным негативным регулятором прогрессирования неоплазии. В то же время это его действие во время беременности служит фактором регулируемой инвазивности трофобласта и не дает хориону малигнизироваться.

Кисспептин также участвует в процессе родоразрешения путем стимуляции секреции окситоцина. Недавнее исследование на крысах показало, что внутримозговое введение кисспептина увеличивало скорость активации нейронов окситоцина в гипоталамусе только на 18–21 дни беременности. Важно отметить, что гипоталамическая экспрессия *KISS-1R* у крыс является неизменной на протяжении всей беременности. Остается неизвестным, почему кисспептин может связываться и активировать свой рецептор только на поздних сроках беременности у крыс. Вполне вероятно, что только высокие уровни кисспептина, характерные для поздней беременности у крыс, способны активировать *KISS-1R* в гипоталамусе и у плода [83].

ЗНАЧЕНИЕ КИСПЕПТИНА В ФОРМИРОВАНИИ ИММУННОЙ ТОЛЕРАНТНОСТИ В ПЕРИОД ФИЗИОЛОГИЧЕСКИ ПРОТЕКАЮЩЕЙ БЕРЕМЕННОСТИ

С точки зрения иммунологии, беременность представляет собой феномен полуаллогенной трансплантации, но при физиологическом развитии процесса отторжения чужеродного трансплантата не происходит [21]. Основными механизмами формирования иммунной толерантности во время беременности являются следующие: 1) индукция фермента индоламин-2,3-диоксигеназы (IDO) антигенпрезентирующими клетками [84]; 2) увеличение числа индуцибельных регуляторных Т-клеток (iTreg), угнетающих иммунный ответ по отношению к плоду; 3) снижение количества Т-лимфоцитов хелперов (Th), продуцирующих интерлейкин (IL)-17 (Th17) и Th1 клеток, стимулирующих цитотоксические реакции; 4) доминирование Th2 клеток, определяющих фетопротекцию [21, 85].

Учитывая, что на различных типах клеток иммунной системы экспрессированы рецепторы для кисспептинов [4, 7], было высказано предположение, что кисспептин, наряду с другими гормонами и белками беременности, способен эффективно модулировать иммунные реакции [86]. Показано, что в организме небеременных женщин и мужчин кисспептин в центральном кровотоке детектируется в очень низких концентрациях и циркулирует, в основном, на уровне сосудов головного мозга [11, 15]. Однако в период беременности кисспептин продуцируется плацентой [8], и, соответственно, в этот период способен оказывать системное влияние на клетки иммунной системы. Нами уста-

новлено прямое влияние кисспептина на регуляторные субпопуляции Т-лимфоцитов [86, 87]. Показано, что кисспептин в концентрациях, соответствующих I–III триместрам беременности способствует формированию иммунной толерантности. Гормон усиливает генерацию iTreg, активно продуцирующих IL-10, который опосредует дистантный механизм иммуносупрессорной активности Treg клеток [84, 88]. Кроме того, кисспептин препятствует дифференцировке Th17 лимфоцитов, одновременно угнетая ими продукцию провоспалительного цитокина IL-17A. Данный эффект гормона связан с повышенной экспрессией молекул FOXP3 (транскрипционный фактор регуляторных Т-клеток

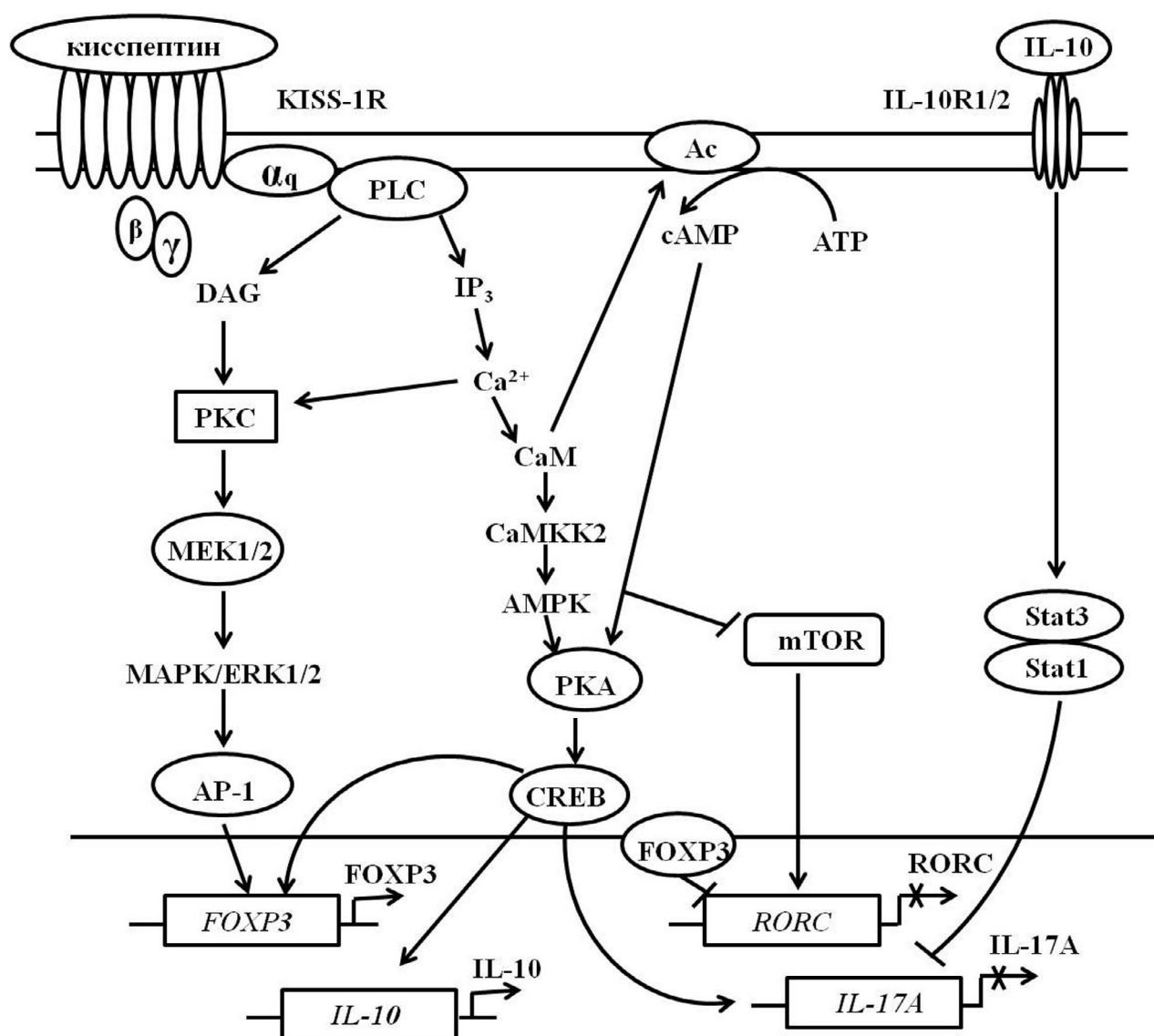


Рис. 4. Механизм реализации эффектов кисспептина в регуляции дифференцировки CD4⁺Т-лимфоцитов периферической крови в iTreg и Th17 клеток [90]. Примечание: Stat – передатчик сигнала и активатор транскрипции; IL-10R1/2 – рецептор IL-10

(Forkhead box P3)), продукт которого — скурфин — определяет супрессорный потенциал Treg клеток, а FOXP3 конкурирует с RORC (retinoid-related orphan nuclear receptor), ответственного за дифференцировку Th17 лимфоцитов [89].

При исследовании иммуномодулирующей функции киспептина были определены основные молекулярные механизмы действия гормона на уровне регуляторных CD4⁺T-лимфоцитов (рис. 4) [90]. Установлено, что взаимодействие гормона с KISS-1R повышает уровень внутриклеточного cAMP. Прирост уровня cAMP связан с процессами генерации iTreg, что проявляется в увеличении данных клеток в культуре. Повышение cAMP приводит к активации белка, связывающего cAMP-чувствительный элемент (CREB) и MAPK/ERK (MEK1/2), что способствует дифференцировке CD4⁺T-лимфоцитов в iTreg, параллельно снижая экспрессию RORC [90]. cAMP-зависимая передача сигналов киспептина, по-видимому, связана со способностью Ca²⁺/CaM (кальмодулин) активировать не только MEK1/2 [91], но и аденилатциклазу (Ac) [92]. Доминирование cAMP-зависимого действия киспептина в лимфоидных клетках определяется способностью [Ca²⁺]i стимулировать протеинкиназу A (PKA) через Ca²⁺/CaM, Ca²⁺/CaM-зависимую протеинкиназу 2 (CaMKK2) и AMP-активируемую протеинкиназу (AMPK) [93]. PKA, в свою очередь, угнетает mTOR — мишень рапамицина у млекопитающих (mammalian target of rapamycin) [94], который активирует транскрипцию RORC [95] и фосфорилирует CREB [96].

Таким образом, активируются, как минимум, два транскрипционных фактора — активирующий белок 1 (AP-1) и CREB [31], которые индуцируют транскрипцию FOXP3 [97] и IL-10 [94], одновременно блокируя транскрипцию RORC. Все это приводит к увеличению количества iTreg с одновременным повышением их функциональной активности за счет усиления секреции IL-10 и уменьшения количества Th17 со сниженной способностью к продукции IL-17A. Данный механизм приводит к экспрессии молекул скурфина, что поляризует CD4⁺T-лимфоциты в iTreg клетки, определяющие феномен толерантности иммунного ответа. В целом, механизмы гормонального контроля клеток иммунной системы киспептином направлены на угнетение цитотоксических реакций, формирование иммунного ответа типа 2 и доминирования iTreg клеток.

Также нами установлено, что киспептин в концентрации, соответствующей его уровню во II триместре беременности, в котором чаще все-

го возникают абортс иммунного генеза, усиливает индукцию IDO моноцитами [86]. В свою очередь, клетки, экспрессирующие повышенные уровни IDO, дополнительно способствуют генерации iTreg, а активация IDO приводит к гибели цитотоксических T-лимфоцитов вследствие дефицита триптофана, необходимого для их активности и выделения токсичных продуктов его деградации, таких как кинуренин [85]. Все это говорит в пользу того, что киспептин во время беременности является важным, ранее не учитываемым физиологическим фактором дифференцировки CD4⁺T-клеток, сдвигая соотношение Treg/Th17 в сторону Treg, что согласно современным представлениям, является наиболее важным механизмом поддержания иммунной толерантности при беременности [84].

В период беременности супрессия адаптивного иммунного ответа матери компенсируется активацией системы естественного иммунитета. Установлено, что главную роль в обеспечении выживания плода играют клетки врожденного иммунитета, основными эффекторами среди которых являются моноциты/макрофаги [21, 98], которые осуществляют клиренсную функцию, фагоцитируя патогены, клеточный детрит и апоптотические тельца [21]. Более того, при беременности моноциты и дендритные клетки (DC) определяют вид иммунного реагирования, усиливая, при сложившихся условиях, активность Th2 лимфоцитов, отвечающих за трофическую функцию иммунной системы матери в отношении плода [21]. В известной степени эти процессы также регулируются киспептином, который стимулирует процессы фагоцитоза и кислородзависимые механизмы микробицидности моноцитов периферической крови, [99]. Известно, что активные кислородные метаболиты являются не только важными факторами бактерицидности моноцитов, но и участвуют в процессах ремоделирования тканей при физиологически протекающей беременности [21, 100]. В отличие от моноцитов, фагоцитарная функция нейтрофилов угнетается киспептином в концентрациях, соответствующих его уровню при беременности [101]. Данный эффект гормона вполне объясним, поскольку известно, что активация нейтрофилов во время беременности может приводить к потере плода [102, 103].

Наряду с моноцитами и нейтрофилами, естественные клетки-киллеры (NK) также являются важным компонентом врожденного иммунитета, составляя основную массу лимфоидных клеток децидуальной оболочки в период беременности [104]. Помимо реализации цитотоксических функций NK-клетки играют важную роль в имплантации и сохранении беременнос-

ти за счет усиления процессов неоваскулогенеза [104]. Как известно, продукция кисспептина трофобластом снижена у женщин со спонтанными абортами и напрямую коррелирует с уровнем NK-клеток периферической крови и децидуальной оболочки [105]. Установлено, что кисспептин в концентрации, характерной для беременности, эффективно модулирует функциональную активность NK-клеток. Гормон увеличивает долю регуляторных NK-лимфоцитов CD56^{bright} подтипа NK3 за счет активации им продукции TGF- β и снижения секреции фетотоксического интерферона- γ . При этом кисспептин может служить индуктором направленной миграции NK-клеток в плаценту в поздние сроки беременности [106]. Недавно установлено, что кисспептин в концентрации, отражающей его уровень при беременности, усиливает экспрессию на NK-клетках ингибиторных молекул NKG2A и L-селектина, усиливая, тем самым, регуляторный, а не цитотоксический потенциал NK-клеток [107]. По-видимому, кисспептин во время беременности модулирует цитокиновый спектр NK-клеток, что лежит в основе снижения цитотоксической функции с одновременным приобретением ими регуляторного потенциала.

Помимо непосредственного влияния кисспептина на лейкоциты периферической крови во время беременности, он способен модулировать функциональную активность и процессы созревания DC тимуса [108]. Известно, что в тимусе формируются основные эффекторные и регуляторные субпопуляции Т-лимфоцитов. Во время беременности происходит стероид-индуцированная инволюция тимуса, способствующая формированию иммунной толерантности, которая определяет успешное развития полуаллогенного плода [109]. Тимические DC играют ключевую роль в поддержании ауто толерантности. Они развиваются из ранних лимфоидных предшественников и осуществляют отрицательную селекцию аутореактивных тимоцитов [110], а также участвуют в индукции направленности дифференцировки предшественников Т-лимфоцитов. Выделяют миелоидные (m) и плазматоидные (p) DC тимуса, которые участвуют в регуляции клеточной дифференцировки. Известно, что во время беременности в периферическом кровотоке увеличивается доля pDC, выполняющих толерогенную функцию. Эти клетки усиленно продуцируют такие цитокины, как IL-10 и TGF- β 1, приводящие к формированию aTreg и, как следствие, иммунной толерантности [111]. Показано, что у животных с дефицитом KISS-1R наблюдается увеличение клеточности и массы тимуса. Одновременно у этих животных

снижается доля Treg и увеличиваются процессы созревания DC в тимусе [112]. Учитывая, что mDC тимуса принимают непосредственное участие в дифференцировке Т-клеток, можно предполагать, что кисспептин является физиологическим регулятором системной девиации основных эффекторных и регуляторных субпопуляций Т-клеток (Th1, Th2, Treg, Th17) в период беременности. В проведенных нами исследованиях по изучению гормональной регуляции процессов дифференцировки DC тимуса было установлено, что кисспептин в концентрациях, характерных для II и III триместров беременности, непосредственно регулирует данный процесс. Гормон снижает общее количество mDC (CD11c⁺) и mDC, экспрессирующих рецептор к тимусному стромальному лимфопоэтину – TSLP-R (CD11c⁺TSLP-R⁺), что приводит к снижению индукции mDC формировать Th17 [108].

Учитывая, что mDC наиболее чувствительны к эффектам кисспептина во второй половине беременности, действие гормона будет способствовать угнетению дифференцировки Th17 на уровне тимуса в этот период. Не исключено, что подавление кисспептином дифференцировочного потенциала mDC тимуса во время беременности может быть одним из звеньев в цепи стероид-индуцируемой инволюции тимуса в этот период.

Таким образом, кисспептин во время беременности получает возможность модулировать не только процессы репродукции, но и функциональную активность клеток иммунной системы, включая тимический этап дифференцировки. Можно предположить, что кисспептин является гормоном, регулирующим не только репродуктивную и иммунную системы, но и, наряду с другими гормонами репродукции, процессы взаимодействия этих систем между собой.

Обобщение представленных данных и их анализ позволяет заключить, что кисспептин-54 является доминирующим в семействе кисспептинов и содержит, как и все кисспептины, декапептид, определяющий основные эффекты гормонов данного семейства. Гормон регулирует физиологические функции на уровне гипоталамо-гипофизарной системы, регулируя пубертатный период и последующую фертильность, определяя механизм функционирования гонадостата. В то же время гормон принимает активное участие в процессе беременности, начиная от времени оплодотворения яйцеклетки до родов и периода лактации. Его интегрирующая функция тесно связана со способностью инициировать

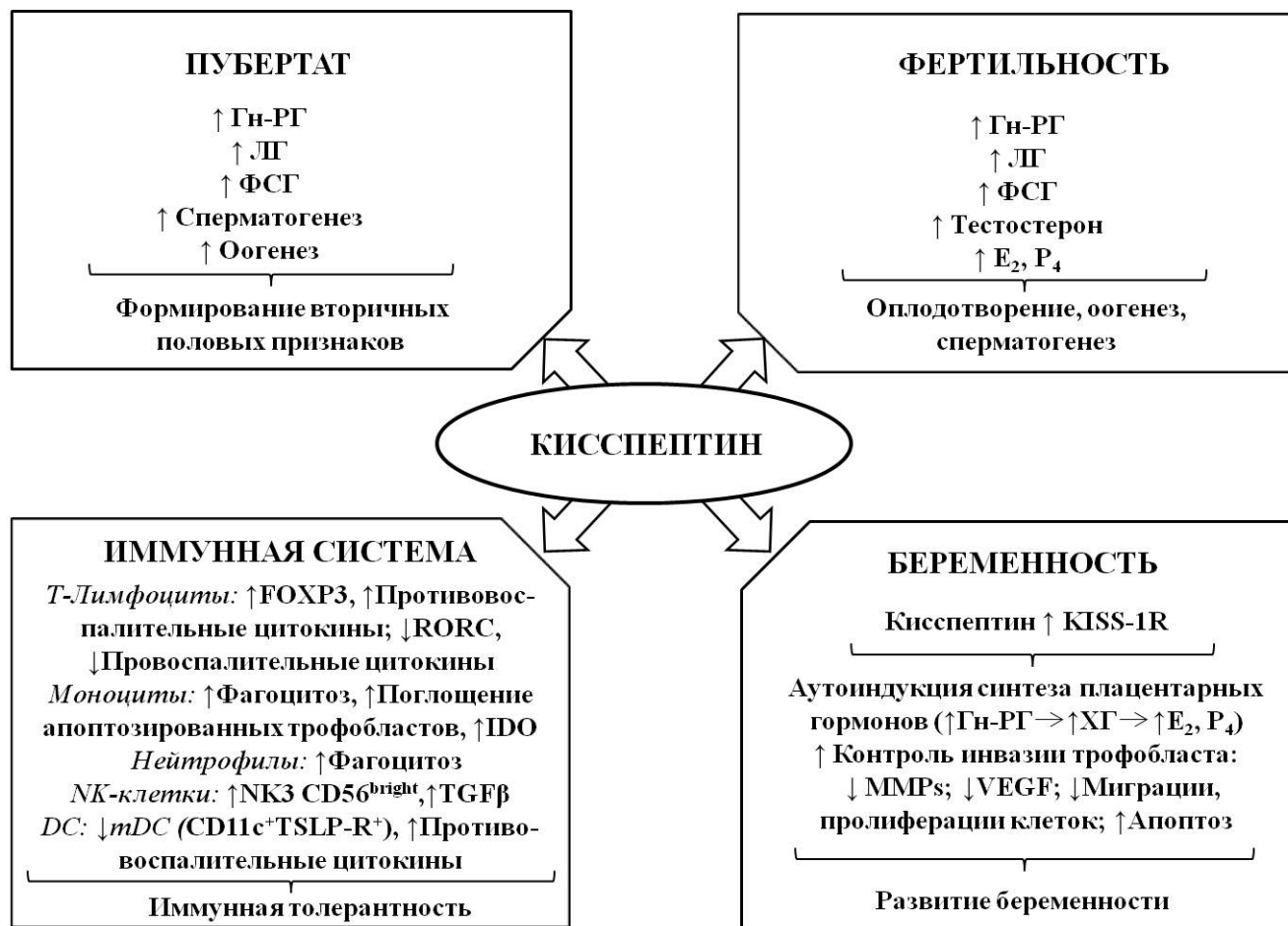


Рис. 5. Регуляция кисспептином репродуктивной и иммунной функций

синтез и секрецию Гн-РГ как в гипоталамусе, так и клетках трофобласта, продуцирующих его во время беременности. Плейотропность эффектов кисспептина определяется многообразием клеток-мишеней, экспрессирующих специфические гормональные рецепторы — KISS-1R. Взаимодействие гормона с этими рецепторами запускает цепь молекулярных событий, приводящих к различным результатам, разнообразие которых зависит от типа ткани или клеток, которые в силу дифференцировки реагируют на гормональное воздействие экспрессией или репрессией специфических генов. Так, на уровне гипоталамических ядер результатом воздействия кисспептина будет активирование синтеза и секреции Гн-РГ, в клетках трофобласта — секреции Гн-РГ с одновременным снижением продукции белков MMP и VEGF, а также ферментов, конвертирующих арахидоновую кислоту в вазоактивные эйкозаноиды. Специфическое связывание кисспептина с клетками иммунной системы, которое в основном происходит в период плацентарного синтеза гормона,

будет способствовать формированию условий иммунной толерантности к антигенам плода, что определит успешность гестационного процесса. Данные условия, с одной стороны, определяются взаимодействием кисспептина с CD4⁺T-лимфоцитами, что обуславливает их трансформацию в регуляторные клетки супрессорного типа — Treg, с одновременным угнетением дифференцировки Th17 и их функциональной активности. С другой стороны, NK-клетки под влиянием гормона специализируются в NK3 (CD56^{bright}, TGFβ⁺), регуляторный подтип с пониженной цитотоксической активностью в отношении фетальных клеток. В то же время моноциты реагируют на кисспептин усиленной экспрессией IDO — основного индуктора Treg и апоптоза фетотоксических T-лимфоцитов, с одновременной активацией клиренсной функции, необходимой для успешного роста новых клеток плаценты. Напротив, угнетая фагоцитарную активность нейтрофилов, кисспептин снижает возможность развития воспалительной реакции, развитие которой может иметь фатальные

последствия для внутриутробного развития плода. На уровне тимуса кисспептин не только принимает участие в его инволюции, но и регулирует созревание тимических mDC, приводя к формированию субпопуляций Т-клеток, способствующих индукции периферической толерантности иммунной системы матери к антигенам плода. Таким образом, один гормон координирует в разные возрастные периоды важные для данного физиологического момента ключевые функции, которые дополняют и усиливают действия друг друга (обобщающие эффекты гормона представлены на рис. 5).

Возможно изучение роли кисспептина как регулятора взаимодействия репродуктивной и

иммунной систем может открыть ранее неизвестные механизмы гормонального контроля над-системного уровня.

Финансирование. Работа выполнена в рамках Государственного задания (номер госрегистрации темы: АААА-А19-119112290007-7).

Конфликт интересов. Конфликт интересов в финансовой или какой-либо другой сфере отсутствует.

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

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Lee, J. H., Miele, M. E., Hicks, D. J., Phillips, K. K., Trent, J. M., Weissman, B. E., and Welch, D. R. (1996) KiSS-1, a novel human malignant melanoma metastasis-suppressor gene, *J. Natl. Cancer Ins.*, **88**, 1731-1737, doi: 10.1093/jnci/88.23.1731.
2. Lee, D. K., Nguyen, T., O'Neill, G. P., Cheng, R., Liu, Y., Howard, A. D., Coulombe, N., Tane, C. P., Tang-Nguyen, A., George, S. R., and O'Dowd, B. F. (1999) Discovery of a receptor related to the galanin receptors, *FEBS Lett.*, **446**, 103-107, doi: 10.1016/S0014-5793(99)00009-5.
3. De Roux, N., Genin, E., Carel, J. C., Matsuda, F., Chaussain, J. L., and Milgrom, E. (2003) Hypogonadotropic hypogonadism due to loss of function of the KISS1-derived peptide receptor GPR54, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **100**, 10972-10986, doi: 10.1073/pnas.1834399100.
4. Ohtaki, T., Shintani, Y., Honda, S., Matsumoto, H., Hori, A., Kanehashi, K., Terao, Y., Kumano, S., Takatsu, Y., Masuda, Y., Ishibashi, Y., Watanabe, T., Asada, M., Yamada, T., Suenaga, M., Kitada, C., Usuki, S., Kurokawa, T., Onda, H., Nishimura, O., and Fujino, M. (2001) Metastasis suppressor gene KiSS-1 encodes peptide ligand of a G-protein-coupled receptor, *Nature*, **411**, 613-617, doi: 10.1038/35079135.
5. Ikeguchi, M., Hirooka, Y., and Kaibara, N. (2003) Quantitative reverse transcriptase polymerase chain reaction analysis for KiSS-1 and orphan G-protein-coupled receptor (hOT7T175) gene expression in hepatocellular carcinoma, *J. Cancer Res. Clin. Oncol.*, **129**, 531-535, doi: 10.1007/s00432-003-0469-z.
6. Kotani, M., Detheux, M., Vandenbogaerde, A., Le Poul, E., Brézillon, S., Tyldesley, R., Suarez-Huerta, N., Vandeput, F., Blanpain, C., Schiffmann, S. N., Vassart, G., and Parmentier, M. (2001) The metastasis suppressor gene KiSS-1 encodes kisspeptins, the natural ligands of the orphan G protein-coupled receptor GPR54, *J. Biol. Chem.*, **276**, 34631-34636, doi: 10.1074/jbc.M104847200.
7. Muir, A. I., Chamberlain, L., Elshourbagy, N. A., Michalovich, D. J., Moore, A., Calamari, P. G., Szekeres, H. M., Sarau, J. K., Chambers, P., Murdock, K., Steplewski, U., Shabon, J. E., Miller, S. E., Middleton, J. G., Darker, C. G., Larminie, S., Wilson, D. J., Bergsma, P., Emson, R., Faull, K. L., and Philpott, D. C. (2001) AXOR12, a novel human G protein-coupled receptor, activated by the peptide KiSS-1, *J. Biol. Chem.*, **276**, 28969-28975, doi: 10.1074/jbc.M102743200.
8. Horikoshi, Y., Matsumoto, H., Takatsu, Y., Ohtaki, T., Kitada, C., Usuki, S., and Fujino, M. (2003) Dramatic elevation of plasma metastatin concentrations in human pregnancy: metastatin as a novel placenta-derived hormone in humans, *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, **2**, 914-919, doi: 10.1210/jc.2002-021235.
9. Funes, S., Hedric, J. A., Vassileva, G., Markowitz, L., Abbondanzo, S., Golovko, A., Yang, S., Monsma, F. J., and Gustafson, E. L. (2003) The KiSS-1 receptor GPR54 is essential for the development of the murine reproductive system, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **4**, 1357-1363, doi: 10.1016/j.bbrc.2003.11.066.
10. Thompson, L., Patterson, M., Murphy, K. G., Smith, K. L., Dhillon, W. S., Todd, J. F., Ghatei, M. A., and Bloom, S. R. (2004) Central and peripheral administration of kisspeptin-10 stimulates the hypothalamic-pituitary-gonadal axis, *J. Neuroendocrinol.*, **16**, 850-858, doi: 10.1111/j.1365-2826.2004.01240.x.
11. Dhillon, W. S., Murphy, K. G., and Bloom, S. R. (2007) The neuroendocrine physiology of kisspeptin in the human, *Rev. Endocrinol. Metab. Disord.*, **8**, 41-46, doi: 10.1007/s11154-007-9029-1.
12. West, A., Vojta, P. J., Welch, D. R., and Weissman, B. E. (1998) Chromosome localization and genomic structure of the KiSS-1 metastasis suppressor gene (KISS1), *Genomics*, **54**, 145-148, doi: 10.1006/geno.1998.5566.
13. Colledge, W. H. (2008) GPR54 and kisspeptins, *Results Probl. Cell Differ.*, **46**, 117-143, doi: 10.1007/400_2007_050.
14. Hu, K. L., Chang, H. M., Zhao, H. C., Yu, Y., Li, R., and Qiao, J. (2019) Potential roles for the kisspeptin/kisspeptin receptor system in implantation and placentation, *Hum. Reprod. Update*, **25**, 326-343, doi: 10.1093/humupd/dmy046.
15. Rometo, A. M., Krajewski, S. J., Voytko, M. L., and Rance, N. E. (2007) Hypertrophy and increased kisspeptin gene expression in the hypothalamic infundibular nucleus of postmenopausal women and ovariectomized monkeys, *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, **92**, 2744-2750, doi: 10.1210/jc.2007-0553.
16. Sullivan-Pyke, C., Haisenleder, D. J., Senapati, S., Nicolais, O., Eisenberg, E., Sammel, M. D., and Barnhart, K. T. (2018) Kisspeptin as a new serum biomarker to discriminate miscarriage from viable intrauterine pregnancy, *Fertil. Steril.*, **109**, 137-141, doi: 10.1016/j.fertnstert.2017.09.029.
17. Bilban, M., Ghaffari-Tabrizi, N., Hintermann, E., Bauer, S., Molzer, S., Zoratti, C., Malli, R., Sharabi, A., Hiden, U.,

- Graier, W., Knöfler, M., Andreae, F., Wagner, O., Quaranta, V., and Desoye, G. (2004) Kisspeptin-10, a KiSS-1/metastin-derived decapeptide, is a physiological invasion inhibitor of primary human trophoblasts, *J. Cell Sci.*, **117**, 1319-1328, doi: 10.1242/jcs.00971.
18. Al-Kaabi, M. A., Hamdan, F. B., and Al-Matubsi, H. (2020) Maternal plasma kisspeptin-10 level in preeclamptic pregnant women and its relation in changing their reproductive hormones, *J. Obstet. Gynaecol. Res.*, **46**, 575-586, doi: 10.1111/jog.14208.
19. Dhillon, W. S., Savage, P., Murphy, K. G., Chaudhri, O. B., Patterson, M., Nijher, G. M., Foggo, V. M., Dancey, G. S., Mitchell, H., Seckl, M. J., Ghatei, M. A., and Bloom, S. R. (2006) Plasma kisspeptin is raised in patients with gestational trophoblastic neoplasia and falls during treatment, *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.*, **291**, E878-E884, doi: 10.1152/ajpendo.00555.2005.
20. Seminara, S. B., Messenger, S., Chatzidaki, E. E., Thresher, R. R., Acierno, J. S., Shagomy, J. K., Bo-Abbas, Y., Kuohung, W., Schwinof, K. M., and Yendrick, A. G. (2003) The GPR54 gene as regulator of puberty, *New Eng. J. Med.*, **349**, 1614-1627, doi: 10.1056/NEJMoa035322.
21. Shirshov, S. V. (2009) *Immunology of Maternal-Fetal Interactions*, Ural Branch of the Russian Academy of Sciences, Yekaterinburg.
22. Limonta, P., Marelli, M. M., Moretti, R., Marzagalli, M., Fontana, F., and Maggi, R. (2018) GnRH in the human female reproductive axis, *Vitam. Horm.*, **107**, 27-66, doi: 10.1016/bs.vh.2018.01.003.
23. Matsuda, F., Ohkura, S., Magata, F., Munetomo, A., Chen, J., Sato, M., Inoue, N., Uenoyama, Y., and Tsukamura, H. (2019) Role of kisspeptin neurons as a GnRH surge generator: Comparative aspects in rodents and non-rodent mammals, *J. Obstet. Gynaecol. Res.*, **45**, 2318-2329, doi: 10.1111/jog.14124.
24. Kauffman, A. S., Gottsch, M. L., Roa, J., Byquist, A. C., Crown, A., Clifton, D. K., Hoffman, G. E., Steiner, R. A., and Tena-Sempere, M. (2007) Sexual differentiation of *Kiss1* gene expression in the brain of the rat, *Endocrinology*, **148**, 1774-1783, doi: 10.1210/en.2006-1540.
25. Trevisan, C. M., Montagna, E., de Oliveira, R., Christofolini, D. M., Barbosa, C. P., Crandall, K. A., and Bianco, B. (2018) Kisspeptin/GPR54 system: what do we know about its role in human reproduction? *Cell Physiol. Biochem.*, **49**, 1259-1276, doi: 10.1159/000493406.
26. Poling, M. C., Luo, E. Y., and Kauffman, A. S. (2017) Sex differences in steroid receptor co-expression and circadian-timed activation of kisspeptin and RFRP-3 neurons may contribute to the sexually dimorphic basis of the LH surge, *Endocrinology*, **158**, 3565-3578, doi: 10.1210/en.2017-00405.
27. Franssen, D., and Tena-Sempere, M. (2018) The kisspeptin receptor: A key G-protein-coupled receptor in the control of the reproductive axis, *Best Pract. Res. Clin. Endocrinol. Metab.*, **32**, 107-123, doi: 10.1016/j.beem.2018.01.005.
28. Uenoyama, Y., Nakamura, S., Hayakawa, Y., Ikegami, K., Watanabe, Y., Deura, C., Minabe, S., Tomikawa, J., Goto, T., Ieda, N., Inoue, N., Sanbo, M., Tamura, C., Hirabayashi, M., Maeda, K. I., and Tsukamura, H. (2015) Lack of pulse and surge modes and glutamatergic stimulation of luteinizing hormone release in *Kiss1* knockout rats, *J. Neuroendocrinol.*, **27**, 187-197, doi: 10.1111/jne.12257.
29. Kirilov, M., Clarkson, J., Liu, X., Roa, J., Campos, P., Porteous, R., Schütz, G., and Herbison, A. E. (2013) Dependence of fertility on kisspeptin-Gpr54 signaling at the GnRH neuron, *Nat. Commun.*, **4**, 2492-2499, doi: 10.1038/ncomms3492.
30. Zeydabadi Nejad, S., Ramezani Tehrani, F., and Zadeh-Vakili, A. (2017) The role of kisspeptin in female reproduction, *Int. J. Endocrinol. Metab.*, **15**, 44337-4443, doi: 10.5812/ijem.44337.
31. Sukhbaatar, U., Kanasaki, H., Mijiddorj, T., Oride, A., and Miyazaki, K. (2013) Kisspeptin induces expression of gonadotropin-releasing hormone receptor in GnRH-producing GT1-7 cells over expressing G protein-coupled receptor 54, *Gen. Comp. Endocrinol.*, **194**, 94-101, doi: 10.1016/j.ygcen.2013.09.002.
32. Hrabovszky, E., Ciofi, P., Vida, B., Horvath, M., Keller, E., Caraty, A., Bloom, S., Ghatei, M., Dhillon, W., Liposits, Z., and Kallo, I. (2010) The kisspeptin system of the human hypothalamus: sexual dimorphism and relationship with gonadotropin-releasing hormone and neurokinin B neurons, *Eur. J. Neurosci.*, **11**, 1984-1998, doi: 10.1111/j.1460-9568.2010.07239.x.
33. Yip, S. H., Boehm, U., Herbison, A. E., and Campbell, R. E. (2015) Conditional viral tract tracing delineates the projections of the distinct kisspeptin neuron populations to gonadotropin-releasing hormone (GnRH) neurons in the mouse, *Endocrinology*, **156**, 2582-2594, doi: 10.1210/en.2015-1131.
34. Uenoyama, Y., Inoue, N., Maeda, K. I., and Tsukamura, H. (2018) The roles of kisspeptin in the mechanism underlying reproductive functions in mammals, *J. Reprod. Dev.*, **64**, 469-476, doi: 10.1262/jrd.2018-110.
35. Cortés, M. E., Carrera, B., Riosco, H., Pablo del Río, J., and Vigil, P. (2015) The role of kisspeptin in the onset of puberty and in the ovulatory mechanism: a mini-review, *J. Pediatr. Adolesc. Gynecol.*, **28**, 286-295, doi: 10.1016/j.jpjag.2014.09.017.
36. Harter, J. L., Kavanagh, G. S., and Smith, J. T. (2018) Kisspeptin, reproduction and metabolism, *J. Endocrinol.*, **238**, R173-R183, doi: 10.1530/JOE-18-0108.
37. Dhillon, W. (2008) Kisspeptin: a novel regulator of reproductive function, *J. Neuroendocrinol.*, **8**, 963-970, doi: 10.1111/j.1365-2826.2008.01753.x.
38. Tng, E. L. (2015) Kisspeptin signalling and its roles in humans, *Singapore Med. J.*, **56**, 649-656, doi: 10.11622/smedj.2015183.
39. Tena-Sempere, M. (2010) Kisspeptin signaling in the brain: recent developments and future challenges, *Mol. Cell Endocrinol.*, **314**, 164-169, doi: 10.1016/j.mce.2009.05.004.
40. Plant, T. M., Ramaswamy, S., and Dipietro, M. J. (2006) Repetitive activation of hypothalamic G protein-coupled receptor 54 with intravenous pulses of kisspeptin in the juvenile monkey (*Macaca mulatta*) elicits a sustained train of gonadotropin-releasing hormone discharges, *Endocrinology*, **147**, 1007-1013, doi: 10.1210/en.2005-1261.
41. Navarro, V. M., Castellano, J. M., Fernandez-Fernandez, R., Barreiro, M. L., Roa, J., Sanchez-Criado, J. E., Aguilar, E., Dieguez, C., Pinilla, L., and Tena-Sempere, M. (2004) Developmental and hormonally regulated messenger ribonucleic acid expression of KiSS-1 and its putative receptor, GPR54, in rat hypothalamus and potent luteinizing hormone-releasing activity of KiSS-1 peptide, *Endocrinology*, **145**, 4565-4574, doi: 10.1210/en.2004-0413.
42. Tena-Sempere, M. (2013) Interaction between energy homeostasis and reproduction: central effects of leptin and ghrelin on the reproductive axis, *Horm. Metab. Res.*, **45**, 919-927, doi: 10.1055/s-0033-1355399.
43. Mathew, H., Castracane, V. D., and Mantzoros, C. (2017) Adipose tissue and reproductive health, *Metabolism*, **86**, 18-32, doi: 10.1016/j.metabol.2017.11.006.
44. Quenell, J. H., Mulligan, A. C., Tups, A., Liu, X., Phipps, S. J., Kemp, C. J., Herbison, A. E., Gratten, D. R., and Anderson, G. M. (2009) Leptin indirectly regulates gonadotropin releasing hormone neuronal function,

- Endocrinology*, **150**, 2805-2812, doi: 10.1210/en.2008-1693.
45. Garcia-Garcia, R. M. (2012) Integrative control of energy balance and reproduction in females, *ISRN Vet. Sci.*, **51**, 121389-121402, doi: 10.5402/2012/121389.
 46. Hill, J., Elmquist, J., and Elias, C. (2008) Hypothalamic pathways linking energy balance and reproduction, *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.*, **294**, E827-E832, doi: 10.1152/ajpendo.00670.2007.
 47. Pompolo, S., Pereira, A., Estrada, K., and Clarke, I. (2006) Colocalization of kisspeptin and gonadotropin-releasing hormone in the ovine brain, *Endocrinology*, **147**, 804-810, doi: 10.1210/en.2005-1123.
 48. Pankov, Y. I. (2015) Kisspeptin and leptin in regulation of fertility, *Mol. Biol. (Mosk.)*, **49**, 707-715, doi: 10.7868/S0026898415050134.
 49. Norwitz, E. R., Schust, D. J., and Fisher, S. J. (2001) Implantation and the survival of early pregnancy, *N. Engl. J. Med.*, **19**, 1400-1407, doi: 10.1056/NEJMra000763.
 50. La Vignera, S., Condorelli, R. A., Cannarella, R., Duca, Y., and Calogero, A. E. (2018) Sport, doping and female fertility, *Reprod. Biol. Endocrinol.*, **16**, 108-118, doi: 10.1186/s12958-018-0437-8.
 51. Tena-Sempere, M. (2008) Ghrelin as a pleiotrophic modulator of gonadal function and reproduction, *Nat. Clin. Pract. Endocrinol. Metab.*, **4**, 666-674, doi: 10.1038/ncpendmet1003.
 52. Frazao, R., Dungan Lemko, H., da Silva, R. P., Ratna, D. V., Lee, C. E., Williams, K. W., Zigman, J. M., and Elias, C. F. (2014) Estradiol modulates Kiss1 neuronal response to ghrelin, *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.*, **306**, 606-614, doi: 10.1152/ajpendo.00211.2013.
 53. Roa, J., Garcia-Galiano, D., Castellano, J. M., Gaytan, F., Pinilla, L., and Tena-Sempere, M. (2010) Metabolic control of puberty onset: new players, new mechanisms, *Mol. Cell. Endocrinol.*, **324**, 87-94, doi: 10.1016/j.mce.2009.12.018.
 54. Reinehr, T., and Roth, C. L. (2019) Is there a causal relationship between obesity and puberty? *Lancet Child Adolesc. Health*, **3**, 44-54, doi: 10.1016/S2352-4642(18)30306-7.
 55. Graham, C. H., and Lala, P. K. (1991) Mechanism of control of trophoblast invasion *in situ*, *J. Cell. Physiol.*, **2**, 228-235, doi: 10.1002/jcp.1041480207.
 56. Matalon, S. T., Drucker, L., Fishman, A., Ornoy, A., and Lishner, M. (2008) The role of heat shock protein 27 in extravillous trophoblast differentiation, *J. Cell. Biochem.*, **103**, 719-729, doi: 10.1002/jcb.21476.
 57. Jattala, M. (1999) Escaping cell death: survival proteins in cancer, *Exp. Cell Res.*, **248**, 30-43, doi: 10.1006/excr.1999.4455.
 58. Ciocca, D. R., and Calderwood, S. K. (2005) Heat shock proteins in cancer: diagnostic, prognostic, predictive, and treatment implications, *Cell Stress Chaperones*, **10**, 86-103, doi: 10.1379/csc-99r.1.
 59. Mohammadi, G., Tavassoli, A., Mousaviagdas, M., Chavoshi, H., and Saniee, L. (2015) Serum levels of MMP9 and MMP2 in patients with oral squamous cell carcinoma, *Asian Pac. J. Cancer Prev.*, **16**, 1327-1330, doi: 10.7314/apjcp.2015.16.4.1327.
 60. Yoshioka, K., Ohno, Y., Horiguchi, Y., Ozu, C., Namiki, K., and Tachibana, M. (2008) Effects of a KiSS-1 peptide, a metastasis suppressor gene, on the invasive ability of renal cell carcinoma cells through a modulation of a matrix metalloproteinase 2 expression, *Life Sci.*, **83**, 332-338, doi: 10.1016/j.lfs.2008.06.018.
 61. Chen, S., Chen, W., Zhang, X., Lin, S., and Chen, Z. (2016) Overexpression of KiSS-1 reduces colorectal cancer cell invasion by down-regulating MMP-9 via blocking PI3K/Akt/NF-kappa β signal pathway, *Int. J. Oncol.*, **48**, 1391-1398, doi: 10.3892/ijo.2016.3368.
 62. Macklin, P. S., McAuliffe, J., Pugh, C. W., and Yamamoto, A. (2017) Hypoxia and HIF pathway in cancer and the placenta, *Placenta*, **56**, 8-13, doi: 10.1016/j.placenta.2017.03.010.
 63. Cheng, J. C., Chang, H. M., and Leung, P. C. K. (2017) TGF- β 1 Inhibits human trophoblast cell invasion by up-regulating connective tissue growth factor expression, *Endocrinology*, **158**, 3620-3628, doi: 10.1210/en.2017-00536.
 64. Hiden, U., Bilban, M., Knöfler, M., and Desoye, G. (2007) Kisspeptins and the placenta: regulation of trophoblast invasion, *Rev. Endocr. Metab. Disord.*, **8**, 31-39, doi: 10.1007/s11154-007-9030-8.
 65. Prossler, J., Chen, Q., Chamley, L., and James, J. L. (2014) The relationship between TGF-beta, low oxygen and the outgrowth of extravillous trophoblasts from anchoring villi during the first trimester of pregnancy, *Cytokine*, **68**, 9-15, doi: 10.1016/j.cyt.2014.03.001.
 66. Renaud, S. J., Postovit, L. M., Macdonald, G. T., Caldwell, J. D., and Graham, C. H. (2005) Activated macrophages inhibit human cytotrophoblast invasiveness *in vitro*, *Biol. Reprod.*, **2**, 237-243, doi: 10.1095/biolreprod.104.038000.
 67. Bauer, S., Pollheimer, J., Hartmann, J., Husslein, P., Aplin, J. D., and Knöfler, M. (2004) Tumor necrosis factor-alpha inhibits trophoblast migration through elevation of plasminogen activator inhibitor-1 in first trimester villous explants cultures, *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, **2**, 812-822, doi: 10.1210/jc.2003-031351.
 68. Benyo, D. F., Miles, T. M., and Conrad, K. P. (1997) Hypoxia stimulates cytokine production by villous explants from the human placenta, *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, **5**, 1582-1588, doi: 10.1210/jcem.82.5.3916.
 69. Janneau, J. L., Maldonado-Estrad, J., Tachdjian, G., Miran, I., Motté, N., Saulnier, P., Sabourin, J. C., Coté, J. F., Simon, B., Frydman, R., Chaouat, G., and Bellet, D. (2002) Transcriptional expression of genes involved in cell invasion and migration by normal and tumoral trophoblast cells, *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, **11**, 5336-5349, doi: 10.1210/jc.2002-021093.
 70. Martino, N. A., Rizzo, A., Pizzi, F., Dell'Aquila, M. E., and Sciorsci, R. L. (2015) Effects of kisspeptin-10 on *in vitro* proliferation and kisspeptin receptor expression in primary epithelial cell cultures isolated from bovine placental cotyledons of fetuses at the first trimester of pregnancy, *Theriogenology*, **83**, 978-987, doi: 10.1016/j.theriogenology.2014.11.033.
 71. Biscaro, A., Braga, A., and Berkowitz, R. S. (2015) Diagnosis, classification and treatment of gestational trophoblastic neoplasia, *Rev. Bras. Ginecol. Obstet.*, **37**, 42-51, doi: 10.1590/S0100-720320140005198.
 72. Li, L., Tian, J., Zhou, L., Wu, S., Zhang, S., Qi, L., and Zhang, H. (2017) Role of kisspeptin/GPR54 in the first trimester trophoblast of women with a history of recurrent spontaneous abortion, *Int. J. Clin. Exp. Pathol.*, **10**, 8161-8173.
 73. Fellows, E. J., Hazzard, T. M., and Kutzler, M. A. (2012) Gene expression in pre-term, pre-labour and parturient canine placenta, *Reprod. Domest. Anim.*, **6**, 182-185, doi: 10.1111/rda.12021.
 74. Francis, V. A., Abera, A. B., Matjila, M., Millar, R. P., and Katz, A. A. (2014) Kisspeptin regulation of genes involved in cell invasion and angiogenesis in first trimester human trophoblast cells, *PLoS One*, **9**, 99680-99692, doi: 10.1371/journal.pone.0099680.
 75. Hu, K. L., Zhao, H., Chang, H.-M., Yu, Y., and Qiao, J. (2018) Kisspeptin/Kisspeptin receptor system in the ovary,

- Front. Endocrinol.*, **8**, 365-379, doi: 10.3389/fendo.2017.00365.
76. De Pedro, M. A., Morán, J., Díaz, I., Murias, L., Fernández-Plaza, C., González, C., and Díaz, E. (2015) Circadian Kisspeptin expression in human term placenta, *Placenta*, **36**, 1337-1339, doi: 10.1016/j.placenta.2015.09.009.
 77. Torricelli, M., Novembri, R., Conti, N., De Falco, G., De Bonis, M., and Petraglia, F. (2012) Correlation with placental kisspeptin in postterm pregnancy and apoptosis, *Reprod. Sci.*, **19**, 1133-1137, doi: 10.1177/1933719112443878.
 78. Cao, Y., Li, Z., Jiang, W., Ling, Y., and Kuang, H. (2019) Reproductive functions of Kisspeptin/KISS1R Systems in the periphery. *Reprod. Biol. Endocrinol.*, **17**, 65-74, doi: 10.1186/s12958-019-0511-x.
 79. Zhai, J., Liu, J., Zhao, S., Zhao, H., Chen, Z., Du, Y., and Li, W. (2017) Kisspeptin-10 inhibits OHSS by suppressing VEGF secretion, *Reproduction*, **154**, 355-362, doi: 10.1530/REP-17-0268.
 80. Mezei, Z., Zamani-Forooshani, O., Csabafi, K., Szikszai, B., Papp, E., Onodi, A., Torok, D., Lepran, A., Telegdy, G., and Szabo, G. (2015) The effect of kisspeptin on the regulation of vascular tone, *Can. J. Physiol. Pharmacol.*, **93**, 787-791, doi: 10.1139/cjpp-2015-0013.
 81. Maguire, J. J., Kirby, H. R., Mead, E. J., Kuc, R. E., d'Anglemont de Tassigny, X., Colledge, W. H., and Davenport, A. P. (2011) Inotropic action of the puberty hormone kisspeptin in rat, mouse and human: cardiovascular distribution and characteristics of the kisspeptin receptor, *PLoS One*, **6**, e27601, doi: 10.1371/journal.pone.0027601.
 82. Sato, K., Shirai, R., Hontani, M., Shinooka, R., Hasegawa, A., Kichise, T., Yamashita, T., Yoshizawa, H., Watanabe, R., Matsuyama, T., Ishibashi-Ueda, H., Koba, S., Kobayashi, Y., Hirano, T., and Watanabe, T. (2017) Potent vasoconstrictor kisspeptin 10 induces atherosclerotic plaque progression and instability: reversal by its receptor GPR54 antagonist, *J. Am. Heart Assoc.*, **6**, e005790, doi: 10.1161/JAHA.117.005790.
 83. Seymour, A. J., Scott, V., Augustine, R. A., Bouwer, G. T., Campbell, R. E., and Brown, C. H. (2017) Development of an excitatory kisspeptin projection to the oxytocin system in late pregnancy, *J. Physiol.*, **595**, 825-838, doi: 10.1113/JP273051.
 84. Mellor, A. L., and Munn, D. H. (2001) Tryptophan catabolism prevents maternal T cells from activating lethal anti-fetal immune responses, *J. Reprod. Immunol.*, **52**, 5-11, doi: 10.1016/S0165-0378(01)00118-8.
 85. Liu, Y. S., Wu, L., Tong, X. H., Wu, L. M., He, G. P., Zhou, G. X., Luo, L. H., and Luan, H. B. (2011) Study on the relationship between Th17 cells and unexplained recurrent spontaneous abortion, *Am. J. Reprod. Immunol.*, **65**, 503-511, doi: 10.1111/j.1600-0897.2010.00921.x.
 86. Gorbunova, O. L., and Shirshov, S. V. (2014) Role of kisspeptin in formation of immune tolerance in pregnancy, *Dokl. Akad. Nauk*, **457**, 494-497, doi: 10.1134/S0012496614040085.
 87. Shirshov, S. V., Gorbunova, O. L., and Orlova, E. G. (2017) Involvement of kisspeptin and leptin in formation of immune reactivity, *Human Physiol.*, **43**, 109-114, doi: 10.7868/S013116461706011X.
 88. Ephrem, A., Epstein, A. L., Stephens, G. L., Stephens, G. L., Thornton, A. M., Glass, D., and Shevach, E. M. (2013) Modulation of Treg cells/T effector function by G1TR signaling is context-dependent, *Eur. J. Immunol.*, **43**, 2421-2429, doi: 10.1002/eji.201343451.
 89. Ichiyama, K., Yoshida, H., and Wakabayashi, Y. (2008) Foxp3 inhibits ROR γ t-mediated IL-17A mRNA transcription through direct interaction with ROR γ t, *J. Biol. Chem.*, **283**, 17003-17008, doi: 10.1074/jbc.M801286200.
 90. Gorbunova, O. L., and Shirshov, S. V. (2016) Molecular mechanisms of the regulation by kisspeptin of formation and functional activity of TREG and TH17, *Biol. Membr.*, **33**, 47-55, doi: 10.7868/S0233475516020067.
 91. Zhang, H.-T., Zhao, Y., Huang, Y., Dorairaj, N. R., Chandler, L. J., and O'Donnell, J. M. (2004) Inhibition of the phosphodiesterase 4 (PDE4) enzymes reverses memory deficits produced by infusion of the MEK inhibitor U0126 into the CA1 subregion of the rat hippocampus, *Neuropsychopharmacology*, **29**, 1432-1439, doi: 10.1038/sj.npp.1300440.
 92. Zheng, F., Zhang, M., Ding, Q., Sethna, F., Yan, L., Moon, C., Yang, M., and Wang, H. (2016) Voluntary running depreciates the requirement of Ca²⁺-stimulated cAMP signaling in synaptic potentiation and memory formation, *Learn. Mem.*, **23**, 442-449, doi: 10.1101/lm.040642.115.
 93. Quan, J., He, M., Ko, W. K., and Wong, A. O. (2014) Kisspeptin induction of somatolactin- α release in goldfish pituitary cells: functional role of cAMP/PKA-, PLC/PKC-, and Ca²⁺/calmodulin-dependent cascades, *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.*, **307**, 872-884, doi: 10.1152/ajpendo.00321.2014.
 94. Wen, A. Y., Sakamoto, K. M., and Miller, L. S. (2010) The role of the transcription factor CREB in immune function, *J. Immunol.*, **185**, 6413-6419, doi: 10.4049/jimmunol.1001829.
 95. Ivanov, I. I., McKenzie, B. S., Zhou, L., Tadokoro, C. E., Lepelletier, A., Lafaille, J. J., Cua, D. J., and Littman, D. R. (2006) The orphan nuclear receptor ROR γ t directs the differentiation program of proinflammatory IL-17⁺ T helper cells, *Cell*, **126**, 1121-1133, doi: 10.1016/j.cell.2006.07.035.
 96. Schwartz, J. H. (2001) The many dimensions of cAMP signaling, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **98**, 13482-13484, doi: 10.1073/pnas.251533998.
 97. Haiqi, H., Yong, Z., and Yi, L. (2011) Transcriptional regulation of Foxp3 in regulatory T cells, *Immunobiology*, **216**, 678-685, doi: 10.1016/j.imbio.2010.11.002.
 98. Albrecht, D., and Jungi, T. W. (1993) Luminol-enhanced chemiluminescence induced in peripheral blood-derived human phagocytes: obligatory requirement of myeloperoxidase exocytosis by monocytes, *J. Leukocyte Biol.*, **54**, 300-306, doi: 10.1002/jlb.54.4.300.
 99. Gorbunova, O. L., Shirshov, S. V., and Zamorina, S. A. (2013) Kisspeptin influence on the functional activity of monocytes, *Immunologiya*, **5**, 247-251.
 100. Alexander, H., Zimmerman, G., Lehmann, M., Pfeiffer, R., Schone, E., Leiblein, S., and Ziegert, M. (1998) HCG secretion by peripheral mononuclear cells during pregnancy, *Domest. Anim. Endocrinol.*, **15**, 377-387, doi: 10.1016/S0739-7240(98)00025-3.
 101. Gorbunova, O. L., Nekrasova, I. V., and Shirshov, S. V. (2018) Kisspeptin influence on the phagocytic activity of neutrophils, in *High Technologies Determinating the Life Quality, Materials of the II International Conference*, Perm State Research University, pp. 208-210.
 102. Zhang, J., Shynlova, O., Sabra, S., Bang, A., Briollais, L., and Lye, S. J. (2017) Immunophenotyping and activation status of maternal peripheral blood leukocytes during pregnancy and labour, both term and preterm, *J. Cell Mol. Med.*, **10**, 2386-2402, doi: 10.1111/jcmm.13160.
 103. Yan, H., Li, H., Zhu, L., Gao, J., Li, P., and Zhang, Z. (2019) Increased TLR4 and TREM-1 expression on monocytes and neutrophils in preterm birth: further evidence of a proinflammatory state, *J. Matern. Fetal. Neonatal. Med.*, **32**, 2961-2969, doi: 10.1080/14767058.2018.1452903.

104. Gaynor, L. M., and Colucci, F. (2017) Uterine natural killer cells: functional distinctions and influence on pregnancy in humans and mice, *Front. Immunol.*, **8**, 467-474, doi: 10.3389/fimmu.2017.00467.
105. Park, D. W., Lee, S. K., Hong, S. R., Han, A. R., Kwak-Kim, J., and Yang, K. M. (2012) Expression of kisspeptin and its receptor GPR54 in the first trimester trophoblast of women with recurrent pregnancy loss, *Am. J. Reprod. Immun.*, **67**, 132-139, doi: 10.1111/j.1600-0897.2011.01073.x.
106. Shirshov, S. V., Nekrasova, I. V., Gorbunova, O. L., and Maslennikova, I. L. (2015) Kisspeptin influence on functional characteristics of separated NK-cells, *Dokl. Akad. Nauk*, **464**, 633-635, doi: 10.1134/S0012496615050129.
107. Shirshov, S. V., Nekrasova, I. V., Zamorina, S. A., Gorbunova, O. L., Orlova, E. G., and Maslennikova, I. V. (2014) Role of gestation-associated hormones in the regulation of expression of molecules responsible for the functional activity of NK-cells, *Dokl. Akad. Nauk*, **457**, 618-621, doi: 10.7868/S0869565214230315.
108. Shirshov, S. V., Orlova, E. G., Loginova, O. A., Nekrasova, I. V., Gorbunova, O. L., and Maslennikova, I. L. (2018) Hormonal regulation of differentiation of dendritic cells of the thymus, *Byul. Eksp. Biol. Med.*, **65**, 193-197, doi: 10.1007/s10517-018-4136-4.
109. Yarilin, A. A. (2010) *Immunology*, GOETAR-Media, Moscow.
110. Sharova, N. I., Litvina, M. M., and Yarilin, A. A. (2010) The cell line of IL-10 producers with the phenotype of plasmacytoid dendritic cells originated from the human thymus, *Immunologiya*, **31**, 181-186.
111. Lutz, M. B., and Schuler, G. (2002) Immature, semi-mature and fully mature dendritic cells: witch signals induce tolerance or immunity? *Trends Immunol.*, **23**, 235-244, doi: 10.1016/s1471-4906(02)02281-0.
112. Xing, R., Liu, F., Yang, Y., Cui, X., Wang, T., Xie, L., Zhao, Y., Fang, L., Yi, T., Zheng, B., Liu, M., and Chen, H. (2018) GPR54 deficiency reduces the Treg population and aggravates experimental autoimmune encephalomyelitis in mice, *Sci. China Life Sci.*, **61**, 675-687, doi: 10.1007/s11427-017-9269-8.

THE ROLE OF KISSPEPTIN IN THE REGULATION OF REPRODUCTIVE AND IMMUNE FUNCTIONS

Review

O. L. Gorbunova* and S. V. Shirshov

Perm Federal Research Center, Institute of Ecology and Genetics of Microorganisms,
Ural Branch of the Russia Academy of Sciences, 614081 Perm, Russia; E-mail: olia15_77@mail.ru

Received February 17, 2020

Revised June 9, 2020

Accepted June 14, 2020

The work is focused on physiological role of the hormone kisspeptin produced by neurons of the hypothalamus anterior zone, which is a key regulator of reproduction processes. Role of the hormone in transmission of information on metabolic activity and induction of the secretion of gonadotropin-releasing hormone (GnRH) by the hypothalamus that determines gestation processes involving fertilization, placentation, fetal development, and child birth is considered. The literature data on molecular mechanisms and effects of kisspeptin on reproductive system including puberty initiation are summarized and analyzed. In addition, attention is paid to hormone-mediated changes in the cardiovascular system in pregnant women. For the first time, the review examines the effect of kisspeptin on functional activity of immune system cells presenting molecular mechanisms of the hormone signal transduction on the level of lymphoid cells that lead to the immune tolerance induction. In conclusion, a conceptual model is presented that determines the role of kisspeptin as an integrator of reproductive and immune functions during pregnancy.

Keywords: kisspeptin, pregnancy, gonadotropin releasing hormone, immune tolerance

УДК: 571.27

СОВРЕМЕННЫЕ ПРЕДСТАВЛЕНИЯ О МОЛЕКУЛЯРНЫХ МЕХАНИЗМАХ НЕЙТРОФИЛЬНОЙ БРОНХИАЛЬНОЙ АСТМЫ И ЕЁ ТЕРАПИИ

Обзор

© 2020 И.П. Шиловский*, А.А. Никольский, О.М. Курбачёва, М.Р. Хаитов

ФГБУ «ГНЦ Институт иммунологии» Федерального медико-биологического агентства,
115522 Москва, Россия; электронная почта: ip.shilovsky@nrcii.ru

Поступила в редакцию 25.03.2020

После доработки 10.06.2020

Принята к публикации 27.06.2020

Длительное время бронхиальную астму (БА) считали гомогенным заболеванием. Однако в последних исследованиях появляется все больше доказательств ее гетерогенности. Подразделение астмы на отдельные фенотипы основывается на клинико-физиологических особенностях, анамнезе и ответе на терапию. В данном обзоре рассматриваются пять наиболее часто выделяемых фенотипов БА. Отдельного внимания заслуживает нейтрофильная БА, поскольку нейтрофилия легких тесно связана с тяжестью заболевания и устойчивостью к традиционной терапии кортикостероидами. Особое внимание уделяется рассмотрению молекулярных механизмов патогенеза нейтрофильной БА и роли Th1- и Th17-клеток в её формировании. Кроме того, в данном обзоре представлены современные сведения о биологии нейтрофилов. Установлено, что нейтрофилы представлены, по меньшей мере, тремя субпопуляциями с различными биологическими функциями. Учитывая это, тотальная элиминация нейтрофилов из легких может приводить к неблагоприятному эффекту. Основываясь на новых знаниях о патогенезе нейтрофильной БА и биологии самих нейтрофилов, в обзоре проведен анализ существующих способов лечения нейтрофильной БА и выделены возможные направления в разработке подходов к терапии данной формы БА в будущем.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: фенотипы бронхиальной астмы, Th17-клетки, нейтрофилы.

DOI: 10.31857/S0320972520080023

ВВЕДЕНИЕ

Бронхиальная астма (БА) — гетерогенное заболевание, обычно характеризующееся хроническим воспалением дыхательных путей [1]. За последние десятилетия резко возросло количество больных БА, в отдельных странах заболеваемость достигает 15–18% [2]. В России общее число больных БА приближается к 10 млн человек, что составляет ~ 7% населения страны [3].

Рост распространенности БА, по всей видимости, связан с недостаточностью существующих способов терапии, которая на сегодняшний день предусматривает применение кортикосте-

роидов, ингибиторов лейкотриенов и бронходилататоров. Эти препараты снижают выраженность проявлений астмы у значительной доли пациентов [1]. Успешно применяют аллерген-специфическую иммунотерапию (АСИТ) — единственный патогенетически-значимый вид лечения БА [4]. Однако АСИТ имеет ряд ограничений, основное из которых — опасность возникновения нежелательных местных и системных реакций (~ у 3,7% пациентов). К тому же АСИТ не используется в лечении пациентов с неаллергической БА [5].

С раскрытием молекулярных и клеточных механизмов патогенеза БА появляются новые способы терапии, главным образом препараты на основе моноклональных антител, направленные против ключевых воспалительных факторов, чаще всего цитокинов и их рецепторов [6]. Однако клинические исследования большинства из них еще продолжаются, а их результаты зачастую противоречивы, что можно объяснить гетерогенностью БА. Появляется все больше исследований, доказывающих существование различных клинических и молекулярных фенотипов БА [7].

Принятые сокращения: БА — бронхиальная астма; ВОЗ — Всемирная организация здравоохранения; АСИТ — аллерген-специфическая иммунотерапия; ILC2 — врожденные лимфоидные клетки 2 типа (*type 2 innate lymphoid cells*); АПК — антиген-презентирующие клетки; FeNO — концентрация выдыхаемого оксида азота (*fractional concentration of exhaled nitric oxide*); NETs — нейтрофильные внеклеточные ловушки (*neutrophil extracellular traps*); КМ — костный мозг.

* Адресат для корреспонденции.

ФЕНОТИПЫ БРОНХИАЛЬНОЙ АСТМЫ

Существующий термин «астма» [8] описывает ряд клинических симптомов и характеризует не одиночное заболевание, а целую группу заболеваний дыхательных путей. Знания о БА, сформировавшиеся в 1990–2000 гг., соответствовали тому уровню развития науки и были достаточными для успешного проведения клинических испытаний неспецифических противовоспалительных препаратов.

С развитием молекулярно-биологических методов исследований удалось раскрыть молекулярные и клеточные механизмы патогенеза БА. В частности, была установлена роль Т-хелперов 2-го типа (Th2 — T-helper 2 cells) и врожденных лимфоидных клеток 2 типа (ILC2 — type 2 innate lymphoid cells), а также продуцируемых ими цитокинов (IL-4, -5, -9 и -13) в формировании основных проявлений БА (продукция аллерген-специфических антител IgE-класса, развитие гиперреактивности бронхов, эозинофильное воспаление легких, ремоделирование бронхов и пр.) [9].

Длительное время считалось, что БА развивается исключительно по Th2-зависимому механизму, однако череда неудачных клинических испытаний таргетных препаратов, подавляющих Th2-ассоциированные цитокины и их рецепторы [6], привела к необходимости пересмотра представлений о молекулярных механизмах заболевания. К настоящему времени БА рассматривается как гетерогенное заболевание, включающее в себя несколько подгрупп, которые обозначают термином «фенотип». Под фенотипом понимаются наблюдаемые свойства организма, которые формируются при взаимодействии генотипа и окружающей среды [10]. Термин «фенотип» предшествовал другому термину — «эндотип». Под эндотипом понимают конкретный биологический путь, объясняющий наблюдаемые свойства фенотипа.

Выделение фенотипов и эндотипов БА — вопрос дискуссионный. Разделение БА на отдельные фенотипы осуществляют на основе наблюдаемых клинических характеристик, анамнеза, физиологических особенностей с идентифицируемыми биомаркерами и ответа на терапию. Чаще всего выделяют следующие фенотипы БА: ранняя аллергическая астма, поздняя эозинофильная астма, астма, вызванная физической нагрузкой, астма, связанная с ожирением и нейтрофильная астма (табл. 1) [10].

Атопическая БА (аллергическая астма с ранним дебютом). Данный фенотип характеризуется выраженными аллергическими симптомами (АР, АК, АгД). Несмотря на то, что конкретный

возрастной предел для астмы с ранним дебютом не определен, симптомы аллергии чаще всего возникают в детском возрасте, а признаки самой БА окончательно устанавливаются во взрослом состоянии. Большинство пациентов с БА имеют именно этот фенотип; как правило, они хорошо поддаются лечению кортикостероидами [15]. Аллергическая астма с ранним дебютом преимущественно протекает по Th2-зависимому механизму [16].

Кортикостероиды являются основой терапии астмы. Их терапевтический эффект обусловлен подавлением продукции провоспалительных Th2-ассоциированных цитокинов (IL-4, -5, -9, -13), индукцией апоптоза эозинофилов и других провоспалительных клеток [17] и блокированием высвобождения провоспалительных медиаторов — лейкотриенов. Считается, что кортикостероидные препараты не обладают специфическим действием на определенные звенья патогенеза БА, однако существуют убедительные доказательства их наибольшей эффективности в отношении Th2-опосредованных воспалительных заболеваний [18].

Помимо неспецифической терапии кортикостероидами, для лечения данного фенотипа БА применяют специфичные препараты на основе моноклональных антител, направленные против молекулярных компонентов Th2-иммунного пути (IgE, Th2-ассоциированные цитокины и их рецепторы) [6]. В настоящее время для лечения БА в мире и в России, в частности, одобрены следующие таргетные препараты на основе моноклональных антител: Reslizumab (анти-IL-5), Mepolizumab (анти-IL-5), Benralizumab (анти-IL-5), Dupilumab (анти-IL-4/IL-13) и Omalizumab (анти-IgE).

Поздняя эозинофильная астма характеризуется наличием значительного количества эозинофилов в мокроте и периферической крови. К этому фенотипу принято относить БА, при которой доля эозинофилов в мокроте превышает 2% от всех лейкоцитов [19]. Частота встречаемости БА с таким фенотипом достоверно не известна; в некоторых исследованиях показано, что данный фенотип может достигать 50% от всех случаев БА [20]. Несмотря на выраженную эозинофилию, симптомы аллергии у этих пациентов, как правило, возникают не в детстве, а во взрослом возрасте. Эта форма астмы часто сопровождается синуситом и полипозом носовой полости [16]. Астма данного фенотипа зачастую протекает тяжело, при этом большое количество эозинофилов сохраняется, несмотря на лечение ингаляционными и пероральными кортикостероидами [21]. Данный фенотип, в отличие от ранней аллергической БА, скорее всего, разви-

Таблица 1. Характеристика фенотипов бронхиальной астмы

Фенотип	Анамнез	Клинико-физиологические особенности	Патобиология и биомаркеры	Ответ на терапию	Ссылки
Ранняя аллергическая астма	раннее начало; от легкой до тяжелой формы	аллергические симптомы (АР, АК, АтД)	специфические IgE-антитела; Th2-ассоциированные цитокины; утолщение субэпителиальной базальной мембраны	чувствительность к кортикостероидам	[11]
Поздняя эозинофильная астма	начало во взрослом возрасте; часто тяжелая	синусит; полипоз носа	кортикостероид-резистентная эозинофилия; IL-5	чувствительность к антителам против IL-5 и цистеинил-лейкотриеновым модификаторам; резистентность к кортикостероидам	[12]
Астма, вызванная физической нагрузкой	—	умеренная тяжесть; интермиттирующая; коррелирует с физической нагрузкой	Th2-ассоциированные цитокины; цистеинил-лейкотриены	реагирует на цистеинил-лейкотриеновые модификаторы, бета-агонисты и антитела против IL-9	[13]
Астма, связанная с ожирением	начало во взрослом возрасте	страдают в первую очередь женщины; симптомы ярко выражены; менее выраженная ГРБ	отсутствие Th2-биомаркеров; оксидативный стресс	реагирует на потерю веса, антиоксиданты и, возможно, на терапию кортикостероидами	[14]
Нейтрофильная астма	—	низкий ОФВ1 (FEV1)	нейтрофилия мокроты; активация Th17-пути; IL-8	возможная чувствительность к терапии макролидными антибиотиками	[10]

Примечание. АР — аллергический ринит, АК — аллергический конъюнктивит, АтД — атопический дерматит, ОФВ1 — объем форсированного выдоха за 1 секунду (FEV1 — forced expiratory flow in 1 second), ГРБ — гиперреактивность бронхов.

вается не только по Th2-зависимому пути, а по более сложному IgE-независимому механизму с вовлечением в патогенез ILC2 и цитокина IL-33. Эпителиальные клетки под воздействием патогенетических стимулов высвобождают IL-33, который активирует ILC2. Последние являются мощными продуцентами IL-5 [22], который отвечает за привлечение и созревание эозинофилов [23]. На моделях у мышей показано, что даже в отсутствие Т- и В-клеток ILC2 индуцировали формирование ГРБ и эозинофилию легких [24].

Эозинофилы обычно очень чувствительны к кортикостероидам, так как последние индуцируют их апоптоз [25]. Поэтому удивительно, что, несмотря на лечение ингаляционными кортикостероидами, эозинофилы сохраняются на повышенном уровне в легких и периферической крови у 50% пациентов с такой астмой. Тем не менее, высокие дозы системных кортикостероидов позволяют преодолевать эту резистентность [26]. Учитывая высокий уровень эозинофилии, для пациентов с этим фенотипом БА антилейкотриеновые препараты, анти-IL-5 и ан-

ти-IL-13-терапия оказывают значительный благоприятный эффект [27].

Таким образом, поздняя эозинофильная астма характеризуется выраженной инфильтрацией легких эозинофилами. Зачастую пациенты с такой астмой резистентны к терапии кортикостероидами, что, несомненно, свидетельствует о более сложном патогенезе этой формы заболевания.

Астма, вызванная физическими упражнениями. Астму физического усилия (АФУ) относят к отдельному фенотипу. Симптомы АФУ проявляются в основном после физической нагрузки. Несмотря на то, что этот фенотип был описан давно, к настоящему времени все еще недостаточно известно о его патогенезе. Пациенты с АФУ часто страдают легкой формой БА и демонстрируют снижение FEV1 на 10–15% в ответ на длительные физические нагрузки, при этом снижение FEV1 более выражено в холодных и сухих условиях. Хотя патогенез этого фенотипа БА мало изучен, имеются доказательства участия в нем Th2-иммунного ответа. В частности, этот фенотип заболевания более распространен

у атлетов с атопией и связан с повышенным количеством эозинофилов в мокроте. АФУ также связана с активацией тучных клеток в слизистой оболочке бронхов. К настоящему времени не описано надежных биомаркеров, присущих АФУ [10]. Для терапии этого фенотипа БА применяют антилейкотриеновые препараты, также пациенты с АФУ хорошо отвечают на анти-IL-9-терапию [28], что может свидетельствовать о Th9, а не о Th2-зависимых механизмах развития данного фенотипа астмы. Недавние исследования на мышах показали, что ГРБ может развиваться по механизму, независимому от активации Th2-клеток, и в отсутствие эозинофильного воспаления легких, а с участием Th9-клеток и продуцируемого ими цитокина — IL-9 [29].

Астма, связанная с ожирением. Вопрос о том, является ли ожирение источником развития астмы или сопутствующим заболеванием, остается спорным. Ряд исследований подтверждает связь ожирения с воспалением, опосредованным такими молекулярными факторами как TNF- α , IL-6 и лептины. Кроме того, было показано, что потеря веса увеличивает выработку провоспалительных цитокинов лимфоцитами периферической крови у людей с аллергической астмой [30].

Механизмы развития астмы, связанной с ожирением, слабо изучены. Согласно текущим представлениям, данный фенотип гетерогенен, так как у части пациентов БА развивается с участием Th2-имунного ответа, в то время как у другой — по Th2-независимому механизму. При этом потеря веса пациентами с неаллергической БА (не Th2-тип) приводила к улучшению симптомов БА. Напротив, у лиц с аллергической астмой (Th2-тип) симптомы заболевания не улучшались после похудения, более того происходила усиленная выработка Th2-цитокинов. Таким образом, быстрая потеря веса в качестве терапии целесообразна не во всех случаях. Неудовлетворительные результаты лечения большинства таких пациентов кортикостероидами говорят об отсутствии или слабой связи патогенеза этого фенотипа БА с Th2-опосредованным воспалением [10].

Нейтрофильная астма. Астму долгое время связывали с эозинофильным воспалением и IgE-опосредованной активацией тучных клеток. Однако накапливаются экспериментальные свидетельства об участии других воспалительных клеток — нейтрофилов в патогенезе БА. Например, у пациентов, погибших в результате приступа БА, при вскрытии в легких обнаруживалось значительное количество нейтрофилов. Также количество нейтрофилов в мокроте коррелировало с тяжестью заболевания [31]. Поскольку повышенная нейтрофилия мокроты

встречается у пациентов с различными формами БА, выделение нейтрофильной БА в отдельный фенотип — вопрос до сих пор дискуссионный. К тому же окончательно не определено, какой уровень нейтрофилии мокроты должен выявляться для отнесения пациента к данному фенотипу заболевания. Согласно ряду авторов, к нейтрофильной БА относят пациентов с уровнем нейтрофилии мокроты либо более 65%, либо более 5×10^6 кл/мл [32]. Другие авторы в качестве диагностического критерия применяют уровень эозинофилов в мокроте менее 3% при уровне нейтрофилов более 60% [33].

Дополнительная сложность идентификации пациентов с нейтрофильной БА заключается в том, что появление нейтрофилов в мокроте может не зависеть от патогенеза БА как такового, а быть результатом воздействия факторов окружающей среды или сопутствующих патологий (ожирение и инфекции дыхательных путей). Несмотря на то, что первоначальные исследования не выявляли связи между ожирением и нейтрофильным воспалением дыхательных путей при астме, дополнительные исследования установили эту взаимосвязь, но только для женщин [34]. В исследованиях на животных показан вклад диеты с высоким содержанием жиров в развитие гиперреактивности бронхов и активацию провоспалительного цитокина IL-17A, который опосредует нейтрофилию дыхательных путей [35].

Нейтрофильное воспаление легких и резистентность к кортикостероидам чаще всего наблюдаются у людей, имеющих в дыхательных путях какие-либо патогены (грибы, вирусы и бактерии). Среди грибов *Aspergillus fumigatus* чаще всего идентифицируется в респираторном тракте при БА, наличие этого патогена коррелирует с нейтрофилией [36]. Респираторно-синцитиальный вирус и риновирус вызывают осложнения БА, сопровождающиеся нейтрофильным воспалением дыхательных путей [37]. Бактериальные инфекции также сопровождаются устойчивой нейтрофилией и резистентностью к кортикостероидам [38]. Показано, что помимо ожирения и инфекций респираторного тракта, курение также ухудшает симптомы заболевания и способствует развитию нейтрофильного воспаления легких при БА [39].

Как упомянуто выше, к нейтрофильной БА относят пациентов с повышенным количеством нейтрофилов в мокроте и неудовлетворительным ответом на терапию ингаляционными кортикостероидами. По некоторым данным, нейтрофильная БА может составлять до 50% от всех случаев тяжелой астмы, устойчивой к терапии кортикостероидами [32]. Стоит отметить, что

нейтрофилия в мокроте часто наблюдается у пациентов, получавших кортикостероиды. Известно, что кортикостероиды ингибируют апоптоз нейтрофилов и активируют их, поэтому лечение кортикостероидами способствует развитию нейтрофилии [40]. Нейтрофилия легких связана с более низкими значениями FEV1 по сравнению с пациентами, у которых нейтрофилы в мокроте не выявляются [41]. Исследование профиля экспрессии генов клетками мокроты показало, что нейтрофильное воспаление сопровождалось активацией IL-1 β и TNF- α [42]. Нейтрофилия может также сосуществовать с эозинофилией, что подчеркивает сложность патофизиологии тяжелой формы астмы БА.

Существование самостоятельного нейтрофильного фенотипа БА подтверждают результаты т.н. кластерного исследования, когда с помощью определенных алгоритмов проводят компьютеризированный анализ большого количества клинических показателей пациентов. В проведенном исследовании было проанализировано 112 таких показателей (включая количество воспалительных клеток крови и бронхоальвеолярного лаважа (БАЛ), кожные тесты, уровень сывороточного IgE и пр.) для гетерогенной группы пациентов, страдающих БА. В результате был выявлен кластер пациентов с тяжелой формой БА, которые характеризовались значительными нарушениями функции дыхания и наличием эозинофилов в БАЛ в сочетании с высоким количеством нейтрофилов [43].

МОЛЕКУЛЯРНЫЕ И КЛЕТОЧНЫЕ МЕХАНИЗМЫ НЕЙТРОФИЛЬНОЙ АСТМЫ

Молекулярные механизмы развития нейтрофильного воспаления при БА изучали как с использованием биоматериала, полученного от пациентов, так и с применением моделей заболевания у мышей. Данные исследования установили взаимосвязь степени тяжести БА и нейтрофильного воспаления легких, которое коррелировало с активацией Th1- [44] и Th17-иммунного ответа, а также с повышенной продукцией IFN γ , IL-17A, IL-17F и IL-8 в мокроте [45].

Роль IL-8, TNF- α и IL-6. Давно известно, что IL-8 (он же CXCL8) является мощным хемоаттрактантом нейтрофилов. Концентрация IL-8 в мокроте коррелирует с количеством нейтрофилов у пациентов с тяжелой формой БА [46]. Данный цитокин могут экспрессировать макрофаги и эпителиальные клетки, активированные патогенами (бактериальной или вирусной природы) и факторами окружающей среды (табачный дым, частицы, содержащиеся в выхлопных

газах и пр.) [46]. Кроме того, Т-клетки и сами нейтрофилы в ответ на активацию IL-17A продуцируют IL-8 [47].

Помимо IL-8, аттракции нейтрофилов в легкие также способствует TNF- α , продуцируемый эпителием [48]. Так, введение TNF- α здоровым добровольцам способствовало возникновению гиперреактивности бронхов и увеличению количества нейтрофилов в индуцированной мокроте (рисунок).

Экспрессия другого провоспалительного цитокина — IL-6 — также повышена в сыворотке крови, мокроте и образцах БАЛ пациентов, страдающих БА [49]. Данный цитокин продуцируется широким спектром клеток (эпителиальные клетки, макрофаги, Т-клетки и пр.) и участвует в поляризации Th17-иммунного ответа (будет обсуждено ниже). Его роль в нейтрофильном воспалении была подтверждена в исследованиях на мышах, нокаутных по данному гену; инактивация IL-6 снижала степень нейтрофильного (и эозинофильного) воспаления ткани легких при моделировании экспериментальной БА (рисунок) [50].

Роль Th1-клеток. Об участии Th1-клеток в развитии нейтрофильного воспаления при БА сообщалось давно. В образцах БАЛ пациентов с тяжелой БА содержалось значительное количество CD4⁺ Т-клеток, продуцирующих IFN γ [44]. Исследования на животных показали, что именно IFN γ играл решающую роль в развитии ГРБ при экспериментальной БА. После инактивации гена IFN γ мыши не развивали ГРБ в ответ на индукцию тяжелой БА. В то же время после нокаута рецептора IL-17RA ГРБ не снижалась, несмотря на уменьшение степени воспаления в легких [44]. Сходное наблюдение было сделано и в клинической практике, когда количество Th1-клеток в БАЛ коррелировало с ухудшением функции легких [51].

Дифференциацию Th0-клеток в Th1 осуществляют цитокины IL-12 и IFN γ . После взаимодействия Т-клеточного рецептора с антигеном, а также воздействия указанных цитокинов индуцируется экспрессия факторов STAT1 и Tbet, которые осуществляют дифференцировку Th1-клеток и запускают продукцию IFN γ . Процесс поляризации Th1-клеток относительно хорошо изучен и описан в ряде обзоров (рисунок) [52].

Продуцируемый Th1-клетками IFN γ вовлечен в хемотаксис нейтрофилов посредством активации экспрессии хемокиновых рецепторов CCR1 и CCR3 на их поверхности. В свою очередь, нейтрофилы продуцируют хемокин CXCL10, осуществляющий аттракцию Th1-клеток (рисунок) [53].

Роль Th17-клеток. Накоплено значительное количество экспериментальных свидетельств участия Th17-клеток, продуцирующих т.н. Th17-ассоциированные цитокины (IL-17A и IL-17F), в развитии нейтрофильного воспаления при БА. Увеличенное количество IL-17A и IL-17F и их мРНК детектируется в мокроте, образцах БАЛ и биопсийном материале, полученном от пациентов с БА [54]. Уровень экспрессии данных цитокинов коррелирует с тяжестью патологии [55], инфильтрацией дыхательных путей нейтрофилами [56] и резистентностью к терапии кортикостероидами.

Исследования на животных подтверждают эту взаимосвязь; введение в дыхательные пути мышей рекомбинантного IL-17A [57] или поляризованных Th17-клеток [58] приводило к увеличению количества нейтрофилов. Наоборот, блокирование IL-17-сигнального пути существенно уменьшало нейтрофилию легких [59], выраженность патологии респираторного тракта и ГРБ [60].

Нейтрофилия дыхательных путей у пациентов с тяжелой БА коррелировала с экспрессией IL-17A, при этом терапия кортикостероидными препаратами не снижала их количество в дыхательных путях [56]. Сходные исследования были получены и на животных, когда экспрессия Th17-ассоциированных цитокинов коррелировала с нечувствительностью к кортикостероидам [61].

Согласно современным представлениям, дифференциацию Th0-клеток мыши в Th17-клетки запускает комбинация цитокинов TGF- β и IL-6 или TGF- β и IL-21. Th0-клетки человека поляризуются в Th17 сходными комбинациями цитокинов: TGF- β + IL-21 или TGF- β + IL-23 + IL-6. При этом сами Th17-клетки продуцируют значительное количество IL-21, тем самым аутокринно усиливая свою дифференцировку. В дифференцировке Th17-клеток участвуют транскрипционные факторы STAT3, ROR α и ROR γ t (рисунок). Также существует пластичность между популяциями Th1-, Th17- и Treg-клетками [62].

Таким образом, цитокины IL-6, IL-21 и IL-23 активируют в Т-клетках экспрессию фактора STAT3, который индуцирует транскрипцию факторов ROR α и ROR γ t, необходимых для продукции IL-17A, IL-17F, IL-21 и IL-22 поляризованными Th17-клетками. При этом Th1-ассоциированный цитокин – IFN γ негативно регулирует дифференциацию Th17-клеток (рисунок). Также регуляторные Т-клетки подавляют поляризацию Th17-иммунного ответа, т.к. повышение соотношения экспрессии IL-17A/IL-10 и ROR γ t/Foxp3 увеличено у пациентов с высокой

частотой обострений [63]. Кроме того, дифференциации Th0-клеток в Th17 способствует процесс презентации аллергена дендритными клетками 2-го типа [64]. В то же время презентация, осуществляемая дендритными клетками 1-го типа, приводит к развитию толерантности на аллерген за счет активации Т-регуляторных клеток (Treg) (рисунок) [65].

Цитокины IL-17A и IL-17F, продуцируемые Th17-клетками, имеют значительное структурное сходство; они связываются с рецепторным комплексом, состоящим из цепей IL-17RA и IL-17RC. Ввиду такого сходства функциональные роли IL-17A и IL-17F также сходны. Цитокины IL-17A, IL-17F и IL-22 стимулируют гены муцинов в эпителиальных клетках, приводя к гиперплазии и метаплазии бронхиального эпителия, а также способствуют пролиферации клеток гладкой мускулатуры бронхов [66], что в итоге приводит к ремоделированию дыхательных путей [67]. Кроме того, Th17-ассоциированные цитокины (IL-17A, IL-17F и IL-22) воздействуют на бронхиальный эпителий, стимулируя продукцию CXCL1 и IL-8, которые, в свою очередь, участвуют в хемоаттракции нейтрофилов в легкие (рисунок) [68].

Таким образом, при развитии нейтрофильной БА происходит поляризация Th0-клеток в Th17 под влиянием определенного цитокинового микроокружения (TGF- β + IL-21, TGF- β + IL-23 + IL-6). Th17-клетки, в свою очередь, продуцируют цитокины IL-17A, IL-17F и IL-22, которые активируют провоспалительные клетки нейтрофилы и вызывают гиперсекрецию слизи бронхиальным эпителием.

Роль других молекулярных и клеточных факторов. Существуют и другие механизмы нейтрофильного воспаления. Один из них – активация инфламмасомы NLRP3 – внутриклеточного мультипротеинового комплекса. Активация осуществляется за счет белка SAA, который продуцируется респираторным эпителием под действием патогенетических факторов (бактерии, поллютанты и пр.). Активированная инфламмасома NLRP3 способствует каспаза-1-опосредованному процессингу провоспалительных цитокинов IL-1 β и IL-18 [69]. Повышенная экспрессия NLRP3, IL-1 β и каспазы-1 обнаруживается в мокроте пациентов с нейтрофильной БА [70], что подтверждает участие этих факторов в нейтрофильном воспалении дыхательных путей.

Врожденные лимфоидные клетки 3 типа (ILC3) также связаны с нейтрофильным воспалением легких и развитием ГРБ. Исследования на мышях показали, что цитокин IL-1 β , выделяемый макрофагами, стимулирует ILC3 продуци-

ровать IL-17A, что в итоге приводит к ГРБ и нейтрофилии легких [71]. Косвенные данные, подтверждающие участие ILC3 в тяжелой нейтрофильной БА, были получены при анализе транскриптома клеток индуцированной мокроты; в мокроте пациентов с тяжелой астмой был повышен уровень мРНК-экспрессии генов, которые вовлечены в пути активации ILC3 (рисунок) [72].

Также сообщается об участии IL-33, высвобождаемого клетками респираторного эпителия, в усилении не только Th2-иммунного ответа, но и Th1-/Th17-ответа [73] (рисунок).

Таким образом, эпителиальные клетки, макрофаги, ILC3, Th1- и Th17-клетки проявляют свою скоординированную активность посредством выделяемых хемокинов и цитокинов, приводя к нейтрофильному воспалению ткани легких и развитию признаков БА: гиперсекреции слизи, ГРБ и ремоделированию респираторного тракта (гипертрофия гладкой мускулатуры бронхов, фиброз ткани легких и гиперплазия эпителия).

БИОЛОГИЯ НЕЙТРОФИЛОВ, ИХ ПАТОГЕНЕТИЧЕСКАЯ РОЛЬ В БА

Как описано выше, в нейтрофильном воспалении легких значительную роль играют IL-6, IL-8 и TNF- α , продуцируемые макрофагами и эпителиальными клетками, а также IFN γ , IL-17A, IL-17F и IL-22, продуцируемые Th1-, Th17-клетками и ILC3. Привлекаемые нейтрофилы составляют первую линию защиты во время инфекции легких. Для уничтожения патогенов они высвобождают во внеклеточную среду т.н. нейтрофильные внеклеточные ловушки (NETs — neutrophil extracellular traps), которые содержат ДНК нейтрофилов, антимикробные факторы (например, пептиды) и функционируют как барьеры для распространения микроорганизмов [74].

Кроме благоприятной антимикробной роли, нейтрофилы действуют как провоспалительные клетки; их избыточное проникновение в легкие приводит к повреждению респираторного тракта. Установлено, что формирование NETs коррелирует с утяжелением течения БА [75].

Под влиянием цитокинов IL-17A и IL-17F нейтрофилы экспрессируют фактор ROS, протеазу MMP-9, эластазу и фермент миелопероксидазу (МРО) [76]. Указанные факторы обнаруживаются в образцах БАЛ и биопсии пациентов с БА в значительных количествах и коррелируют с ухудшением функции дыхания, нарушениями бронхиального эпителия и формированием эм-

физема-подобного состояния. Кроме продукции протеаз, активированные нейтрофилы высвобождают их ингибиторы: TIMP-1 и SLPI [44]. Такая дисрегуляция протеаз и их ингибиторов вносит вклад в структурные нарушения респираторного тракта и, как следствие, приводит к бронхиальной обструкции, характерной для БА.

Длительное время считалось, что нейтрофилы представляют собой гомогенный пул гранулоцитов с относительно коротким периодом полужизни около 6–8 ч. Продукция нейтрофилов осуществляется костным мозгом (КМ) и контролируется цитокином — G-CSF. Считается, что стимуляция рецептора CXCR4 активирует состояние резидентности, т.е. часть нейтрофилов остается в КМ. В процессе созревания под действием G-CSF экспрессия CXCR4 уменьшается, и происходит их высвобождение из КМ в системный кровоток. Одна часть популяции циркулирует в кровотоке, в то время как другая часть распределяется по тканям органов. Стареющие нейтрофилы увеличивают экспрессию CXCR4 на своей поверхности, что позволяет им возвращаться в КМ для последующей утилизации посредством фагоцитоза стромальными макрофагами [74].

Накапливается множество экспериментальных свидетельств о биологии нейтрофилов, не укладывающихся в традиционные представления об этих клетках. В одном исследовании [77] было показано, что в условиях воспаления часть нейтрофилов имеет более длительную продолжительность жизни (3–5 суток, вместо 6–8 ч).

Согласно современным представлениям, нейтрофилы не являются гомогенным пулом клеток; они могут быть разделены, по меньшей мере, на три популяции, которые различаются по функциям: 1) зрелые нейтрофилы (CD16^{high}/CD62L^{high}) имеют ядро нормальной формы, 2) незрелые нейтрофилы (CD16^{low}/CD62L^{high}) имеют палочкообразное сплошное ядро, 3) гиперсегментированные нейтрофилы (CD16^{high}/CD62L^{low}) (табл. 2) [78]. Зрелые нейтрофилы, функция которых — иммунный надзор за бактериальными инвазиями, циркулируют в условиях стабильного гомеостаза. Однако при нарушении гомеостаза появляются другие популяции нейтрофилов (незрелые и гиперсегментированные). Незрелые нейтрофилы восполняют пул нейтрофилов и тем самым поддерживают его на относительно постоянном уровне в участке воспаления. Кроме того, незрелые нейтрофилы (под действием GM-CSF, IL-4 и IFN γ) могут трансдифференцироваться в нейтрофил/дендритные гибриды, которые, помимо бактериального киллинга, выполняют антиген-презентирующую роль [79]. На поверхности таких нейтрофилов обнаружи-

ваются маркеры дендритных клеток (CD11c, MHCII, CD80 и CD86). Показано, что эти гибриды способны мигрировать из участка воспаления в региональные лимфоузлы к месту локализации Т-клеток и осуществлять активацию последних, усиливая воспаление. В участке воспаления на долю таких гибридных клеток может приходиться до 20–30% от всей популяции нейтрофилов [79]. Гиперсегментированные нейтрофилы примечательны тем, что обладают иммунорегулирующими свойствами; они супрессируют Т-клетки и тем самым обладают противовоспалительными свойствами [80]. Не известно, происходит ли такая трансдифференцировка клеток при нейтрофильной астме, и каким образом изменяется состав различных популяций нейтрофилов в участке воспаления легких. Выявление этих механизмов позволит предложить новые способы терапии этой патологии.

Таким образом, нейтрофилы, привлекаемые в легкие за счет активности ряда цитокинов (IL-6, IL-8, TNF- α , IFN γ , IL-17A, IL-17F и IL-22), выделяют ферменты, которые осуществляют структурные нарушения респираторного тракта, что в итоге приводит к ухудшению дыхательной функции органа. Однако отдельные популяции нейтрофилов, кроме воспалительной, выполняют другие биологические функции (антигенпрезентирующая и иммунорегуляторная). Эти знания о биологии нейтрофилов имеют решающее значение для создания новых способов фармакотерапии нейтрофильной астмы, включая ее тяжелые формы.

ПОДХОДЫ К ТЕРАПИИ НЕЙТРОФИЛЬНОЙ АСТМЫ

Нейтрофильная астма трудно поддается лечению кортикостероидами. Более того, длитель-

ное их применение способствует развитию нейтрофильного воспаления легких [81], так как кортикостероиды индуцируют апоптоз эозинофилов, при этом ингибируют апоптоз нейтрофилов. Соответственно, снижение дозы потребляемых кортикостероидных препаратов может рассматриваться как подход к лечению нейтрофильной БА. В работе Demarche et al. показано, что снижение дозы кортикостероидов у 70% пациентов с БА приводило к уменьшению числа нейтрофилов в мокроте, при этом не наблюдалось утяжеления симптомов заболевания [82]. Тем не менее, требуется разработка новых подходов к лечению нейтрофильного воспаления дыхательных путей.

Бимосиамоза. Блокада миграции нейтрофилов в легкие представляется логичным подходом. Первым этапом их миграции является адгезия клеток с помощью CD15s к Е-селектину эндотелия кровеносных сосудов. Бимосиамоза является пан-селективным антагонистом. Ингаляция бимосиамозы пациентам с ХОБЛ приводит к значительному снижению количества макрофагов и концентрации IL-8 в мокроте. Отмечена тенденция к уменьшению числа нейтрофилов, что может быть результатом снижения концентрации их хемоаттрактанта — IL-8 (табл. 3) [83].

Анти-CXCR2 терапия. Наиболее значимыми хемоаттрактантами нейтрофилов считаются IL-8 (CXCL8), GRO- α (CXCL1), ENA-75 (CXCL5) и IL-17A. Ингибиторы указанных факторов, а также антагонисты их рецепторов (CXCR2, IL-17RA и др.) могут приводить к уменьшению нейтрофилии дыхательных путей. Известны попытки применения ингибиторов рецептора CXCR2, играющего роль в миграции нейтрофилов; препараты SCH527123 [84] и AZD8309 [85]. Однако данные об эффективности таких ингибиторов для лечения тяжелой формы БА не подтвердились в крупном многоцентровом кли-

Таблица 2. Субпопуляции нейтрофилов

Субпопуляция	Фенотип	Биологическая роль
Зрелые	CD16 ^{high} /CD62L ^{high}	иммунный надзор за бактериальными инвазиями
Незрелые	CD16 ^{low} /CD62L ^{high}	восполняют пул нейтрофилов в участке воспаления
Гиперсегментированные	CD16 ^{high} /CD62L ^{low}	иммунорегуляторные свойства. Способны супрессировать Т-клетки и, как следствие, воспалительную реакцию
Нейтрофил/дендритные гибриды	CD16 ^{low} /CD62L ^{high} CD11c, MHCII, CD80, CD86	трансдифференцируются из незрелых. Дополнительно к бактериальному киллингу выполняют антигенпрезентирующую функцию. Активируют Т-клетки и, как следствие, воспалительную реакцию

ническом исследовании с участием 640 добровольцев (табл. 3) [86].

Анти-TNF- α терапия. Другой подход заключается в таргетировании некоторых провоспалительных цитокинов (IL-1b, IL-17A, IL-23 и пр.). Несмотря на доказанную роль TNF- α в нейтрофильном воспалении, препарат Golimumab, содержащий в своем составе моноклональные антитела против TNF- α не показал клинической эффективности [87]. Другой ингибитор TNF- α — препарат Etanercept, который представляет собой химерный белок, содержащий часть рецептора для TNF- α и Fc-фрагмент IgG1-антитела. Одно исследование показало клиническую эффективность Etanercept; у пациентов снижалась гиперреактивность бронхов и выраженность симптомов. Однако другое исследование продемонстрировало более скромный эффект препарата; отмечалось улучшение качества жизни пациентов и гиперреактивность бронхов [88]. Еще один анти-TNF- α препарат — Adalimumab — на основе рекомбинантного моноклонального антитела продемонстрировал способность снижать уровень нейтрофилии, индуцированной у здоровых добровольцев эндотоксинами. Однако других подтверждений клинической эффективности Adalimumab в отношении нейтрофильной БА не опубликовано (таб. 3) [89]. Также имеется информация о том, что анти-TNF- α терапия при астме приводит ко многим нежелательным последствиям: реактивации туберкулеза, потенциально высокой вероятности появления опухолей и инфекций и т.д.

Анти-IL-17 терапия. Многими исследованиями доказано участие Th17-ассоциированных цитокинов в нейтрофильной БА. Учитывая это, был разработан препарат Brodalumab, содержащий моноклональные антитела против рецептора для IL-17A. Проведенные клинические исследования не показали значительной клинической эффективности препарата [90]. Недавно были инициированы клинические исследования другого препарата — CJM112, содержащего моноклональные антитела против IL-17A; данные о его эффективности еще не опубликованы (табл. 3) [91].

Анти-IL-1 β , IL-23 терапия. Препарат Anakinra — антагонист рецептора для IL-1, при подкожном введении существенно снижал количество нейтрофилов в мокроте, а также уровни IL-1 β , IL-6 и IL-8 у здоровых добровольцев после индукции у них воспаления ингаляциями липополисахаридом [92].

Как описано выше, IL-23 важен для поляризации Th17-иммунного ответа и нейтрофильного воспаления. Однако препарат Risankizumab, содержащий моноклональные антитела против

IL-23, не проявлял клинической эффективности (табл. 3) [93].

Ингибиторы киназ. Другой подход заключается в регуляции факторов транскрипции сигнальных путей, которые приводят к экспрессии вышеуказанных хемоаттрактантов нейтрофилов. Он реализован в препарате Imatinib, представляющем собой ингибитор тирозиновой протеинкиназы (KIT). Препарат показал клиническую эффективность при лечении тяжелой формы БА, резистентной к кортикостероидам. Прием препарата снижал бронхиальную гиперреактивность; причем это снижение обратно коррелировало с количеством нейтрофилов в БАЛ. Также снижалась активация тучных клеток, уменьшалось их количество в образцах биопсии легких (табл. 3) [94].

Макролиды. Антибиотики из группы макролидов в дополнение к антибактериальной активности обладают противовоспалительными свойствами. Учитывая это, эффекты макролидов (кларитромицин и азитромицин) были изучены в отношении тяжелой формы БА. Кларитромицин снижал уровень IL-8, эластазы, MMP-9 и количество нейтрофилов в мокроте пациентов с БА [95]. Другой антибиотик — азитромицин уменьшал частоту обострений БА и улучшал качество жизни. Механизм действия азитромицина может быть обусловлен способностью ингибировать провоспалительный фактор транскрипции NF- κ B и серин-треониновую протеинкиназу mTOR, необходимые для активации и дифференцировки нейтрофилов (табл. 3) [96].

Ингибиторы PDE4. Ингибиторы фосфодиэстеразы-4 (PDE4), например, Roflumilast в исследованиях на животных продемонстрировали способность снижать эозинофил- и нейтрофил-опосредованное воспаление, а также экспрессию TNF- α [97]. В клинических исследованиях с участием 4873 [98] и 3802 [99] пациентов, страдающих БА, Roflumilast улучшал функцию дыхания (ОФВ1) как в качестве монотерапии, так и в комбинации с ингаляционными кортикостероидами. В отдельном исследовании с участием пациентов с БА и ХОБЛ показана способность Roflumilast не только улучшать ОФВ1, но и снижать нейтрофильное воспаление респираторного тракта (табл. 3) [100].

Будущее в терапии нейтрофильной БА. Многие антицитокиновые и антихемокиновые способы терапии не показали клинической эффективности в лечении нейтрофильной астмы. Возможная причина неудач вышеописанных подходов — это не до конца раскрытые молекулярные и клеточные механизмы нейтрофильного воспаления, а также в целом «устаревшие» представления о биологии нейтрофилов. Как обсужда-

Таблица 3. Способы терапии нейтрофильной БА

Препарат	Механизм действия	Патология	Результат	Ссылки
Бимосиамоза	антагонист селектинов; ингибирование миграции лейкоцитов в легкие	ХОБЛ	значительно снижается количество макрофагов в мокроте; тенденция к снижению количества нейтрофилов в мокроте; значительное снижение концентрации IL-8 в мокроте, а также тенденция к уменьшению концентрации MMP-9 и MPO	[83]
SCH527123	ингибитор CXCR2	тяжелая неконтролируемая БА с повышенным содержанием нейтрофилов в мокроте	снижение нейтрофилии в мокроте на 36,3%, в системном кровотоке на 14%; тенденция к улучшению качества жизни пациентов; нет влияния на ОФВ1, уровень эластазы, IL-8 и MPO в мокроте	[84]
AZD8309	антагонист CXCR2	модель нейтрофильного воспаления респираторного тракта здоровых добровольцев, индуцированная ингаляциями ЛПС	снижение общей клеточности мокроты на 77% и количества нейтрофилов на 79%; снижение уровня эластазы, CXCL1 в мокроте; тенденция к снижению количества макрофагов, лейкотриена B4 и CXCL8	[85]
AZD8309	антагонист CXCR2	тяжелая неконтролируемая БА	отсутствует клиническая эффективность	[86]
Golimumab	мАт против TNF- α	тяжелая неконтролируемая БА	не показал клинической эффективности	[87]
Etanercept	химерный белок, содержащий часть рецептора для TNF- α и Fc-фрагмент IgG1-антитела	тяжелая неконтролируемая БА	снижение гиперреактивности бронхов и выраженности симптомов; улучшение качества жизни пациентов	[88]
Adalimumab	мАт против TNF- α	модель нейтрофильного воспаления респираторного тракта здоровых добровольцев, индуцированная ингаляциями эндотоксинов	снижение количества нейтрофилов и макрофагов в индуцированной мокроте	[89]
Brodalumab	мАт против цепи IL-17RA-рецептора для IL-17A, IL-17F, IL-25	средняя и тяжелая форма БА	отсутствие клинической эффективности	[90]
CJM112	мАт против IL-17A	тяжелая неконтролируемая БА	исследования продолжаются	[91]
Anakinra	антагонист рецептора для IL-1	модель нейтрофильного воспаления респираторного тракта здоровых добровольцев, индуцированная ингаляциями ЛПС	снижение количества нейтрофилов в индуцированной мокроте; снижение уровней IL-1b, IL-6 и IL-8	[92]
Risankizumab	мАт против IL-23	средняя и тяжелая формы БА	отсутствует клиническая эффективность	[93]
Кларитромицин	антимикробное и противовоспалительное действие	тяжелая неконтролируемая БА	снижение уровня IL-8, эластазы, MMP-9 и количества нейтрофилов в мокроте	[95]

Препарат	Механизм действия	Патология	Результат	Ссылки
Азитромицин	антимикробное и противовоспалительное действие	тяжелая неконтролируемая БА	снижение частоты обострений и улучшение качества жизни пациентов	[96]
Imatinib	ингибитор тирозиновой протеинкиназы KIT	тяжелая форма БА, резистентная к терапии кортикостероидами	снижение бронхиальной гиперреактивности, которое обратно коррелировало с уровнем нейтрофилов в БАЛ; снижение уровня маркера активации тучных клеток (триптазы) в сыворотке крови; снижение количества тучных клеток в образцах биопсии легких	[94]
Roflumilast	ингибитор PDE4	БА	восстановление ОФВ1	[98]
		слабая и средняя формы БА	восстановление ОФВ1	[99]
		ХОБЛ и БА	восстановление ОФВ1; снижение количества нейтрофилов и эозинофилов в респираторном тракте	[100]

лось выше, нейтрофилы могут проявлять функциональную пластичность, приспосабливаясь к изменениям в микросреде. Существование фенотипов, в которых осуществлялась попытка подавить инфильтрацию всего пула нейтрофилов, а не отдельных «нежелательных» субпопуляций, объясняет неудачи некоторых клинических испытаний.

Учитывая недавно полученные знания о биологии нейтрофилов и о существовании отдельных их субпопуляций, можно ожидать появления новых терапевтических подходов. В частности, целесообразно избирательно блокировать активность зрелых нейтрофилов, обладающих воспалительным эффектом. Наоборот, активация гиперсегментированных нейтрофилов, являющихся супрессорами воспаления, также является перспективным направлением будущих исследований.

Исследования молекулярных и клеточных механизмов БА, проведенные за последние 15–20 лет, привели к пониманию того, что данное заболевание гетерогенно и подразделяется на несколько фенотипов. Разные группы исследователей предлагают различные типы классификаций БА; в данном обзоре представлена одна из наиболее распространенных классификаций, выделяющая 5 фенотипов заболевания с учетом наблюдаемых клинико-физиологических особенностей, анамнеза и ответа на терапию [10].

Однако стоит отметить, что в реальной клинической практике не выделяют фенотипы БА в

качестве самостоятельных диагнозов. Сложность выделения различных форм БА во многом обусловлена тем, что еще не до конца установлены четкие критерии отнесения того или иного пациента к конкретному фенотипу. Дополнительную сложность создает тот факт, что у одного пациента могут сочетаться несколько фенотипов заболевания. Например, у пациента с атопической БА с ранним дебютом со временем дополнительно может возникнуть ожирение и т.д. Кроме того, фенотипы заболевания БА могут трансформироваться один в другой. Так, к примеру, поздняя эозинофильная БА может переходить в нейтрофильную астму на фоне инфекции респираторного тракта или воздействия негативных факторов окружающей среды.

Тем не менее, несмотря на сложности в использовании термина «фенотип» в реальной клинической практике, накоплено множество экспериментальных свидетельств гетерогенности астмы как заболевания. В большинстве случаев воспаление при БА характеризуется эозинофилией и продукцией цитокинов Th2-типа (IL-4, IL-5, IL-9 и IL-13). Однако в ряде случаев бронхиальная астма может развиваться не по Th2-зависимому механизму, а с участием Th1/Th17-клеток и характеризоваться инфильтрацией других провоспалительных клеток — нейтрофилов.

Нейтрофильное воспаление в легких может быть индуцировано такими триггерами, как инфекции респираторного тракта, табачный дым, ожирение и пр. Однако в ряде случаев даже в от-

существование вышеуказанных факторов может наблюдаться нейтрофилия респираторного тракта, поэтому в настоящее время нейтрофильную БА выделяют в отдельный фенотип на основе ряда клинических и патофизиологических особенностей.

Слабый ответ пациентов с нейтрофильной БА на стандартную терапию кортикостероидами обуславливает необходимость создания способов терапии данной патологии. К настоящему времени отсутствуют надежные и доступные способы лечения такой астмы, однако на основе новых знаний о биологии нейтрофилов (созревание, дифференциация и миграция) разраба-

тываются терапевтические подходы, которые могут быть успешны в будущем.

Финансирование. Работа выполнена при финансовой поддержке Министерства высшего образования Российской Федерации (грант МД-1578.2019.4).

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

- GINA Committee. Global Initiative for Asthma. (2020) Global strategy for asthma management and prevention: 2020 (URL: https://ginasthma.org/wp-content/uploads/2020/04/GINA-2020-Appendix_final-wms.pdf).
- Soriano, J. B., Abajobir, A. A., Abate, K. H., Abera, S. F., Agrawal, A. et al. (2017) Global, regional, and national deaths, prevalence, disability-adjusted life years, and years lived with disability for chronic obstructive pulmonary disease and asthma, 1990–2015: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2015, *Lancet Respir. Med.*, **5**, 691–706, doi: 10.1016/S2213-2600(17)30293-X.
- Avdeev, S. N., Nenasheva, N. M., Zhudnikov, K. V., Petrakovskaya, V. A., and Izyumova, G. V. (2018) Prevalence, morbidity, phenotypes and other characteristics of severe bronchial asthma in Russian Federation, *Pulmonologiya*, **28**, 341–358, doi: 10.18093/0869-0189-2018-28-3-341-358.
- Moote, W., Kim, H., and Ellis, A. K. (2018) Allergen-specific immunotherapy, *Allergy Asthma Clin. Immunol.*, **14**, 1–10, doi: 10.1186/s13223-018-0282-5.
- Pavlova, K. S., Kurbacheva, O. M., Galitskaya, M. A., and Smirnov, D. S. (2017) Actual conception of allergen-specific immunotherapy mechanisms, potential biomarkers of efficacy and ways of enhancement, *Russ. Allergol. J.*, **14**, 5–17.
- Corren, J., Lemanske, R. F., Hanania, N. A., Korenblat, P. E., Parsey, M. V., Arron, J. R., Harris, J. M., Scheerens, H., Wu, L. C., Su, Z., Mosesova, S., Eisner, M. D., Bohen, S. P., and Matthews, J. G. (2011) Lebrikizumab treatment in adults with asthma, *New Eng. J. Med.*, **365**, 1088–1098, doi: 10.1056/NEJMoa1106469.
- Boyman, O., Kaegi, C., Akdis, M., Baybek, S., Bossios, A., Chatzipetrou, A., Eiwegger, T., Firinu, D., Harr, T., Knol, E., Matucci, A., Palomares, O., Schmidt-Weber, C., Simon, H. U., Steiner, U. C., Vultaggio, A., Akdis, C. A., and Spertini, F. (2015) EAACI IG Biologicals task force paper on the use of biologic agents in allergic disorders, *Allergy*, **70**, 727–754, doi: 10.1111/all.12616.
- Kuruvilla, M. E., Lee, F. E. H., and Lee, G. B. (2019) Understanding asthma phenotypes, endotypes, and mechanisms of disease, *Clin. Rev. Allergy Immunol.*, **56**, 219–233, doi: 10.1007/s12016-018-8712-1.
- Grayson, M. H., Feldman, S., Prince, B. T., Patel, P. J., Matsui, E. C., and Apter, A. J. (2018) Advances in asthma in 2017: Mechanisms, biologics, and genetics, *J. Allergy Clin. Immunol.*, **142**, 1423–1436, doi: 10.1016/j.jaci.2018.08.033.
- Wenzel, S. E. (2012) Asthma phenotypes: The evolution from clinical to molecular approaches, *Nat. Med.*, **18**, 716–725, doi: 10.1038/nm.2678.
- Miranda, C., Busacker, A., Balzar, S., Trudeau, J., and Wenzel, S. E. (2004) Distinguishing severe asthma phenotypes: role of age at onset and eosinophilic inflammation, *J. Allergy Clin. Immunol.*, **113**, 101–108, doi: 10.1016/j.jaci.2003.10.041.
- Hirano, T., and Matsunaga, K. (2018) Late-onset asthma: current perspectives, *J. Asthma Allergy*, **11**, 19–27, doi: 10.2147/JAA.S125948.
- Aggarwal, B., Mulgirigama, A., and Berend, N. (2018) Exercise-induced bronchoconstriction: prevalence, pathophysiology, patient impact, diagnosis and management, *Prim. Care Respir. Med.*, **28**, 1–8, doi: 10.1038/s41533-018-0098-2.
- Peters, U., Dixon, A. E., and Forno, E. (2018) Obesity and asthma, *J. Allergy Clin. Immunol.*, **141**, 1169–1179, doi: 10.1016/j.jaci.2018.02.004.
- Fitzpatrick, A. M., Teague, W. G., Meyers, D. A., Peters, S. P., Li, X., Li, H., Wenzel, S. E., Aujla, S., Castro, M., Bacharier, L. B., Gaston, B. M., Bleecker, E. R., and Moore, W. C. (2011) Heterogeneity of severe asthma in childhood: confirmation by cluster analysis of children in the national institutes of health/national heart, lung, and blood institute severe asthma research program, *J. Allergy Clin. Immunol.*, **127**, 382–389, doi: 10.1016/j.jaci.2010.11.015.
- Moore, W. C., Meyers, D. A., Wenzel, S. E., Teague, W. G., Li, H. et al. (2010) Identification of asthma phenotypes using cluster analysis in the severe asthma research program, *Am. J. Respir. Crit. Care Med.*, **181**, 315–323, doi: 10.1164/rccm.200906-0896OC.
- Achuthan, A., Aslam, A. S. M., Nguyen, Q., Lam, P. Y., Fleetwood, A. J., Frye, A. T., Louis, C., Lee, M., Smith, J. E., Cook, A. D., Olshansky, M., Turner, S. J., and Hamilton, J. A. (2018) Glucocorticoids promote apoptosis of proinflammatory monocytes by inhibiting ERK activity article, *Cell Death Dis.*, **9**, 1–13, doi: 10.1038/s41419-018-0332-4.
- Maneechotesuwan, K., Yao, X., Ito, K., Jazrawi, E., Usmani, O. S., Adcock, I. M., and Barnes, P. J. (2009) Suppression of GATA-3 nuclear import and phosphorylation: a novel mechanism of corticosteroid action in allergic disease, *PLoS Med.*, **6**, 1–13, doi: 10.1371/journal.pmed.1000076.
- Jayaram, L., Pizzichini, M. M., Cook, R. J., Boulet, L. P., Lemière, C., Pizzichini, E., Cartier, A., Hussack, P., Goldsmith, C. H., Laviolette, M., Parameswaran, K., and Hargreave, F. E. (2006) Determining asthma treatment by monitoring sputum cell counts: effect on exacerbations, *Eur. Respir. J.*, **27**, 483–494, doi: 10.1183/09031936.06.00137704.

20. Woodruff, P. G., Modrek, B., Choy, D. F., Jia, G., Abbas, A. R., Ellwanger, A., Koth, L. L., Arron, J. R., and Fahy, J. V. (2009) T-helper type 2-driven inflammation defines major subphenotypes of asthma, *Am. J. Respir. Crit. Care Med.*, **180**, 388-395, doi: 10.1164/rccm.200903-0392OC.
21. Van Veen, I. H., ten Brinke, A., Gauw, S. A., Sterk, P. J., Rabe, K. F., and Bel, E. H. (2009) Consistency of sputum eosinophilia in difficult-to-treat asthma: a 5-year follow-up study, *J. Allergy Clin. Immunol.*, **124**, 615-617, doi: 10.1016/j.jaci.2009.06.029.
22. Khaitov, M. R., Gaisina, A. R., Shilovskiy, I. P., Smirnov, V. V., Ramenskaia, G. V., Nikonova, A. A., and Khaitov, R. M. (2018) The role of interleukin-33 in pathogenesis of bronchial asthma. New experimental data, *Biochemistry (Moscow)*, **83**, 13-25, doi: 10.1134/S0006297918010029.
23. Hassani, M., and Koenderman, L. (2018) Immunological and hematological effects of IL-5(α)-targeted therapy: an overview, *Allergy*, **73**, 1979-1988, doi: 10.1111/all.13451.
24. Bartemes, K. R., Iijima, K., Kobayashi, T., Kephart, G. M., McKenzie, A. N., and Kita, H. (2012) IL-33-responsive lineage – CD25⁺ CD44(hi) lymphoid cells mediate innate type 2 immunity and allergic inflammation in the lungs, *J. Immunol.*, **188**, 1503-1513, doi: 10.4049/jimmunol.1102832.
25. Druilhe, A., Létuvé, S., and Pretolani, M. (2003) Glucocorticoid-induced apoptosis in human eosinophils: mechanisms of action, *Apoptosis*, **8**, 481-495, doi: 10.1023/a:1025590308147.
26. Brinke, A. T., Zwinderman, A. H., Sterk, P. J., Rabe, K. F., and Bel, E. H. (2004) "Refractory" eosinophilic airway inflammation in severe asthma: effect of parenteral corticosteroids, *Am. J. Respir. Crit. Care Med.*, **170**, 601-605, doi: 10.1164/rccm.200404-440OC.
27. Doran, E., Cai, F., Holweg, C. T. J., Wong, K., Brumm, J., and Arron, J. R. (2017) Interleukin-13 in asthma and other eosinophilic disorders, *Front. Med.*, **4**, 1-14, doi: 10.3389/fmed.2017.00139.
28. Parker, J. M., Oh, C. K., LaForce, C., Miller, S. D., Pearlman, D. S., Le, C., Robbie, G. J., White, W. I., White, B., and Molfino, N. A. (2011) Safety profile and clinical activity of multiple subcutaneous doses of MEDI-528, a humanized anti-interleukin-9 monoclonal antibody, in two randomized phase 2a studies in subjects with asthma, *BMC Pulm. Med.*, **11**, 1-10, doi: 10.1186/1471-2466-11-14.
29. Saeki, M., Kaminuma, O., Nishimura, T., Kitamura, N., Mori, A., and Hiroi, T. (2016) Th9 cells elicit eosinophil-independent bronchial hyperresponsiveness in mice, *Allergol. Int.*, **65**, 24-29, doi: 10.1016/j.alit.2016.05.003.
30. Dixon, A. E., Pratley, R. E., Forgione, P. M., Kaminsky, D. A., Whittaker-Leclair, L. A., Griffes, L. A., Garudathri, J., Raymond, D., Poynter, M. E., Bunn, J. Y., and Irvin, C. G. (2011) Effects of obesity and bariatric surgery on airway hyperresponsiveness, asthma control, and inflammation, *J. Allergy Clin. Immunol.*, **128**, 508-515, doi: 10.1016/j.jaci.2011.06.009.
31. Moore, W. C., Hastie, A. T., Li, X., Li, H., Busse, W. W., Jarjour, N. N., Wenzel, S. E., Peters, S. P., Meyers, D. A., and Bleeker, E. R. (2014) Sputum neutrophil counts are associated with more severe asthma phenotypes using cluster analysis, *J. Allergy Clin. Immunol.*, **133**, 1557-1563, doi: 10.1016/j.jaci.2013.10.011.
32. Ray, A., and Kolls, J. K. (2017) Neutrophilic inflammation in asthma and association with disease severity, *Trends Immunol.*, **38**, 942-954, doi: 10.1016/j.it.2017.07.003.
33. Gao, J., and Wu, F. (2018) Association between fractional exhaled nitric oxide, sputum induction and peripheral blood eosinophil in uncontrolled asthma, *Allergy Asthma Clin. Immunol.*, **14**, 1-9, doi: 10.1186/s13223-018-0248-7.
34. Scott, H. A., Gibson, P. G., Garg, M. L., and Wood, L. G. (2011) Airway inflammation is augmented by obesity and fatty acids in asthma, *Eur. Respir. J.*, **38**, 594-602, doi: 10.1183/09031936.00139810.
35. Kim, H. Y., Lee, H. J., Chang, Y. J., Pichavant, M., Shore, S. A., Fitzgerald, K. A., Iwakura, Y., Israel, E., Bolger, K., Faul, J., DeKruyff, R. H., and Umetsu, D. T. (2014) Interleukin-17-producing innate lymphoid cells and the NLRP3 inflammasome facilitate obesity-associated airway hyperreactivity, *Nat. Med.*, **20**, 54-61, doi: 10.1038/nm.3423.
36. Brown, G. D. (2011) Innate antifungal immunity: the key role of phagocytes, *Annu. Rev. Immunol.*, **29**, 1-21, doi: 10.1146/annurev-immunol-030409-101229.
37. Openshaw, P. J. M., Chiu, C., Culley, F. J., and Johansson, C. (2017) Protective and harmful immunity to RSV infection, *Annu. Rev. Immunol.*, **35**, 501-532, doi: 10.1146/annurev-immunol-051116-052206.
38. Simpson, J. L., Daly, J., Baines, K. J., Yang, I. A., Upham, J. W., Reynolds, P. N., Hodge, S., James, A. L., Hugenholtz, P., Willner, D., and Gibson, P. G. (2016) Airway dysbiosis: *Haemophilus influenza* and *Tropheryma* in poorly controlled asthma, *Eur. Respir. J.*, **47**, 792-800, doi: 10.1183/13993003.00405-2015.
39. Polosa, R., and Thomson, N. C. (2013) Smoking and asthma: dangerous liaisons, *Eur. Respir. J.*, **41**, 716-725, doi: 10.1183/09031936.00073312.
40. Kato, T., Takeda, Y., Nakada, T., and Sendo, F. (1995) Inhibition by dexamethasone of human neutrophil apoptosis *in vitro*, *Nat. Immun.*, **14**, 198-208.
41. Gupta, S., Siddiqui, S., Haldar, P., Raj, J. V., Entwisle, J. J., Wardlaw, A. J., Bradding, P., Pavord, I. D., Green, R. H., and Brightling, C. E. (2009) Qualitative analysis of high-resolution CT scans in severe asthma, *Chest*, **136**, 1521-1528, doi: 10.1378/chest.09-0174.
42. Baines, K. J., Simpson, J. L., Wood, L. G., Scott, R. J., and Gibson, P. G. (2011) Transcriptional phenotypes of asthma defined by gene expression profiling of induced sputum samples, *J. Allergy Clin. Immunol.*, **127**, 153-160, doi: 10.1016/j.jaci.2010.10.024.
43. Wu, W., Bleeker, E., Moore, W., Busse, W. W., Castro, M., Chung, K. F., Calhoun, W. J., Erzurum, S., Gaston, B., Israel, E., Curran-Everett, D., and Wenzel, S. E. (2014) Unsupervised phenotyping of severe asthma research program participants using expanded lung data, *J. Allergy Clin. Immunol.*, **133**, 1280-1288, doi: 10.1016/j.jaci.2013.11.042.
44. Raundhal, M., Morse, C., Khare, A., Oriss, T. B., Milosevic, J., Trudeau, J., Huff, R., Pilewski, J., Holguin, F., Kolls, J., Wenzel, S., Ray, P., and Ray, A. (2015) High IFN- γ and low SLPI mark severe asthma in mice and humans, *J. Clin. Invest.*, **125**, 3037-3050, doi: 10.1172/JCI80911.
45. Liu, W., Liu, S., Verma, M., Zafar, I., Good, J. T., Rollins, D., Groshong, S., Gorska, M. M., Martin, R. J., and Alam, R. (2017) Mechanism of TH2/TH17-predominant and neutrophilic TH2/TH17-low subtypes of asthma, *J. Allergy Clin. Immunol.*, **139**, 1548-1558, doi: 10.1016/j.jaci.2016.08.032.
46. Gibson, P. G., Simpson, J. L., and Saltos, N. (2001) Heterogeneity of airway inflammation in persistent asthma: evidence of neutrophilic inflammation and increased sputum interleukin-8, *Chest*, **119**, 1329-1336, doi: 10.1378/chest.119.5.1329.
47. Pelletier, M., Maggi, L., Micheletti, A., Lazzeri, E., Tamassia, N., Costantini, C., Cosmi, L., Lunardi, C., Annunziato, F., Romagnani, S., and Cassatella, M. A. (2010) Evidence for a cross-talk between human neutrophils and Th17 cells, *Blood*, **115**, 335-343, doi: 10.1182/blood-2009-04-216085.

48. Nguyen, T. H., Maltby, S., Simpson, J. L., Eysers, F., Baines, K. J., Gibson, P. G., Foster, P. S., and Yang, M. (2016) TNF- α and macrophages are critical for respiratory syncytial virus-induced exacerbations in a mouse model of allergic airways disease, *J. Immunol.*, **196**, 3547-3558, doi: 10.4049/jimmunol.1502339.
49. Peters, M. C., McGrath, K. W., Hawkins, G. A., Hastie, A. T., Levy, B. D. et al. (2016) Plasma interleukin-6 concentrations, metabolic dysfunction, and asthma severity: a cross-sectional analysis of two cohorts, *Lancet Respir. Med.*, **4**, 574-584, doi: 10.1016/S2213-2600(16)30048-0.
50. Chu, D. K., Al-Garawi, A., Llop-Guevara, A., Pillai, R. A., Radford, K., Shen, P., Walker, T. D., Goncharova, S., Calhoun, W. J., Nair, P., and Jordana, M. (2015) Therapeutic potential of anti-IL-6 therapies for granulocytic airway inflammation in asthma, *Allergy Asthma Clin. Immunol.*, **11**, 1-6, doi: 10.1186/s13223-015-0081-1.
51. Duvall, M. G., Barnig, C., Cernadas, M., Ricklefs, I., Krishnamoorthy, N. et al. (2017) Natural killer cell-mediated inflammation resolution is disabled in severe asthma, *Sci. Immunol.*, **2**, 1-23, doi: 10.1126/sciimmunol.aam5446.
52. Geginat, J., Paroni, M., Maglie, S., Alfen, J. S., Kastirr, I., Gruarin, P., Simone, M. D., Pagani, M., and Abrignani, S. (2014) Plasticity of human CD4 T cell subsets, *Front. Immunol.*, **5**, 1-10, doi: 10.3389/fimmu.2014.00630.
53. Yoneyama, H., Narumi, S., Zhang, Y., Murai, M., Baggiolini, M., Lanzavecchia, A., Ichida, T., Asakura, H., and Matsushima, K. (2002) Pivotal role of dendritic cell-derived CXCL10 in the retention of T helper cell 1 lymphocytes in secondary lymph nodes, *J. Exp. Med.*, **195**, 1257-1266, doi: 10.1084/jem.20011983.
54. Ricciardolo, F. L. M., Sorbello, V., Folino, A., Gallo, F., Massaglia, G. M., Favatà, G., Conticello, S., Vallesse, D., Gani, F., Malerba, M., Folkerts, G., Rolla, G., Profita, M., Mauad, T., Stefano, A. D., and Ciprandi, G. (2017) Identification of IL-17F/frequent exacerbator endotype in asthma, *J. Allergy Clin. Immunol.*, **140**, 395-406, doi: 10.1016/j.jaci.2016.10.034.
55. Agache, I., Ciobanu, C., Agache, C., and Anghel, M. (2010) Increased serum IL-17 is an independent risk factor for severe asthma, *Respir. Med.*, **104**, 1131-1137, doi: 10.1016/j.rmed.2010.02.018.
56. Bullens, D. M. A., Truyen, E., Coteur, L., Dilissen, E., Hellings, P. W., Dupont, L. J., and Ceuppens, J. L. (2006) IL-17 mRNA in sputum of asthmatic patients: linking T cell driven inflammation and granulocytic influx? *Respir. Res.*, **7**, 1-9, doi: 10.1186/1465-9921-7-135.
57. Liang, S. C., Long, A. J., Bennett, F., Whitters, M. J., Karim, R., Collins, M., Goldman, S. J., Dunussi-Joannopoulos, K., Williams, C. M. M., Wright, J. F., and Fouser, L. A. (2007) An IL-17F/A heterodimer protein is produced by mouse Th17 cells and induces airway neutrophil recruitment, *J. Immunol.*, **179**, 7791-7799, doi: 10.4049/jimmunol.179.11.7791.
58. McKinley, L., Alcorn, J. F., Peterson, A., Dupont, R. B., Kapadia, S., Logar, A., Henry, A., Irvin, C. G., Piganelli, J. D., Ray, A., and Kolls, J. K. (2008) TH17 cells mediate steroid-resistant airway inflammation and airway hyperresponsiveness in mice, *J. Immunol.*, **181**, 4089-4097, doi: 10.4049/jimmunol.181.6.4089.
59. Willis, C. R., Siegel, L., Leith, A., Mohn, D., Escobar, S., Wannberg, S., Misura, K., Rickel, E., Rottman, J. B., Comeau, M. R., Sullivan, J. K., Metz, D. P., Tocker, J., and Budelsky, A. L. (2015) IL-17RA signaling in airway inflammation and bronchial hyperreactivity in allergic asthma, *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.*, **53**, 810-821, doi: 10.1165/rcmb.2015-0038OC.
60. Lajoie, S., Lewkowich, I. P., Suzuki, Y., Clark, J. R., Sproles, A. A., Dienger, K., Budelsky, A. L., and Wills-Karp, M. (2010) Complement-mediated regulation of the IL-17A axis is a central genetic determinant of the severity of experimental allergic asthma, *Nat. Immunol.*, **11**, 928-935, doi: 10.1038/ni.1926.
61. Torjusen, E., and Matsui, E. C. (2009) TH17 cells mediate steroid-resistant airway inflammation and airway hyperresponsiveness in mice, *Pediatrics*, **124**, 140, doi: 10.1542/peds.2009-1870DDD.
62. Malmhall, C., Bossios, A., Radinger, M., Sjostrand, M., Lu, Y., Lundback, B., and Lotvall, J. (2012) Immunophenotyping of circulating T helper cells argues for multiple functions and plasticity of T cells *in vivo* in humans – possible role in asthma, *PLoS One*, **7**, 1-11, doi: 10.1371/journal.pone.0040012.
63. Zou, X. L., Chen, Z. G., Zhang, T. T., Feng, D. Y., Li, H. T., and Yang, H. L. (2018) Th17/Treg homeostasis, but not Th1/Th2 homeostasis, is implicated in exacerbation of human bronchial asthma, *Ther. Clin. Risk. Manag.*, **14**, 1627-1636, doi: 10.2147/TCRM.S172262.
64. Norimoto, A., Hirose, K., Iwata, A., Tamachi, T., Yokota, M., Takahashi, K., Saijo, S., Iwakura, Y., and Nakajima, H. (2014) Dectin-2 promotes house dust mite-induced T helper type 2 and type 17 cell differentiation and allergic airway inflammation in mice, *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.*, **51**, 201-209, doi: 10.1165/rcmb.2013-0522OC.
65. Khare, A., Krishnamoorthy, N., Oriss, T. B., Fei, M., Ray, P., and Ray, A. (2013) Cutting edge: inhaled antigen upregulates retinaldehyde dehydrogenase in lung CD103⁺ but not plasmacytoid dendritic cells to induce Foxp3 *de novo* in CD4⁺ T cells and promote airway tolerance, *J. Immunol.*, **191**, 25-29, doi: 10.4049/jimmunol.1300193.
66. Chang, Y., Al-Alwan, L., Risse, P. A., Halayko, A. J., Martin, J. G., Baglole, C. J., Eidelman, D. H., and Hamid, Q. (2012) Th17-associated cytokines promote human airway smooth muscle cell proliferation, *FASEB J.*, **26**, 5152-5160, doi: 10.1096/fj.12-208033.
67. Wang, Q., Li, H., Yao, Y., Xia, D., and Zhou, J. (2010) The overexpression of heparin-binding epidermal growth factor is responsible for Th17-Induced airway remodeling in an experimental asthma model, *J. Immunol.*, **185**, 834-841, doi: 10.4049/jimmunol.0901490.
68. Liu, D., Tan, Y., Bajinka, O., Wang, L., and Tang, Z. (2020) Th17/IL-17 axis regulated by airway microbes get involved in the development of asthma, *Curr. Allergy Asthma Rep.*, **20**, 1-9, doi: 10.1007/s11882-020-00903-x.
69. Kelley, N., Jeltama, D., Duan, Y., and He, Y. (2019) The NLRP3 inflammasome: An overview of mechanisms of activation and regulation, *Inter. J. Mol. Sci.*, **20**, 1-24, doi: 10.3390/ijms20133328.
70. Simpson, J. L., Phipps, S., Baines, K. J., Oreo, K. M., Gunawardhana, L., and Gibson, P. G. (2014) Elevated expression of the NLRP3 inflammasome in neutrophilic asthma, *Eur. Resp. J.*, **43**, 1067-1076, doi: 10.1183/09031936.00105013.
71. Doherty, T. A., and Broide, D. H. (2019) Airway innate lymphoid cells in the induction and regulation of allergy, *Aller. Intern.*, **68**, 9-16, doi: 10.1016/j.alit.2018.11.001.
72. Hekking, P. P., Loza, M. J., Pavlidis, S., de Meulder, B., Lefaudeux, D. et al. (2018) Pathway discovery using transcriptomic profiles in adult-onset severe asthma, *J. Allergy Clin. Immunol.*, **141**, 1280-1290, doi: 10.1016/j.jaci.2017.06.037.
73. Yagami, A., Orihara, K., Morita, H., Futamura, K., Hashimoto, N., Matsumoto, K., Saito, H., and Matsuda, A. (2010) IL-33 mediates inflammatory responses in human lung tissue cells, *J. Immunol.*, **185**, 5743-5750, doi: 10.4049/jimmunol.0903818.
74. Nauseef, W. M., and Borregaard, N. (2014) Neutrophils at work, *Nat. Immunol.*, **15**, 602-611, doi: 10.1038/ni.2921.

75. Liu, T., Wang, F. P., Wang, G., and Mao, H. (2017) Role of neutrophil extracellular traps in asthma and chronic obstructive pulmonary disease, *Chinese Med. J.*, **130**, 730-736, doi: 10.4103/0366-6999.201608.
76. Ogawa, H., Azuma, M., Tsunematsu, T., Morimoto, Y., Kondo, M., Tezuka, T., Nishioka, Y., and Tsuneyama, K. (2018) Neutrophils induce smooth muscle hyperplasia via neutrophil elastase-induced FGF-2 in a mouse model of asthma with mixed inflammation, *Clin. Exp. Allergy*, **48**, 1715-1725, doi: 10.1111/cea.13263.
77. Pillay, J., den Braber, I., Vrsekooop, N., Kwast, L. M., de Boer, R. J., Borghans, J. A. M., Tesselaar, K., and Koenderman, L. (2010) *In vivo* labeling with $^2\text{H}_2\text{O}$ reveals a human neutrophil lifespan of 5.4 days, *Blood*, **116**, 625-627, doi: 10.1182/blood-2010-01-259028.
78. Silvestre-Roig, C., Fridlender, Z. G., Glogauer, M., and Scapini, P. (2019) Neutrophil diversity in health and disease, *Trends Immunol.*, **40**, 565-583, doi: 10.1016/j.it.2019.04.012.
79. Fites, J. S., Gui, M., Kernien, J. F., Negoro, P., Dagher, Z., Sykes, D. B., Nett, J. E., Mansour, M. K., and Klein, B. S. (2018) An unappreciated role for neutrophil-DC hybrids in immunity to invasive fungal infections, *PLoS Pathog.*, **14**, 1-32, doi: 10.1371/journal.ppat.1007073.
80. Pillay, J., Tak, T., Kamp, V. M., and Koenderman, L. (2013) Immune suppression by neutrophils and granulocytic myeloid-derived suppressor cells: similarities and differences, *Cell. Mol. Life Sci.*, **70**, 3813-3827, doi: 10.1007/s00018-013-1286-4.
81. Cowan, D. C., Cowan, J. O., Palmay, R., Williamson, A., and Taylor, D. R. (2010) Effects of steroid therapy on inflammatory cell subtypes in asthma, *Thorax*, **65**, 384-390, doi: 10.1136/thx.2009.126722.
82. Demarche, S., Schleich, F., Henket, M., Paulus, V., Louis, R., and Hees, T. V. (2018) Step-down of inhaled corticosteroids in non-eosinophilic asthma: a prospective trial in real life, *Clin. Exp. Allergy*, **48**, 525-535, doi: 10.1111/cea.13106.
83. Watz, H., Bock, D., Meyer, M., Schierhorn, K., Vollhardt, K., Woischwill, C., Pedersen, F., Kirsten, A., Beeh, K., Meyer-Sabellek, W., Magnussen, H., and Beier, J. (2013) Inhaled pan-selectin antagonist bimosiamose attenuates airway inflammation in COPD, *Pulm. Pharmacol. Ther.*, **26**, 265-270, doi: 10.1016/j.pupt.2012.12.003.
84. Nair, P., Gaga, M., Zervas, E., Alagha, K., Hargreave, F. E., O'Byrne, P. M., Stryzak, P., Gann, L., Sadeh, J., and Chanez, P. (2012) Safety and efficacy of a CXCR2 antagonist in patients with severe asthma and sputum neutrophils: a randomized, placebo-controlled clinical trial, *Clin. Exp. Allergy*, **42**, 1097-1103, doi: 10.1111/j.1365-2222.2012.04014.x.
85. Leaker, B. R., Barnes, P. J., and O'Connor, B. (2013) Inhibition of LPS-induced airway neutrophilic inflammation in healthy volunteers with an oral CXCR2 antagonist, *Respir. Res.*, **14**, 1-9, doi: 10.1186/1465-9921-14-137.
86. O'Byrne, P. M., Metev, H., Puu, M., Richter, K., Keen, C., Uddin, M., Larsson, B., Cullberg, M., and Nair, P. (2016) Efficacy and safety of a CXCR2 antagonist, AZD5069, in patients with uncontrolled persistent asthma: a randomised, double-blind, placebo-controlled trial, *Lancet Respir. Med.*, **4**, 797-806, doi: 10.1016/S2213-2600(16)30227-2.
87. Wenzel, S. E., Barnes, P. J., Bleeker, E. R., Bousquet, J., Busse, W., Dahlén, S. E., Holgate, S. T., Meyers, D. A., Rabe, K. F., Antczak, A., Baker, J., Horvath, I., Mark, Z., Bernstein, D., Kerwin, E., Schlenker-Herzeg, R., Lo, K. H., Watt, R., Barnathan, E. S., and Chanez, P. (2009) A randomized, double-blind, placebo-controlled study of tumor necrosis factor- α blockade in severe persistent asthma, *Am. J. Respir. Crit. Care Med.*, **179**, 549-558, doi: 10.1164/rccm.200809-1512OC.
88. Morjaria, J. B., Chauhan, A. J., Babu, K. S., Polosa, R., Davies, D. E., and Holgate, S. T. (2008) The role of a soluble TNF α receptor fusion protein (etanercept) in corticosteroid refractory asthma: a double blind, randomised, placebo controlled trial, *Thorax*, **63**, 584-591, doi: 10.1136/thx.2007.086314.
89. Michel, O., Dinh, P. H. D., Doyen, V., and Corazza, F. (2014) Anti-TNF inhibits the Airways neutrophilic inflammation induced by inhaled endotoxin in human, *BMC Pharmacol. Toxicol.*, **15**, 1-10, doi: 10.1186/2050-6511-15-60.
90. Busse, W. W., Holgate, S., Kerwin, E., Chon, Y., Feng, J., Lin, J., and Lin, S. (2013) Randomized, double-blind, placebo-controlled study of Brodalumab, a human anti-IL-17 receptor monoclonal antibody, in moderate to severe asthma, *Am. J. Respir. Crit. Care Med.*, **188**, 1294-1302, doi: 10.1164/rccm.201212-2318OC.
91. NCT03299686 (2019) Study to assess the efficacy and safety of CJM112 in patients with inadequately controlled severe asthma.
92. Hernandez, M. L., Mills, K., Almond, M., Todoric, K., Aleman, M. M., Zhang, H., Zhou, H., and Peden, D. B. (2015) IL-1 receptor antagonist reduces endotoxin-induced airway inflammation in healthy volunteers, *J. Allergy Clin. Immunol.*, **135**, 379-385, doi: 10.1016/j.jaci.2014.07.039.
93. NCT02443298 (2018) Efficacy and safety of BI 655066/ABBV-066 (Risankizumab) in patients with severe persistent asthma.
94. Cahill, K. N., Katz, H. R., Cui, J., Lai, J., Kazani, S., Crosby-Thompson, A., Garofalo, D., Castro, M., Jarjour, N., DiMango, E., Erzurum, S., Trevor, J. L., Shenoy, K., Chinchilli, V. M., Wechsler, M. E., Laidlaw, T. M., Boyce, J. A., and Israel, E. (2017) KIT inhibition by imatinib in patients with severe refractory asthma, *N. Engl. J. Med.*, **376**, 1911-1920, doi: 10.1056/NEJMoal613125.
95. Simpson, J. L., Powell, H., Boyle, M. J., Scott, R. J., and Gibson, P. G. (2008) Clarithromycin targets neutrophilic airway inflammation in refractory asthma, *Am. J. Respir. Crit. Care Med.*, **177**, 148-155, doi: 10.1164/rccm.200707-1134OC.
96. Gibson, P. G., Yang, I. A., Upham, J. W., Reynolds, P. N., Hodge, S., James, A. L., Jenkins, C., Peters, M. J., Marks, G. B., Baraket, M., Powell, H., Taylor, S. L., Leong, L. E. X., Rogers, G. B., and Simpson, J. L. (2017) Effect of azithromycin on asthma exacerbations and quality of life in adults with persistent uncontrolled asthma (AMAZES): a randomised, double-blind, placebo-controlled trial, *Lancet*, **390**, 659-668, doi: 10.1016/S0140-6736(17)31281-3.
97. Bardin, P., Kannies, F., Gauvreau, G., Bredenbröcker, D., and Rabe, K. F. (2015) Roflumilast for asthma: efficacy findings in mechanism of action studies, *Pulm. Pharmacol. Ther.*, **35**, 4-10, doi: 10.1016/j.pupt.2015.08.006.
98. Meltzer, E. O., Chervinsky, P., Busse, W., Ohta, K., Bardin, P., Bredenbröcker, D., and Bateman, E. D. (2015) Roflumilast for asthma: efficacy findings in placebo-controlled studies, *Pulm. Pharmacol. Ther.*, **35**, 20-27, doi: 10.1016/j.pupt.2015.10.006.
99. Bateman, E. D., Bousquet, J., Aubier, M., Bredenbröcker, D., and O'Byrne, P. M. (2015) Roflumilast for asthma: efficacy findings in non-placebo-controlled comparator and dosing studies, *Pulm. Pharmacol. Ther.*, **35**, 11-19, doi: 10.1016/j.pupt.2015.10.002.
100. Rabe, K. F., Calverley, P. M. A., Martinez, F. J., and Fabbri, L. M. (2017) Effect of roflumilast in patients with severe COPD and a history of hospitalisation, *Eur. Resp. J.*, **50**, 1-4, doi: 10.1183/13993003.00158-2017.

MODERN VIEW ON THE MOLECULAR MECHANISMS OF NEUTROPHILIC BRONCHIAL ASTHMA AND PROSPECTS OF ITS THERAPY

Review

I. P. Shilovskiy*, A. A. Nikolskii, O. M. Kurbacheva, and M. R. Khaitov

*National Research Center – Institute of Immunology of Federal Medico-Biological Agency,
115522 Moscow, Russia; E-mail: ip.shilovsky@nrcii.ru*

Received March 25, 2020

Revised June 10, 2020

Accepted June 27, 2020

For a long time asthma was commonly considered as a homogeneous disease. However, recent studies provide increasing evidence of its heterogeneity and existence of different phenotypes of the disease. Currently, classification of asthma into several phenotypes is based on clinical and physiological features, anamnesis, and response to therapy. This review describes five most frequently identified asthma phenotypes. Neutrophilic asthma (NA) deserves special attention, since neutrophilic inflammation of the lungs is closely associated with severity of the disease and with the resistance to conventional corticosteroid therapy. This review focuses on molecular mechanisms of neutrophilic asthma pathogenesis and on the role of Th1- and Th17-cells in the development of this type of asthma. In addition, this review presents current knowledge of biology of neutrophils. It has been established that human neutrophils are represented by at least three subpopulations with different biological functions. Therefore, total elimination of neutrophils from the lungs can result in negative consequences. Based on the new knowledge of NA pathogenesis and biology of neutrophils, the review summarizes current approaches for treatment of neutrophilic asthma and suggests new promising ways to treat this type of asthma that could be developed in future.

Keywords: bronchial asthma phenotypes, Th17-cells, neutrophil

ТРАНСЛЕЗИОННЫЙ СИНТЕЗ И РЕ-ИНИЦИАЦИЯ СИНТЕЗА ДНК В ФОРМИРОВАНИИ УСТОЙЧИВОСТИ К ХИМИОТЕРАПИИ

Обзор

© 2020 Е.С. Шилкин¹, Е.О. Болдинова¹, А.Д. Столяренко¹, Р.И. Гончарова²,
Р.Н. Чупров-Неточин³, М.П. Смаль^{2*}, А.В. Макарова^{1*}

¹ ФГБУН Институт молекулярной генетики РАН, 123182 Москва, Россия;
электронная почта: atakarova-img@yandex.ru

² Институт генетики и цитологии НАН Беларуси, 220072 Минск, Беларусь; электронная почта: m.smal@igc.by

³ ФГАОУ ВО Московский физико-технический институт (Национальный исследовательский университет),
141701 Долгопрудный, Московская область, Россия

Поступила в редакцию 16.04.2020

После доработки 26.06.2020

Принята к публикации 26.06.2020

Многие препараты химиотерапии блокируют деление опухолевых клеток, повреждая ДНК. ДНК-полимеразы эта (Pol η), йота (Pol ι), каппа (Pol κ), REV1 Y-семейства и зета (Pol ζ) В-семейства эффективно включают нуклеотиды напротив ряда повреждений ДНК в ходе транслезионного синтеза. Праймаза-полимераза PrimPol и комплекс ДНК-полимераза альфа-праймаза ре-инициируют синтез ДНК с помощью праймазной активности. Эти ферменты могут снижать эффективность препаратов химиотерапии, способствовать выживанию опухолевых клеток и прогрессированию злокачественных заболеваний. ДНК-полимеразы являются перспективными мишенями для повышения эффективности химиотерапии, а мутации и полиморфизмы некоторых ДНК-полимераз могут служить дополнительными прогностическими маркерами при выборе терапии ряда онкологических заболеваний.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: транслезионный синтез ДНК, реинициация синтеза, репликация повреждения ДНК, резистентность к препаратам химиотерапии.

DOI: 10.31857/S0320972520080035

ВВЕДЕНИЕ

При делении клеток ДНК-полимераза (ДНКП) удваивают ДНК в ходе репликации. Многосубъединичные репликативные ДНКП В-семейства дельта (Pol δ), эпсилон (Pol ε) и альфа (Pol α) обеспечивают точное копирование геномной ДНК: комплекс Pol α-праймаза инициирует репликацию и синтезирует РНК-ДНК-праймеры, тогда как Pol ε и Pol δ копируют большую часть ДНК на лидирующей и отстающей цепях соответственно [1, 2]. Многие повреждения ДНК блокируют работу репликативных ДНКП, вызывая остановку репликации [3]. Существует несколько уровней защиты от пов-

реждений ДНК. Основным механизмом защиты является репарация, в ходе которой большинство поврежденных оснований и нуклеотидов удаляются из ДНК. Для защиты от повреждений, которые избежали репарации, запускается альтернативный механизм — «синтез через повреждение», или транслезионный синтез ДНК. ДНКП Y-семейства йота (Pol ι), эта (Pol η), каппа (Pol κ), REV1 и В-семейства зета (Pol ζ) эффективно включают нуклеотиды напротив повреждений ДНК в ходе транслезионного синтеза и способствуют преодолению блоков репликации (рис. 1) [4–7].

В отличие от репликативных ДНКП, транслезионные ДНКП обладают низкой точностью синтеза на неповрежденной ДНК и, защищая клетки от повреждений, являются источником мутаций в организме. Нарушения в работе этих ферментов повышают риск развития онкологических заболеваний. Функции транслезионных ДНКП и их роль в канцерогенезе и защите от онкологических заболеваний рассмотрена в недавнем обзоре [10]. В настоящем обзоре рассматри-

Принятые сокращения: ДНКП — ДНК-полимераза; XP-V — xeroderma pigmentosum variant (вариант пигментной ксеродермы); MAF — minor allele frequency (частота минорного аллеля); OR — odds ratio (отношение шансов); HR — hazard ratio (отношение рисков); RIR — REV1 interacting region (район взаимодействия с REV1); UBM2 — ubiquitin-binding motif 2 (убиквитин-связывающий мотив 2).

* Адресат для корреспонденции.

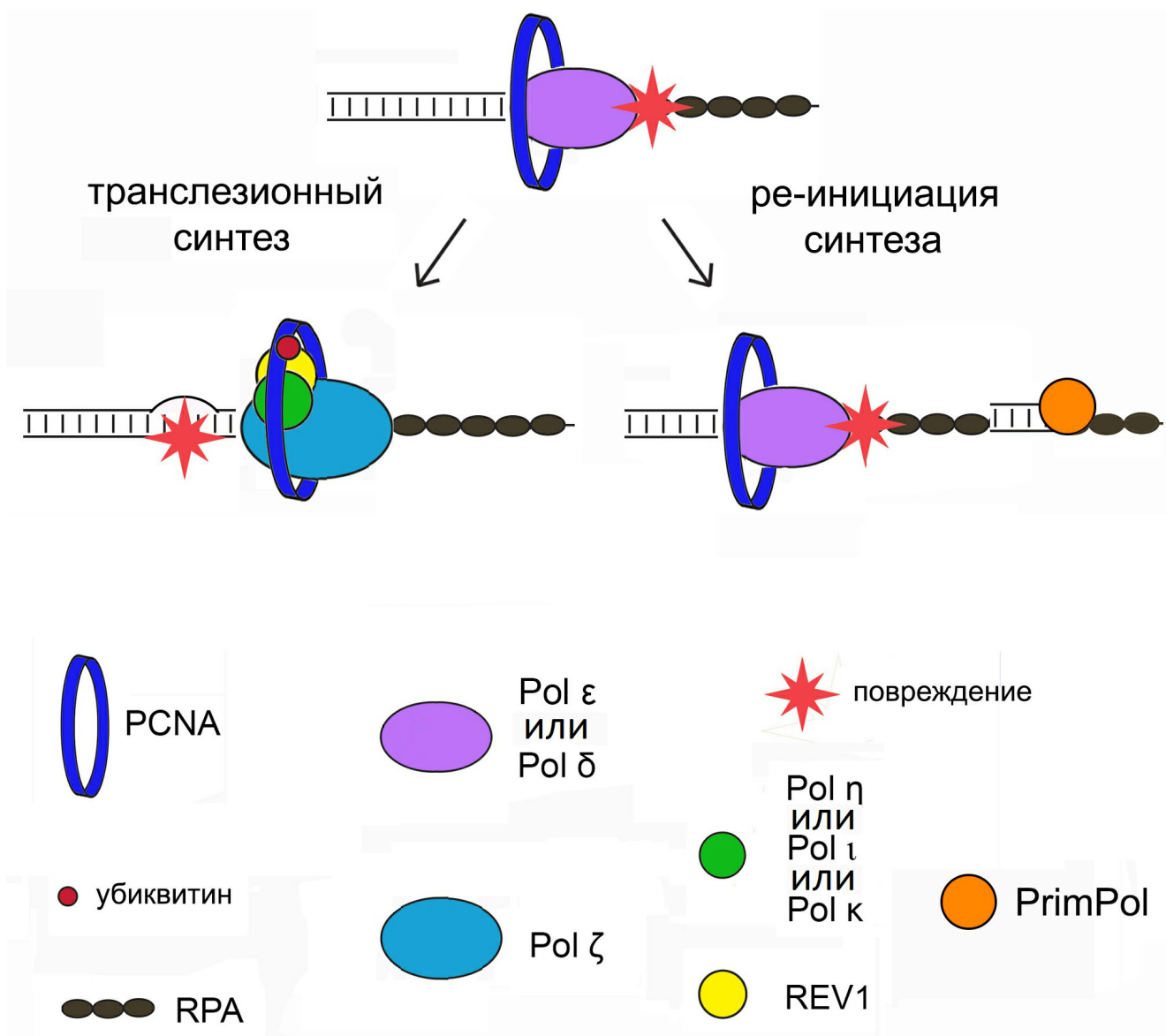


Рис. 1. Транслезионный синтез ДНК и ре-инициация синтеза ДНК с участием PrimPol. После остановки репликативной ДНКП В-семейства Pol δ или Pol ϵ в поврежденном участке ДНК происходит убиквитинирование PCNA и переключение на транслезионный синтез. Транслесомы состоят из ДНКП Y-семейства Pol η , Pol ι или Pol κ («инserter»), ДНКП В-семейства Pol ζ («экстендер»), а также ДНКП Y-семейства REV1 — белка, который одновременно взаимодействует с PCNA и остальными ДНКП и выполняет координирующую и регуляторную функции [4–7]. Репликация может быть также запущена праймазами с помощью репрайминга. ДНК-праймаза и ДНК-полимераза PrimPol синтезирует ДНК *de novo* на лидирующей цепи и взаимодействует с RPA, но не PCNA [8, 9]. (С цветными вариантами рис. 1 и 2 можно ознакомиться в электронной версии статьи на сайте: <http://sciencejournals.ru/journal/biokhsm/>)

валяется роль Pol η , Pol ι , Pol κ , REV1 и Pol ζ в репликации ДНК, содержащей повреждения, вызванные химиотерапевтическими препаратами, обсуждаются роль этих ферментов в механизмах резистентности к химиотерапии и успехи в получении ингибиторов транслезионных ДНКП, а также роль ре-инициации репликации ДНК (с помощью ДНК-праймазы и ДНК-полимеразы PrimPol и комплекса Pol α -праймаза) в развитии устойчивости к химиотерапии.

ПРОТИВООПУХОЛЕВЫЕ ПРЕПАРАТЫ, БЛОКИРУЮЩИЕ РЕПЛИКАЦИЮ

Действие многих химиотерапевтических препаратов основано на блокировании репликации быстро делящихся опухолевых клеток с помощью повреждения ДНК. К таким препаратам относят аналоги нуклеозидов, алкилирующие соединения (производные бис- β -хлорэтиламина и нитрозомочевины, митомицин С) и

препараты платиновой группы (цисплатин, оксалиплатин), вызывающие внутринитевые и межнитевые сшивки ДНК [11].

Препараты платиновой группы. К препаратам платиновой группы относят 4-замещенные комплексы Pt^{2+} , содержащие, как правило, две прочные координационные связи с молекулами аммиака или аминами, а две другие — с лабильными лигандами (например, анионом Cl^-). В зависимости от взаимного расположения лигандов различают *цис*- и *транс*-комплексы платины. Одним из наиболее известных и используемых препаратов является *цис*-диамминдихлороплатина (II) — цисплатин (рис. 2, а). В клетки цисплатин попадает с помощью диффузии и в результате работы белков-транспортеров [12, 13]. Внутри клеток из-за низкой концентрации Cl^- -ионов происходит замещение Cl^- в составе комплекса на молекулы воды. Активированная гидратированная форма цисплатина атакует нуклеофильные сайты N7-атомов пуриновых оснований ДНК [14]. Сначала образуется моноаддукт, и в зависимости от расположения второго пурина возможно образование 1,2-GG- (65%), 1,2-AG- (25%) и 1,3-GNG- (5–10%) -внутрицепочечных сшивок ДНК и малого количества (<1–3%) межцепочечных сшивок ДНК [15, 16]. Цисплатиновые повреждения ДНК ингибируют репликацию и транскрипцию, приводят к остановке клеточного цикла в G2-фазе и апоптозу [11].

Митомицин С относится к группе противоопухолевых антибиотиков, продуцируемых *Streptomyces caespitosus* (рис. 2, б). Митомицин С является бифункциональным алкилирующим агентом и реагирует с ДНК после внутриклеточной восстановительной активации оксидоредуктазами [17, 18.]. Митомицин С проявляет высокую субстратную специфичность, алкилируя экспонированные в малую бороздку ДНК N²-атомы гуаниновых оснований, хотя в ряде случаев (например, при активации ДТ-диафоразой) возможно образование аддуктов по N7-атому G [19]. Алкилирование N²-dG зависит от сиквенс-контекста и происходит преимущественно в CpG-островках, что объясняется стабилизацией молекулы митомицина С во время атаки N²-атома первого G взаимодействием с гуаниновым основанием в комплементарной цепи ДНК [18]. Таким образом, основным продуктом бифункционального присоединения митомицина С к ДНК являются межцепочечные G-G сшивки в CpG-островках и реже — внутрицепочечные 1,2-GG-аддукты (рис. 2, б) [20, 21.].

Производные бис-β-хлорэтиламина (азотистые иприты) — класс алкилирующих агентов, среди которых клинически важными являются бифункциональные производные оксазафосфо-

рина (циклофосфамид и др.), мелфалан, хлорамбуцил. Структура циклофосфамида показана на рис. 2, в. Данные препараты реагируют с ДНК через образование нестабильных активных азиридиновых интермедиатов, атакующих преимущественно N7-атомы G. Соединения образуют межцепочечные сшивки между N7-атомами G в GNC-контексте [22, 23]. Минимальное расстояние между двумя G в такой последовательности больше, чем длина сшивающего фрагмента, и предполагается, что это приводит к изгибу структуры ДНК [24].

Производные нитрозомочевины — ещё одна группа бифункциональных алкилирующих препаратов, к которым относятся фотемустин, кармустин, ломустин и стрептозоцин. Соединения этой группы легко проникают через гематоэнцефалический барьер и широко используются в терапии опухолей головного мозга [25, 26]. Структура фотемустина показана на рис. 2, г. При физиологических значениях pH производные нитрозомочевины гидролизуются с образованием 2-хлорэтилдизагоксида. В ходе электрофильной атаки ДНК по O⁶- и N7-атомам гуанина образуются различные 2-хлорэтилпроизводные [26]. Нуклеофильная атака по второму реакционному центру моноаддуктов приводит к образованию внутрицепочечных сшивок между N7-атомами соседних G или внутримолекулярной циклизации между O⁶- и N1-атомами G. При атаке N3-атома комплементарного C образуется межцепочечная сшивка [27].

Алкилирующие триазины (дакарбазин и производные) и **тетразины** (темозоломид) — группа монофункциональных алкилирующих препаратов. Структура темозоломида показана на рис. 2, д. В ходе ферментативной (дакарбазин) или спонтанной активации в физиологических условиях (темозоломид) образуется реакционноспособный катион метилдiazония, который неселективно метилирует основания ДНК. В продуктах реакции обнаружены O⁶-метилгуанин (6–8%), N7-метилгуанин (70%), N1- и N3-метилладенин (15% и 10%) и N3-метилцитозин (<1%) [28, 29]. O⁶-метилгуанин образует пару с включаемымся dTTP, что приводит к резкому возрастанию числа мутаций при репликации ДНК [30].

Антиметаболиты-антагонисты нуклеотидов. Широкое распространение из этой группы препаратов получили аналоги пуриновых нуклеозидов флударабин, кладрибин, клофарабин и аналоги цитидина цитарабин и гемцитабин (рис. 2, е) [31]. Большинство соединений представляют собой модифицированные нуклеозиды и при попадании в клетку фосфорилируются до нуклеозидтрифосфатов — нуклеотидов. Такие нуклеотиды конкурируют с клеточными dNTP за

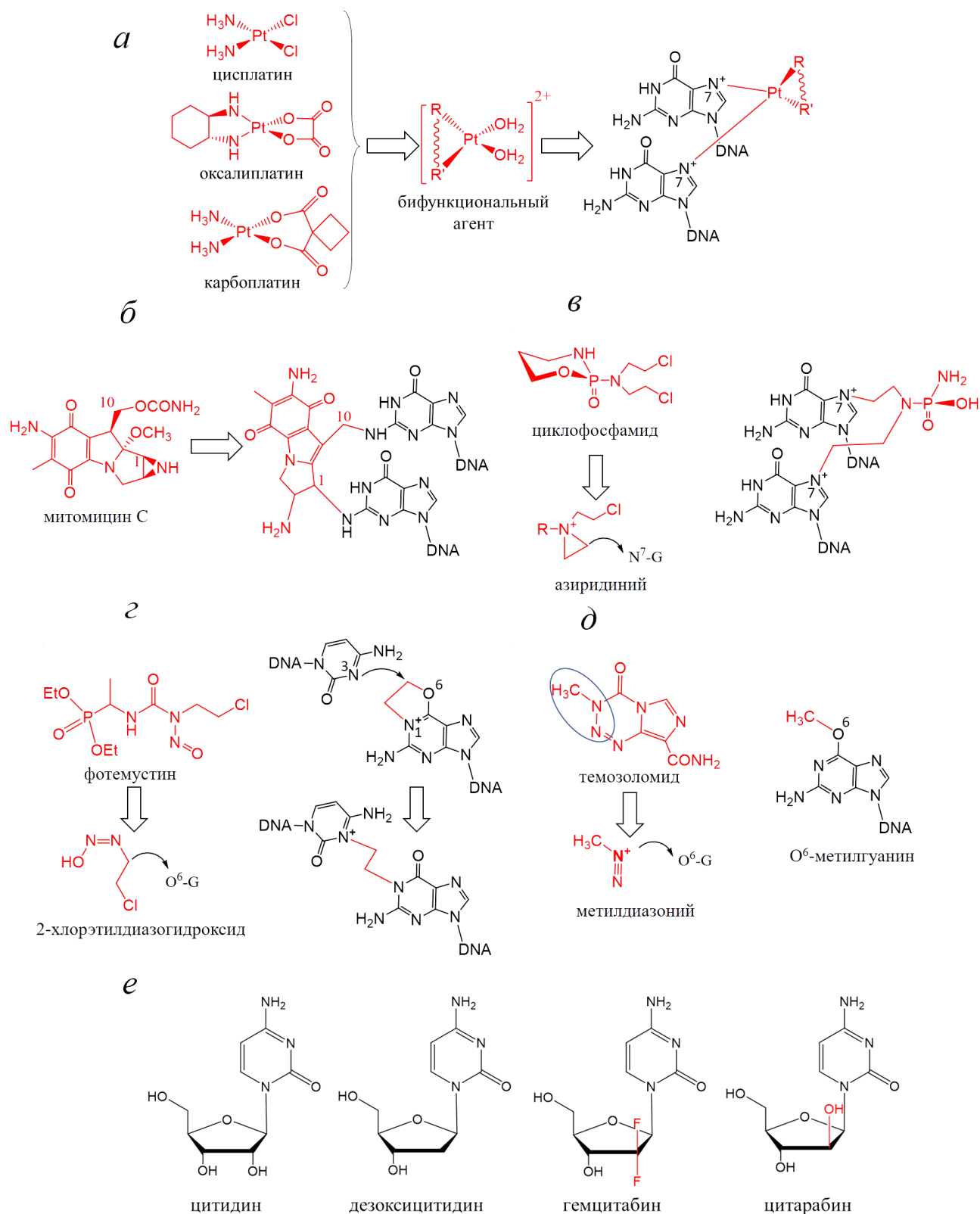


Рис 2. Химиотерапевтические препараты, модифицирующие ДНК. На рисунке показаны препараты платины (а), бифункциональные (б, в, г) и монофункциональные (д) алкилирующие соединения и аналоги цитидина (е). Красным показаны молекулы препаратов и их активные производные (а–д) или выделены группы, отличающие соединение от цитидина (е). Синим овалом на рис. д изображена часть молекулы темозоломида, являющаяся предшественником для метилдiazония

связывание с ДНКП и включаются в растущую цепь ДНК, терминируя синтез и блокируя репликацию в активно делящихся опухолевых клетках [32]. Некоторые препараты дополнительно ингибируют другие клеточные ферменты. Например, гемцитабин, F-атомы которого имитируют ОН-группу рибонуклеотидов, ингибирует рибонуклеотидредуктазу, СТР-синтазу и тимидилатсинтазу, а также РНК-полимеразу, блокируя транскрипцию [33].

Данный список препаратов не является полным. Например, не были рассмотрены антрациклиновые антибиотики и ингибиторы топоизомераз. Эти темы освещены в обзорах [34, 35].

ТРАНСЛЕЗИОННЫЙ СИНТЕЗ И ХИМИОТЕРАПИЯ

Согласно двухполимеразной модели, в процессе транслезионного синтеза полимеразы «инсертер» Y-семейства Pol η, Pol ι или Pol κ включает нуклеотиды непосредственно напротив поврежденного участка ДНК, после чего происходит переключение на полимеразу-«экстендер» B-семейства Pol ζ (рис. 1) [5].

Pol η и Pol ι. Мутации, которые приводят к потере или снижению активности Pol η, вызывают развитие варианта наследственной пигментной ксеродермы (xeroderma pigmentosum variant, XP-V), характеризующегося высокой частотой опухолей кожи [36]. Защитное антиканцерогенное действие Pol η в клетках кожи обусловлено эффективным и точным транслезионным синтезом напротив тимин-тиминовых димеров, образующихся под влиянием ультрафиолета [36].

Pol η также эффективнее других ДНКП осуществляет транслезионный синтез на ДНК-матрицах с внутрицепочечными сшивками, образующимися под действием препаратов платиновой группы цисплатина и оксалиплатина [37–41]. Нокдаун *POLH*, кодирующего Pol η, снижает эффективность транслезионного синтеза напротив внутринитевой цисплатиновой сшивки в клетках U2OS ~ в 2 раза [42]. Предполагается, что в культуре клеток высокий уровень экспрессии *POLH* вызывает резистентность клеток опухолей яичников, легких и мочевого пузыря к цисплатину, а снижение уровня экспрессии *POLH* сенситизирует клетки яичников и легких к действию препарата [43–45]. Интересно, что потеря *POLH* подавляет рост клеток ксенографта* опухоли легких человека H1975 после

пересадки бестимусным мышам даже без терапии [45]. Это может быть связано с участием Pol η в транслезионном синтезе напротив эндогенных повреждений.

Показано, что высокий уровень экспрессии *POLH* в клетках опухолей повышает уровень смертности среди пациентов с немелкоклеточным раком легкого и аденокарциномой желудка, что может быть связано со снижением эффективности химиотерапии цисплатином или оксалиплатином у данной группы пациентов [46, 47]. Напротив, падение активности Pol η в опухолевых клетках пациентов с пигментной ксеродермой XP-V фенотипа обуславливает высокую эффективность химиотерапии цисплатином, и делает цисплатин у данной группы пациентов препаратом выбора [48]. Следует отметить, что из-за повышенной чувствительности клеток к цисплатину у XP-V пациентов при химиотерапии чаще развиваются побочные эффекты (потеря слуха, повреждение почек, миелосупрессия) [49]. Это необходимо учитывать при выборе дозировки.

Кроме того, исследования активности Pol η *in vitro* и в культуре клеток позволяют предположить, что Pol η может снижать эффективность таких химиотерапевтических препаратов, как цитарабин и гемцитабин [50–53]. Показан также эффективный и высокоошибочный транслезионный синтез Pol η и Pol κ на ДНК-матрицах с аддуктами тамоксифена — модулятора рецепторов эстрогена, который используется для лечения эстроген-зависимых опухолей [54]. Индуцированные Pol η и Pol κ мутации могут быть связаны с генотоксическими свойствами препарата.

Pol ι является ближайшим гомологом Pol η [55]. Данные об участии Pol ι в развитии резистентности к препаратам платиновой и алкилирующей групп в литературе отсутствуют. Однако способность Pol ι к транслезионному синтезу на участках ДНК с межнитевыми сшивками была показана *in vitro* для аддуктов псоралена, который используется в фотохимиотерапии псориаза [56]. Как и Pol η, Pol ι эффективно включает dNTP на матрицах с аддуктами цитарабина, и нокдаун *POLI*, кодирующего Pol ι, приводит к падению выживаемости клеток после обработки этим препаратом [53].

Pol κ. *In vitro* Pol κ «проходит» межнитевые сшивки разной структуры между остатками N²-G [57, 58], аддукты тамоксифена [54] и эффективно продолжает синтез от концов праймеров, спаренных с внутринитевой цисплатиновой сшивкой [59]. Вклад Pol κ в развитие резистентности к препаратам химиотерапии подтверждается работами на культурах клеток и модельных

* Ксенографт — экспериментальная онкологическая модель, использующая привитые животным (например, мышам) опухоли человека.

Таблица 1. Полиморфные варианты транслезионных ДНКП, ассоциированные с ответом на лечение и исходом заболевания при применении препаратов платины (если не указано иное), 5-фторурацила и дакомитиниба

ДНКП	Полиморфизм*	MAF	Связь генотипа с заболеванием	Ссылки
Pol κ	синонимичная замена, rs3213801	0,226	AA ассоциирован с ответом на лечение при раке легкого (OR = 1,91; 95%CI 1,00–3,54)	[64]
	интрон, rs5744533	0,238	AA ассоциирован с ответом на лечение при раке легкого (OR = 1,91; 95%CI 1,00–3,54)	[64]
	интрон, rs5744655	0,013	AA ассоциирован с отсутствием ответа на лечение при раке легкого (OR = 0,46; 95%CI 0,23–0,99)	[64]
	интрон, rs3756558	0,136	GG ассоциирован с низкой степенью общей (OR = 0,69; 95%CI 0,50–0,94) и гематологической токсичности при раке легкого (OR = 0,71; 95%CI 0,50–0,98)	[64]
	интрон, rs10077427	0,133	GG ассоциирован с лучшей выживаемостью до прогрессирования при раке легкого (HR = 0,55; 95%CI 0,41–0,73)	[64]
	5'-UTR, rs5744545	0,102	AG и GG ассоциированы с низкой выживаемостью до прогрессирования при раке легкого (HR = 2,19; 95%CI 1,53–2,55)	[64]
Pol ζ: REV3L	3'-UTR, rs465646	0,195	лучшая общая выживаемость при мезотелиоме (HR = 0,50; 95%CI 0,30–0,83)	[65]
			высокая степень гематологической токсичности при раке легкого (OR = 2,54; 95%CI 1,17–5,42)	[66]
	миссенс-замена, T1224I, rs462779	0,330	лучшая общая выживаемость при мезотелиоме (HR = 0,58; 95%CI 0,36–0,92)	[65]
			низкий уровень общей выживаемости при остеосаркоме (HR = 2,60; 95%CI 1,18–5,74)	[67]
			низкий риск тромбоцитопении при раке легкого (OR = 0,40; 95%CI 0,20–0,78)	[68]
			СТ и ТТ ассоциированы с гастроинтестинальной токсичностью при мезотелиоме (OR = 2,71; 95%CI 1,18–6,21)	[65]
	интрон, rs240969	0,207	GG ассоциирован с ответом на лечение при раке легкого (OR = 0,55; 95%CI 0,36–0,83)	[66]
	интрон, rs240966	0,28	аллель G ассоциирован с низкой степенью гематологической токсичности при раке легкого (OR = 0,44; 95%CI 0,21–0,94)	[66]
	интрон, rs4945880	0,059	GG ассоциирован с высокой степенью гематологической токсичности при раке легкого (OR = 1,50; 95%CI 1,05–2,15)	[66]
	миссенс-замена, R2762Q, rs3218592	0,0009	аллель Т обнаружен у пациентов с метастатическим колоректальным раком, не ответивших на лечение 5-фторурацилом	[69]
	соматические мутации G1398V, I1992fs, Y2479fs		чувствительность к дакомитинибу при плоскоклеточной карциноме головы и шеи	[70]
Pol ζ: REV7 (MAD2L2)	интрон, rs2233025	0,172	аллель G ассоциирован с низкой степенью гематологической токсичности при раке легкого (OR = 0,29; 95%CI 0,10–0,82)	[66]

Окончание таблицы 1

ДНКП	Полиморфизм*	MAF	Связь генотипа с заболеванием	Ссылки
REV1	миссенс-замена, V138M, rs3087403	0,260	риск лейкопении (OR = 2,74; 95%CI 1,24–6,06) и нейтропении (OR = 2,07; 95%CI 1,01–4,24) при мезотелиоме	[65]
			низкий уровень общей выживаемости при остеосаркоме (HR = 4,44; 95%CI 1,92–10,27)	[67]
	миссенс-замена, F257S, rs3087386	0,398	AA и AG ассоциированы с низким риском нейтропении при мезотелиоме (OR = 0,44; 95%CI 0,21–0,92)	[65]
			низкая выживаемость при раке легкого (HR = 1,92; 95%CI 1,08–3,39)	[71]
	интрон, rs3792136	0,142	низкая выживаемость при раке легкого (HR = 2,36; 95%CI 1,30–4,25)	[71]

Примечание. * Синонимичные замены и замены в интронах могут нарушать сплайсинг или влиять на уровень экспрессии, затрагивая регуляторные области.

животных. Pol κ в кооперации с Pol ζ с низкой точностью «проходит» цисплатиновые внутрицепочечные сшивки в клетках U2OS ~ в 30% случаев [42]. Потеря функции Pol κ повышает как чувствительность клеток к митомицину C, так и частоту индуцированного мутагенеза в культуре клеток человека и у мышей [60, 61]. Наконец, показано участие Pol κ в независимой от репликации репарации сшивок, образованных цисплатином и митомицином C, в неделящихся клетках [62, 63].

Ассоциация полиморфизмов *POLK* с повышенной чувствительностью к препаратам платиновой группы показана у пациентов с мелкоклеточным раком легких [64] (табл. 1).

Pol ζ состоит из нескольких субъединиц: каталитической REV3 и регуляторных REV7 (в форме димера), POLD2 (p50) и POLD3 (p66) [72–75]. Функции ДНКП Y-семейства частично взаимозаменяемы, тогда как роль Pol ζ в транслезионном синтезе является уникальной. Pol ζ играет роль в развитии устойчивости разных типов клеток и опухолей к цисплатину [76–82], 5-фторурацилу [83] и препаратам алкилирующего действия темозоломиду и фотемустину [84]. Показано, что Pol ζ повышает эффективность транслезионного синтеза Pol η напротив цисплатиновых сшивок *in vitro* [73]. В клетках U2OS Pol ζ осуществляет до 80% событий транслезионного синтеза напротив внутринитевой цисплатиновой сшивки в кооперации с Pol η или Pol κ [42]. Подавление уровня экспрессии каталитической субъединицы Pol ζ *REV3L* в клетках карциномы головы и шеи, немелкоклеточного рака легкого, глиомы головного мозга, рака шейки матки, а также подавление *Rev3l* непосредственно в опухолях при метастазирующем

раке легких и лимфомах у мышей приводит к хорошему ответу на препараты химиотерапии [76, 77, 80, 81, 85–87].

Полиморфизмы гена *REV3L* оказывают влияние на эффективность химиотерапии цисплатином у пациентов с остеосаркомой и мезотелиомой [65, 67], и дакомитинибом у пациентов с плоскоклеточными карциномами головы и шеи (соматические мутации) [70] (табл. 1). Высокий уровень экспрессии регуляторной субъединицы Pol ζ *REV7* вызывает устойчивость к радиотерапии [88], а также коррелирует с негативным прогнозом, и является независимым прогностическим фактором развития устойчивости к ритуксимабу (препарат на основе моноклональных антител к CD20 антигену В-лимфоцитов) у пациентов с В-клеточными лимфомами, хотя механизм развития устойчивости неясен [89].

REV1 относится к Y-семейству ДНКП, однако обладает низкой полимеразной активностью и включает только dCMP напротив неповрежденных матричных нуклеотидов, AP-сайтов и N^2 -аддуктов гуанина в материнской цепи ДНК [4, 5, 90–92]. REV1 играет важную структурную и регуляторную роли в процессе транслезионного синтеза. REV1 взаимодействует с другими полимеразми Y-семейства, с Pol ζ и с фактором процессивности PCNA, координируя сборку и работу транслесомы [4, 5].

Высокий уровень экспрессии *REV1* вызывает устойчивость клеток карциномы яичника к цисплатину [93, 94]. Низкий уровень экспрессии *REV1* сопровождается полной регрессией плоскоклеточных карцином головы и шеи после комбинированной химиотерапии и лучевой терапии, а высокий уровень экспрессии коррелирует с устойчивостью к радиотерапии [95]. Ис-

следования на модели *Em-tus* мышей, доклинической модели лимфомы Беркитта, показали, что подавление экспрессии *Rev1* снижает мутагенез, индуцированный цисплатином и циклофосфамидом, и предупреждает развитие резистентности к циклофосфамиду [87].

Полиморфизмы *REV1*, в частности, аминокислотная замена V138M (rs3087403), оказывают влияние на эффективность химиотерапии цисплатином у пациентов с остеосаркомой [67], а полиморфизм F257S может служить маркером негативного прогноза при раке легких [71] (табл. 1).

ИНГИБИТОРЫ ТРАНСЛЕЗИОННОГО СИНТЕЗА ДНК

Подавление клеточных механизмов толерантности к повреждениям ДНК может повысить эффективность химиотерапии. В последние годы ведется поиск ингибиторов ДНКП, участвующих в транслезионном синтезе ДНК. Стратегии разработки ингибиторов включают создание ингибиторов, непосредственно подавляющих каталитическую активность ДНКП, ингибиторов, нарушающих ключевые белок-белковые взаимодействия между компонентами транслесомы, и ингибиторов убиквитинилированного PCNA.

Было проведено несколько исследований по поиску низкомолекулярных ингибиторов ДНКП γ -семейства. Скрининг тысяч химических соединений *in vitro* и компьютерное моделирование позволили обнаружить более десятка ингибиторов Pol η , Pol κ , Pol ι и *REV1*, характеризующихся разной эффективностью и специфичностью [96–105] (табл. 2).

Было показано, что соединения кандесартан цилексетил (антагонист рецептора ангиотензина), маноалид и МК-886 ингибируют Pol κ в микромолярных концентрациях (табл. 2) [104]. Кандесартан цилексетил не оказывал существенного влияния на репликацию в культуре клеток, но повышал их чувствительность к УФ, а также ингибировал активность Pol ι и Pol η [104]. Производные тиобарбитуровой кислоты ингибируют Pol η в 3–10 раз эффективнее других ДНКП, повышая чувствительность клеток к препаратам платиновой группы (табл. 2) [97, 105].

Для *REV1* был предложен целый ряд низкомолекулярных ингибиторов, блокирующих ключевые белок-белковые взаимодействия транслесомы. Полученные соединения связываются с разными районами *REV1*: 1) RIR-мотивом, взаимодействующим с γ -ДНКП [98–101],

2) с убиквитинсвязывающим мотивом UBM2, взаимодействующим с моноубиквитинилированным PCNA [102], 3) C-концевым районом взаимодействия с регуляторной субъединицей *REV7* Pol ζ [103] (табл. 2). Был предложен и ингибитор, нарушающий взаимодействие между *REV3* и *REV7* (табл. 2) [96]. Ингибирующее действие большинства соединений и их способность повышать чувствительность клеток к препаратам химиотерапии были показаны в культуре клеток (табл. 2). Высокая эффективность ингибитора *REV1* JH-RE-06, блокирующего взаимодействие между *REV1* и *REV7*, была продемонстрирована также на модели ксенографта меланомы человека у мышей [103]. Совместная терапия ингибитором JH-RE-06 и цисплатином почти полностью остановила рост опухоли.

Высокоспецифичные ингибиторы на основе рибозимов и РНК-аптамеров были получены для *REV1* [106] и Pol ι [107]. Доставка рибозимов в легкие мышей с помощью небулайзера снизила частоту мутаций, индуцированных бензо[α]пиреном, и в два раза сократила количество химически индуцированных опухолей [106]. Потенциальным ингибитором Pol η может служить микроРНК miRNA-93. Показано, что суперэкспрессия данной микроРНК снижает экспрессию *POLH* и увеличивает эффективность химиотерапии цисплатином [43]. Недавно были получены ингибирующие ДНК-аптамеры к Pol η [Бондаренко К.А., Макарова А.В., неопубликованные данные].

Ингибиторами транслезионного синтеза также могут выступать соединения, выделенные из живых организмов: 3-О-метилфуникон из *Penicillium pinophilum*, соединения пенициллиол (penicilliol) А и В из *Penicillium daleae*, гликолипиды шпината, кохаминовая кислота морской губки рода *Ircinia*, а также соединения таларофлавонов (talaroflavone) и 1-дезоксирубралактона (1-deoxyrubralactone) из штамма грибов, собранных с водорослей Японского моря [108]. Разрабатываются новые аналоги dNTP, ингибирующие работу ДНКП транслезионного синтеза [109].

РЕ-ИНИЦИАЦИЯ СИНТЕЗА ДНК

Праймаза-полимераза PrimPol относится к классу архео-эукариотических праймаз. В отличие от других ДНКП PrimPol обладает ДНК-праймазной активностью и может ре-иницировать синтез ДНК после встречи репликативной ДНКП с повреждением и остановки репликации (рис. 1) [110, 111]. Можно предположить, что, осуществляя ре-инициацию репликации,

Таблица 2. Низкомолекулярные ингибиторы ДНКП Υ-семейства и Pol ζ

Ингибитор	ДНКП	IC50 <i>in vitro</i> , μM*	Эффекты в культуре клеток или организме животных	Ссылка
Производные тиобарбитуровой кислоты ITBA-16 и ITBA-19	Pol η	16–17	нет данных	[97]
PNR-7-02, производное индол тиобарбитуровой кислоты	Pol η	8	чувствительность к препаратам платины	[105]
Кандесартан цилексетил, антагонист рецептора ангиотензина	Pol κ	9	чувствительность к УФ	[104]
	Pol η	11		
	Pol ι	6		
Маноалид, антагонист фосфолипазы A2	Pol κ	3	нет данных	[104]
МК-886, антагонист лейкотриенов	Pol κ	13	нет данных	[104]
Тиофены	REV1 RIR	#4–4,1; #5–2,5	чувствительность к УФ и цисплатину	[100, 101]
Феназопиридин (#1) и его производные	REV1 RIR	#1–1; #3–0,39	нет данных	[98]
Соединения, близкие по структуре феназопиридину #4-6	REV1 RIR	#4–1,6; #5-6,7; #6–4,9	чувствительность к цисплатину	[99]
Соединения #1 и #2	REV1 UBM2	#1–3,4; #2–9,7	#1 – чувствительность к циклофосфамиду и цисплатину	[102]
Производное 1,4-дигидрохинолина JH-RE-06	REV1, район взаимодействия с REV7	0,8	чувствительность к цисплатину и целому ряду ДНК-повреждающих агентов в культурах клеток, ингибирует рост опухоли в комбинации с цисплатином на модели ксенографта меланомы человека у мыши	[103]
Соединение #7	REV7, район взаимодействия с REV3	78	чувствительность к цисплатину	[96]

Примечание. * Для неповрежденной ДНК, если не указано иное.

PrimPol играет роль в развитии резистентности ко многим химиотерапевтическим препаратам, повреждающим ДНК.

Первые исследования на культурах клеток подтверждают вклад PrimPol в развитие резистентности к цисплатину. Нокаут гена *PRIMPOL* повышает чувствительность кератиноцитов курицы DT40 к цисплатину [112]. Предполагается, что именно PrimPol отвечает за развитие резистентности к цисплатину в клетках опухолей груди и яичников с дефектами гомологичной рекомбинации, вызванных нарушениями в работе белков-онкосупрессоров BRCA [113]. BRCA1 и

BRCA2 необходимы для регуляции и координации достаточно точного процесса гомологичной рекомбинации двухцепочечных разрывов ДНК. BRCA1 и BRCA2 взаимодействуют с рекомбиназой RAD51 и участвуют в образовании RAD51-нуклеопротеиновых филаментов гомологичных участков одноцепочечной ДНК [114]. Показано, что PrimPol необходима для выживания *BRCA1*^{-/-} клеток после обработки цисплатином [113]. Сверхэкспрессия PrimPol в клетках *BRCA1*^{-/-} снижает чувствительность к комбинированной химиотерапии ингибиторами ATR-киназы и цисплатином [113].

Кроме того, было показано, что PrimPol включает противоопухолевые аналоги нуклеотидов цитарабин и гемцитабин в новосинтезированную цепь ДНК *in vitro* [115].

Исследования ассоциаций полиморфизмов PrimPol с развитием онкологических заболеваний пока не проводились, но было показано, что в опухолях легких часто встречается замена Y100H, затрагивающая активный центр фермента [116]. Было высказано предположение о том, что данная мутация может давать преимущество раковым клеткам на ранних стадиях канцерогенеза, поскольку стимулирует включение рибонуклеотидов. Концентрации рибонуклеотидов в клетках в несколько раз превышают концентрации дезоксирибонуклеотидов, а опухолевые клетки часто характеризуются дополнительным падением концентраций dNTP, поэтому включение рибонуклеотидов PrimPol при репликации может стимулировать деление [117]. Можно предположить, что замена Y100H может вносить вклад в развитие резистентности к препаратам, направленным на ингибирование синтеза нуклеотидов, таких как метотрексат, гидроксимочевина и 5-фторурацил [108].

Важно отметить, что недавние [118] и более ранние [119] исследования показали, что встреча репликативной ДНКП *Saccharomyces cerevisiae* с блокирующим повреждением (и в отстающей, и в лидирующей цепях) не останавливает репликацию: Pol α -праймаза продолжает синтез на отстающей цепи за счет ре-инициации, синтезируя новые фрагменты Оказаки. Анализ репликации плазмидной ДНК с Т-Т димером в экстрактах клеток человека [120, 121] и мониторинг динамики синтеза нитей ДНК в клетках человека [122] также показали, что повреждение в отстающей цепи не блокирует репликацию. Предполагается, что (как и у низших эукариот) у млекопитающих Pol α -праймаза продолжает синтезировать новые фрагменты Оказаки [123], хотя экспериментальные доказательства еще не получены.

PrimPol, вероятно, осуществляет репрайминг на лидирующей цепи в случаях, когда повреждения затрагивают лидирующую цепь или обе цепи (межнитевая сшивка). Экспериментальные свидетельства, указывающие на то, что PrimPol осуществляет синтез ДНК *de novo* на лидирующей цепи, были получены в культуре клеток курицы [124] и В-лимфоцитах мыши [125].

Таким образом, Pol α -праймаза и PrimPol также являются мишенями для разработки противоопухолевых препаратов. Ретиноидоподоб-

ные низкомолекулярные соединения CD437 и ST1926 обладают выраженной противоопухолевой активностью для целого ряда опухолевых клеток и связывают каталитическую субъединицу Pol α – POLA1 [126, 127].

В настоящем обзоре рассмотрена роль ДНКП в транслезионном синтезе ДНК в ответ на повреждения, вызванные препаратами химиотерапии. Важно отметить, что из-за «толерантности» активного центра, отсутствия 3'-5'-корректирующей активности и использования неканонических взаимодействий при включении нуклеотидов точность синтеза транслезионных ДНКП на неповрежденной ДНК на несколько порядков ниже точности синтеза репликативных ДНКП [6, 7]. Поэтому транслезионный синтез может способствовать ускоренному накоплению мутаций, некоторые из которых могут дать преимущества опухолевым клеткам и вызвать резистентность. Подавление транслезионного синтеза не только блокирует репликацию, но и снизит скорость появления клонов опухолевых клеток с новыми свойствами, замедлив химиоиндуцированную клональную эволюцию опухоли.

Таким образом, ДНКП транслезионного синтеза являются перспективными мишенями для повышения эффективности химиотерапии, а мутации, полиморфизмы и уровень активности некоторых ДНКП могут быть ценными прогностическими маркерами при выборе терапии ряда онкологических заболеваний. Несомненно, получение новых специфичных и эффективных ингибиторов транслезионных ДНКП и ключевых белок-белковых взаимодействий транслесомы является перспективным подходом повышения эффективности и снижения цитотоксичности химиотерапевтических препаратов.

Финансирование. Работа выполнена при финансовой поддержке грантами: 1) разделы по ДНКП Y-семейства [РФФИ-комфи 17-00-00264 (АВМ), РФФИ-Бел-а 18-54-00024 (АВМ) и БРФФИ Б18Р-094 (МПС)]; 2) раздел по PrimPol: РФФИ 18-14-00354 (АВМ).

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Соблюдение этических норм. Статья не содержит исследований, в которых участвовали люди, и экспериментов, выполненных с использованием животных.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Burgers, P. M. J., and Kunkel, T. A. (2017) Eukaryotic DNA replication fork, *Annu. Rev. Biochem.*, **86**, 417-438, doi: 10.1146/annurev-biochem-061516-044709.
- Kunkel, T. A. (2009) Evolving views of DNA replication (in)fidelity, *Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol.*, **74**, 91-101, doi: 10.1101/sqb.2009.74.027.
- Friedberg, E. C., Walker, G. C., Siede, W., Wood, R. D., Schultz, R. A., and Ellenberger, T. (2006) *DNA Repair and Mutagenesis. Second Edition*, ASM Press, Washington (DC).
- Makarova, A. V., and Burgers, P. M. (2015) Eukaryotic DNA polymerase ζ , *DNA Rep. (Amst)*, **29**, 47-55, doi: 10.1016/j.dnarep.2015.02.012.
- Rizzo, A. A., and Korzhnev, D. M. (2019) The Rev1-Pol ζ translesion synthesis mutasome: structure, interactions and inhibition, *Enzymes*, **45**, 139-181, doi: 10.1016/bs.enz.2019.07.001.
- Sale, J. E., Lehmann, A. R., and Woodgate, R. (2012) Y-family DNA polymerases and their role in tolerance of cellular DNA damage, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, **13**, 141-152, doi: 10.1038/nrm3289.
- Yang, W., and Woodgate, R. (2007) What a difference a decade makes: insights into translesion DNA synthesis, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **104**, 15591-15598, doi: 10.1073/pnas.0704219104.
- Guilliam, T. A., Jozwiakowski, S. K., Ehlinger, A., Barnes, R. P., Rudd, S. G., Bailey, L. J., Skehel, M., Eckert, K. A., Chazin, W. J., and Doherty, A. J. (2015) Human PrimPol is a highly error-prone polymerase regulated by single-stranded DNA binding proteins, *Nucleic Acids Res.*, **43**, 1056-1068, doi: 10.1093/nar/gku1321.
- Martínez-Jiménez, M. I., Lahera, A., and Blanco, L. (2017) Human PrimPol activity is enhanced by RPA, *Sci. Rep.*, **7**, 783, doi: 10.1038/s41598-017-00958-3.
- Шилкин Е. С., Болдинова Е. О., Столяренко А. Д., Гончарова Р. И., Чупров-Нетоцин Р. Н., Хайруллин Р. Ф., Смаль М. П., Макарова А. В. (2020) Транслезионный синтез и канцерогенез, *Биохимия*, **85**, 494-506.
- Siddik, Z. H. (2003) Cisplatin: mode of cytotoxic action and molecular basis of resistance, *Oncogene*, **22**, 7265-7279, doi: 10.1038/sj.onc.1206933.
- Gately, D., and Howell, S. (1993) Cellular accumulation of the anticancer agent cisplatin: a review, *Br. J. Cancer*, **67**, 1171-1176, doi: 10.1038/bjc.1993.221.
- Zhou, J., Kang, Y., Chen, L., Wang, H., Liu, J., Zeng, S., and Yu, L. (2020) The drug-resistance mechanisms of five platinum-based antitumor agents, *Front. Pharmacol.*, **11**, 1-17, doi: 10.3389/fphar.2020.00343.
- Bancroft, D. P., Lepre, C. A., and Lippard, S. J. (1990) Platinum-195 NMR kinetic and mechanistic studies of *cis*- and *trans*-diamminedichloroplatinum(II) binding to DNA, *J. Am. Chem. Soc.*, **112**, 6860-6871, doi: 10.1021/ja00175a020.
- Fichtinger-Schepman, A. M. J., Lohman, P. H. M., Berends, F., and van Oosterom, A. T. (1987) *Cis*-diamminedichloroplatinum(ii)-induced DNA adducts in peripheral leukocytes from seven cancer patients: quantitative immunochemical detection of the adduct induction and removal after a single dose of *cis*-diamminedichloroplatinum(ii), *Cancer Res.*, **47**, 3000-3004.
- Plooy, A. C. M., Fichtinger-Schepman, A. M. J., Schutte, H. H., Van Dijk, M., and Lohman, P. H. M. (1985) The quantitative detection of various Pt-DNA-adducts in chinese hamster ovary cells treated with cisplatin: application of immunochemical techniques, *Carcinogenesis*, **6**, 561-566, doi: 10.1093/carcin/6.4.561.
- Cummings, J., Spanswick, V. J., and Smyth, J. F. (1995) Re-evaluation of the molecular pharmacology of mitomycin C, *Eur. J. Cancer*, **31**, 1928-1933, doi: 10.1016/0959-8049(95)00364-9.
- Tomasz, M., (1995) Mitomycin C: small, fast and deadly (but very selective), *Chem. Biol.*, **2**, 575-579, doi: 10.1016/1074-5521(95)90120-5.
- Umar, G. S., Lipman, R., Cummings, J., and Tomasz, M. (1997) Mitomycin cDNA adducts generated by DT-diaphorase: revised mechanism of the enzymatic reductive activation of mitomycin C, *Biochemistry*, **36**, 14128-14136, doi: 10.1021/bi971394i.
- Warren, A. J., Maccubbin, A. E., and Hamilton, J. W. (1998) Detection of mitomycin C DNA adducts *in vivo* by 32 P-postlabeling: time course for formation and removal of adducts and biochemical modulation, *Cancer Res.*, **58**, 453-461.
- Tomasz, M., Lipman, R., Chowdary, D., Pawlak, J., Verdine, G., and Nakanishi, K. (1987) Isolation and structure of a covalent cross-link adduct between mitomycin C and DNA, *Science*, **235**, 1204-1208, doi: 10.1126/science.3103215.
- Dong, Q., Barsky, D., Colvin, M. E., Melius, C. F., Ludeman, S. M., Moravsek, J. F., Colvin, O. M., Bigner, D. D., Modrich, P., and Friedman, H. S. (1995) A structural basis for a phosphoramidate mustard-induced DNA interstrand cross-link at 5'-d(GAC), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **92**, 12170-12174, doi: 10.1073/pnas.92.26.12170.
- Rink, S. M., Solomon, M. S., Taylor, M. J., Hopkins, P. B., Rajur, S. B., and McLaughlin, L. W. (1993) Covalent structure of a nitrogen mustard-induced DNA interstrand cross-link: an N7-to-N7 Linkage of deoxyguanosine residues at the duplex sequence 5'-d(GNC), *J. Am. Chem. Soc.*, **115**, 2551-2557, doi: 10.1021/ja00060a001.
- Rink, S. M., and Hopkins, P. B. (1995) A mechlorethamine-induced DNA interstrand cross-link Bends duplex DNA, *Biochemistry*, **34**, 1439-1445, doi: 10.1021/bi00004a039.
- Brandes, A. A., Bartolotti, M., Tosoni, A., and Franceschi, E. (2016) Nitrosoureas in the management of malignant gliomas, *Curr. Neurol. Neurosci. Rep.*, **16**, 13, doi: 10.1007/s11910-015-0611-8.
- Nikolova, T., Roos, W. P., Krämer, O. H., Strik, H. M., and Kaina, B. (2017) Chloroethylating nitrosoureas in cancer therapy: DNA damage, repair and cell death signaling, *Biochim. Biophys. Acta Rev. Cancer*, **1868**, 29-39, doi: 10.1016/j.bbcan.2017.01.004.
- Chen, F. X., Bodell, W. J., Liang, G., and Gold, B. (1996) Reaction of *N*-(2-chloroethyl)-*N*-nitrosoureas with DNA: effect of buffers on DNA adduction, cross-linking, and cytotoxicity, *Chem. Res. Toxicol.*, **9**, 208-214, doi: 10.1021/tx950097g.
- Denny, B. J., Tsang, L. L. H., Slack, J. A., Wheelhouse, R. T., and Stevens, M. F. G. (1994) NMR and molecular modeling investigation of the mechanism of activation of the antitumor drug temozolomide and its interaction with DNA, *Biochemistry*, **33**, 9045-9051, doi: 10.1021/bi00197a003.
- Friedman, H. S., Kerby, T., and Calvert, H. (2000) Temozolomide and treatment of malignant glioma, *Clin. Cancer Res.*, **6**, 2585-2597.

30. Tentori, L., and Graziani, G. (2002) Pharmacological strategies to increase the antitumor activity of methylating agents, *Curr. Med. Chem.*, **9**, 1285-1301, doi: 10.2174/0929867023369916.
31. Tsesmetzis, N., Paulin, C. B. J., Rudd, S. G., and Herold, N. (2018) Nucleobase and nucleoside analogues: resistance and re-sensitisation at the level of pharmacokinetics, pharmacodynamics and metabolism, *Cancers (Basel)*, **10**, 240, doi: 10.3390/cancers10070240.
32. Berdis, A. J. (2017) Inhibiting DNA polymerases as a therapeutic intervention against cancer, *Front. Mol. Biosci.*, **4**, 1-12, doi: 10.3389/fmolb.2017.00078.
33. Mini, E., Nobili, S., Caciagli, B., Landini, I., and Mazzei, T. (2006) Cellular pharmacology of gemcitabine, *Ann. Oncol.*, **17**, 7-12, doi: 10.1093/annonc/mdj941.
34. Liang, X., Wu, Q., Luan, S., Yin, Z., He, C., Yin, L., Zou, Y., Yuan, Z., Li, L., Song, X., He, M., Lv, C., and Zhang, W. (2019) A comprehensive review of topoisomerase inhibitors as anticancer agents in the past decade, *Europ. J. Med. Chem.*, **171**, 129-168, doi: 10.1016/j.ejmech.2019.03.034.
35. Minotti, G., Menna, P., Salvatorelli, E., Cairo, G., and Gianni, L. (2004) Anthracyclines: molecular advances and pharmacologic developments in antitumor activity and cardiotoxicity, *Pharmacol. Rev.*, **56**, 185-229, doi: 10.1124/pr.56.2.6.
36. Masutani, C., Kusumoto, R., Yamada, A., Dohmae, N., Yokoi, M., Yuasa, M., Araki, M., Iwai, S., Takio, K., and Hanaoka, F. (1999) The XPV (xeroderma pigmentosum variant) gene encodes human DNA polymerase η , *Nature*, **399**, 700-704, doi: 10.1038/21447.
37. Alt, A., Lammens, K., Chiocchini, C., Lammens, A., Pieck, J. C., Kuch, D., Hopfner, K. P., and Carell, T. (2007) Bypass of DNA lesions generated during anticancer treatment with cisplatin by DNA polymerase η , *Science*, **318**, 967-970, doi: 10.1126/science.1148242.
38. Ouzon-Shubeita, H., Baker, M., Koag, M.-C., and Lee, S. (2019) Structural basis for the bypass of the major oxaliplatin-DNA adducts by human DNA polymerase η , *Biochem. J.*, **476**, 747-758, doi: 10.1042/BCJ20180848.
39. Ummat, A., Rechkoblit, O., Jain, R., Roy Choudhury, J., Johnson, R. E., Silverstein, T. D., Buku, A., Lone, S., Prakash, L., Prakash, S., and Aggarwal, A. K. (2012) Structural basis for cisplatin DNA damage tolerance by human polymerase η during cancer chemotherapy, *Nat. Struct. Mol. Biol.*, **19**, 628-632, doi: 10.1038/nsmb.2295.
40. Vaisman, A., Masutani, C., Hanaoka, F., and Chaney, S. G. (2000) Efficient translesion replication past oxaliplatin and cisplatin GpG adducts by human DNA polymerase η , *Biochemistry*, **39**, 4575-4580, doi: 10.1021/bi000130k.
41. Zhao, Y., Biertümpfel, C., Gregory, M. T., Hua, Y. J., Hanaoka, F., and Yang, W. (2012) Structural basis of human DNA polymerase η -mediated chemoresistance to cisplatin, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **109**, 7269-7274, doi: 10.1073/pnas.1202681109.
42. Shachar, S., Ziv, O., Avkin, S., Adar, S., Wittschleben, J., Reissner, T., Chaney, S., Friedberg, E. C., Wang, Z., Carell, T., Geacintov, N., and Livneh, Z. (2009) Two-polymerase mechanisms dictate error-free and error-prone translesion DNA synthesis in mammals, *EMBO J.*, **28**, 383-393, doi: 10.1038/emboj.2008.281.
43. Srivastava, A. K., Han, C., Zhao, R., Cui, T., Dai, Y., Mao, C., Zhao, W., Zhang, X., Yu, J., and Wang, Q. E. (2015) Enhanced expression of DNA polymerase η contributes to cisplatin resistance of ovarian cancer stem cells, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **112**, 4411-4416.
44. Li, X.-Q., Ren, J., Chen, P., Chen, Y.-J., Wu, M., Wu, Y., Chen, K., and Li, J. (2018) Co-inhibition of Pol η and ATR sensitizes cisplatin-resistant non-small cell lung cancer cells to cisplatin by impeding DNA damage repair, *Acta Pharmacol. Sin.*, **39**, 1359-1372, doi: 10.1038/aps.2017.187.
45. Zhang, J., Sun, W., Ren, C., Kong, X., Yan, W., and Chen, X. (2019) A PolH transcript with a short 3'UTR enhances PolH expression and mediates cisplatin resistance, *Cancer Res.*, **79**, 3714-3724, doi: 10.1158/0008-5472.CAN-18-3928.
46. Ceppi, P., Novello, S., Cambieri, A., Longo, M., Monica, V., Iacono, M. L., Gaj-Levra, M., Saviozzi, S., Volante, M., and Papotti, M. (2009) Polymerase η mRNA expression predicts survival of non-small cell lung cancer patients treated with platinum-based chemotherapy, *Clin. Cancer Res.*, **15**, 1039-1045, doi: 10.1158/1078-0432.CCR-08-1227.
47. Teng, K., Qiu, M., Li, Z., Luo, H., Zeng, Z., Luo, R., Zhang, H., Wang, Z., Li, Y., and Xu, R. (2010) DNA polymerase η protein expression predicts treatment response and survival of metastatic gastric adenocarcinoma patients treated with oxaliplatin-based chemotherapy, *J. Transl. Med.*, **8**, 126, doi: 10.1186/1479-5876-8-126.
48. Albertella, M. R., Green, C. M., Lehmann, A. R., and O'Connor, M. J. (2005) A role for polymerase η in the cellular tolerance to cisplatin-induced damage, *Cancer Res.*, **65**, 9799-8006, doi: 10.1158/0008-5472.CAN-05-1095.
49. Sumiyoshi, M., Soda, H., Sadanaga, N., Taniguchi, H., Ikeda, T., Maruta, H., Dotsu, Y., Ogawara, D., Fukuda, Y., and Mukae, H. (2017) Alert regarding cisplatin-induced severe adverse events in cancer patients with xeroderma pigmentosum, *Intern. Med.*, **56**, 979-982, doi: 10.2169/internalmedicine.56.7866.
50. Chen, Y.-W., Cleaver, J. E., Hanaoka, F., Chang, C.-F., and Chou, K.-M. (2006) A novel role of DNA polymerase η in modulating cellular sensitivity to chemotherapeutic agents, *Mol. Cancer Res.*, **4**, 257-265, doi: 10.1158/1541-7786.MCR-05-0118.
51. Rechkoblit, O., Choudhury, J. R., Buku, A., Prakash, L., Prakash, S., and Aggarwal, A. K. (2018) Structural basis for polymerase η -promoted resistance to the anticancer nucleoside analog cytarabine, *Sci. Rep.*, **8**, 12702, doi: 10.1038/s41598-018-30796-w.
52. Rechkoblit, O., Johnson, R. E., Buku, A., Prakash, L., Prakash, S., and Aggarwal, A. K. (2019) Structural insights into mutagenicity of anticancer nucleoside analog cytarabine during replication by DNA polymerase η , *Sci. Rep.*, **9**, 16400, doi: 10.1038/s41598-019-52703-7.
53. Yoon, J.-H., Choudhury, R. J., Prakash, L., and Prakash, S. (2019) Translesion synthesis DNA polymerases η , ι , and υ promote mutagenic replication through the anticancer nucleoside cytarabine, *J. Biol. Chem.*, **294**, 19048-19054, doi: 10.1074/jbc.RA119.011381.
54. Yasui, M., Suzuki, N., Laxmi, Y. S., and Shibutani, S. (2006) Translesion synthesis past tamoxifen-derived DNA adducts by human DNA polymerases η and κ , *Biochemistry*, **45**, 12167-12174, doi: 10.1021/bi0608461.
55. McDonald, J. P., Rapić-Otrin, V., Epstein, J. A., Broughton, B. C., Wang, X., Lehmann, A. R., Wolgemuth, D. J., and Woodgate, R. (1999) Novel human and mouse

- homologs of *Saccharomyces cerevisiae* DNA polymerase eta, *Genomics*, **60**, 20-30, doi: 10.1006/geno.1999.5906.
56. Smith, L. A., Makarova, A. V., Samson, L., Thiesen, K. E., Dhar, A., and Bessho, T. (2012) Bypass of a psoralen DNA interstrand cross-link by DNA polymerases β , ι , and κ *in vitro*, *Biochemistry*, **51**, 8931-8938, doi: 10.1021/bi3008565.
57. Minko, I. G., Harbut, M. B., Kozekov, I. D., Kozekova, A., Jakobs, P. M., Olson, S. B., Moses, R. E., Harris, T. M., Rizzo, C. J., and Lloyd, R. S. (2008) Role for DNA polymerase kappa in the processing of N2-N2-guanine interstrand cross-links, *J. Biol. Chem.*, **283**, 17075-17082, doi: 10.1074/jbc.M801238200.
58. Ho, V., Guainazzi, A., Derkunt, S. B., Enoiu, M., and Schärer, O. D. (2011) Structure-dependent bypass of DNA interstrand crosslinks by translesion synthesis polymerases, *Nucleic Acids Res.*, **39**, 7455-7464, doi: 10.1093/nar/gkr448.
59. Jha, V., and Ling, H. (2018) Structural basis for human DNA polymerase kappa to bypass cisplatin intrastrand cross-link (Pt-GG) lesion as an efficient and accurate extender, *J. Mol. Biol.*, **430**, 1577-1589, doi: 10.1016/j.jmb.2018.04.023.
60. Kanemaru, Y., Suzuki, T., Sassa, A., Matsumoto, K., Adachi, N., Honma, M., Numazawa, S., and Nohmi, T. (2017) DNA polymerase kappa protects human cells against MMC-induced genotoxicity through error-free translesion DNA synthesis, *Genes Environ.*, **39**, 6, doi: 10.1186/s41021-016-0067-3.
61. Takeiri, A., Wada, N. A., Motoyama, S., Matsuzaki, K., Tateishi, H., Matsumoto, K., Niimi, N., Sassa, A., Grúz, P., Masumura, K., Yamada, M., Mishima, M., Jishage, K. I., and Nohmi, T. (2014) *In vivo* evidence that DNA polymerase kappa is responsible for error-free bypass across DNA cross-links induced by mitomycin C, *DNA Rep.*, **24**, 113-121, doi: 10.1016/j.dnarep.2014.09.002.
62. Williams, H. L., Gottesman, M. E., and Gautier, J. (2012) Replication-independent repair of DNA interstrand crosslinks, *Mol. Cell*, **47**, 140-147, doi: 10.1016/j.molcel.2012.05.001.
63. Zhuo, M., Gorgun, M. F., and Englander, E. W. (2018) Translesion synthesis DNA polymerase kappa is indispensable for DNA repair synthesis in cisplatin exposed dorsal root ganglion neurons, *Mol. Neurobiol.*, **55**, 2506-2515, doi: 10.1007/s12035-017-0507-5.
64. Shao, M., Jin, B., Niu, Y., Ye, J., Lu, D., and Han, B. (2014) Association of *POLK* polymorphisms with platinum-based chemotherapy response and severe toxicity in non-small cell lung cancer Patients, *Cell Biochem. Biophys.*, **70**, 1227-1237, doi: 10.1007/s12013-014-0046-x.
65. Goričar, K., Kovač, V., and Dolžan, V. (2014) Polymorphisms in translesion polymerase genes influence treatment outcome in malignant mesothelioma, *Pharmacogenomics*, **15**, 941-950, doi: 10.2217/pgs.14.14.
66. Ye, J., Chu, T., Li, R., Niu, Y., Jin, B., Xia, J., Shao, M., and Han, B. (2015) Pol ζ polymorphisms are associated with platinum based chemotherapy response and side effects among non-small cell lung cancer patients, *Neoplasma*, **62**, 833-839, doi: 10.4149/neo_2015_101.
67. Goričar, K., Kovač, V., Jazbec, J., Zakotnik, B., Lamovec, J., and Dolžan, V. (2015) Translesion polymerase genes polymorphisms and haplotypes influence survival of osteosarcoma patients, *OMICS*, **19**, 180-185, doi: 10.1089/omi.2014.0159.
68. Zheng, Y., Deng, Z., Yin, J., Wang, S., Lu, D., Wen, X., Li, X., Xiao, D., Hu, C., Chen, X., Zhang, W., Zhou, H., and Liu, Z. (2017) The association of genetic variations in DNA repair pathways with severe toxicities in NSCLC patients undergoing platinum-based chemotherapy, *Int. J. Cancer*, **141**, 2336-2347, doi: 10.1002/ijc.30921.
69. Wang, J., Wang, X., Zhao, M., Choo, S. P., Ong, S. J., Ong, S. Y., Chong, S. S., Teo, Y. Y., and Lee, C. G. (2014) Potentially functional SNPs (pfsNPs) as novel genomic predictors of 5-FU response in metastatic colorectal cancer patients, *PLoS One*, **9**, e111694, doi: 10.1371/journal.pone.0111694.
70. Huang, K. K., Jang, K. W., Kim, S., Kim, H. S., Kim, S.-M., Kwon, H. J., Kim, H. R., Yun, H. J., Ahn, M. J., and Park, K. U. (2016) Exome sequencing reveals recurrent REV3L mutations in cisplatin-resistant squamous cell carcinoma of head and neck, *Sci. Rep.*, **6**, 19552, doi: 10.1038/srep19552.
71. Xu, H. L., Gao, X. R., Zhang, W., Cheng, J. R., Tan, Y. T., Zheng, W., Shu, X. O., and Xiang, Y. B. (2013) Effects of polymorphisms in translesion DNA synthesis genes on lung cancer risk and prognosis in Chinese men, *Cancer Epidemiol.*, **37**, 917-922, doi: 10.1016/j.canep.2013.08.003.
72. Baranovskiy, A. G., Lada, A. G., Siebler, H. M., Zhang, Y., Pavlov, Y. I., and Tahirov, T. H. (2012) DNA polymerase δ and ζ switch by sharing accessory subunits of DNA polymerase δ , *J. Biol. Chem.*, **287**, 17281-17287, doi: 10.1074/jbc.M112.351122.
73. Lee, Y. S., Gregory, M. T., and Yang, W. (2014) Human Pol ζ purified with accessory subunits is active in translesion DNA synthesis and complements Pol η in cisplatin bypass, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **111**, 2954-2959, doi: 10.1073/pnas.1324001111.
74. Makarova, A. V., Stodola, J. L., and Burgers, P. M. (2012) A four-subunit DNA polymerase ζ complex containing Pol δ accessory subunits is essential for PCNA-mediated mutagenesis, *Nucleic Acids Res.*, **40**, 11618-11626, doi: 10.1093/nar/gks948.
75. Rizzo, A. A., Vassel, F.-M., Chatterjee, N., D'Souza, S., Li, Y., Hao, B., Hemann, M. T., Walker, G. C., and Korzhnev, D. M. (2018) Rev7 dimerization is important for assembly and function of the Rev1/Pol ζ translesion synthesis complex, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **115**, 8191-8200, doi: 10.1073/pnas.1801149115.
76. Adachi, M., Ijichi, K., Hasegawa, Y., Ogawa, T., Nakamura, H., Yasui, Y., Fukushima, M., and Ishizaki, K. (2008) Hypersensitivity to cisplatin after hRev3 mRNA knockdown in head and neck squamous cell carcinoma cells, *Mol. Med. Rep.*, **1**, 695-698, doi: 10.3892/mmr.00000015.
77. Chen, X., Zhu, H., Ye, W., Cui, Y., and Chen, M. (2019) MicroRNA-29a enhances cisplatin sensitivity in non-small cell lung cancer through the regulation of REV3L, *Mol. Med. Rep.*, **19**, 831-840, doi: 10.3892/mmr.2018.9723.
78. Lin, X., Trang, J., Okuda, T., Stephen, B., and Howell, S. B. (2006) DNA polymerase zeta accounts for the reduced cytotoxicity and enhanced mutagenicity of cisplatin in human colon carcinoma cells that have lost DNA mismatch repair, *Clin. Cancer Res.*, **12**, 563-568, doi: 10.1158/1078-0432.CCR-05-1380.
79. Song, L., McNeil, E. M., Ritchie, A.-M., Astell, K. R., Gourley, C., and Melton, D. W. (2017) Melanoma cells replicate through chemotherapy by reducing levels of key homologous recombination protein RAD51 and increasing

- expression of translesion synthesis DNA polymerase ζ , *BMC Cancer*, **17**, 864, doi: 10.1186/s12885-017-3864-6.
80. Wang, H., Zhang, S.-Y., Wang, S., Lu, J., Wu, W., Weng, L., Chen, D., Zhang, Y., Lu, Z., Yang, J., Chen, Y., Zhang, X., Chen, X., Xi, C., Lu, D., and Zhao, S. (2009) REV3L confers chemoresistance to cisplatin in human gliomas: the potential of its RNAi for synergistic therapy, *Neuro Oncol.*, **11**, 790-802, doi: 10.1215/15228517-2009-015.
 81. Wang, W., Sheng, W., Yu, C., Cao, J., Zhou, J., Wu, J., Zhang, H., and Zhang, S. (2015) REV3L modulates cisplatin sensitivity of non-small cell lung cancer H1299 cells, *Oncol. Rep.*, **34**, 1460-1468, doi: 10.3892/or.2015.4121.
 82. Wu, F., Lin, X., Okuda, T., and Howell, S. B. (2004) DNA Polymerase zeta regulates cisplatin cytotoxicity, mutagenicity, and the rate of development of cisplatin resistance, *Cancer Res.*, **64**, 8029-8035, doi: 10.1158/0008-5472.CAN-03-3942.
 83. Zhu, X., Zou, S., Zhou, J., Zhu, H., Zhang, S., Shang, Z., Ding, W.-Q., Wu, J., and Chen, Y. (2016) REV3L, the catalytic subunit of DNA polymerase ζ , is involved in the progression and chemoresistance of esophageal squamous cell carcinoma, *Oncol. Rep.*, **35**, 1664-1670, doi: 10.3892/or.2016.4549.
 84. Roos, W. P., Tsaalbi-Shtylik, A., Tsaryk, R., Güvercin, F., de Wind, N., and Kaina, B., The translesion polymerase Rev3L in the tolerance of alkylating anticancer drugs, *Mol. Pharmacol.*, **76**, 927-934, doi: 10.1124/mol.109.058131.
 85. Doles, J., Oliver, T. G., Cameron, E. R., Hsu, G., Jacks, T., Walker, G. C., and Hemann, M. T. (2010) Suppression of Rev3, the catalytic subunit of pol zeta, sensitizes drug-resistant lung tumors to chemotherapy, *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, **107**, 20786-20791, doi: 10.1073/pnas.1011409107.
 86. Yang, L., Shi, T., Liu, F., Ren, C., Wang, Z., Li, Y., Tu, X., Yang, G., and Cheng, X. (2015) REV3L, a promising target in regulating the chemosensitivity of cervical cancer cells, *PLoS One*, **10**, e0120334, doi: 10.1371/journal.pone.0120334.
 87. Xie, K., Doles, J., Hemann, M. T., and Walker, G. C. (2010) Error-prone translesion synthesis mediates acquired chemoresistance, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **107**, 20792-20797, doi: 10.1073/pnas.1011412107.
 88. Gu, C., Luo, J., Lu, X., Tang, Y., Ma, Y., Yun, Y., Cao, J., Cao, J., Huang, Z., and Zhou, X. (2019) REV7 confers radioresistance of esophagus squamous cell carcinoma by recruiting PRDX2, *Cancer Sci.*, **110**, 962, doi: 10.1111/cas.13946.
 89. Okina, S., Yanagisawa, N., Yokoyama, M., Sakurai, Y., Numata, Y., Umezawa, A., Higashihara, M., and Murakumo, Y. (2015) High expression of REV7 is an independent prognostic indicator in patients with diffuse large B-cell lymphoma treated with rituximab, *Int. J. Hematology*, **102**, 662-669, doi: 10.1007/s12185-015-1880-3.
 90. Masuda, Y., and Kamiya, K. (2002) Biochemical properties of the human REV1 protein, *FEBS Lett.*, **520**, 88-92, doi: 10.1016/s0014-5793(02)02773-4.
 91. Choi, J. Y., Lim, S., Kim, E. J., Jo, A., and Guengerich, F. P. (2010) Translesion synthesis across abasic lesions by human B-family and Y-family DNA polymerases α , δ , η , ι , κ , and REV1, *J. Mol. Biol.*, **404**, 34-44, doi: 10.1016/j.jmb.2010.09.015.
 92. Choi, J. Y., and Guengerich, F. P. (2008) Kinetic analysis of translesion synthesis opposite bulky N2- and O6-alkyl-guanine DNA adducts by human DNA polymerase REV1, *J. Biol. Chem.*, **283**, 23645-23655, doi: 10.1074/jbc.M801686200.
 93. Lin, X., Okuda, T., Trang, J., and Howell, S. B. (2006) Human REV1 modulates the cytotoxicity and mutagenicity of cisplatin in human ovarian carcinoma cells, *Mol. Pharmacol.*, **69**, 1748-1754, doi: 10.1124/mol.105.020446.
 94. Okuda, T., Lin, X., Trang, J., and Howell, S. B. (2005) Suppression of hREV1 expression reduces the rate at which human ovarian carcinoma cells acquire resistance to cisplatin, *Mol. Pharmacol.*, **67**, 1852-1860, doi: 10.1124/mol.104.010579.
 95. Ruzs, O., Pál, M., Szilágyi, É., Rovó, L., Varga, Z., Tomisa, B., Fábrián, G., Kovács, L., Nagy, O., Mózes, P., Reisz, Z., Tiszlavicz, L., Deák, P., and Kahán, Z. (2017) The expression of checkpoint and DNA repair genes in head and neck cancer as possible predictive factors, *Pathol. Oncol. Res.*, **23**, 253-264, doi: 10.1007/s12253-016-0088-z.
 96. Actis, M. L., Ambaye, N. D., Evison, B. J., Shao, Y., Vanarotti, M., Inoue, A., McDonald, E. T., Kikuchi, S., Heath, R., Hara, K., Hashimoto, H., and Fujii, N. (2016) Identification of the first small-molecule inhibitor of the REV7 DNA repair protein interaction, *Bioorg. Med. Chem.*, **24**, 4339-4346, doi: 10.1016/j.bmc.2016.07.026.
 97. Coggins, G. E., Maddukuri, L., Penthala, N. R., Hartman, J. H., Eddy, S., Ketkar, A., Crooks, P. A., and Eoff, R. L. (2013) N-aroyl indole thiobarbituric acids as inhibitors of DNA repair and replication stress response polymerases, *ACS Chem. Biol.*, **8**, 1722-1729, doi: 10.1021/cb400305r.
 98. Dash, R. C., Ozen, Z., McCarthy, K. R., Chatterjee, N., Harris, C. A., Rizzo, A. A., Walker, G. C., Korzhnev, D. M., and Hadden, M. K. (2019) Virtual pharmacophore screening identifies small-molecule inhibitors of the Rev1-CT/RIR protein-protein interaction, *Chem. Med. Chem.*, **14**, 1610-1617, doi: 10.1002/cmcd.201900307.
 99. Dash, R. C., Ozen, Z., Rizzo, A. A., Lim, S., Korzhnev, D. M., and Hadden, M. K. (2018) Structural approach to identify a lead scaffold that targets the translesion synthesis polymerase Rev1, *J. Chem. Inf. Model.*, **58**, 2266-2277, doi: 10.1021/acs.jcim.8b00535.
 100. Ozen, Z., Dash, R. C., McCarthy, K. R., Chow, S. A., Rizzo, A. A., Korzhnev, D. M., and Hadden, M. K. (2018) Small molecule scaffolds that disrupt the Rev1-CT/RIR protein-protein interaction, *Bioorg. Med. Chem.*, **26**, 4301-4309, doi: 10.1016/j.bmc.2018.07.029.
 101. Sail, V., Rizzo, A. A., Chatterjee, N., Dash, R. C., Ozen, Z., Walker, G. C., Korzhnev, D. M., and Hadden, M. K. (2017) Identification of small molecule translesion synthesis inhibitors that target the Rev1-CT/RIR protein-protein interaction, *ACS Chem. Biol.*, **12**, 1903-1912, doi: 10.1021/acscchembio.6b01144.
 102. Vanarotti, M., Evison, B. J., Actis, M. L., Inoue, A., McDonald, E. T., Shao, Y., Heath, R. J., and Fujii, N. (2018) Small-molecules that bind to the ubiquitin-binding motif of REV1 inhibit REV1 interaction with K164-monoubiquitinated PCNA and suppress DNA damage tolerance, *Bioorg. Med. Chem.*, **26**, 2345-2353, doi: 10.1016/j.bmc.2018.03.028.
 103. Wojtaszek, J. L., Chatterjee, N., Najeeb, J., Ramos, A., Lee, M., Bian, K., Xue, J. Y., Fenton, B. A., Park, H., Li, D., Hemann, M. T., Hong, J., Walker, G. C., and Zhou, P. (2019) A small molecule targeting mutagenic translesion synthesis improves chemotherapy, *Cell*, **178**, 152-159, doi: 10.1016/j.cell.2019.05.028.

104. Yamanaka, K., Dorjsuren, D., Eoff, R. L., Egli, M., Maloney, D. J., Jadhav, A., Simeonov, A., Stephen, R., and Lloyd, R. S. (2012) A comprehensive strategy to discover inhibitors of the translesion synthesis DNA polymerase κ , *PLoS One*, **7**, e45032, doi: 10.1371/journal.pone.0045032.
105. Zafar, M. K., Maddukuri, L., Ketkar, A., Penthala, N. R., Reed, M. R., Eddy, S., Crooks, P. A., and Eoff, R. L. (2018) A small-molecule inhibitor of human DNA polymerase η potentiates the effects of cisplatin in tumor cells, *Biochemistry*, **57**, 1262-1273, doi: 10.1021/acs.biochem.7b01176.
106. Dumstorf, C. A., Mukhopadhyay, S., Krishnan, E., Haribabu, B., and McGregor, W. G. (2009) REV1 is implicated in the development of carcinogen-induced lung cancer, *Mol. Cancer Res.*, **7**, 247-254, doi: 10.1158/1541-7786.MCR-08-0399.
107. Lakhin, A. V., Kazakov, A. A., Makarova, A. V., Pavlov, Y. I., Efremova, A. S., Shram, S. I., Tarantul, V. Z., and Gening, L. V. (2012) Isolation and characterization of high affinity aptamers against DNA polymerase ι , *Nucleic Acids Ther.*, **22**, 49-57, doi: 10.1089/nat.2011.0324.
108. Zafar, M. K., and Eoff, R. L. (2017) Translesion DNA synthesis in cancer: molecular mechanisms and therapeutic opportunities, *Chem. Res. Toxicol.*, **30**, 1942-1955, doi: 10.1021/acs.chemrestox.7b00157.
109. Choi, J.-S., Kim, S., Motea, E., and Berdis, A. (2017) Inhibiting translesion DNA synthesis as an approach to combat drug resistance to DNA damaging agents, *Oncotarget*, **20**, 40804-40816, doi: 10.18632/oncotarget.17254.
110. García-Gómez, S., Reyes, A., Martínez-Jiménez, M. I., Chocrón, E. S., Mourón, S., Terrados, G., Powell, C., Salido, E., Méndez, J., Holt, I. J., and Blanco, L. (2013) PrimPol, an archaic primase/polymerase operating in human cells, *Mol. Cell*, **52**, 541-553, doi: 10.1016/j.molcel.2013.09.025.
111. Bianchi, J., Rudd, S. G., Jozwiakowski, S. K., Bailey, L. J., Soura, V., Taylor, E., Stevanovic, I., Green, A. J., Stracker, T. H., Lindsay, H. D., and Doherty, A. J. (2013) PrimPol bypasses UV photoproducts during eukaryotic chromosomal DNA replication, *Mol. Cell*, **52**, 566-573, doi: 10.1016/j.molcel.2013.10.035.
112. Kobayashi, K., Guillian, T. A., Tsuda, M., Yamamoto, J., Bailey, L. J., Iwai, S., Takeda, S., Doherty, A. J., and Hirota, K. (2016) Repriming by PrimPol is critical for DNA replication restart downstream of lesions and chain-terminating nucleosides, *Cell Cycle*, **15**, 1997-2008, doi: 10.1080/15384101.2016.1191711.
113. Quinet, A., Tirman, S., Jackson, J., Šviković, S., Lemaçon, D., Carvajal-Maldonado, D., González-Acosta, D., Vessoni, A. T., Cybulla, E., Wood, M., Tavis, S., Batista, L. F. Z., Méndez, J., Sale, J. E., and Vindigni, A. (2020) PRIMPOL-mediated adaptive response suppresses replication fork reversal in BRCA-deficient cells, *Mol. Cell*, **77**, 461-474, doi: 10.1016/j.molcel.2019.10.008.
114. Hatano, Y., Tamada, M., Matsuo, M., and Hara, A. (2020) Molecular trajectory of BRCA1 and BRCA2 mutations, *Front Oncol.*, **10**, 361, doi: 10.3389/fonc.2020.00361.
115. Tokarsky, E. J., Wallenmeyer, P. C., Phi, K. K., and Suo, Z. (2017) Significant impact of divalent metal ions on the fidelity, sugar selectivity, and drug incorporation efficiency of human primPol, *DNA Rep.*, **49**, 51-59, doi: 10.1016/j.dnarep.2016.11.003.
116. Liu, J., Lee, W., Jiang, Z., Chen, Z., Jhunjunwala, S., Havery, P. M., Gnad, F., Guan, Y., Gilbert, H. N., Stinson, J., Klijn, C., Guillory, J., Bhatt, D., Vartanian, S., Walter, K., Chan, J., Holcomb, T., Dijkgraaf, P., Johnson, S., Koeman, J., Minna, J. D., Gazdar, A. F., Stern, H. M., Hoeflich, K. P., Wu, T. D., Settlement, J., de Sauvage, F. J., Gentleman, R. C., Neve, R. M., Stokoe, D., Modrusan, Z., Seshagiri, S., Shames, D. S., and Zhang, Z. (2012) Genome and transcriptome sequencing of lung cancers reveal diverse mutational and splicing events, *Genome Res.*, **22**, 2315-2327, doi: 10.1101/gr.140988.112.
117. Díaz-Talavera, A., Calvo, P. A., González-Acosta, D., Díaz, M., Sastre-Moreno, G., Blanco-Franco, L., Guerra, S., Martínez-Jiménez, M. I., Méndez, J., and Blanco, L. (2019) A cancer-associated point mutation disables the steric gate of human PrimPol, *Sci. Rep.*, **9**, 1121, doi: 10.1038/s41598-018-37439-0.
118. Taylor, M. R. G., and Yeeles, J. T. P. (2018) The initial response of a eukaryotic replisome to DNA damage, *Mol. Cell*, **70**, 1067-1080, doi: 10.1016/j.molcel.2018.04.022.
119. Lopes, M., Foiani, M., and Sogo, J. M. (2006) Multiple mechanisms control chromosome integrity after replication fork uncoupling and restart at irreparable UV lesions, *Mol. Cell*, **21**, 15-27, doi: 10.1016/j.molcel.2005.11.015.
120. Svoboda, D. L., and Vós, J. M. (1995) Differential replication of a single, UV-induced lesion in the leading or lagging strand by a human cell extract: fork uncoupling or gap formation, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **92**, 11975-11979, doi: 10.1073/pnas.92.26.11975.
121. Veaute, X., Mari-Giglia, G., Lawrence, C. W., and Sarasin, A. (2000) UV lesions located on the leading strand inhibit DNA replication but do not inhibit SV40 T-antigen helicase activity, *Mutat. Res.*, **459**, 19-28, doi: 10.1016/s0921-8777(99)00052-x.
122. Elvers, I., Johansson, F., Groth, P., Erixon, K., and Helleday, T. (2011) UV stalled replication forks restart by re-priming in human fibroblasts, *Nucleic Acids Res.*, **39**, 7049-7057, doi: 10.1093/nar/gkr420.
123. Hedglin, M., and Benkovic, S. J. (2017) Eukaryotic translesion DNA synthesis on the leading and lagging strands: unique detours around the same obstacle, *Chem. Rev.*, **117**, 7857-7877, doi: 10.1021/acs.chemrev.7b00046.
124. Schiavone, D., Jozwiakowski, S. K., Romanello, M., Guillaud, G., Guillian, T. A., Bailey, L. J., Sale, J. E., and Doherty, A. J. (2016) PrimPol is required for replicative tolerance of G quadruplexes in vertebrate cells, *Mol. Cell*, **61**, 161-169, doi: 10.1016/j.molcel.2015.10.038.
125. Pilzecker, B., Buoninfante, O. A., Pritchard, C., Blomberg, O. S., Huijbers, I. J., van den Berk, P. C. M., and Jacobs, H. (2016) PrimPol prevents APOBEC/AID family mediated DNA mutagenesis, *Nucleic Acids Res.*, **44**, 4734-4744, doi: 10.1093/nar/gkw123.
126. Han, T., Goralski, M., Capota, E., Padrick, S. B., Kim, J., Xie, Y., and Nijhawan, D. (2016) The anti-tumor toxin CD437 is a direct inhibitor of DNA polymerase α , *Nat. Chem. Biol.*, **12**, 511-515, doi: 10.1038/nchembio.2082.
127. Abdel-Samad, R., Aouad, P., Gali-Muhtasib, H., Sweidan, Z., Hmadi, R., Kadara, H., D'Andrea, E. L., Fucci, A., Pisano, C., and Darwiche, N. (2018) Mechanism of action of the atypical retinoid ST1926 in colorectal cancer: DNA damage and DNA polymerase α , *Am. J. Cancer Res.*, **8**, 39-55.

TRANSLESION SYNTHESIS AND RE-INITIATION OF DNA SYNTHESIS IN CHEMOTHERAPY RESISTANCE

Review

**E. S. Shilkin¹, E. O. Boldinova¹, A. D. Stolyarenko¹, R. I. Goncharova²,
R. N. Chuprov-Netochin³, M. P. Smal^{2*}, and A. V. Makarova^{1*}**

¹ *Institute of Molecular Genetics of the Russian Academy of Sciences,
123182 Moscow, Russia; E-mail: amakarova-img@yandex.ru*

² *Institute of Genetics and Cytology of the National Academy of Sciences of Belarus,
220072 Minsk, Belarus; E-mail: m.smal@igc.by*

³ *Moscow Institute of Physics and Technology, 141701 Dolgoprudny, Moscow Region, Russia*

Received April 16, 2020

Revised June 26, 2020

Accepted June 26, 2020

Many chemotherapy drugs block tumor cell division by damaging DNA. DNA polymerases eta (Pol η), iota (Pol ι), kappa (Pol κ), REV1 of the Y-family and zeta (Pol ζ) of the B-family efficiently incorporate nucleotides opposite a number of DNA lesions during translesion DNA synthesis. Primase-polymerase PrimPol and the Pol α -primase complex reinitiate DNA synthesis downstream of the damaged sites using their DNA primase activity. These enzymes can decrease the efficacy of chemotherapy drugs, contribute to the survival of tumor cells and to the progression of malignant diseases. DNA polymerases are promising targets for increasing the effectiveness of chemotherapy, and mutations and polymorphisms in some DNA polymerases can serve as additional prognostic markers in a number of oncological disorders.

Keywords: translesion DNA synthesis, DNA lesions, resistance to chemotherapy drugs

РОЛЬ ГИДРОЛАЗ СЕМЕЙСТВА NUDIX В МЕТАБОЛИЗМЕ NAD И ADP-РИБОЗЫ У МЛЕКОПИТАЮЩИХ

Обзор

© 2020 В.А. Куликова^{1,2,3*}, А.А. Никифоров²

¹ ФГАОУ ВО Санкт-Петербургский политехнический университет имени Петра Великого, 195251 Санкт-Петербург, Россия; электронная почта: veronika.a.kulikova@gmail.com

² ФГБУН Институт цитологии РАН, 194064 Санкт-Петербург, Россия

³ ФГБУ Институт эволюционной физиологии и биохимии имени И.М. Сеченова РАН, 194223 Санкт-Петербург, Россия

Поступила в редакцию 29.04.2020

После доработки 21.06.2020

Принята к публикации 22.06.2020

Белки суперсемейства NUDIX гидролаз (NUDT), расщепляющие органические пирофосфаты, найдены во всех классах организмов от архей и бактерий до высших эукариот. У млекопитающих белки данного семейства имеют широкий спектр функций и характеризуются различной субстратной специфичностью и внутриклеточной локализацией. Они контролируют концентрации различных метаболитов в клетке, в том числе ключевых регуляторных молекул, таких как NAD, ADP-рибоза и их производных. В данном обзоре рассмотрена роль белков NUDT в метаболизме NAD и ADP-рибозы в клетках человека и животных.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: NUDIX гидролазы, NAD, ADP-рибоза, метаболизм.

DOI: 10.31857/S0320972520080047

ВВЕДЕНИЕ

Белки суперсемейства NUDIX гидролаз (NUDT) найдены во всех классах организмов от архей и бактерий до высших эукариот. Данные ферменты расщепляют широкий спектр органических пирофосфатов, преимущественно имею-

щих структуру NDP-X (NDP — нуклеозиддифосфат, X — любое соединение). В результате гидролиза пирофосфатной связи образуется нуклеозидмонофосфат (NMP) и P-X. Субстратами NUDIX гидролаз являются (дезоксид)нуклеозидтрифосфаты, в том числе их окисленные формы, нуклеотидные сахара и спирты, динуклеозидные полифосфаты (Np_nN), а также кэп-структуры РНК. Все белки семейства NUDIX имеют консервативный каталитический NUDIX домен (NUDIX box), состоящий из 23 аминокислот $GX_5EX_3[UA]XREX_2EEXGU$, где U — алифатическая гидрофобная аминокислота, X — любая аминокислота [1].

К настоящему времени у млекопитающих охарактеризовано 24 гена, кодирующих белки семейства NUDIX гидролаз. Белки данного семейства имеют широкий спектр функций и характеризуются различной субстратной специфичностью и внутриклеточной локализацией. Одни гидролазы расщепляют окисленные нуклеотиды, которые обладают мутагенным потенциалом, другие контролируют внутриклеточные концентрации различных метаболитов, в том числе важнейших регуляторных молекул [1, 2]. Например, цитозольные NUDIX гидролазы млекопитающих (NUDT1, NUDT5 и NUDT15) расщепляют окисленные нуклеотиды и предо-

Принятые сокращения: NUDT — белки суперсемейства NUDIX гидролаз; ADPR — ADP-рибоза (ADP-ribose); OAcADPR — O-ацетил-ADP-рибоза (O-acetyl-ADP-ribose); PARP — семейство белков поли(ADP-рибоза)полимераз (poly(ADP-ribose)polymerase); Nam — никотинамид (nicotinamide); PAR — полимеры ADP-рибозы (poly(ADP-ribose)); ЭР — эндоплазматический ретикулум; PARG — поли-ADP-рибозилгликогидролаза (poly(ADP-ribose) glycohydrolase); ARH — семейство белков ADP-рибозилгидролаз (ADP-ribosylhydrolase); TARG — терминальная ADP-рибозилгидролаза (terminal ADP-ribose protein glycohydrolase1); SIRT1-7 — белки семейства сиртуинов; cADPR — циклическая ADP-рибоза (cyclic ADP-ribose); R5'P — рибозо-5'-фосфат (ribose-5'-phosphate); АФК — активные формы кислорода; GAPDH — глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназа (glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase); NMN — никотинамидмононуклеотид (nicotinamide mononucleotide); NMNAT — семейство белков никотинамидмононуклеотидаденилтрансфераз (nicotinamide mononucleotide adenyltransferase); ANT — аденин-нуклеотидтранслоказа (adenine nucleotide translocase); AMPK — AMP-активируемая протеинкиназа (AMP-activated protein kinase); NAD — никотинамидадениндинуклеотид.

* Адресат для корреспонденции.

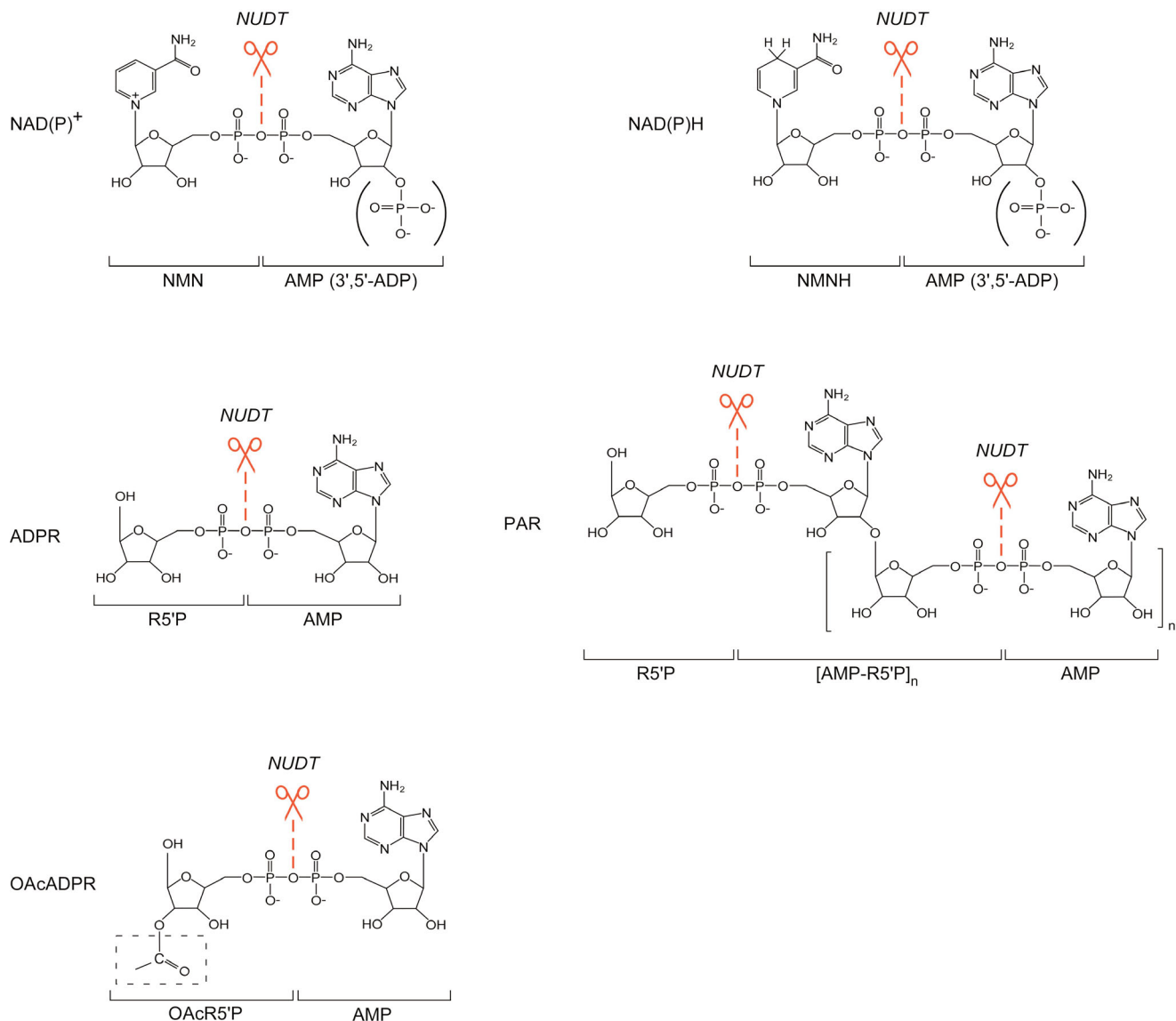


Рис. 1. Структуры NAD(P), ADP-рибозы и её производных — субстратов гидролаз семейства NUDIX. NUDIX гидролазы (NUDT) млекопитающих расщепляют NAD(P)⁺ на NMN и AMP (3',5'-ADP). NAD(P)H расщепляется на NMNH и AMP (3',5'-ADP). ADP-рибоза (ADPR) расщепляется на рибозо-5'-фосфат (R5'P) и AMP. Полимеры ADP-рибозы (PAR) расщепляются с образованием R5'P, AMP и AMP, соединенного с R5'P (AMP-R5'P). О-ацетил-ADP-рибоза (OAcADPR) расщепляется с образованием О-ацетил-рибозо-5'-фосфата (OAcR5'P) и AMP. (С цветными вариантами рис. 1–3 можно ознакомиться в электронной версии статьи на сайте: <http://sciencejournals.ru/journal/biokhsm/>)

тврщают их встраивание в ДНК и РНК, поддерживая стабильность генома и повышая устойчивость клеток к оксидативному стрессу [3–6]. Другие представители семейства NUDIX (белки NUDT20, NUDT16 и NUDT3) убирают 5'-кэп (7-метилгуанозин) с РНК, и таким образом регулируют стабильность мРНК и малых ядерных РНК и контролируют экспрессию генов [7, 8]. Тогда как пероксисомальные белки мыши Nudt7 и Nudt19, а также митохондриальный белок Nudt8 расщепляют кофермент-А (CoA) и его ацильные производные (Ацил-CoA)

с образованием 3',5'-ADP и соответствующих ацильных производных 4'-фосфопантетеина [9–11]. Более того, установлено, что Nudt19 участвует в регуляции уровня CoA в почках, а сверхэкспрессия Nudt7 в печени мышей приводит к уменьшению концентрации короткоцепочечных Ацил-CoA, что коррелирует со значительным снижением уровня желчных кислот и скорости окисления жирных кислот в гепатоцитах [10, 11].

Такие важнейшие низкомолекулярные соединения, как NAD, NADP, ADP-рибоза и

ОAcADPR, также являются субстратами гидролаз семейства NUDIX (рис. 1). В данном обзоре рассмотрена роль белков NUDT в метаболизме NAD и ADP-рибозы в клетках человека и животных.

МЕТАБОЛИЗМ NAD И ADP-РИБОЗЫ У МЛЕКОПИТАЮЩИХ

NAD является коферментом дегидрогеназ, катализирующих окислительно-восстановительные реакции центральных метаболических путей в клетках человека. Ключевые реакции гликолиза, цикла Кребса и β -окисления жирных кислот сопряжены с обратимым переходом NAD из его окисленной формы (NAD^+) в восстановленную форму (NADH). NADH является донором электронов для электрон-транспортной цепи, работа которой сопряжена с окислительным фосфорилированием ADP до АТФ. Фосфорилированная форма NAD (NADP) также является жизненно необходимым внутриклеточным метаболитом. Данный динуклеотид существует преимущественно в восстановленной форме (NADPH) и является коферментом реакций в анаболических процессах синтеза жирных кислот и холестерина, а также необходим для защиты клетки от окислительного стресса [12].

В настоящее время известно, что NAD, помимо ключевой роли в энергетическом метаболизме клетки, также играет важнейшую роль в различных регуляторных процессах в клетке [13–15] (рис. 2). NAD^+ используется в качестве субстрата ферментами семейства PARP для внутриклеточного ADP-рибозилирования белков. В результате этой посттрансляционной модификации NAD^+ расщепляется на никотинамид (NAM) и ADP-рибозу, затем одна (моно-ADP-рибозилирование) или несколько (поли-ADP-рибозилирование) молекул ADP-рибозы переносятся на специфические аминокислоты белка-мишени. Семейство PARP включает 17 ферментов, четыре из которых PARP1, PARP2, PARP5a и PARP5b являются поли(ADP-рибоза)полимеразами и могут присоединять к своим мишеням длинные разветвленные цепочки полимеров ADP-рибозы, PAR. Остальные представители семейства PARP являются ADP-рибозилтрансферазами, катализирующими моно-ADP-рибозилирование белков. Поли-ADP-рибозилирование белков является важнейшей регуляторной модификацией и играет ключевую роль в ответе клетки на повреждение ДНК, в регуляции транскрипции, а также в гибели клетки [16, 17]. Также внутриклеточные моно- и поли-ADP-рибозилирование вовлечены в регуляцию

множества других клеточных процессов, таких как поддержание теломера, синтез и процессинг РНК, трансляция, деградация белков, ответ на клеточный стресс, вызванный накоплением в эндоплазматическом ретикулуме несвернутых белков (ЭР-стресс), иммунный ответ, дифференцировка и многие другие [16, 17]. ADP-рибозилирование является обратимой модификацией. Поддержание баланса между ADP-рибозилированием белков и отщеплением ADP-рибозы крайне важно для регуляции ответа клетки на различные стрессовые факторы. Например, эффективность ответа клетки на повреждение ДНК зависит от баланса между активностями поли(ADP-рибоза)полимеразы PARP1 и фермента PARG, расщепляющего полимеры ADP-рибозы [16]. Ферменты PARG и ARH3 (ADP-ribosyl-acceptor hydrolase 3) расщепляют O-гликозидную связь в полимерах ADP-рибозы, в то время как оставшуюся молекулу ADP-рибозы, присоединенную к белку, убирают ферменты — MacroD1, MacroD2, гликогидролаза TARG1 (terminal ADP-ribose protein glycohydrolase 1), а также ARH3 и ARH1 [18] (рис. 2). Недавно было показано, что субстратами ферментов семейства PARP являются не только белки, но и нуклеиновые кислоты [19, 20] (рис. 2). Обратимое моно- и поли-ADP-рибозилирование ДНК может играть важную роль в репарации ДНК, а также в защите ДНК от деградации нуклеазами. Также было продемонстрировано, что белки человека PARP10, PARP11 и PARP15 моно-ADP-рибозилируют фосфорилированные концы РНК *in vitro* [21].

Другим семейством NAD^+ -зависимых регуляторных ферментов в клетке является семейство высококонсервативных деацетилаз — сиртуинов [22]. Данные ферменты отщепляют Nam от NAD^+ и переносят ацетильную группу с остатка лизина модифицированного белка на ADP-рибозу, в результате чего образуется ОAcADPR [23]. Установлено, что сиртуины деацетилируют широкий спектр белковых субстратов, включая гистоны, регуляторные, структурные и каталитически активные белки, и таким образом участвуют в регуляции транскрипции, репарации, апоптоза, секреции инсулина, работы биологических часов, старения и многих других процессов [22, 24–26]. Образующаяся в результате NAD^+ -зависимого деацетилирования белков ОAcADPR может активировать катионные каналы TRPM2 на плазматической мембране [27]. ОAcADPR расщепляется до ADP-рибозы белками ARH3, MacroD1 и MacroD2 [28, 29] (рис. 2).

Также NAD^+ является субстратом ADP-рибозилциклаз CD38 и SARM1, которые используют данный динуклеотид для синтеза ADP-рибозы и циклической ADP-рибозы (сADPR),

ADP-рибозы [14, 34, 35]. Нарушение регуляции уровня NAD в клетках и тканях ассоциированы с широким спектром заболеваний, таких как нейродегенеративные заболевания, диабет, ожирение, метаболический синдром, рак и многие другие [36]. Основным способом поддержания уровня NAD в клетках человека и животных является его синтез из Nam, который поступает в организм с пищей, а также образуется в результате расщепления NAD^+ в различных регуляторных процессах. Помимо этого, NAD может эффективно синтезироваться из других форм витамина B3, а также образовываться *de novo* из триптофана [35, 37, 38].

РОЛЬ NUDIX ГИДРОЛАЗ ПРОСТЕЙШИХ В МЕТАБОЛИЗМЕ NAD И ADP-РИБОЗЫ

В клетках прокариот и простейших эукариот уровень NAD регулируется не только за счет биосинтеза, но также путем ферментативного расщепления данного динуклеотида гидролазами семейства NUDIX [39–42].

NUDIX гидролазы, субстратами которых являются $\text{NAD}^+(\text{H})$, обнаружены во многих классах организмов. Показано, что NUDIX гидролаза *E. coli* YjaD расщепляет NAD^+ и NADH *in vitro*. При этом NADH является в 120 раз более предпочтительным субстратом, чем NAD^+ [39]. Пероксисомальный белок *S. cerevisiae* Npy1p также является NUDIX гидролазой, расщепляющей $\text{NAD}^+(\text{H})$ и $\text{NADP}^+(\text{H})$ *in vitro* [41, 42]. Установлено, что в *A. nidulans* белок NdxA семейства NUDIX гидролаз расщепляет NAD^+ и NADH *in vitro* и *in vivo* и таким образом контролирует уровень внутриклеточного NAD и поддерживает соотношение NAD^+ и NADH, тем самым регулируя важнейшие NAD-зависимые клеточные процессы [40]. NdxA негативно регулирует активность сирутина sirA, который NAD^+ -зависимым образом деацетилирует остаток лизина 16 гистона H4, тем самым регулируя экспрессию генов [40].

NUDIX гидролазы можно разделить на подсемейства, характеризующиеся гомологичными последовательностями аминокислот, которые определяют специфичность гидролаз к различным субстратам. У всех описанных $\text{NAD}^+(\text{H})$ гидролаз из разных организмов была выявлена последовательность SQPWFPXS со стороны C-конца от NUDIX box [43].

Белки семейства NUDIX, субстратом которых является ADP-рибоза, обнаружены во многих классах организмов, включая *E. coli*, *S. cerevisiae* и млекопитающих. У NUDIX гидролаз, расщепляющих ADP-рибозу, нет общей консер-

вативной последовательности, определяющей их субстратную специфичность. Однако у многих охарактеризованных гидролаз ADP-рибозы семейства NUDIX из разных организмов был выявлен консервативный остаток пролина, находящийся на расстоянии 15–16 аминокислот со стороны C-конца от Nudix box [44, 45].

NUDIX гидролаза Ysa1 дрожжей *S. cerevisiae* локализуется преимущественно в митохондриях и расщепляет ADP-рибозу до AMP и рибозо-5'-фосфата ($\text{R5}'\text{P}$) *in vitro* и *in vivo* [46]. Установлено, что белок Ysa1 контролирует уровень ADP-рибозы в клетке, тем самым, влияя на устойчивость клеток к оксидативному стрессу и на уровень эндогенных активных форм кислорода (АФК). Ysa1 повышает уровень АФК в клетке с помощью двух различных механизмов. Показано, что в отсутствие Ysa1 в митохондриях накапливается ADP-рибоза, которая подавляет комплекс I электрон–транспортной цепи, утечка электронов из которого является одним из основных источников образования АФК в клетке [46, 47]. Также было продемонстрировано, что в отсутствие Ysa1 в клетках накапливается ADP-рибоза, которая подавляет гликолиз, ингибируя глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназу (GAPDH), в результате чего увеличивается окисление глюкозы в пентозофосфатном пути и продукция NADPH. Накопление NADPH приводит к повышению устойчивости клетки к оксидативному стрессу, так как NADPH является коферментом редуктаз, защищающих клетку от АФК [46, 48].

РОЛЬ NUDIX ГИДРОЛАЗ МЛЕКОПИТАЮЩИХ В МЕТАБОЛИЗМЕ NAD

Среди представителей белков семейства NUDIX у млекопитающих охарактеризовано два белка NUDT12 и NUDT13, последовательности которых наиболее гомологичны последовательностям описанных ранее $\text{NAD}^+(\text{H})$ гидролаз из прокариот и низших эукариот [43, 49].

NUDT12. NUDIX гидролаза человека NUDT12 имеет сигнальный пептид PNL на C-конце и локализуется в пероксисомах [43]. Также была показана его цитозольная локализация [2, 50]. Белок NUDT12 был охарактеризован *in vitro* как $\text{NAD}^+(\text{H})$ гидролаза [43]. Показано, что NUDT12 эффективно гидролизует NADH до восстановленной формы NMN (NMNH) и AMP ($K_m = 11$ мкМ, $k_{\text{cat}} = 11 \text{ с}^{-1}$) и NADPH до NMNH и 2',5'-ADP ($K_m = 16$ мкМ, $k_{\text{cat}} = 16 \text{ с}^{-1}$) *in vitro*. Менее эффективно белок также гидролизует NAD^+ ($K_m = 190$ мкМ, $k_{\text{cat}} = 10,5 \text{ с}^{-1}$). Также ме-

нее эффективно белок гидролизует Ar_2A , NADP^+ , FAD и ADP -рибозу. Для гидролазной активности NUDT12 необходимы катионы Mn^{2+} или Mg^{2+} . Наибольшая активность белка с NADH наблюдается при значениях pH от 8,0 до 9,0, при этом NUDT12 сохраняет 50% активности при значениях pH 6,5 и 11,0 [43]. Было продемонстрировано, что у трансгенных мышей с полным отсутствием белка Nudt12 в печени и почках уровень NADH (но не NAD^+) в данных тканях значительно повышен [50].

NAD в пероксисомах используется как кофактор для бета-окисления жирных кислот [51]. Пероксисомальный белок NUDT12 потенциально может участвовать в регуляции уровня NAD в органелле, расщепляя его на NMN и AMP (рис. 3). Было показано, что NAD может транспортироваться из цитозоля в пероксисомы с помощью переносчика SLC25A17 [52], тогда как молекулы размером до 300 Да, например, AMP , могут входить и выходить из пероксисомы через каналы Pxmp2 [53–55]. Вероятно, NMN тоже может выходить из пероксисомы через данные каналы. Таким образом, расщепление пероксисомального NAD на NMN и AMP гидролазой NUDT12 может быть одним из механизмов регуляции не только пероксисомально, но и цитозольного пула NAD [35].

В клетках эукариот в процессе транскрипции РНК подвергается модификации – кэпированию 5'-конца транскрипта 7-метилгуанозином. Кэпирование защищает 5'-конец РНК от действия рибонуклеаз, участвует в экспорте мРНК из ядра, а также в инициации трансляции [56]. Недавно было показано, что РНК млекопитающих также может быть кэпирована NAD^+ [33] (рис. 2). РНК, кэпированные NAD^+ с 5'-конца, не могут эффективно транслироваться, а также менее стабильны, чем молекулы РНК, кэпированные 7-метилгуанозином, и некэпированные РНК [33]. Белки семейства DXO могут детектировать и убирать NAD^+ -кэпы с молекул РНК, что приводит к их деградации [33]. Установлено, что NUDIX гидролаза NUDT12 также может убирать NAD^+ -кэпы с 5'-конца мРНК [50, 57] (рис. 2). Проведено, что мышечный белок Nudt12 и белок человека NUDT12 могут расщеплять NAD^+ -кэп молекул РНК *in vitro*. Расщепление происходит по фосфодиэфирной связи, в результате образуется NMN и AMP , связанный с РНК [50, 57]. Нокаут по NUDT12 в клетках HEK293 приводит к увеличению количества кэпированных NAD^+ мРНК в 1,5 раза, при этом растет уровень кэпированных NAD^+ мРНК, кодирующих белки, вовлеченные в энергетический метаболизм клетки, в том числе митохондриальные белки электрон-транспорт-

ной цепи [57]. Таким образом, NUDT12 может играть важную роль в регуляции экспрессии генов на уровне стабильности мРНК, однако на сегодняшний день функциональная роль NAD^+ -кэпирования молекул РНК у млекопитающих до конца не ясна.

NUDT13. Мышиный белок Nudt13 является еще одной гидролазой млекопитающих, расщепляющей $\text{NAD}^+(\text{H})$. Nudt13 локализуется в митохондриях и ядре [2, 49]. Было показано, что Nudt13 эффективно гидролизует NADH ($K_m = 340 \text{ мкМ}$, $k_{\text{cat}} = 7 \text{ с}^{-1}$) и NADPH *in vitro* (рис. 2). Менее эффективно белок также расщепляет NAD^+ , NADP^+ , ADP -рибозу, FAD и Ar_2A [49]. Для эффективного катализа Nudt13 необходимы катионы Mn^{2+} или Mg^{2+} в необычно больших концентрациях (соответственно 2–5 мМ Mn^{2+} и 40–100 мМ Mg^{2+}). Наибольшая активность белка наблюдается при pH от 7,8 до 8,2 [49].

В некоторых тканях митохондрии содержат до 70 % клеточного NAD [58, 59]. Митохондриальный NAD является коферментом таких жизненно необходимых метаболических процессов, как цикл трикарбоновых кислот и окисление жирных кислот, а NADH является донором электронов для дыхательной цепи на внутренней мембране митохондрии, который сопряжен с синтезом ATP [60]. NAD^+ в митохондрии также является субстратом белков SIRT3, 4 и 5, регулирующих активность ключевых метаболических ферментов [61].

Механизмы регуляции митохондриального пула NAD на сегодняшний день до конца не ясны. Вероятнее всего, механизмы поддержания митохондриального пула NAD отличаются в разных типах клеток в зависимости от их тканевого происхождения. В одних клетках прямого обмена между митохондриальным и цитоплазматическим пулами NAD не происходит [62–64]. Локализация NAD -биосинтетического фермента никотинамидмононуклеотидаденилтрансферазы NMNAT3 в митохондриальном матриксе указывает на то, что предшественником митохондриального NAD может являться цитозольный NMN , который транспортируется в митохондриальный матрикс и используется там для синтеза NAD [65]. В других клетках NAD напрямую транспортируется через митохондриальную мембрану из цитозоля в митохондриальный матрикс [66]. Подавление экспрессии NMNAT3 приводит к значительному снижению уровня митохондриального NAD в клетках HEK293, при этом никак не влияет на уровень митохондриального NAD в клетках линии HeLa [67]. Белок NUDT13 потенциально может участвовать в регуляции уровня NAD и NAD -зависимых процессов в митохондрии, а также

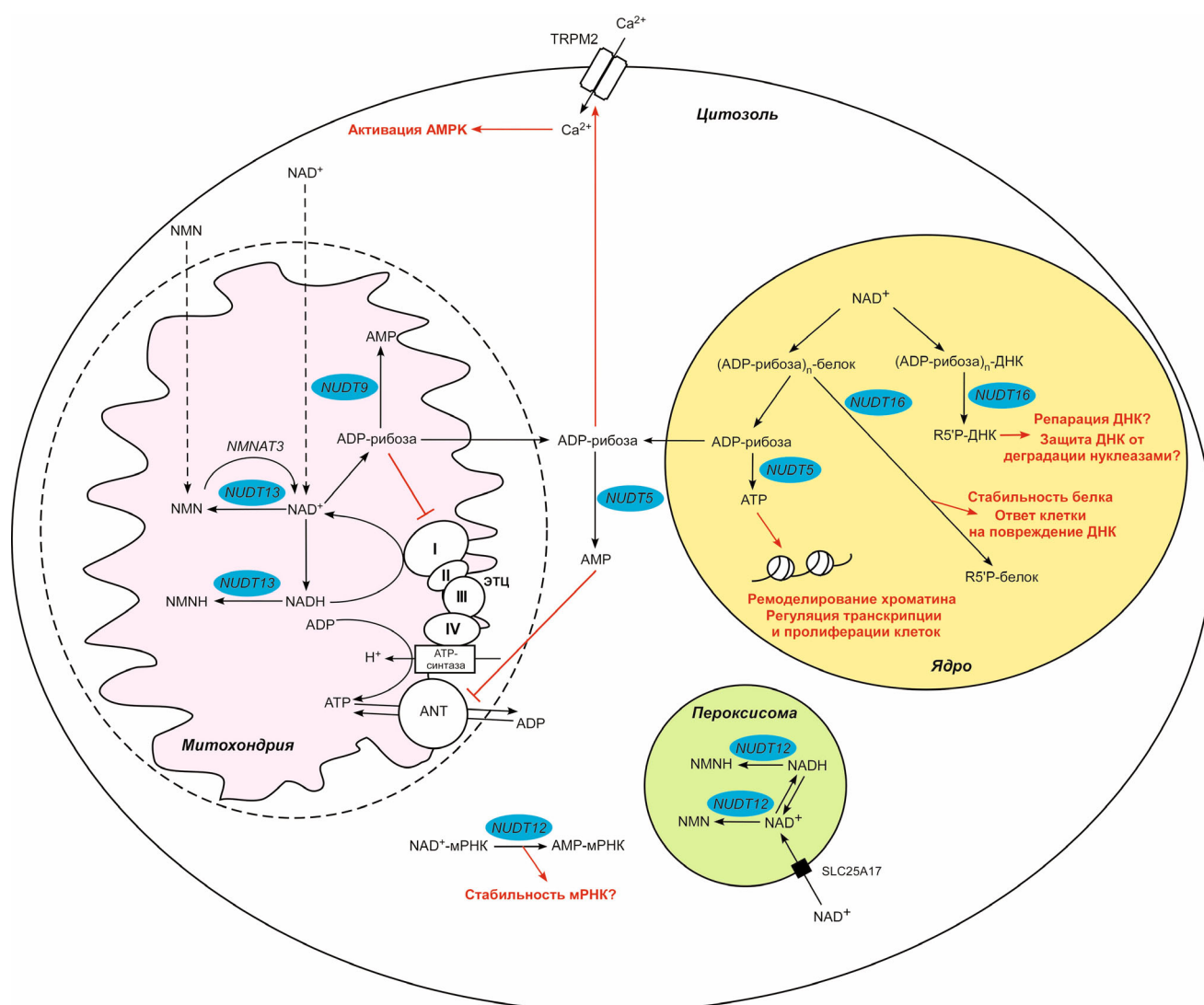


Рис. 3. Компартментализация NUDT-зависимого расщепления NAD, ADP-рибозы и их производных. NUDT5 расщепляет ADP-рибозу в цитозоле, тем самым, предотвращая активацию транспорта Ca^{2+} из внеклеточного пространства через каналы TRPM2 на плазматической мембране и последующую активацию AMP-активируемой протеинкиназы (AMPK). Расщепление ADP-рибозы в цитозоле белком NUDT5 приводит к накоплению AMP, который ингибирует синтез ATP на внутренней мембране митохондрии, блокируя ANT. Пероксисомальный белок NUDT12 может участвовать в регуляции уровня NAD и NAD-зависимых процессов в пероксисомах, а также контролировать соотношение NAD^+/NADH в данной органелле путем расщепления пероксисомального $\text{NAD}^+(\text{H})$ на NMN(H) и AMP. Цитозольная форма NUDT12 расщепляет NAD^+ на 5'-конце мРНК и может регулировать стабильность транскриптов. NUDT13 может участвовать в регуляции уровня NAD и NAD-зависимых процессов в митохондрии, а также контролировать соотношение NAD^+/NADH в данной органелле за счет расщепления митохондриального $\text{NAD}^+(\text{H})$ на NMN(H) и AMP. NUDT9 расщепляет ADP-рибозу в митохондрии, не позволяя ей выходить в цитозоль, и таким образом регулирует импорт Ca^{2+} из внеклеточного пространства и активность AMPK. NUDT9-зависимое расщепление ADP-рибозы может играть важную роль для энергетического метаболизма клетки, так как свободная ADP-рибоза является ингибитором окисления NADH комплексом I электрон-транспортной цепи (ЭТЦ). В ядре NAD^+ используется белками семейства PARP для обратимого моно- и поли-ADP-рибозирования белков и ДНК. NUDT16 расщепляет ADP-рибозу и полимеры ADP-рибозы, присоединенные к белку или ДНК, в результате чего белок или ДНК остаются модифицированы рибозо-5'-фосфатом (R5'P). NUDT16 регулирует стабильность белков в ядре и играет важную роль в ответе клетки на повреждение ДНК. NUDT5 использует ADP-рибозу для синтеза ATP в ядре. NUDT5-зависимое повышение уровня ATP в ядре необходимо для ремоделирования хроматина, регуляции транскрипции и пролиферации клеток.

контролировать соотношение NAD^+/NADH в данной органелле путем расщепления митохондриального $\text{NAD}^+(\text{H})$ на NMN(H) и AMP (рис. 3).

Комплексный сравнительный анализ субстратной специфичности 18 гидролаз человека семейства NUDIX, помимо NUDT12 и NUDT13, выявил еще два белка NUDT5 и

NUDIX гидролазы млекопитающих в метаболизме NAD и ADP-рибозы

Гидролаза семейства NUDIX	Локализация в клетке	Субстраты	Ссылки
mNudt5	ядро, цитозоль	ADPR, OAcADPR	[77]
hNUDT5	ядро, цитозоль	ADPR, NADH, NADPH	[2, 69, 70, 86]
hNUDT9	митохондрии, цитозоль	ADPR, OAcADPR, PAR-белок	[2, 77, 79, 86]
hNUDT12	пероксисомы, цитозоль	NAD ⁺ (H), NADP ⁺ (H), ADPR, NAD ⁺ -PHK	[2, 43, 50]
mNudt12	пероксисомы, цитозоль	NAD ⁺ -PHK	[57, 68]
mNudt13	митохондрии	NAD ⁺ (H), NADP ⁺ (H), ADPR	[49]
hNUDT14	цитозоль	NADH, ADPR	[2, 86]
mNudt16	цитозоль, ядро	NAD ⁺ , NAD ⁺ -PHK	[68]
hNUDT16	цитозоль, ядро	ADPR, ADPR-белок, PAR-белок, ADPR-ДНК, PAR-ДНК, ADPR-PHK, NAD ⁺ -PHK	[19–21, 68, 86–88]

NUDT14, расщепляющих NADH *in vitro* [2]. Также было показано, что мышинный белок Nudt16 расщепляет NAD⁺ и NAD⁺-кэп молекул PHK *in vitro* [68] (таблица).

РОЛЬ NUDIX ГИДРОЛАЗ МЛЕКОПИТАЮЩИХ В МЕТАБОЛИЗМЕ ADP-РИБОЗЫ

Анализ субстратной специфичности белков семейства NUDIX выявил у млекопитающих несколько ферментов, катализирующих расщепление ADP-рибозы и её производных, таких как полимеры ADP-рибозы и OAcADPR (таблица). Наиболее хорошо охарактеризованы NUDIX гидролазы млекопитающих NUDT5, NUDT9 и NUDT16.

NUDT5. Из всех NUDIX гидролаз человека белок NUDT5 имеет наибольшую гомологию с дрожжевым белком Ysa1 (63% идентичных аминокислот) и локализуется в цитозоле и ядре [2, 69, 70]. Показано, что белок NUDT5 расщепляет преимущественно ADP-рибозу ($K_m = 60$ мкМ, $V_{max} = 8$ мкмоль·мин⁻¹·мг⁻¹). Продуктами расщепления ADP-рибозы являются AMP и рибозо-5'-фосфат. Менее эффективно гидролаза также расщепляет и другие нуклеозид-5'-дифосфосахара, такие как ADP-манноза и ADP-глюкоза, а также динуклеотиды NADH и NADPH. Важно отметить, что cADPR не является субстратом для NUDT5. Для эффективного катализа NUDT5 необходимы катионы Mn²⁺ или Mg²⁺. Наибольшая активность белка наблюдается при значениях pH от 7,4 до 9,0 [70].

Было продемонстрировано, что подавление экспрессии NUDT5 в клетках человека линии

U2OS приводит к значительному снижению скорости гидролиза ADP-рибозы в экстрактах клеток по сравнению с контрольными экстрактами [71], тогда как нокдаун NUDT5 в клетках HeLa приводит к накоплению ADP-рибозы, которая активирует каналы TRPM2 на плазматической мембране [72] (рис. 3).

Также показано, что расщепление ADP-рибозы NUDIX гидролазами NUDT5 и NUDT9 приводит к накоплению AMP, который ингибирует синтез АТФ на внутренней мембране митохондрии, блокируя адениннуклеотидтранслоказу (ANT) [73] (рис. 3). ANT — белок внутренней мембраны митохондрии, который отвечает за импорт цитозольного ADP в митохондриальный матрикс для последующего фосфорилирования АТФ-синтазой и за выход АТФ из митохондрии. ANT высокоспецифична по отношению к ADP и АТФ [74] и играет важнейшую роль в энергетическом метаболизме клетки. В ответ на повреждение ДНК PARP1 гиперактивируется, в результате чего повышается уровень полимеров ADP-рибозы. PARG расщепляет полимеры ADP-рибозы, а NUDIX гидролазы NUDT5 и NUDT9 расщепляют образовавшиеся молекулы свободной ADP-рибозы, что приводит к накоплению цитозольного AMP, который конкурирует с ADP за связывание с ANT и блокирует транслоказу, таким образом подавляя синтез АТФ [73] (рис. 3).

Еще одной потенциальной ролью NUDIX гидролазы NUDT5 является регуляция активности важнейшего энергетического сенсора клетки — AMPK. AMPK активируется в ответ на накопление AMP и подавление синтеза АТФ. Главная функция данной серин/треониновой протеинкиназы — поддержание энергетического

баланса в клетке в ответ на различные виды метаболического стресса. АМРК фосфорилирует широкий спектр субстратов, тем самым активируя катаболические пути, в результате которых синтезируется АТФ, и подавляя анаболические пути, в которых АТФ расходуется [75]. АМР аллостерически активирует АМРК: он связывается с её γ -субъединицей, что стимулирует фосфорилирование Thr172 α -субъединицы АМРК [76]. Расщепляя АДР-рибозу, NUDT5 может контролировать уровень АМР в клетке, и таким образом регулировать активность АМРК.

NUDIX гидролаза мыши Nudt5 эффективно расщепляет пирофосфатную связь в молекуле ОАсАДР *in vitro*, в результате чего образуется О-ацетил-рибозо-5'-фосфат и АМР [77] (рис. 1 и 2). NUDT5 может контролировать концентрацию внутриклеточной ОАсАДР, которая наряду с АДР, активирует катионные каналы TRPM2 на плазматической мембране [27]. Таким образом, расщепляя АДР-рибозу и её ацетилированную производную, NUDT5 может играть важную роль в регуляции Ca^{2+} сигналинга в клетке, однако экспериментальные подтверждения данной гипотезы еще предстоит получить.

Недавно было показано, что белок NUDT5 обладает не только гидролазной, но и фосфорилазной активностью, катализируя образование АТФ и рибозо-5'-фосфата из АДР-рибозы и пирофосфата (PPi) *in vitro* [69]. С использованием siRNA к NUDT5 было установлено, что в ответ на обработку раковых клеток Т47D прогестинами уровень АТФ в ядре повышается NUDT5-зависимым образом (рис. 3). В частности, было показано, что в ответ на обработку клеток прогестинами активируется PARP1, в результате чего повышается уровень полимеров АДР-рибозы. PARP расщепляет полимеры АДР-рибозы, и NUDT5 использует образовавшиеся молекулы АДР-рибозы для синтеза АТФ. Повышение АТФ в ядре необходимо для прогестин-индуцированного ремоделирования хроматина, регуляции транскрипции и пролиферации клеток [69] (рис. 3). В другой работе было продемонстрировано, что ингибирование NUDT5 в клетках Т47D приводит к снижению уровня АТФ в ядре по сравнению с необработанными клетками, а также блокирует прогестин-индуцированное ремоделирование хроматина и экспрессию прогестин-зависимых генов в раковых клетках [71].

Анализ данных базы TGCA (The Cancer Genome Atlas) показал, что уровень мРНК NUDT5 во многих видах опухолей выше, чем в нормальных тканях [78]. Более высокий уровень экспрессии NUDT5 в раковых клетках по

сравнению с нормальными также подтверждается данными иммуногистологического окрашивания образцов опухолей пациентов специфичными антителами к NUDT5 [78]. Кроме того, у пациентов с раком молочной железы, имеющих повышенный уровень экспрессии NUDT5, был более высокий риск рецидивов и метастазирования [69]. Таким образом, повышенный уровень экспрессии NUDT5 является прогностическим маркером более агрессивного фенотипа различных типов опухолей [78]. Было установлено, что NUDT5 повышает агрессивность опухоли через модуляцию экспрессии ряда ключевых онкогенов, таких как убиквитин-специфичная пептидаза 22 (USP22), RAB35B, FOCAD и простагландин Е-синтаза (PTGES) [78]. Также было показано, что раковые клетки с нокдауном по NUDT5 и раковые клетки различных линий, в которых активность NUDT5 подавлена специфичным ингибитором, не могут расти в формате 3D-культур, так как синтез АТФ в ядре белком NUDT5 необходим для регуляции экспрессии генов, участвующих в клеточной адгезии, поддержании раковых стволовых клеток и в эпителиально-мезенхимальном переходе [78].

NUDT9. Митохондриальный белок человека NUDT9 является еще одной NUDIX гидролазой высокоспецифичной по отношению к АДР-рибозе [79] (рис. 2).

Источниками свободной АДР-рибозы в митохондрии может быть обратимое моно-АДР-рибозилирование белков ферментом SIRT4 [80, 81], а также неферментативное АДР-рибозилирование [82, 83]. Кроме того, сиртуины NAD^{+} -зависимым образом деацетируют белки в митохондриальном матриксе с образованием ОАсАДР, которая расщепляется ферментом ARH3 до АДР-рибозы [29] (рис. 2).

В нескольких исследованиях продемонстрировано, что расщепление АДР-рибозы гидролазой NUDT9 регулирует транспорт Ca^{2+} из внеклеточного пространства через каналы TRPM2 на плазматической мембране [72, 84] (рис. 3). В ответ на оксидативный стресс в клетке происходит накопление АДР-рибозы, которая активирует каналы TRPM2. Сверхэкспрессированный в митохондрии клеток HEK293 белок NUDT9 расщепляет АДР-рибозу, не позволяя ей выходить в цитозоль и активировать транспорт Ca^{2+} из внеклеточного пространства через каналы TRPM2 [84]. В другой работе было показано, что в условиях гипоксии при подавлении экспрессии NUDT9 в клетках HeLa транспорт Ca^{2+} через каналы TRPM2 значительно возрастает [72]. Повышение уровня Ca^{2+} приводит к активации Ca^{2+} /кальмодулин-зависимой протеинкиназы

П, которая фосфорилирует и активирует AMPK (рис. 3). Активация AMPK в ответ на подавление NUDT9 приводит к повышению уровня HIF-1 α и к активации экспрессии генов мишени HIF-1 α [72]. Таким образом, было установлено, что в условиях гипоксии гидролаза NUDT9 негативно регулирует уровень белка HIF-1 α и его функции [72].

Помимо этого, митохондриальный белок NUDT9 может играть важную роль в регуляции энергетического метаболизма клетки, так как свободная ADP-рибоза является ингибитором окисления NADH комплексом I дыхательной цепи в митохондриях [85] (рис. 3).

Помимо свободной ADP-рибозы, субстратами NUDT9 также являются полимеры ADP-рибозы, связанные с белком. Было показано, что при инкубации аутомодифицированного белка PARP1 с NUDT9 *in vitro* полимеры ADP-рибозы эффективно расщепляются [86] (рис. 2).

NUDT16. NUDIX гидролаза человека NUDT16 расщепляет фосфодиэфирную связь в молекуле ADP-рибозы. Субстратами NUDT16 являются как свободная ADP-рибоза, так и молекулы моно-ADP-рибозы, которыми модифицированы белки, ДНК и РНК. Также NUDT16 расщепляет полимеры ADP-рибозы, которыми модифицированы белки и ДНК [19–21, 86–88] (рис. 2).

Было установлено, что при инкубации аутомодифицированного белка PARP1 с NUDT16 *in vitro* полимеры ADP-рибозы эффективно расщепляются, в результате чего молекула белка остается модифицирована рибозо-5'-фосфатом, и образуются AMP и ADP, соединенный с рибозо-5'-фосфатом [86, 87] (рис. 1). Совсем недавно было показано, что NUDIX гидролаза NUDT16 расщепляет полимеры ADP-рибозы, присоединенные к С-концу белка 53BP1, регулируя его стабильность и выживаемость клеток в ответ на повреждение ДНК [88] (рис. 3). Белок 53BP1 играет важную роль в ответе клетки на повреждение ДНК [89]. Поли-ADP-рибозилирование 53BP1 в клетке приводит к его узнаванию E3 убиквитин лигазой RNF146, в результате чего происходит его полиубиквитинилирование и деградация [88]. Было показано, что С-конец белка 53BP1 поли-ADP-рибозилируется *in vitro*, и NUDT16 убирает образовавшиеся полимеры ADP-рибозы. В клетках с нокаутом по NUDT16 уровень белка 53BP1 ниже, а уровень его поли-ADP-рибозилирования в ответ на повреждение ДНК выше, чем в контрольных клетках. Более того, в отсутствие NUDT16 снижается выживаемость клеток после повреждения ДНК [88]. Также было установлено, что NUDT16 расщепляет моно-ADP-рибозу, которой модифицирован белок, в результате чего белок остается модифици-

рован рибозо-5'-фосфатом [86, 87], а также молекулы свободной ADP-рибозы [87] (рис. 2).

Недавно было показано, что субстратами ферментов семейства PARP являются не только белки, но и нуклеиновые кислоты (рис. 2). PARP1 и PARP2 обратимо поли-ADP-рибозилируют фосфорилированные концы одно- и двунитевых ДНК *in vitro* [19]. PARP3 обратимо моно-ADP-рибозилирует преимущественно фосфатные группы на тупых 5'-концах двунитевых ДНК, а так же на 5'-концах одонитевых разрывов ДНК *in vitro* [20, 90]. Кроме того, одонитевой разрыв ДНК, моно-ADP-рибозилированный белком PARP3, может быть лигирован в отсутствие АТР с образованием двунитевой ДНК, содержащей неклассический апурин-апиримидиновый сайт (ribo-AP-сайт), который служит субстратом для белков эксцизионной репарации оснований [90]. Ферменты PARG, ARH3, MacroD1, MacroD2 и TARG1 отщепляют ADP-рибозу от ДНК [20] (рис. 2). Обратимое моно- и поли-ADP-рибозилирование ДНК может играть важную роль в репарации ДНК, а также в защите ДНК от деградации нуклеазами. Было показано, что NUDT16 расщепляет моно-ADP-рибозу и полимеры ADP-рибозы, присоединенные к ДНК *in vitro*, в результате чего ДНК остается модифицирована рибозо-5'-фосфатом [19, 20] (рис. 2). Таким образом, NUDIX гидролаза NUDT16 может играть роль в ответе клетки на повреждение ДНК, регулируя ADP-рибозилирование ДНК (рис. 3).

Помимо этого, было продемонстрировано, что белки человека PARP10, PARP11 и PARP15 моно-ADP-рибозилируют фосфорилированные концы РНК *in vitro* [21]. Ферменты PARG, ARH3, MacroD1, MacroD2 и TARG1 отщепляют ADP-рибозу от РНК, в то время как NUDT16 расщепляет фосфодиэфирную связь в молекуле моно-ADP-рибозы, которой модифицирована молекула РНК *in vitro* [21] (рис. 2).

Также совсем недавно было установлено, что белок мыши Nudt16 может расщеплять свободный NAD⁺ и NAD⁺-кэп молекул РНК *in vitro* (таблица). Нокаут по NUDT16 в клетках HEK293 приводит к увеличению количества экзипированных NAD⁺ РНК в 1,3 раза [68].

Финансирование. Работа выполнена при финансовой поддержке РФ (проект 18-74-00081) и РФФИ (проект 19-34-60039).

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

- McLennan, A. G. (2006) The Nudix hydrolase superfamily, *Cell. Mol. Life Sci.*, **63**, 123-143, doi: 10.1007/s00018-005-5386-7.
- Carreras-Puigvert, J., Zitnik, M., Jemth, A. S., Carter, M., Unterlass, J. E. et al. (2017) A comprehensive structural, biochemical and biological profiling of the human NUDIX hydrolase family, *Nat. Commun.*, **8**, 1541, doi: 10.1038/s41467-017-01642-w.
- Rai, P., and Sobol, R. W. (2019) Mechanisms of MTH1 inhibition-induced DNA strand breaks: the slippery slope from the oxidized nucleotide pool to genotoxic damage, *DNA Rep.*, **77**, 18-26, doi: 10.1016/j.dnarep.2019.03.001.
- Ishibashi, T., Hayakawa, H., and Sekiguchi, M. (2003) A novel mechanism for preventing mutations caused by oxidation of guanine nucleotides, *EMBO Rep.*, **4**, 479-483, doi: 10.1038/sj.embor.embor838.
- Cai, J. P., Ishibashi, T., Takagi, Y., Hayakawa, H., and Sekiguchi, M. (2003) Mouse MTH2 protein which prevents mutations caused by 8-oxoguanine nucleotides, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **305**, 1073-1077, doi: 10.1016/s0006-291x(03)00864-7.
- Ishibashi, T., Hayakawa, H., Ito, R., Miyazawa, M., Yamagata, Y., and Sekiguchi, M. (2005) Mammalian enzymes for preventing transcriptional errors caused by oxidative damage, *Nucleic Acids Res.*, **33**, 3779-3784, doi: 10.1093/nar/gki682.
- Grudzien-Nogalska, E., and Kiledjian, M. (2017) New insights into decapping enzymes and selective mRNA decay, *Wiley Interdisc. rev. RNA*, **8**, doi: 10.1002/wrna.1379.
- Lu, G., Zhang, J., Li, Y., Li, Z., Zhang, N., Xu, X., Wang, T., Guan, Z., Gao, G. F., and Yan, J. (2011) hNUDT16: a universal decapping enzyme for small nucleolar RNA and cytoplasmic mRNA, *Protein Cell*, **2**, 64-73, doi: 10.1007/s13238-011-1009-2.
- Gasmi, L., and McLennan, A. G. (2001) The mouse Nudt7 gene encodes a peroxisomal nudix hydrolase specific for coenzyme A and its derivatives, *Biochem. J.*, **357**, 33-38, doi: 10.1042/0264-6021:3570033.
- Shumar, S. A., Kerr, E. W., Geldenhuys, W. J., Montgomery, G. E., Fagone, P., Thirawatananond, P., Saavedra, H., Gabelli, S. B., and Leonardi, R. (2018) Nudt19 is a renal CoA diphosphohydrolase with biochemical and regulatory properties that are distinct from the hepatic Nudt7 isoform, *J. Biol. Chem.*, **293**, 4134-4148, doi: 10.1074/jbc.RA117.001358.
- Kerr, E. W., Shumar, S. A., and Leonardi, R. (2019) Nudt8 is a novel CoA diphosphohydrolase that resides in the mitochondria, *FEBS Lett.*, **593**, 1133-1143, doi: 10.1002/1873-3468.13392.
- Ying, W. (2008) NAD⁺/NADH and NADP⁺/NADPH in cellular functions and cell death: regulation and biological consequences, *Antioxid. Redox Signal.*, **10**, 179-206, doi: 10.1089/ars.2007.1672.
- Kulikova, V. A., Gromyko, D. V., and Nikiforov, A. A. (2018) The regulatory role of NAD in human and animal cells, *Biochemistry (Moscow)*, **83**, 800-812, doi: 10.1134/S0006297918070040.
- Stromland, O., Niere, M., Nikiforov, A. A., VanLinden, M. R., Heiland, I., and Ziegler, M. (2019) Keeping the balance in NAD metabolism, *Biochem. Soc. Trans.*, **47**, 119-130, doi: 10.1042/BST20180417.
- Yang, Y., and Sauve, A. A. (2016) NAD(+) metabolism: Bioenergetics, signaling and manipulation for therapy, *Biochim. Biophys. Acta*, **1864**, 1787-1800, doi: 10.1016/j.bbapap.2016.06.014.
- Gupte, R., Liu, Z., and Kraus, W. L. (2017) PARPs and ADP-ribosylation: recent advances linking molecular functions to biological outcomes, *Genes Dev.*, **31**, 101-126, doi: 10.1101/gad.291518.116.
- Cohen, M. S., and Chang, P. (2018) Insights into the biogenesis, function, and regulation of ADP-ribosylation, *Nat. Chem. Biol.*, **14**, 236-243, doi: 10.1038/nchembio.2568.
- Rack, J. G. M., Palazzo, L., and Ahel, I. (2020) (ADP-ribosyl)hydrolases: structure, function, and biology, *Genes Dev.*, **34**, 263-284, doi: 10.1101/gad.334631.119.
- Talhaoui, I., Lebedeva, N. A., Zarkovic, G., Saint-Pierre, C., Kutuzov, M. M., Sukhanova, M. V., Matkarimov, B. T., Gasparutto, D., Saparbaev, M. K., Lavrik, O. I., and Ishchenko, A. A. (2016) Poly(ADP-ribose) polymerases covalently modify strand break termini in DNA fragments *in vitro*, *Nucl. Acids Res.*, **44**, 9279-9295, doi: 10.1093/nar/gkw675.
- Munnur, D., and Ahel, I. (2017) Reversible mono-ADP-ribosylation of DNA breaks, *FEBS J.*, **284**, 4002-4016, doi: 10.1111/febs.14297.
- Munnur, D., Bartlett, E., Mikolcevic, P., Kirby, I. T., Rack, J. G. M., Mikoc, A., Cohen, M. S., and Ahel, I. (2019) Reversible ADP-ribosylation of RNA, *Nucl. Acids Res.*, **47**, 5658-5669, doi: 10.1093/nar/gkz305.
- Houtkooper, R. H., Pirinen, E., and Auwerx, J. (2012) Sirtuins as regulators of metabolism and healthspan, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, **13**, 225-238, doi: 10.1038/nrm3293.
- Tanner, K. G., Landry, J., Sternglanz, R., and Denu, J. M. (2000) Silent information regulator 2 family of NAD-dependent histone/protein deacetylases generates a unique product, 1-O-acetyl-ADP-ribose, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **97**, 14178-14182, doi: 10.1073/pnas.250422697.
- Sassone-Corsi, P. (2016) *The Epigenetic and Metabolic Language of the Circadian Clock*, in *A Time for Metabolism and Hormones* (Sassone-Corsi, P., and Christen, Y. eds.) Cham (CH), pp. 1-11
- Imai, S., and Guarente, L. (2014) NAD⁺ and sirtuins in aging and disease, *Trends Cell. Biol.*, **24**, 464-471, doi: 10.1016/j.tcb.2014.04.002.
- Cao, Y., Jiang, X., Ma, H., Wang, Y., Xue, P., and Liu, Y. (2016) SIRT1 and insulin resistance, *J. Diabetes Complic.*, **30**, 178-183, doi: 10.1016/j.jdiacomp.2015.08.022.
- Grubisha, O., Rafty, L. A., Takanishi, C. L., Xu, X., Tong, L., Perraud, A. L., Scharenberg, A. M., and Denu, J. M. (2006) Metabolite of SIR2 reaction modulates TRPM2 ion channel, *J. Biol. Chem.*, **281**, 14057-14065, doi: 10.1074/jbc.M513741200.
- Chen, D., Vollmar, M., Rossi, M. N., Phillips, C., Kraehenbuehl, R., Slade, D., Mehrotra, P. V., von Delft, F., Crosthwaite, S. K., Gileadi, O., Denu, J. M., and Ahel, I. (2011) Identification of macrodomain proteins as novel O-acetyl-ADP-ribose deacetylases, *J. Biol. Chem.*, **286**, 13261-13271, doi: 10.1074/jbc.M110.206771.
- Ono, T., Kasamatsu, A., Oka, S., and Moss, J. (2006) The 39-kDa poly(ADP-ribose) glycohydrolase ARH3 hydrolyzes O-acetyl-ADP-ribose, a product of the Sir2 family of acetyl-histone deacetylases, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **103**, 16687-16691, doi: 10.1073/pnas.0607911103.
- Lee, H. C., and Zhao, Y. J. (2019) Resolving the topological enigma in Ca²⁺ signaling by cyclic ADP-ribose and NAADP, *J. Biol. Chem.*, **294**, 19831-19843, doi: 10.1074/jbc.REV119.009635.
- Guse, A. H. (2015) Calcium mobilizing second messengers derived from NAD, *Biochim. Biophys. Acta*, **1854**, 1132-1137, doi: 10.1016/j.bbapap.2014.12.015.
- Sumoza-Toledo, A., and Penner, R. (2011) TRPM2: a multifunctional ion channel for calcium signalling, *J.*

- Physiol.*, **589**, 1515-1525, doi: 10.1113/jphysiol.2010.201855.
33. Jiao, X., Doamekpor, S. K., Bird, J. G., Nickels, B. E., Tong, L., Hart, R. P., and Kiledjian, M. (2017) 5'-End nicotinamide adenine dinucleotide cap in human cells promotes RNA decay through DXO-mediated deNADding, *Cell*, **168**, 1015-1027, doi: 10.1016/j.cell.2017.02.019.
 34. Luscher, B., Butepage, M., Eckei, L., Krieg, S., Verheugd, P., and Shilton, B. H. (2018) ADP-ribosylation, a multifaceted posttranslational modification involved in the control of cell physiology in health and disease, *Chem. Rev.*, **118**, 1092-1136, doi: 10.1021/acs.chemrev.7b00122.
 35. Nikiforov, A., Kulikova, V., and Ziegler, M. (2015) The human NAD metabolome: functions, metabolism and compartmentalization, *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.*, **50**, 284-297, doi: 10.3109/10409238.2015.1028612.
 36. Katsyuba, E., Romani, M., Hofer, D., and Auwerx, J. (2020) NAD⁺ homeostasis in health and disease, *Nat. Metab.*, **2**, doi: 10.1038/s42255-019-0161-5.
 37. Dolle, C., Skoge, R. H., Vanlinden, M. R., and Ziegler, M. (2013) NAD biosynthesis in humans – enzymes, metabolites and therapeutic aspects, *Curr. Top. Med. Chem.*, **13**, 2907-2917, doi: 10.2174/15680266113136660206.
 38. Yang, Y., Zhang, N., Zhang, G., and Sauve, A. A. (2020) NRH salvage and conversion to NAD⁺ requires NRH kinase activity by adenosine kinase, *Nat. Metab.*, **2**, 364-379, doi: 10.1038/s42255-020-0194-9.
 39. Frick, D. N., and Bessman, M. J. (1995) Cloning, purification, and properties of a novel NADH pyrophosphatase. Evidence for a nucleotide pyrophosphatase catalytic domain in MutT-like enzymes, *J. Biol. Chem.*, **270**, 1529-1534, doi: 10.1074/jbc.270.4.1529.
 40. Shimizu, M., Masuo, S., Fujita, T., Doi, Y., Kamimura, Y., and Takaya, N. (2012) Hydrolase controls cellular NAD, sirtuin, and secondary metabolites, *Mol. Cell. Biol.*, **32**, 3743-3755, doi: 10.1128/MCB.00032-12.
 41. Xu, W., Dunn, C. A., and Bessman, M. J. (2000) Cloning and characterization of the NADH pyrophosphatases from *Caenorhabditis elegans* and *Saccharomyces cerevisiae*, members of a Nudix hydrolase subfamily, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **273**, 753-758, doi: 10.1006/bbrc.2000.2999.
 42. AbdelRaheim, S. R., Cartwright, J. L., Gasmi, L., and McLennan, A. G. (2001) The NADH diphosphatase encoded by the *Saccharomyces cerevisiae* NPY1 Nudix hydrolase gene is located in peroxisomes, *Arch. Biochem. Biophys.*, **388**, 18-24, doi: 10.1006/abbi.2000.2268.
 43. AbdelRaheim, S. R., Spiller, D. G., and McLennan, A. G. (2003) Mammalian NADH diphosphatases of the Nudix family: cloning and characterization of the human peroxisomal NUDT12 protein, *Biochem. J.*, **374**, 329-335, doi: 10.1042/BJ20030441.
 44. Dunn, C. A., O'Handley, S. F., Frick, D. N., and Bessman, M. J. (1999) Studies on the ADP-ribose pyrophosphatase subfamily of the nudix hydrolases and tentative identification of trgB, a gene associated with tellurite resistance, *J. Biol. Chem.*, **274**, 32318-32324, doi: 10.1074/jbc.274.45.32318.
 45. Lin, S., Gasmi, L., Xie, Y., Ying, K., Gu, S., Wang, Z., Jin, H., Chao, Y., Wu, C., Zhou, Z., Tang, R., Mao, Y., and McLennan, A. G. (2002) Cloning, expression and characterisation of a human Nudix hydrolase specific for adenosine 5'-diphosphoribose (ADP-ribose), *Biochim. Biophys. Acta*, **1594**, 127-135, doi: 10.1016/s0167-4838(01)00296-5.
 46. Tong, L., Lee, S., and Denu, J. M. (2009) Hydrolase regulates NAD⁺ metabolites and modulates cellular redox, *J. Biol. Chem.*, **284**, 11256-11266, doi: 10.1074/jbc.M809790200.
 47. Adam-Vizi, V., and Chinopoulos, C. (2006) Bioenergetics and the formation of mitochondrial reactive oxygen species, *Trends Pharmacol. Sci.*, **27**, 639-645, doi: 10.1016/j.tips.2006.10.005.
 48. Jamieson, D. J. (1998) Oxidative stress responses of the yeast *Saccharomyces cerevisiae*, *Yeast*, **14**, 1511-1527, doi: 10.1002/(SICI)1097-0061(199812)14:16<1511::AID-YEA356>3.0.CO;2-S.
 49. Abdelraheim, S. R., Spiller, D. G., and McLennan, A. G. (2017) Mouse Nudt13 is a mitochondrial Nudix hydrolase with NAD(P)H pyrophosphohydrolase activity, *Protein J.*, **36**, 425-432, doi: 10.1007/s10930-017-9734-x.
 50. Wu, H., Li, L., Chen, K. M., Homolka, D., Gos, P., Fleury-Olela, F., McCarthy, A. A., and Pillai, R. S. (2019) Decapping enzyme NUDT12 partners with BLMH for cytoplasmic surveillance of NAD-capped RNAs, *Cell Rep.*, **29**, 4422-4434, doi: 10.1016/j.celrep.2019.11.108.
 51. Wanders, R. J., Waterham, H. R., and Ferdinandusse, S. (2015) Metabolic interplay between peroxisomes and other subcellular organelles including mitochondria and the endoplasmic reticulum, *Front. Cell Dev. Biol.*, **3**, 83, doi: 10.3389/fcell.2015.00083.
 52. Agrimi, G., Russo, A., Scarcia, P., and Palmieri, F. (2012) The human gene SLC25A17 encodes a peroxisomal transporter of coenzyme A, FAD and NAD⁺, *Biochem. J.*, **443**, 241-247, doi: 10.1042/BJ20111420.
 53. Antonenkov, V. D., and Hiltunen, J. K. (2012) Transfer of metabolites across the peroxisomal membrane, *Biochim. Biophys. Acta*, **1822**, 1374-1386, doi: 10.1016/j.bbadis.2011.12.011.
 54. Antonenkov, V. D., Sormunen, R. T., and Hiltunen, J. K. (2004) The rat liver peroxisomal membrane forms a permeability barrier for cofactors but not for small metabolites *in vitro*, *J. Cell Sci.*, **117**, 5633-5642, doi: 10.1242/jcs.01485.
 55. Rokka, A., Antonenkov, V. D., Soinenen, R., Immonen, H. L., Pirila, P. L., Bergmann, U., Sormunen, R. T., Weckstrom, M., Benz, R., and Hiltunen, J. K. (2009) Pxm2 is a channel-forming protein in mammalian peroxisomal membrane, *PLoS One*, **4**, e5090, doi: 10.1371/journal.pone.0005090.
 56. Ramanathan, A., Robb, G. B., and Chan, S. H. (2016) mRNA capping: biological functions and applications, *Nucleic Acids Res.*, **44**, 7511-7526, doi: 10.1093/nar/gkw551.
 57. Grudzien-Nogalska, E., Wu, Y., Jiao, X., Cui, H., Mateyak, M. K., Hart, R. P., Tong, L., and Kiledjian, M. (2019) Structural and mechanistic basis of mammalian Nudt12 RNA deNADding, *Nat. Chem. Biol.*, **15**, 575-582, doi: 10.1038/s41589-019-0293-7.
 58. Alano, C. C., Tran, A., Tao, R., Ying, W., Karliner, J. S., and Swanson, R. A. (2007) Differences among cell types in NAD(+) compartmentalization: a comparison of neurons, astrocytes, and cardiac myocytes, *J. Neurosci. Res.*, **85**, 3378-3385, doi: 10.1002/jnr.21479.
 59. Stein, L. R., and Imai, S. (2012) The dynamic regulation of NAD metabolism in mitochondria, *Trends Endocrinol. Metab.*, **23**, 420-428, doi: 10.1016/j.tem.2012.06.005.
 60. Wallace, D. C. (2009) Mitochondria, bioenergetics, and the epigenome in eukaryotic and human evolution, *Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol.*, **74**, 383-393, doi: 10.1101/sqb.2009.74.031.
 61. Dolle, C., Rack, J. G., and Ziegler, M. (2013) NAD and ADP-ribose metabolism in mitochondria, *FEBS J.*, **280**, 3530-3541, doi: 10.1111/febs.12304.
 62. Yang, H., Yang, T., Baur, J. A., Perez, E., Matsui, T., Carmona, J. J., Lamming, D. W., Souza-Pinto, N. C., Bohr, V. A., Rosenzweig, A., de Cabo, R., Sauve, A. A., and Sinclair, D. A. (2007) Nutrient-sensitive mitochondri-

- al NAD⁺ levels dictate cell survival, *Cell*, **130**, 1095-1107, doi: 10.1016/j.cell.2007.07.035.
63. Pittelli, M., Formentini, L., Faraco, G., Lapucci, A., Rapizzi, E., Cialdai, F., Romano, G., Moneti, G., Moroni, F., and Chiarugi, A. (2010) Inhibition of nicotinamide phosphoribosyltransferase: cellular bioenergetics reveals a mitochondrial insensitive NAD pool, *J. Biol. Chem.*, **285**, 34106-34114, doi: 10.1074/jbc.M110.136739.
 64. Barile, M., Passarella, S., Danese, G., and Quagliariello, E. (1996) Rat liver mitochondria can synthesize nicotinamide adenine dinucleotide from nicotinamide mononucleotide and ATP via a putative matrix nicotinamide mononucleotide adenyltransferase, *Biochem. Mol. Biol. Intern.*, **38**, 297-306.
 65. Nikiforov, A., Dolle, C., Niere, M., and Ziegler, M. (2011) Pathways and subcellular compartmentation of NAD biosynthesis in human cells: from entry of extracellular precursors to mitochondrial NAD generation, *J. Biol. Chem.*, **286**, 21767-21778, doi: 10.1074/jbc.M110.213298.
 66. Davila, A., Liu, L., Chellappa, K., Redpath, P., Nakamaru-Ogiso, E., Paoletta, L. M., Zhang, Z., Migaud, M. E., Rabinowitz, J. D., and Baur, J. A. (2018) Nicotinamide adenine dinucleotide is transported into mammalian mitochondria, *Elife*, **7**, doi: 10.7554/eLife.33246.
 67. Cambronne, X. A., Stewart, M. L., Kim, D., Jones-Brunette, A. M., Morgan, R. K., Farrens, D. L., Cohen, M. S., and Goodman, R. H. (2016) Biosensor reveals multiple sources for mitochondrial NAD(+), *Science*, **352**, 1474-1477, doi: 10.1126/science.aad5168.
 68. Sharma, S., Grudzien-Nogalska, E., Hamilton, K., Jiao, X., Yang, J., Tong, L., and Kiledjian, M. (2020) Mammalian Nudix proteins cleave nucleotide metabolite caps on RNAs, *Nucleic Acids Res.*, **48**, 6788-6798, doi: 10.1093/nar/gkaa402.
 69. Wright, R. H., Lioutas, A., Le Dily, F., Soronellas, D., Pohl, A., Bonet, J., Nacht, A. S., Samino, S., Font-Mateu, J., Vicent, G. P., Wierer, M., Trabado, M. A., Schelhorn, C., Carolis, C., Macias, M. J., Yanes, O., Oliva, B., and Beato, M. (2016) ADP-ribose-derived nuclear ATP synthesis by NUDIX5 is required for chromatin remodeling, *Science*, **352**, 1221-1225, doi: 10.1126/science.aad9335.
 70. Gasmi, L., Cartwright, J. L., and McLennan, A. G. (1999) Cloning, expression and characterization of YSA1H, a human adenosine 5'-diphosphosugar pyrophosphatase possessing a MutT motif, *Biochem. J.*, **344 Pt. 2**, 331-337.
 71. Page, B. D. G., Valerie, N. C. K., Wright, R. H. G., Wallner, O., Isaksson, R., Carter, M., Rudd, S. G., Loseva, O., Jemth, A. S., Almlof, I., Font-Mateu, J., Llona-Minguez, S., Baranczewski, P., Jeppsson, F., Homan, E., Almqvist, H., Axelsson, H., Regmi, S., Gustavsson, A. L., Lundback, T. et al. (2018) Targeted NUDT5 inhibitors block hormone signaling in breast cancer cells, *Nat. Commun.*, **9**, 250, doi: 10.1038/s41467-017-02293-7.
 72. Yoon, B., Yang, E. G., and Kim, S. Y. (2018) The ADP-ribose reactive NUDIX hydrolase isoforms can modulate HIF-1alpha in cancer cells, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **504**, 321-327, doi: 10.1016/j.bbrc.2018.08.185.
 73. Formentini, L., Macchiarulo, A., Cipriani, G., Camaioni, E., Rapizzi, E., Pellicciari, R., Moroni, F., and Chiarugi, A. (2009) Poly(ADP-ribose) catabolism triggers AMP-dependent mitochondrial energy failure, *J. Biol. Chem.*, **284**, 17668-17676, doi: 10.1074/jbc.M109.002931.
 74. Nury, H., Dahout-Gonzalez, C., Trezeguet, V., Lauquin, G. J., Brandolin, G., and Pebay-Peyroula, E. (2006) Relations between structure and function of the mitochondrial ADP/ATP carrier, *Annu. Rev. Biochem.*, **75**, 713-741, doi: 10.1146/annurev.biochem.75.103004.142747.
 75. Hardie, D. G., Ross, F. A., and Hawley, S. A. (2012) AMPK: a nutrient and energy sensor that maintains energy homeostasis, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, **13**, 251-262, doi: 10.1038/nrm3311.
 76. Gowans, G. J., Hawley, S. A., Ross, F. A., and Hardie, D. G. (2013) AMP is a true physiological regulator of AMP-activated protein kinase by both allosteric activation and enhancing net phosphorylation, *Cell Metab.*, **18**, 556-566, doi: 10.1016/j.cmet.2013.08.019.
 77. Rafty, L. A., Schmidt, M. T., Perraud, A. L., Scharenberg, A. M., and Denu, J. M. (2002) Analysis of O-acetyl-ADP-ribose as a target for Nudix ADP-ribose hydrolases, *J. Biol. Chem.*, **277**, 47114-47122, doi: 10.1074/jbc.M208997200.
 78. Pickup, K. E., Pardow, F., Carbonell-Caballero, J., Lioutas, A., Villanueva-Canas, J. L., Wright, R. H. G., and Beato, M. (2019) Expression of oncogenic drivers in 3D cell culture depends on nuclear ATP synthesis by NUDT5, *Cancers*, **11**, doi: 10.3390/cancers11091337.
 79. Perraud, A. L., Shen, B., Dunn, C. A., Rippe, K., Smith, M. K., Bessman, M. J., Stoddard, B. L., and Scharenberg, A. M. (2003) NUDT9, a member of the Nudix hydrolase family, is an evolutionarily conserved mitochondrial ADP-ribose pyrophosphatase, *J. Biol. Chem.*, **278**, 1794-1801, doi: 10.1074/jbc.M205601200.
 80. Ahuja, N., Schwer, B., Carobbio, S., Waltregny, D., North, B. J., Castronovo, V., Maechler, P., and Verdin, E. (2007) Regulation of insulin secretion by SIRT4, a mitochondrial ADP-ribosyltransferase, *J. Biol. Chem.*, **282**, 33583-33592, doi: 10.1074/jbc.M705488200.
 81. Haigis, M. C., Mostoslavsky, R., Haigis, K. M., Fahie, K., Christodoulou, D. C., Murphy, A. J., Valenzuela, D. M., Yancopoulos, G. D., Karow, M., Blander, G., Wolberger, C., Prolla, T. A., Weindrich, R., Alt, F. W., and Guarente, L. (2006) SIRT4 inhibits glutamate dehydrogenase and opposes the effects of calorie restriction in pancreatic beta cells, *Cell*, **126**, 941-954, doi: 10.1016/j.cell.2006.06.057.
 82. Zhang, J., Zhang, J., Benovic, J. L., Sugai, M., Wetzker, R., Gout, I., and Rittenhouse, S. E. (1995) Sequestration of a G-protein beta gamma subunit or ADP-ribosylation of Rho can inhibit thrombin-induced activation of platelet phosphoinositide 3-kinases, *J. Biol. Chem.*, **270**, 6589-6594, doi: 10.1074/jbc.270.12.6589.
 83. Jacobson, E. L., Cervantes-Laurean, D., and Jacobson, M. K. (1997) ADP-ribose in glycation and glycooxidation reactions, *Adv. Exp. Med. Biol.*, **419**, 371-379, doi: 10.1007/978-1-4419-8632-0_49.
 84. Perraud, A. L., Takanishi, C. L., Shen, B., Kang, S., Smith, M. K., Schmitz, C., Knowles, H. M., Ferraris, D., Li, W., Zhang, J., Stoddard, B. L., and Scharenberg, A. M. (2005) Accumulation of free ADP-ribose from mitochondria mediates oxidative stress-induced gating of TRPM2 cation channels, *J. Biol. Chem.*, **280**, 6138-6148, doi: 10.1074/jbc.M411446200.
 85. Zharova, T. V., and Vinogradov, A. D. (1997) A competitive inhibition of the mitochondrial NADH-ubiquinone oxidoreductase (complex I) by ADP-ribose, *Biochim. Biophys. Acta*, **1320**, 256-264, doi: 10.1016/s0005-2728(97)00029-7.
 86. Palazzo, L., Thomas, B., Jemth, A. S., Colby, T., Leidecker, O., Feijs, K. L., Zaja, R., Loseva, O., Puigvert, J. C., Matic, I., Helleday, T., and Ahel, I. (2015) Processing of protein ADP-ribosylation by Nudix hydrolases, *Biochem. J.*, **468**, 293-301, doi: 10.1042/BJ20141554.
 87. Thirawatananond, P., McPherson, R. L., Malhi, J., Nathan, S., Lambrecht, M. J., Brichacek, M., Hergenrother, P. J., Leung, A. K. L., and Gabelli, S. B. (2019) Structural analyses of NudT16-ADP-ribose complexes direct rational design of mutants with improved processing of poly(ADP-ribosyl)ated proteins, *Sci. Rep.*, **9**, 5940, doi: 10.1038/s41598-019-39491-w.

88. Zhang, F., Lou, L., Peng, B., Song, X., Reizes, O., Almasan, A., and Gong, Z. (2020) Nudix hydrolase NUDT16 regulates 53BP1 protein by reversing 53BP1 ADP-ribosylation, *Cancer Res.*, **80**, 999-1010, doi: 10.1158/0008-5472.CAN-19-2205.
89. Ward, I. M., Minn, K., van Deursen, J., and Chen, J. (2003) p53 Binding protein 53BP1 is required for DNA damage responses and tumor suppression in mice, *Mol. Cell. Biol.*, **23**, 2556-2563, doi: 10.1128/mcb.23.7.2556-2563.2003.
90. Belousova, E. A., Kutuzov, M. M., Ivankina, P. A., Ishchenko, A. A., and Lavrik, O. I. (2018) A new DNA break repair pathway involving PARP3 and base excision repair proteins, *Dokl. Biochem. Biophys.*, **482**, 233-237, doi: 10.1134/S1607672918050010.

THE ROLE OF NUDIX HYDROLASES IN NAD AND ADP-RIBOSE METABOLISM IN MAMMALS

Review

V. A. Kulikova^{1,2,3*} and A. A. Nikiforov²

¹ *Peter the Great St. Petersburg Polytechnic University, 195251 St. Petersburg, Russia;
E-mail: veronika.a.kulikova@gmail.com*

² *Institute of Cytology, Russian Academy of Sciences, 194064 St. Petersburg, Russia*

³ *Sechenov Institute of Evolutionary Physiology and Biochemistry,
Russian Academy of Sciences, 194223 St. Petersburg, Russia*

Received April 29, 2020

Revised June 21, 2020

Accepted June 22, 2020

Proteins of the NUDIX hydrolase (NUDT) superfamily that cleave organic pyrophosphates are found in all classes of organisms, from archaea and bacteria to higher eukaryotes. In mammals, NUDTs exhibit a wide range of functions and are characterized by different substrate specificity and intracellular localization. They control the concentration of various metabolites in the cell, including key regulatory molecules such as nicotinamide adenine dinucleotide (NAD), ADP-ribose, and their derivatives. In this review, we discuss the role of NUDT proteins in the metabolism of NAD and ADP-ribose in human and animal cells.

Keywords: NUDIX hydrolases, NAD, ADP-ribose, metabolism

УДК 577.12

СИНТЕЗ ГЛУТАТИОНА В ОПУХОЛЕВЫХ КЛЕТКАХ

Обзор

© 2020 Е.В. Калинина*, Л.А. Гаврилюк

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

Поступила в редакцию 23.05.2020

После доработки 20.06.2020

Принята к публикации 20.06.2020

Трипептид GSH связан не только с контролем и поддержанием окислительно-восстановительного гомеостаза клетки, но и процессами детоксикации, пролиферации, дифференцировки клеток, регуляцией механизмов клеточной гибели. Нарушения синтеза GSH и изменение соотношения GSH/GSSG являются общей чертой многих патологических состояний, включая злокачественные новообразования. Многочисленные данные свидетельствуют о значимости GSH и соотношения GSH/GSSG в регуляции жизнеспособности опухолевых клеток, в инициации развития опухоли, её прогрессировании и лекарственной устойчивости. Однако контроль механизма синтеза GSH в злокачественных опухолях остаётся малоизученным. В обзоре рассматриваются особенности синтеза GSH и его регуляции в опухолевых клетках и обсуждается роль синтеза GSH в механизме апоптоза, некроптоза, ферроптоза, аутофагии.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: синтез GSH *de novo*, микроРНК, апоптоз, некроптоз, ферроптоз, аутофагия.

DOI: 10.31857/S0320972520080059

ВВЕДЕНИЕ

Трипептид глутатион (GSH) является наиболее распространённым низкомолекулярным, водорастворимым антиоксидантом, содержание которого достигает 1–10 мМ в большинстве клеток (10 мМ для гепатоцитов) [1]. Внутриклеточный уровень восстановленного глутатиона составляет 90–95% от его общей концентрации. Функции GSH связаны не только с контролем и поддержанием окислительно-восстановительного гомеостаза клетки посредством участия в антиоксидантной защите и тиол-дисульфидном обмене пептидов и белков, редокс-зависимой регуляции клеточного сигналинга и экспрессии генов, но и с участием в процессах детоксикации токсичных соединений, синтезе эйкозаноидов [1, 2].

В настоящее время всё большее внимание обращается на тот факт, что нарушения синтеза GSH, изменения его содержания и соотношения восстановленной и окисленной формы (GSH/GSSG) являются общей чертой многих патологических процессов, включая развитие злокачественных новообразований [3, 4]. Результаты исследований последнего десятилетия свидетельствуют о том, что при различных видах рака наблюдается повышение содержания GSH и активности глутатион-зависимых ферментов [5, 6]. Кроме того, получены экспериментальные данные, подтверждающие двойственную роль АФК и GSH в инициации и прогрессировании злокачественных опухолей [7].

Ряд работ указывает на определенный дуализм роли GSH в развитии злокачественных новообразований. С одной стороны, GSH играет важную роль в защите клеток от действия канцерогенов, участвуя в их детоксикации и элиминации из организма с помощью изоформ суперсемейства глутатионтрансферазы [8]. С другой стороны, повышенный уровень GSH в различных опухолях (в частности, при раке костного мозга, молочной железы, толстого кишечника, гортани, лёгкого) вносит вклад в механизм адаптационной защиты опухолевых клеток, способствуя развитию лекарственной устойчивости к противоопухолевым препаратам [6, 9].

Принятые сокращения: AIF – фактор, индуцирующий апоптоз; АФК – активные формы кислорода; ARE – антиоксидант-респонсивный элемент; ASK-1 – регулирующая апоптотические сигналы киназа 1; BSO – L-бутионин-(S, R)-сульфоксимин; γ -GT – γ -глутамилтрансфераза; GPx – глутатионпероксидаза; Grx – глутаредоксин; GS – глутатионсинтаза; GSH, GSSG – глутатион восстановленный, окисленный; γ -GCL – γ -глутамилцистеинлигаза; GST – глутатион S-трансфераза; MAPK – митоген-активируемая протеинкиназа; miR – микроРНК, NF- κ B – ядерный фактор κ B; Nrf2 – NF-E2-зависимый фактор 2.

* Адресат для корреспонденции.

Влияние GSH на окислительный стресс, возникновение и прогрессирование опухоли осложняется двойственной ролью АФК в этих процессах. Низкий уровень АФК необходим для многих внутриклеточных процессов метаболизма и пролиферации клеток. Значительный рост уровня АФК вызывает нарушение механизмов их инактивации, возникающий дефицит антиоксидантов может привести к серьезному повреждению и гибели клеток [10]. Однако повышение генерации АФК, активируя сигнальные пути, может способствовать злокачественному росту. В опухолевых клетках повышение уровня АФК в результате дисфункции митохондрий, генетических мутаций, изменений метаболизма приводит к накоплению большого количества окисленных белков, ДНК, липидов. В ответ на развитие окислительного стресса возникает редокс-зависимое повышение экспрессии генов антиоксидантных ферментов [10, 11]. Наблюдается рост активности многих антиоксидантных ферментов, в том числе, супероксиддисмутазы, каталазы, тиоредоксинов, гемоксигеназы, пероксиредоксинов. Таким образом, в опухолевых клетках происходит изменение баланса АФК/антиоксиданты, включая соотношение GSH/GSSG, при более высоких их уровнях по сравнению с нормальными клетками [2].

В то же время отмечается, что повышенный уровень GSH может способствовать метастазированию, в частности, при меланоме, гепатокарциноме, раке поджелудочной железы [6, 12]. Обнаружено, что при метастазировании наблюдается корреляция между содержанием глутатиона и степенью метастазирования [13]. Прямая корреляция выявлена между повышением уровня GSH и активностью патологического процесса как следствия рецидива после хирургического удаления первичной опухоли [13].

Несмотря на высокий уровень накопленных данных о значимой роли GSH в злокачественной трансформации, особенности его синтеза в опухолевых клетках остаются малоизученными. В настоящем обзоре проведен анализ механизма синтеза GSH и его регуляции в опухолевых клетках наряду с оценкой роли GSH в разных типах программируемой гибели.

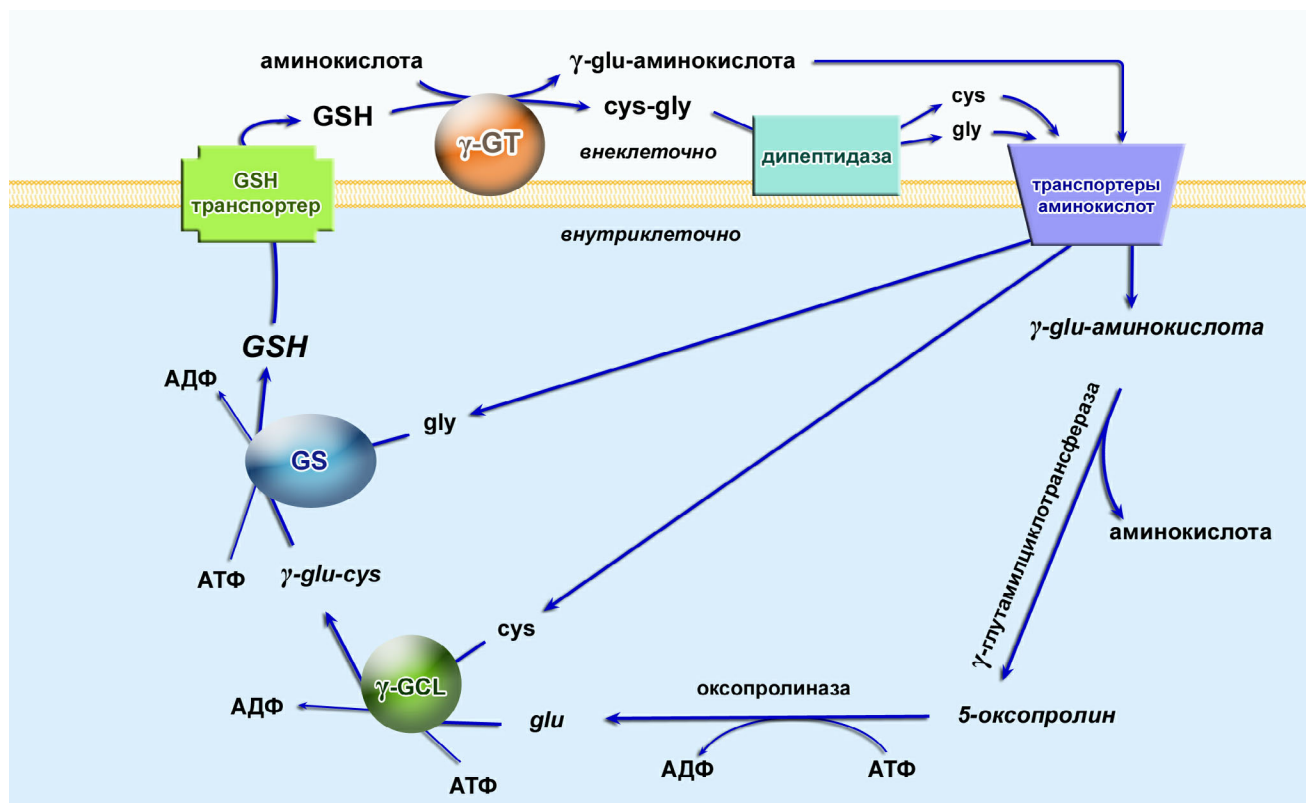
СИНТЕЗ GSH *de novo* В ОПУХОЛЕВЫХ КЛЕТКАХ

Синтез GSH *de novo* проходит в два АТФ-зависимых этапа, которые включены в цикл шести ферментативных реакций, получивших название γ -глутамильного цикла (рис. 1). Первый этап — реакция образования пептидной связи

между цистеином и глутаминовой кислотой, которая катализируется γ -глутамилцистеинлигазой (γ -GCL) и является скоростью-лимитирующей реакцией в синтезе GSH. Второй этап — реакция, катализируемая глутатионсинтетазой (GS), приводящая к образованию GSH в результате связывания глицина с γ -глутамилцистеином [14]. Фермент, способный гидролизовать специфическую связь в молекуле GSH между остатками глутаминовой кислоты и цистеина, — γ -глутамилтрансфераза (γ -GT), локализован на внешней стороне цитоплазматической мембраны определенных типов клеток и обеспечивает перенос γ -глутамильного остатка на нейтральную аминокислоту, делая возможным её транспорт в клетку. Образующийся в результате действия γ -GT дипептид цистеинилглицин расщепляется дипептидазой на цистеин и глицин, которые становятся субстратами для γ -GCL и GS. γ -Глутамилциклотрансфераза обеспечивает разрыв связи γ -глутамильного остатка с аминокислотой с образованием свободной аминокислоты и 5-оксопролина, который под действием оксопролиназы дециклизуется, образуя глутаминовую кислоту, также служащей субстратом для γ -GCL. Таким образом, внеклеточный GSH может быть разрушен, входящие в его состав аминокислоты поступают в клетку, где вновь возможно их включение в состав молекулы GSH.

Синтез GSH происходит, в основном, в цитоплазме клеток печени с последующим импортом в митохондрии и ядро. Большая часть содержания GSH плазмы крови обеспечивается его синтезом в печени, поэтому нарушения этого процесса в гепатоцитах ведут к системным межорганным изменениям гомеостаза глутатиона [15]. Необходимое для нормального функционирования внутриклеточных процессов содержание GSH пополняется не только за счет синтеза *de novo*, но и благодаря активности глутатионредуктазы (GR), которая восстанавливает окисленный глутатион (GSSG) в присутствии NADPH(H^+) до GSH [14]. Регуляция синтеза GSH может значительно меняться при развитии патологии, в частности, при онкогенезе [16].

В опухолевых клетках наблюдается значительное изменение экспрессии генов и активности ферментов, участвующих в синтезе GSH. Повышение синтеза GSH может быть следствием метаболического перепрограммирования опухолевых клеток, связанного с редокс-зависимым сигналингом, характер которого в значительной степени определяется соотношением GSH/GSSG, что позволяет GSH участвовать в регуляции клеточных систем с взаимобратной связью. В частности показано, что онкогенная передача сигналов фосфатидилинозитол-3-ки-



назой (PI3K) может стимулировать повышение содержания GSH в клетках рака молочной железы [17].

Во многих типах опухолевых клеток наблюдается рост экспрессии генов *GCLC* и *GCLM*. Так, в клетках HT-29 колоректального рака об-

На клетках MG-63 остеосаркомы показано, что действие простагландина (15d-PGJ2) приводит к повышению генерации АФК, вызывая активацию p38 MAPK и последующее фосфорилирование киназы Akt (RAC-alpha serine/threonine-protein kinase) [20]. Киназа Akt является ключевым ферментом сигнального пути PI3K/AKT и вовлечена в регуляцию пролиферации и выживания клеток. Данный путь участвует в активации транскрипционных факторов Nrf2 и Egr1, что приводит к повышению экспрессии гена каталитической субъединицы GCLC. Значительное повышение экспрессии гена *GCLC* обнаружено у пациентов, страдающих раком лёгких [21]. Повышенная экспрессия гена *GCLC* и высокая активность γ -GCL отмечены у больных с плоскоклеточным раком головы

и шеи [22]. При наблюдении пациентов с колоректальными опухолями установлен рост содержания мРНК *GCLC* в 18,8% случаев аденом и 84,2% карцином [23]. Повышенная активность γ -GCL обнаружена у пациентов с почечно-клеточным раком [24]. Рост экспрессии гена *GCLM* в опухолевых клетках может быть связан с развитием лекарственной устойчивости [21, 25]. Кроме того, мутации гена *GCLM* приводят к отсроченному возникновению опухоли на моделях с саркомой молочной железы и лимфомой, что делает *GCLM* эффективной фармакологической мишенью для борьбы с химиотерапевтической устойчивостью при этих видах злокачественных новообразований [16, 26]. Полученные данные, как полагают авторы, позволяют рассматривать ген *GCLM* в качестве возможной эффективной фармакологической мишени для борьбы с лекарственной устойчивостью при этих видах злокачественных новообразований.

GS, второй ключевой фермент синтеза GSH, является димером, состоящим из двух идентичных субъединиц и содержащим два домена: один предназначен для АТФ, второй является каталитическим центром. Для присоединения АТФ к ферменту в качестве кофакторов необходимы два иона магния (Mg^{2+}). У человека дефекты гена *GS* наследуются по аутосомно-рецессивному пути. Возникновение мутаций в гене *GS* может являться причиной разной степени тяжести метаболического ацидоза, 5-оксипролинурии, усиленного гемолиза и нарушения функции центральной нервной системы. Определение активности GS у таких пациентов выявило её корреляцию с содержанием GSH [26]. Дефицит GS может наблюдаться в отсутствии мутаций в гене *GS* и быть следствием нарушения сплайсинга [27]. Мутации могут быть сочетанными, в частности, мутации гена *GS* и гена *OPLAH*, кодирующего 5-оксипролиназу [28]. Гомозиготные мыши, нокаутные по гену *GS*, неспособны синтезировать GSH и быстро погибают. Данные результаты свидетельствуют о необходимости для выживания синтеза GSH *de novo* [29]. Появление и развитие злокачественных новообразований может сопровождаться изменением активности GS. Повышение активности GS обнаружено у пациентов с рецидивом рака мочевого пузыря, с мелкоклеточным раком лёгкого и колоректальным раком [30, 31]. Однако, несмотря на эти и другие имеющиеся в литературе работы, отмечающие повышенную активность GS в опухолевых клетках, роль этого фермента в злокачественных новообразованиях действительно всё ещё остается малоизученной.

Большое значение для синтеза GSH имеет активность мембранно-связанного фермента γ -

GT, поставляющего γ -глутамильный остаток (рис. 1). Гетеродимерный гликопротеин γ -GT, состоящий из двух субъединиц, чаще всего экспрессируется на люминальных поверхностях секреторных клеток, таких как желчные протоки и почечные проксимальные канальцы [32]. Активность γ -GT значительно повышается при окислительном стрессе, особенно в опухолевых клетках с высоким уровнем метаболизма, и коррелирует с содержанием GSH [33]. Ингибирование γ -GT является одним из механизмов снижения внутриклеточного содержания GSH как средства повышения чувствительности опухолей к различным химиотерапевтическим агентам. Наиболее часто применяемыми ингибиторами γ -GT являются аналоги глутамата (ацивин, L-азазерин, 6-диазо-5-оксо-1-норлейцин) и производные бороната [32]. К сожалению, применение таких конкурентных ингибиторов, как аналоги глутаминовой кислоты, оказывает высокое токсическое действие. Кроме этих препаратов предлагается использование неконкурентных ингибиторов, например, таких как OU749, которые обладают низкой токсичностью и значительно повышают чувствительность клеток опухоли к терапии путем снижения уровня GSH и цистеина [34]. Перспективным является поиск новых ингибиторов γ -GT среди GSH-конъюгатов, к которым можно отнести S-геранилгеранил-L-глутатион и даринапарсин [35, 36].

Скорость синтеза GSH в значительной степени определяется концентрацией трёх аминокислот: глутаминовой кислоты, цистеина и глицина, среди которых доминирующая роль принадлежит цистеину. Цистеин образуется в значительной степени путём транссульфурации аминокислот. Согласно этому пути, метионин активируется с использованием АТФ, превращаясь в S-аденозилметионин (SAM), который является донором метильной группы, необходимой для метилирования многих субстратов, с помощью метионаденозилтрансферазы [37]. При гидролизе SAM образуется гомоцистеин, который в процессе катаболизма превращается в цистатионин с последующим образованием цистеина и α -кетобутирата [38].

В опухолевых клетках отмечается повышение процесса транссульфурации. В клетках почечно-клеточной карциномы с низкой скоростью пролиферации найдено повышенное содержание серина, гомоцистеина, SAM и S-аденозилгомоцистеина [39]. Клетки опухолей с высокой степенью пролиферации содержат повышенное количество α -гидроксibuтирата и продуктов метаболизма метионина — S-аденозилгомоцистеина и гомоцистеина. Предполагается,

что на ранней и поздней стадии агрессивной почечно-клеточной карциномы уровень цистеина предпочтительно пополняется путем транссульфурации [39].

В клетки опухоли цистеин также может поступать из микроокружения с помощью независимого от натрия цистин/глутаматного антипортера, который известен как Хс- или хСТ-система, кодируемая геном *SLC7A11* [40]. Гетеродимерный цистин/глутаматный антипортер состоит из трансмембранного белка *SLC7A11*, связанного с регуляторным белком *SLC3A2* дисульфидной связью. Белок *SLC7A11* имеет 12 трансмембранных доменов и в основном импортирует в клетку (в обмен на глутамат) цистин, который восстанавливается до цистеина цистинредуктазой [41]. Таким образом, помимо синтеза с помощью транссульфурации, опухолевые клетки могут получать цистеин, используя этот транспортный путь, пополняя внутриклеточное содержание Cys, необходимое для синтеза GSH. Ген *SLC7A11*, который, как было показано, необходим для пролиферации клеток рака простаты, молочной железы, почек, толстого кишечника, определяет содержание лёгкой цепи Хс-системы в мембранах клеток этих опухолей [38]. В опухолевых стволовых клетках обнаружен повышенный уровень этого транспортёра, коррелирующий с содержанием в них GSH [42]. Функциональная активность цистин/глутаматного антипортера Хс способствует онкогенной трансформации белков RAS и вносит заметный вклад в сохранение внутриклеточного окислительно-восстановительного баланса опухолевых клеток [43]. Некоторые типы опухолевых клеток (лейкемия, лимфома) не способны генерировать цистеин. Поэтому для поддержания роста таких клеток аминокислота должна поступать в клетки из их микроокружения. При снижении содержания цистеина в клетках оно пополняется с помощью Хс-системы благодаря экскреции цистина соседними клетками (фибробластами, активированными макрофагами). Поэтому цистин/глутаматный антипортер рассматривается как потенциальная мишень для лечения злокачественных новообразований, при которых рост и выживание опухолевых клеток зависят от поступления аминокислот извне [40, 42]. Помимо цистеина синтез GSH зависит от содержания глутамината и глутаминовой кислоты. Доступность глутамината влияет на синтез GSH тремя различными механизмами. Во-первых, глутамин является основным источником глутаминовой кислоты, образующейся с помощью глутаминазы 1 и 2 [44]. Экспериментально показано, что активность глутаминазы строго регулируется для поддержания внутриклеточного

уровня глутамината, необходимого для синтеза GSH [44]. Глутамин может транспортироваться несколькими различными системами транспорта аминокислот. Среди них семейство транспортёров растворённых веществ 1, из которых белок 5 (*SLC1A5/ASCT2*) является наиболее часто сверхэкспрессируемым транспортным белком в различных клетках опухолей человека, зависящих от внеклеточного глутамината [45]. Содержание глутамината и GSH снижается в клетках с низкой экспрессией гена этого транспортёра, также как и снижается активность глутаминазы 1 и 2. Эта система регулируется онкогенным фактором транскрипции с-Мус в клетках рака предстательной железы и лимфомы [45, 46]. Обнаружено, что miR-23a и miR-24b могут подавлять экспрессию гена *SLC1A5*, снижая метаболизм глутамината в опухоли [46]. Репрессия этих микроРНК онкогенным фактором с-Мус приводила к повышению экспрессии гена *GLS* и усилению катаболизма глутамината в клетках меланомы. Вторым механизмом влияния глутамината на уровень GSH связан с его ролью в поддержании содержания GSH в восстановленной форме благодаря поддержанию уровня образования NADPH(H⁺) путем регуляции содержания малата [44]. Образование малата из глутамината может осуществляться двумя путями. По первому пути малат, полученный из глутамината, транспортируется из митохондрий в цитоплазму и превращается малик-ферментом в пируват, восстанавливая NADP⁺ до NADPH(H⁺). По второму пути, связанному с малат-аспартатным челночным механизмом, аспартат, полученный в матриксе митохондрий при переаминировании глутамината и оксалоацетата, транспортируется из митохондрий в цитозоль. В цитозоле аспартат трансаминируется в оксалоацетат под действием AsAT и затем превращается в малат с последующим образованием пирувата и NADPH(H⁺) [47]. NADPH(H⁺) имеет решающее значение для регенерации GSH из окисленной формы GSSG при действии фермента GR [14].

Третий механизм влияния глутамината на синтез GSH связан с транспортом цистина в клетку. Транспортная цистин-глутаматная система Хс зависит от доступности глутамината для клеток, так как одна молекула глутамината обменивается на молекулу цистина. Экспериментально доказано, что содержание глутамината и глутамината имеет решающее значение для поддержания необходимого для клетки уровня GSH [44].

Помимо глутамината и цистеина синтез GSH зависит от доступности глицина, который является необходимой аминокислотой для многих метаболических процессов, одним из которых является синтез пуринов (аденин, гуанин) в

быстро делящихся опухолевых клетках. Дефицит серина и глицина вызывает снижение синтеза GSH, повышая генерацию АФК в культуре опухолевых клеток. Глицин является заменимой аминокислотой, синтез которой возможен из серина. В некоторых случаях серин может быть получен путем транссульфурации. В опухолях, где этот путь нарушен, обнаружено повышенное накопление 3-фосфоглицерата [48]. Экспериментально показано, что повышение содержания глицина способствует онкогенезу [49]. В опухолевых клетках NCI-60 обнаружено, что потребление глицина и экспрессия генов ферментов, необходимых для биосинтеза глицина, коррелируют со скоростью пролиферации клеток.

Высокое соотношение GSH/GSSG в опухолевых клетках может быть объяснено повышением активности пентозофосфатного пути (ПП), в результате которого образуется NADPH(H^+) [50]. Так, активация ПП, значительное количество GSH и промежуточных метаболитов ПП обнаружены в клетках почечно-клеточной карциномы [51]. ПП является единственным внутриклеточным путём, в процессе которого образуются пентозы (рибоза), необходимые для синтеза нуклеиновых кислот, коферментов (NAD, FAD), макроэргических соединений (АТФ, ГТФ), циклических нуклеотидов (цАМФ, цГМФ). Второй биосинтетической особенностью ПП является образование NADPH(H^+), составляющего 65–70% от его общего содержания в клетке, необходимого для биосинтеза жирных кислот, холестерина, желчных кислот, стероидных гормонов. Все эти соединения необходимы клеткам растущей опухоли, как и GSH, пополнению пула которого способствует GR, катализирующая восстановление GSSG с использованием NADPH(H^+) [14].

РОЛЬ микроРНК В РЕГУЛЯЦИИ СИНТЕЗА GSH В ОПУХОЛЕВЫХ КЛЕТКАХ

Особое внимание в последнее время уделяется роли микроРНК в регуляции метаболизма опухолевых клеток и возможности их использования в комбинации с противоопухолевыми препаратами. Данные многих работ демонстрируют значительную роль микроРНК в регуляции содержания GSH в опухолевых клетках, контролируя не только его синтез, но и восстановление GSSG (таблица). Установлено, что действие с-Мус-активированной miR-18a приводит к подавлению экспрессии гена *GCLC* и повышению чувствительности опухолей к окислительному стрессу. Напротив, ингибирование

miR-18a *in vivo* приводит к повышению экспрессии гена *GCLC* и содержания GSH в опухоли [52]. Экспрессия гена *GCLC* может подавляться действием miR-18a при раке предстательной железы и miRNA-153 в клетках глиобластомы [53, 54]. На моделях почечного и печёночного фиброза установлено подавление экспрессии генов *GCLC*, *GCLM* и снижение содержания GSH при действии miR-433 [55]. MiRNA-433 подавляет экспрессию этих генов (как каталитической, так и регуляторной субъединиц γ -GCL) с помощью Nrf2-независимого механизма в клетках злокачественных опухолей яичника и кишечника [56, 57]. Напротив, в клетках гепатоклеточной карциномы miRNA-27a/b модулирует экспрессию гена *GCLC* Nrf2-зависимым путём [58]. При исследовании уровня экспрессии гена *GS* у пациентов с хроническим лимфоцитарным лейкозом установлено обратно пропорциональное соотношение между экспрессией этого гена и уровнем miRNA125-b [59].

Сверхэкспрессия miRNA-214 приводит к снижению экспрессии гена *GR* в клетках рака молочной железы, лёгкого, шейки матки, толстого кишечника, что связано с плохим прогнозом для пациентов [60–63]. MiRNA22 подавляет экспрессию гена *GGT* в клетках злокачественных опухолей, толстого кишечника и предстательной железы [64, 65].

Отмечается влияние микроРНК на поступление в клетки цистеина, необходимого для синтеза GSH, посредством регуляции его транспорта Xc-системой, которая стабилизируется в клеточной мембране с помощью CD44v, известного маркера опухолевых стволовых клеток [41]. В опухолевых клетках колоректального рака экспрессия гена *SLC7A11*, кодирующей Xc-систему, имеет обратную корреляцию с уровнем экспрессии miRNA-26b [66]. Рост экспрессии miRNA-375 вызывает подавление экспрессии гена *SLC7A11*, что повышает радиочувствительность и снижает пролиферацию и инвазию плоскоклеточного рака полости рта [67]. Подобный эффект имеет место и при сверхэкспрессии miRNA-27a, которая снижает уровень Xc и, как следствие, содержание внутриклеточного GSH, тем самым повышая чувствительность к противоопухолевым препаратам клеток рака мочевого пузыря, устойчивых к цисплатину [68].

РОЛЬ GSH В ПРОГРАММИРУЕМОЙ ГИБЕЛИ ОПУХОЛЕВЫХ КЛЕТОК

Уровень GSH и соотношение GSH/GSSG являются важной характеристикой клеточного редокс-статуса, поддерживающего клеточный

МикроРНК, участвующие в регуляции синтеза GSH и восстановления GSSG в опухолевых клетках

МикроРНК	Мишень	Эффект	Вид новообразования	Ссылки
miRNA-18a	γ -GCL	онкоген	гепатоклеточная карцинома	[52]
			рак простаты	[53]
miRNA-433	γ -GCL	онкосупрессор	рак яичника	[56]
			рак кишечника	[57]
miRNA-27a/b	γ -GCL	онкосупрессор	гепатоклеточная карцинома	[58]
miRNA-153	γ -GCL	онкосупрессор	глиобластома	[54]
miRNA-125b	GS	онкосупрессор	хронический лимфолейкоз	[59]
miRNA-214	GR	онкосупрессор	рак молочной железы	[60]
			рак лёгкого	[61]
			колоректальный рак	[62]
			рак шейки матки	[62]
			рак почки	[63]
miRNA-22	γ -GGT	онкосупрессор	колоректальный рак	[64]
		онкоген	рак простаты	[65]
miRNA-26b	Xc	онкосупрессор	колоректальный рак	[66]
miRNA-375	Xc	онкосупрессор	плоскоклеточный рак ротовой полости	[67]
miRNA-27a	Xc	онкосупрессор	рак мочевого пузыря	[68]

гомеостаз и влияющего на жизнеспособность клетки, в том числе на способность к пролиферации, дифференцировке, программируемой гибели. Значительное снижение содержания GSH и соотношения GSH/GSSG может быть пусковым триггером для разных типов программируемой гибели клеток (апоптоз, аутофагия, некроптоз, ферроптоз), однако, возможно и включение смешанных или множественных форм гибели [69].

Апоптотическая гибель клеток, как наиболее изученный тип программируемой гибели, характеризуется уменьшением объёма цитоплазмы, конденсацией хроматина, фрагментацией ядра, блеббингом клеточной мембраны и образованием апоптотических телец. Снижение содержания GSH терапевтическими факторами (ряд противоопухолевых препаратов, радиотерапия) может сопровождаться инициацией апоптоза и происходит в результате ряда причин: дефицита субстратов для синтеза GSH, ин-

гибирования процесса синтеза GSH, усиленного использования GSH в процессах детоксикации и активации транспорта GSH из клетки [70]. Уменьшение содержания GSH в клетке приводит к недостаточности антиоксидантной системы и росту образования АФК, что вызывает повреждение мембран митохондрий, падение трансмембранного потенциала, нарушение процессов синтеза АТФ, активацию внутреннего пути развития апоптоза (рис. 2). Повышенный уровень АФК и снижение митохондриального отношения mGSH/GSSG приводит к повышению проницаемости наружной мембраны митохондрий благодаря мегапорам (образованным, в частности, в результате роста соотношения белков Bax/Bcl2), что сопровождается высвобождением фактора AIF, активирующего апоптоз, цитохрома c, образованием апоптосом и активацией каспаз [69, 70].

Снижение синтеза GSH при действии необратимого ингибитора γ -GCL L-бутионин-(S,

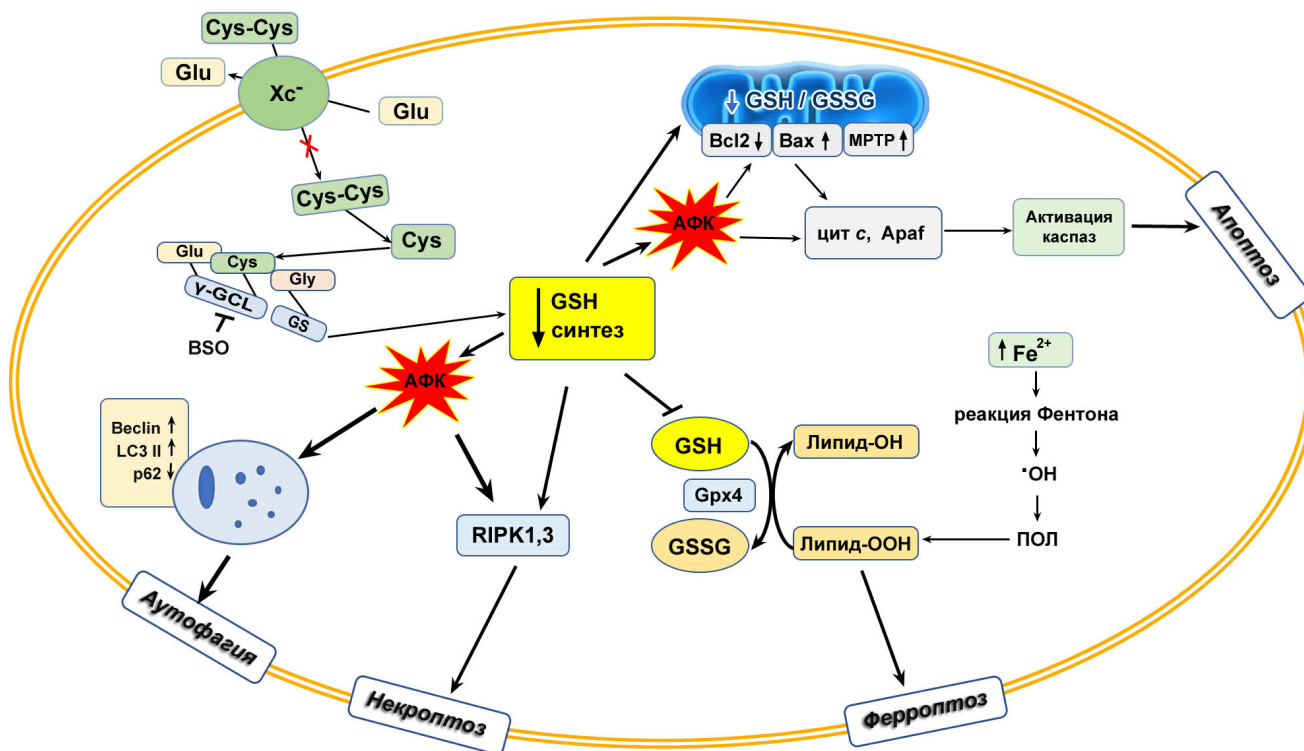


Рис. 2. Роль GSH в механизмах программируемой гибели опухолевых клеток. Подавление синтеза GSH способствует активации: а) *апоптоза*: путем снижения поступления GSH в митохондрии и отношения mGSH/GSSG с последующим повышением уровня АФК, пермеабилзации внешней митохондриальной мембраны (mPTP), соотношения белков Bax/Bcl2, высвобождением про-апоптотических факторов, цитохрома *c*, образованием апоптосом, активацией каспаз и фрагментацией ДНК; б) *некроптоза*: падение уровня GSH сопровождается ростом генерации АФК, активации киназ RIPK1 и RIPK3, сборкой некрисом; в) *ферроптоза*: распад ферритина, значительно повышающий содержание ионов Fe^{2+} , наряду с ростом уровня H_2O_2 запускает реакцию Фентона, которая приводит к образованию $\cdot OH$ радикалов, инициирующих перекисное окисление липидов (ПОЛ). Дефицит GSH, как косубстрата Gpx4, приводит к накоплению гидроперекисей липидов, активирующих ферроптоз; г) *аутофагии*: истощение содержания GSH способствует H_2O_2 -зависимой активации аутофагии, сопровождающейся усиленным образованием аутофагосом и изменением содержания маркеров аутофагии - ростом содержания белков Beclin, LC3 II и деградацией белка p62, связывающегося с убиквитинированными белками

R)-сульфоксимины (BSO) способствует активации апоптоза в клетках рака молочной железы, яичников и почки и замедляет рост клеток при раке пищевода [71]. Комбинированная терапия BSO и мелфалана, используемая для пациентов с резистентной нейробластомой, сопровождалась активацией апоптоза опухолевых клеток [72]. Введение BSO повышало чувствительность клеток опухоли к химиотерапевтическим средствам у пациентов с миеломой и раком шеи [73]. Препарат повышал действие нифуртимокса для подавления роста опухолевых клеток и продемонстрировал способность эффективного модулятора GSH-опосредованной лекарственной резистентности за счёт повышения цитотоксичности алкилирующих агентов и радиации *in vitro*.

Использование флавоноида лутеолина приводит к снижению жизнеспособности клеток холангиокарциномы путём активации апоптоза благодаря росту генерации АФК, возникающего

в результате снижения активности γ -GCL и содержания GSH [74].

При **некроптозе** отсутствует фрагментация ДНК, в отличие от апоптоза происходит увеличение объёма органелл и клетки, разрушение цитоплазматической мембраны [75]. Ключевыми регуляторами некроптоза являются протеинкиназы 1 (RIPK1, receptor-interacting serine/threonine-protein kinase 1) и 3 (RIPK3, receptor-interacting serine/threonine-protein kinase 3), взаимодействующие с так называемыми рецепторами смерти, среди которых выделяют TNFR1 и TNFR2 (рецепторы некроза опухоли TNF- α), рецепторы FasL (Fas ligand) и TRAIL (TNF-related apoptosis-inducing ligand). RIPK1 и RIPK3 аутофосфорилируются, трансфосфорилируют друг друга и собираются в некрисомы. Активаторы некроптоза и внешнего апоптоза могут быть общими. Так, каспаза 8 и протеинкиназа 1 контролируют переключение между апоптозом и некрозом [76]. Во многих работах

показана связь между снижением содержания GSH и активацией некроптоза. Так, действие диметилфумарата, используемого для лечения рассеянного склероза, активировало некроптоз клеток карциномы толстого кишечника мыши CT26, вызывая падение уровня GSH и рост генерации АФК наряду с активацией MAP-киназ JNK, p38, ERK. Добавление GSH и *N*-ацетилцистеина препятствовало развитию некроптоза [77]. Аналогичный эффект был получен при действии оритодина (дитерпеноид, обладающий противовоспалительным действием, получаемый из китайского лекарственного растения *Rabdosia rubescens*) на клетки аденокарциномы 786-О: развитию некроптоза, связанного с активацией JNK, p38, ERK, препятствовало введение GSH и его предшественника *N*-ацетилцистеина [78]. Снижение соотношения GSH/GSSG и повышение образования АФК под действием противомаларийного препарата артесуната в клетках почечной карциномы человека также приводило к развитию некроптоза. Этот эффект подавлялся при введении некростатина-1 или при нокдауне RIPK1 [79]. Дефицит цистина/цистеина, необходимого для синтеза GSH, также вызывает развитие окислительного стресса и приводит к активации как некроптоза, так и ферроптоза [80].

Характерной особенностью **ферроптоза** является активация Fe^{2+} -зависимого перекисного окисления липидов [81]. Морфологически клетки, подвергнутые ферроптозу, отличаются уменьшением размера митохондрий и митохондриальных крист, а также наличием разрывов внешней митохондриальной мембраны. Механизм ферроптоза связан с накоплением в клетке свободного Fe^{2+} . Медиаторами ферроптоза являются белки, участвующие в метаболизме железа: трансферрин, рецептор трансферрина (TFR), ферропортин, тяжёлая и лёгкая цепи ферритина. Уровень железа в клетках регулируется TFR, который транспортирует железо в клетки, и ферропортином, экспортирующим железо из клетки. Ионы железа (Fe^{3+}) поступают в клетку с помощью TFR и затем восстанавливаются с образованием Fe^{2+} . Железо, хранящееся в ферритине, высвобождается в результате его распада в лизосомах. Распад ферритина, значительно повышающий содержание ионов Fe^{2+} , наряду с ростом уровня H_2O_2 запускает реакцию Фентона, которая приводит к образованию высоко реакционноспособных $\cdot\text{OH}$ радикалов, инициирующих перекисное окисление липидов (ПОЛ) и накопление гидроперекисей липидов (в основном гидроперекисей фосфатидилэтаноламинов), активирующих ферроптоз [82] (рис. 2). Дополнительным признаком ферроп-

тоза являются Fe^{2+} -зависимая инактивация глутатионпероксидазы 4 (Gpx4), основным субстратом которой являются гидроперекиси фосфолипидов [82]. Одним из основных факторов, активирующих ферроптоз, является снижение содержания GSH, косубстрата Gpx4, чаще всего за счёт дефицита Xc-системы, поставляющей цистин, необходимый для синтеза GSH [83]. Эрастин, первый обнаруженный индуктор ферроптоза, являясь ингибитором системы транспорта Xc-, активно снижает транспорт цистина в клетку, вызывая дефицит синтеза GSH, что активирует образование АФК, гидроперекисей фосфолипидов и ферроптоз [82]. Эрастин необратимо связывается с транспортным белком SLC7A11 Xc-системы, инактивируя его. Действие эрастина снижает антиоксидантную защиту клетки путем подавления активности Gpx4, которая не может восстанавливать гидроперекиси липидов вследствие дефицита GSH как косубстрата [84]. Этот эффект может быть блокирован добавлением в среду GSH и *N*-ацетилцистеина. Имидазолилкетоэрастин, аналог карбонилэрастина, также может ингибировать систему Xc- и является более эффективным в отношении подавления роста опухолевых клеток, чем эрастин [85]. Действие эрастина не вызывает морфологических или биохимических изменений, подобных тем, которые происходят при апоптозе клеток, такие как изменение хроматина или распад поли-АДФ-рибозо-полимеразы (PARP). Кроме того, гибель клеток, вызванная эрастином, не блокируется ингибиторами апоптоза, некроптоза или аутофагии. Однако антиоксиданты (витамин E) и хелаторы железа (мезилат дефероксамина) блокируют гибель клеток. Таким образом, ферроптоз является железо-зависимой, неапоптотической формой регулируемой гибели клеток [81].

Механизм ферроптоза связан с регуляцией некоторых патологических процессов, в том числе развития злокачественных новообразований. Многочисленные исследования подтвердили, что ферроптоз играет ключевую роль в подавлении роста опухоли. Так, ферроптоз может быть причиной гибели опухолевых клеток лёгких, молочной железы, поджелудочной железы, почек [86]. В связи с этим индукция ферроптоза рассматривается как новая терапевтическая стратегия в лечении рака. Часто используемые ингибиторы Xc-системы (сульфасалазин и эрастин) могут применяться в качестве терапевтических средств для повышения чувствительности клеток опухоли к противоопухолевым агентам. Данные препараты, снижая внутриклеточный уровень цистина, вызывают ферроптоз [87]. Такие препараты, как сорафениб и артесу-

нат, могут вызывать ферроптоз клеток некоторых видов злокачественных новообразований. Поэтому их предлагается использовать в комбинированных схемах химиотерапии. Обнаружено, что сорафениб вызывает ферроптоз в клетках гепатокарциномы, ингибируя Хс-систему и снижая содержание GSH [88]. Сорафениб, как ингибитор протоонкогенных киназ, применяется для лечения пациентов с почечно-клеточной карциномой, распространённой гепатоцеллюлярной карциномой и другими солидными опухолями. Противоопухолевая эффективность сорафениба коррелирует с ингибированием сигнального пути Raf-MEK-ERK и нескольких рецепторных тирозинкиназ, включая рецептор фактора роста эндотелия сосудов VEGF, тем самым ингибируя неоангиогенез. Однако индукция ферроптоза не связана с ингибирующим действием сорафениба на RAF киназы. Существует два основных механизма, с помощью которых сорафениб вызывает ферроптоз. Согласно первому механизму сорафениб, как и эрастин, ингибирует импорт цистина Хс-системой, вызывая стресс эндоплазматического ретикулума, истощение GSH и железо-зависимое накопление липидных АФК [87]. Другой механизм связан с путём p62-Keap1-NRF2, когда предполагается, что Nrf2 является ключевым фактором в определении терапевтического ответа на лечение, направленное на активацию ферроптоза в клетках опухоли [89].

Среди противоопухолевых препаратов, используемых для лечения солидных опухолей, цисплатин обладает весьма высокой эффективностью. Его противоопухолевый эффект в значительной степени обусловлен алкилирующим действием на ДНК. Однако недавние исследования показали, что цисплатин может активировать как ферроптоз, так и апоптоз в опухолевых клетках [90]. Такое свойство цисплатина объясняется способностью легко связываться с тиольными группами, что определяет его высокое сродство к GSH, являющимся одним из самых распространённых небелковых тиолов в клетках. Показано, что большая часть внутриклеточного цисплатина связывается с GSH, образуя комплекс Pt-GS. Подобно эрастину истощение GSH, наряду с инактивацией Gpx4, является основным механизмом действия цисплатина, вызывающим активацию ферроптоза [82, 90].

При **аутофагии** происходит процесс разрушения цитоплазматических компонентов в лизосомах клетки в условиях стресса. Аутофагия сопровождается образованием аутофагосом, включающих удаляемые органеллы и цитоплазму, с последующим формированием аутофаголизосом в результате слияния с лизосомами, в

которых содержимое подвергается распаду. Длительное время аутофагию считали механизмом защиты клеток. Однако аутофагия может вызывать гибель клеток, и её можно рассматривать как механизм подавления роста опухолей [91]. Низкий уровень GSH в клетке, способствуя развитию окислительного стресса, является сигналом для активации аутофагии как реакции адаптации к стрессу [92]. Различные пути снижения внутриклеточного GSH способствуют активации аутофагии. Так, ингибирование Хс-системы при действии сульфасалазина, приводящее к снижению транспорта цистина в опухолевые клетки и подавлению синтеза GSH, сопровождается активацией аутофагии [93]. Истощение содержания GSH способствует H_2O_2 -зависимой активации аутофагии, сопровождающейся усиленным образованием аутофагосом и изменением содержания маркеров аутофагии – ростом содержания белка LC3 II и деградацией белка p62, связывающегося с убиквитинированными белками [94]. Процессы аутофагии и ферроптоза часто развиваются одновременно при снижении уровня GSH и активности Gpx4. Ферроптоз, вызываемый дигидроартемизинином в клетках острого миелоидного лейкоза, развивается в результате активации процесса аутофагии при понижении содержания GSH, деградации ферритина и накоплении ионов Fe^{2+} [95]. Повышение активности лизосом при ферроптозе связано с усилением шаперон-опосредуемой аутофагии, приводящей к деградации Gpx4 [96]. Действие эрастина стимулирует как ферроптоз, так и аутофагию опухолевых клеток [97]. Ингибирование лизосомальной функции биламицином A1 и хлорохином может значительно замедлить процесс ферроптоза, активированный эрастином [98]. Внутриклеточный распад ферритина является зависимым от аутофагии, для этого коактиватор ядерного рецептора 4 (NCOA4) в качестве транспортёра доставляет ферритин к аутофагосоме [99].

Снижение внутриклеточного содержания GSH в результате подавления его синтеза и/или повышенного использования за счёт роста генерации АФК может быть общим событием в возникновении одновременно разных форм программируемой гибели опухолевых клеток. Так, фенетилизотиоцианат, обладающий противоопухолевым эффектом в отношении многих видов злокачественных новообразований, при действии на клетки остеосаркомы K7M2, вызывая снижение уровня GSH (за счёт связывания с его SH-группой) с последующим ростом образования АФК и активацией редокс-зависимого сигналинга, приводит к гибели опухолевых клеток путём активации как ферроптоза, так и ауто-

фагии, апоптоза [100]. Данный факт может рассматриваться в качестве возможного доказательства роли внутриклеточного уровня GSH и соотношения GSH/GSSG как триггера в редокс-зависимой регуляции механизмов программируемой клеточной гибели.

Таким образом, многочисленные данные свидетельствуют о значимости GSH и соотношения GSH/GSSG в регуляции жизнеспособности опухолевых клеток, инициации развития опухоли, её прогрессии и лекарственной устойчивости. Тем не менее контроль механизмов синтеза глутатиона в доброкачественных и злокачественных опухолях остаётся малоизученным. Дальнейшее исследование механизмов регуляции синтеза GSH может помочь в поиске

более селективных и менее токсичных ингибиторов синтеза GSH, которые можно применять в сочетании с противоопухолевыми препаратами для эффективного подавления роста злокачественных новообразований.

Финансирование. Публикация подготовлена при финансовой поддержке Программы РУДН «5-100».

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

- Scirè, A., Cianfruglia, L., Minnelli, C., Bartolini, D., Torquato, P., Principato, G., Galli, F., and Armeni, T. (2019) Glutathione compartmentalization and its role in glutathionylation and other regulatory processes of cellular pathways, *Biofactors*, **45**, 152-168, doi: 10.1002/biof.1476.
- Kalinina, E. V., Chernov, N. N., and Novichkova, M. D. (2014) Role of glutathione, glutathione transferase, and glutaredoxin in regulation of redox-dependent processes, *Biochemistry (Moscow)*, **79**, 1562-1583, doi: 10.1134/S0006297914130082.
- Dwivedi, D., Megha, K., Mishra, R., and Mandal, P. K. (2020) Glutathione in brain: overview of its conformations, functions, biochemical characteristics, quantitation and potential therapeutic role in brain disorders, *Neurochem. Res.*, doi: 10.1007/s11064-020-03030-1.
- Teskey, G., Abraham, R., Cao, R., Gjurjic, K., Islamoglu, H., Lucero, M., Martinez, A., Paredes, E., Salaiz, O., Robinson, B., and Venketaraman, V. (2018) Glutathione as a marker for human disease, *Adv. Clin. Chem.*, **87**, 141-159, doi: 10.1016/bs.acc.2018.07.004.
- Xiao, Y., and Meierhofer, D. (2019) Glutathione metabolism in renal cell carcinoma progression and implications for therapies, *Int. J. Mol. Sci.*, **20**, 3672, doi: 10.3390/ijms20153672.
- Bansal, A., and Simon, M. C. (2018) Glutathione metabolism in cancer progression and treatment resistance, *J. Cell Biol.*, **217**, 2291-2298, doi: 10.1083/jcb.201804161.
- Galadari, S., Rahman, A., Pallichankandy, S., and Thayyullathil, F. (2017) Reactive oxygen species and cancer paradox: to promote or to suppress? *Free Radic. Biol. Med.*, **104**, 144-164, doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2017.01.004.
- Chatterjee, A., and Gupta, S. (2018) The Multifaceted role of glutathione S-transferases in cancer, *Cancer Lett.*, **433**, 33-42, doi: 10.1016/j.canlet.2018.06.028.
- Desideri, E., Ciccarone, F., and Ciriolo, M. R. (2019) Targeting glutathione metabolism: partner in crime in anti-cancer therapy, *Nutrients*, **11**, 1926, doi: 10.3390/nut11081926.
- Kengen, J., Deglasse, J. P., Neveu, M. A., Mignon, L., Desmet, C., Gourgue, F., Jonas, J. C., Gallez, B., and Jordan, B. F. (2018) Biomarkers of tumour redox status in response to modulations of glutathione and thioredoxin antioxidant pathways, *Free Radic. Res.*, **52**, 256-266, doi: 10.1080/10715762.2018.1427236.
- Kirtonia, A., Sethi, G., and Garg, M. (2020) The multifaceted role of reactive oxygen species in tumorigenesis, *Cell. Mol. Life Sci.*, doi: 10.1007/s00018-020-03536-5.
- Xiao, Y., Yang, H., and Lu, J. (2019) Serum gamma-glutamyltransferase and the overall survival of metastatic pancreatic cancer, *BMC Cancer*, **19**, 1020, doi: 10.1186/s12885-019-6250-8.
- Huang, Z. Z., Chen, C., Zeng, Z., Yang, H., Oh, J., Chen, L., and Lu, S. C. (2001) Mechanism and significance of increased glutathione level in human hepatocellular carcinoma and liver regeneration, *FASEB J.*, **15**, 19-21, doi: 10.1096/fj.00-0445fj.
- Lu, S. C. (2013) Glutathione synthesis, *Biochim. Biophys. Acta*, **1830**, 3143-3153, doi: 10.1016/j.bbagen.2012.09.008.
- Ookhtens, M., and Kaplowitz, N. (1998) Role of the liver in interorgan homeostasis of glutathione and cyst(e)ine, *Semin. Liver Dis.*, **18**, 313-329, doi: 10.1055/s-2007-1007167.
- Lu, S. C. (2009) Regulation of glutathione synthesis, *Mol. Aspects Med.*, **30**, 42-59, doi: 10.1016/j.mam.2008.05.005.
- Lien, E. C., Lyssiotis, C. A., Juvekar, A., Hu, H., Asara, J. M., Cantley, L. C., and Toker, A. (2016) Glutathione biosynthesis is a metabolic vulnerability in PI(3)K/Akt-driven breast cancer, *Nat. Cell Biol.*, **18**, 572-578, doi: 10.1038/ncb3341.
- Ristoff, E., and Larsson, A. (2007) Inborn errors in the metabolism of glutathione, *Orphanet J. Rare Dis.*, **2**, 16, doi: 10.1186/1750-1172-2-16.
- Huseby, N. E., Ravuri, C., and Moens, U. (2016) The proteasome inhibitor lactacystin enhances GSH synthesis capacity by increased expression of antioxidant components in an Nrf2-independent, but p38 MAPK-dependent manner in rat colorectal carcinoma cells, *Free Radic. Res.*, **50**, 1-13, doi: 10.3109/10715762.2015.1100730.
- Koyani, C. N., Kitz, K., Rossmann, C., Bernhart, E., Huber, E., Trummer, C., Windischhofer, W., Sattler, W., and Malle, E. (2016) Activation of the MAPK/Akt/Nrf2-Egr1/HO-1-GCLC axis protects MG-63 osteosarcoma cells against 15d-PGJ2-mediated cell death, *Biochem. Pharmacol.*, **104**, 29-41, doi: 10.1016/j.bcp.2016.01.011.
- Hiyama, N., Ando, T., Maemura, K., Sakatani, T., Amano, Y., Watanabe, K., Kage, H., Yatomi, Y., Nagase, T., Nakajima, J., and Takai, D. (2018) Glutamate-cysteine ligase catalytic subunit is associated with cisplatin resistance in lung adenocarcinoma, *Jpn. J. Clin. Oncol.*, **48**, 303-307, doi: 10.1093/jjco/hyy013.

22. Dequanter, D., Van De Velde, M., Bar, I., Nuyens, V., Rousseau, A., Nagy, N., Vanhamme, L., Vanhaeverbeek, M., Brohée, D., Delrée, P., Boudjeltia, K., Lothaire, P., and Uzureau, P. (2016) Nuclear localization of glutamate-cysteine ligase is associated with proliferation in head and neck squamous cell carcinoma, *Oncol. Lett.*, **11**, 3660-3668, doi: 10.3892/ol.2016.4458.
23. Tatebe, S., Unate, H., Sinicrope, F. A., Sakatani, T., Sugamura, K., Makino, M., Ito, H., Savaraj, N., Kaibara, N., and Kuo, M. T. (2002) Expression of heavy subunit of gamma-glutamylcysteine synthetase (gamma-GCSh) in human colorectal carcinoma, *Int. J. Cancer*, **97**, 21-27, doi: 10.1002/ijc.1574.
24. Li, M., Zhang, Z., Yuan, J., Zhang, Y., and Jin, X. (2014) Altered glutamate cysteine ligase expression and activity in renal cell carcinoma, *Biomed. Rep.*, **2**, 831-834, doi: 10.3892/br.2014.359.
25. Syu, J. P., Chi, J. T., and Kung, H. N. (2016) Nrf2 is the key to chemotherapy resistance in MCF7 breast cancer cells under hypoxia, *Oncotarget*, **7**, 14659-14672, doi: 10.18632/oncotarget.7406.
26. Njålsson, R., and Norgren, S. (2005) Physiological and pathological aspects of GSH metabolism, *Acta Paediatr.*, **94**, 132-137, doi: 10.1111/j.1651-2227.2005.tb01878.x.
27. Njålsson, R., Carlsson, K., Winkler, A., Larsson, A., and Norgren, S. (2003) Diagnostics in patients with glutathione synthetase deficiency but without mutations in the exons of the *GSS* gene, *Hum. Mutat.*, **22**, 14659-14672, doi: 10.1002/humu.9199.
28. Li, X., Ding, Y., Liu, Y., Ma, Y., Song, J., Wang, Q., and Yang, Y. (2015) Five Chinese patients with 5-oxoprolinuria due to glutathione synthetase and 5-oxoprolinase deficiencies, *Brain Dev.*, **37**, 952-959, doi: 10.1016/j.braindev.2015.03.005.
29. Winkler, A., Njålsson, R., Carlsson, K., Elgadi, A., Rozell, B., Abraham, L., Ersal, N., Shi, Z. Z., Lieberman, M. W., Larsson, A., and Norgren, S. (2011) Glutathione is essential for early embryogenesis-analysis of a glutathione synthetase knockout mouse, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **412**, 121-126, doi: 10.1016/j.bbrc.2011.07.056.
30. Ke, H. L., Lin, J., Ye, Y., Wu, W. J., Lin, H. H., Wei, H., Huang, M., Chang, D. W., Dinney, C. P., and Wu, X. (2015) Genetic variations in glutathione pathway genes predict cancer recurrence in patients treated with transurethral resection and *Bacillus Calmette-Guérin* instillation for non-muscle invasive bladder cancer, *Ann. Surg. Oncol.*, **22**, 4104-4110, doi: 10.1245/s10434-015-4431-5.
31. Strohkamp, S., Gemoll, T., Humborg, S., Hartwig, S., Lehr, S., Freitag-Wolf, S., Becker, S., Franzén, B., Pries, R., Wollenberg, B., Roblick, U. J., Bruch, H. P., Keck, T., Auer, G., and Habermann, J. K. (2018) Protein levels of clusterin and glutathione synthetase in platelets allow for early detection of colorectal cancer, *Cell. Mol. Life Sci.*, **75**, 323-334, doi: 10.1007/s00018-017-2631-9.
32. Terzyan, S. S., Burgett, A. W. G., Heroux, A., Smith, C. A., Mooers, B. H., and Hanigan, M. H. (2015) Human γ -glutamyl transpeptidase 1: structures of the free enzyme, inhibitor-bound tetrahedral transition states, and glutamate-bound enzyme reveal novel movement within the active site during catalysis, *J. Biol. Chem.*, **290**, 17576-17586, doi: 10.1074/jbc.M115.659680.
33. Hofbauer, S. L., Stangl, K. I., de Martino, M., Lucca, I., Haitel, A., Shariat, S. F., and Klatte, T. (2014) Pretherapeutic gamma-glutamyltransferase is an independent prognostic factor for patients with renal cell carcinoma, *Br. J. Cancer*, **111**, 1526-1531, doi: 10.1038/bjc.2014.450.
34. Corti, A., Franzini, M., Paolicchi, A., and Pompella, A. (2010) Gamma-glutamyltransferase of cancer cells at the crossroads of tumor progression, drug resistance and drug targeting, *Anticancer Res.*, **30**, 1169-1181.
35. Lu, E., Wolfrey, F. D., Muppidi, J. R., Xu, Y., and Cyster, J. G. (2019) S-geranylgeranyl-L-glutathione is a ligand for human B-cell confinement receptor P2RY, *Nature*, **567**, 244-248, doi: 10.1038/s41586-019-1003-z.
36. Ramsay, E. E., and Dilda, P. J. (2014) Glutathione S-conjugates as prodrugs to target drug-resistant tumors, *Front. Pharmacol.*, **5**, 181, doi: 10.3389/fphar.2014.00181.
37. Lu, S. C., and Mato, J. M. (2012) S-adenosylmethionine in liver health, injury, and cancer, *Physiol. Rev.*, **92**, 1515-1542, doi: 10.1152/physrev.00047.2011.
38. Kredich, N. M. (2008) Biosynthesis of cysteine, *EcoSal Plus.*, **3**, 1-30, doi: 10.1128/ecosalplus.3.6.1.11.
39. Hakimi, A. A., Reznik, E., Lee, C.-H., Creighton, C. J., Brannon, A. R., Luna, A., Aksoy, B. A., Liu, E. M., Shen, R., and Lee, W. (2016) An integrated metabolic atlas of clear cell renal cell carcinoma, *Cancer Cell*, **29**, 104-116, doi: 10.1016/j.ccell.2015.12.004.
40. Shin, C. S., Mishra, P., Watrous, J. D., Carelli, V., D'Aurelio, M., Jain, M., and Chan, D. C. (2017) The glutamate/cystine xCT antiporter antagonizes glutamine metabolism and reduces nutrient flexibility, *Nat. Commun.*, **8**, 5074, doi: 10.1038/ncomms15074.
41. Lo, M., Wang, Y. Z., and Gout, P. W. (2008) The x(c)(-) cystine/glutamate antiporter: a potential target for therapy of cancer and other diseases, *J. Cell Physiol.*, **215**, 593-602, doi: 10.1002/jcp.21366.
42. Lewerenz, J., Hewett, S. J., Huang, Y., Lambros, M., Gout, P. W., Kalivas, P. W., Massie, A., Smolders, I., Methner, A., Pergande, M., Smith, S. B., Ganapathy, V., and Maher, P. (2013) The cystine/glutamate antiporter system x(c)(-) in health and disease: from molecular mechanisms to novel therapeutic opportunities, *Antioxid. Redox Signal.*, **18**, 522-555, doi: 10.1089/ars.2011.4391.
43. Lim, J. K. M., Delaidelli, A., Minaker, S. W., Zhang, H. F., Colovic, M., Yang, H., Negri, G. L., von Karstedt, S., Lockwood, W. W., Schaffer, P., Leprivier, G., and Sorensen, P. H. (2019) Cystine/glutamate antiporter xCT (SLC7A11) facilitates oncogenic Russian Academy of Sciences transformation by preserving intracellular redox balance, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **116**, 9433-9442, doi: 10.1073/pnas.1821323116.
44. Zhang, J., Pavlova, N. N., and Thompson, C. B. (2017) Cancer cell metabolism: The essential role of the nonessential amino acid, glutamine, *EMBO J.*, **36**, 1302-1315, doi: 10.15252/embj.201696151.
45. Yang, L., Venneti, S., and Nagrath, D. (2017) Glutaminolysis: a hallmark of cancer metabolism, *Annu. Rev. Biomed. Eng.*, **19**, 163-194, doi: 10.1146/annurev-bioeng-071516-044546.
46. Gao, P., Tchernyshyov, I., Chang, T. C., Lee, Y. S., Kita, K., Ochi, T., Zeller, K. I., De Marzo, A. M., Van Eyk, J. E., Mendell, J. T., and Dang, C. V. (2009) cMyc suppression of miR-23a/b enhances mitochondrial glutaminase expression and glutamine metabolism, *Nature*, **458**, 762-765, doi: 10.1038/nature07823.
47. Altman, B. J., Stine, Z. E., and Dang, C. V. (2016) From Krebs to clinic: Glutamine metabolism to cancer therapy, *Nat. Rev. Cancer*, **16**, 619-634, doi: 10.1038/nrc.2016.71.
48. Locasale, J. W., Grassian, A. R., Melman, T., Lyssiotis, C. A., Mattaini, K. R., Bass, A. J., Heffron, G., Metallo, C. M., Muranen, T., Sharfi, H., Sasaki, A. T., Anastasiou, D., Mullarky, E., Vokes, N. I., Sasaki, M., Beroukhim, R., Stephanopoulos, G., Ligon, A. H., Meyerson, M., Richardson, A. L., Chin, L., Wagner, G., Asara, J. M., Brugge, J. S., Cantley, L. C., and Van der Heiden, M. G. (2011) Phosphoglycerate dehydrogenase diverts glycolytic

- flux and contributes to oncogenesis, *Nat. Genet.*, **43**, 869-874, doi: 10.1038/ng.890.
49. Jain, M., Nilsson, R., Sharma, S., Madhusudhan, N., Kitami, T., Souza, A. L., Kafri, R., Kirschner, M. W., Clish, C. B., and Mootha, V. K. (2012) Metabolite profiling identifies a key role for glycine in rapid cancer cell proliferation, *Science*, **336**, 1040-1044, doi: 10.1126/science.1218595.
50. Zhang, Z. Z., Lee, E. E., Sudderth, J., Yue, Y., Zia, A., Glass, D., Deberardinis, R. J., and Wang, R. C. (2016) Glutathione depletion, pentose phosphate pathway activation, and hemolysis in erythrocytes protecting cancer cells from vitamin C-induced oxidative stress, *J. Biol. Chem.*, **291**, 22861-22867, doi: 10.1074/jbc.C116.748848.
51. Li, B., Qiu, B., Lee, D. S. M., Walton, Z. E., Ochocki, J. D., Mathew, L. K., Mancuso, A., Gade, T. P., Keith, B., Nissim, I., and Simon, M. C. (2014) Fructose-1,6-bisphosphatase opposes renal carcinoma progression, *Nature*, **513**, 251-255, doi: 10.1038/nature13557.
52. Anderton, B., Camarda, R., Balakrishnan, S., Balakrishnan, A., Kohnz, R. A., Lim, L., Evason, K. J., Momcilovic, O., Kruttwig, K., Huang, Q., Xu, G., Nomura, D. K., and Goga, A. (2017) MYC-driven inhibition of the glutamate-cysteine ligase promotes glutathione depletion in liver cancer, *EMBO Rep.*, **18**, 569-585, doi: 10.15252/embr.201643068.
53. Hsu, T. I., Hsu, C. H., Lee, K. H., Lin, J. T., Chen, C. S., Chang, K. C., Su, C. Y., Hsiao, M., and Lu, P. J. (2014) MicroRNA-18a is elevated in prostate cancer and promotes tumorigenesis through suppressing STK4 *in vitro* and *in vivo*, *Oncogenesis*, **3**, 99, doi: 10.1038/oncsis.2014.12.
54. Liu, Z., Wang, J., Li, Y., Fan, J., Chen, L., and Xu, R. (2017) MicroRNA-153 regulates glutamine metabolism in glioblastoma through targeting glutaminase, *Tumour Biol.*, **39**, 1010428317691429, doi: 10.1177/1010428317691429.
55. Espinosa-Diez, C., Fierro-Fernández, M., Sánchez-Gómez, F., Rodríguez-Pascual, F., Alique, M., Ruiz-Ortega, M., Beraza, N., Martínez-Chantar, M. L., Fernández-Hernando, C., and Lamas, S. (2015) Targeting of gamma-glutamyl-cysteine ligase by miR-433 reduces glutathione biosynthesis and promotes TGF- β -dependent fibrogenesis, *Antioxid. Redox Signal.*, **23**, 1092-1105, doi: 10.1089/ars.2014.6025.
56. Liang, T., Guo, Q., Li, L., Cheng, Y., Ren, C., and Zhang, G. (2016) MicroRNA-433 inhibits migration and invasion of ovarian cancer cells via targeting Notch1, *Neoplasia*, **63**, 696-704, doi: 10.4149/neo_2016_506.
57. Li, H., Li, J., Yang, T., Lin, S., and Li, H. (2018) MicroRNA-433 represses proliferation and invasion of colon cancer cells by targeting homeobox A1, *Oncol. Res.*, **26**, 315-322, doi: 10.3727/096504017X15067856789781.
58. Tak, H., Kang, H., Ji, E., Hong, Y., Kim, W., and Lee, E. K. (2018) Potential use of TIA-1, MFF, microRNA-200a-3p, and microRNA-27 as a novel marker for hepatocellular carcinoma, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **497**, 1117-1122, doi: 10.1016/j.bbrc.2018.02.189.
59. Tili, E., Michaille, J. J., Luo, Z., Volinia, S., Rassenti, L. Z., Kipps, T. J., and Croce, C. M. (2012) The down-regulation of miR-125b in chronic lymphocytic leukemias leads to metabolic adaptation of cells to a transformed state, *Blood*, **120**, 2631-2638, doi: 10.1182/blood-2012-03-415737.
60. Wang, F., Li, L., Chen, Z., Zhu, M., and Gu, Y. (2016) MicroRNA-214 acts as oncogene in breast cancer by targeting the PTENPI3K/Akt signaling pathway, *Int. J. Mol. Med.*, **37**, 1421-1428, doi: 10.3892/ijmm.2016.2518.
61. Zhao, X., Lu, C., Chu, W., Zhang, Y., Zhang, B., Zeng, Q., Wang, R., Li, Z., Lv, B., and Liu, J. (2016) MicroRNA-214 governs lung cancer growth and metastasis by targeting carboxypeptidase-D, *DNA Cell Biol.*, **35**, 715-721, doi: 10.1089/dna.2016.3398.
62. Chandrasekaran, K. S., Sathyanarayanan, A., and Karunakaran, D. (2016) MicroRNA-suppresses growth, migration and invasion through a novel target, high mobility group AT-hook 1, in human cervical and colorectal cancer cells, *Br. J. Cancer*, **115**, 741-751, doi: 10.1038/bjc.2016.234.
63. Das, F., Dey, N., Bera, A., Kasinath, B. S., Ghosh-Choudhury, N., and Choudhury, G. G. (2016) MicroRNA-214 reduces insulin-like growth factor-1 (IGF-1) receptor expression and downstream mTORC1 signaling in renal carcinoma cells, *J. Biol. Chem.*, **291**, 14662-14676, doi: 10.1074/jbc.M115.694331.
64. Xia, S. S., Zhang, G. J., Liu, Z. L., Tian, H. P., He, Y., Meng, C. Y., Li, L. F., Wang, Z. W., and Zhou, T. (2017) MicroRNA-22 suppresses the growth, migration and invasion of colorectal cancer cells through a Sp1 negative feedback loop, *Oncotarget*, **8**, 36266-36278, doi: 10.18632/oncotarget.16742.
65. Dhar, S., Kumar, A., Gomez, C. R., Akhtar, I., Hancock, J. C., Lage, J. M., Pound, C. R., and Levenson, A. S. (2017) MTA1-activated EpimicroRNA-22 regulates E-cadherin and prostate cancer invasiveness, *FEBS Lett.*, **591**, 924-933, doi: 10.1002/1873-3468.12603.
66. Fan, D., Lin, X., Zhang, F., Zhong, W., Hu, J., Chen, Y., Cai, Z., Zou, Y., He, X., Chen, X., Lan, P., and Wu, X. (2018) MicroRNA 26b promotes colorectal cancer metastasis by downregulating phosphatase and tensin homolog and wingless-type MMTV integration site family member 5A, *Cancer Sci.*, **109**, 354-362, doi: 10.1111/cas.13451.
67. Zhang, B., Li, Y., Hou, D., Shi, Q., Yang, S., and Li, Q. (2017) MicroRNA-375 inhibits growth and enhances radiosensitivity in oral squamous cell carcinoma by targeting insulin like growth factor 1 receptor, *Cell Physiol. Biochem.*, **42**, 2105-2117, doi: 10.1159/000479913.
68. Drayton, R. M., Dudzic, E., Peter, S., Bertz, S., Hartmann, A., Bryant, H. E., and Catto, J. W. (2014) Reduced expression of miRNA-27a modulates cisplatin resistance in bladder cancer by targeting the cystine/glutamate exchanger SLC7A11, *Clin. Cancer Res.*, **20**, 1990-2000, doi: 10.1158/1078-0432.CCR-13-2805.
69. D'Arcy, M. S. (2019) Cell death: a review of the major forms of apoptosis, necrosis and autophagy, *Cell Biol. Int.*, **43**, 582-592, doi: 10.1002/cbin.11137.
70. Franco, R., and Cidlowski, J. A. (2009) Apoptosis and glutathione: beyond an antioxidant, *Cell Death Differ.*, **16**, 1303-1314, doi: 10.1038/cdd.2009.107.
71. Nishizawa, S., Araki, H., Ishikawa, Y., Kitazawa, S., Hata, A., Soga, T., and Hara, T. (2018) Low tumor glutathione level as a sensitivity marker for glutamate-cysteine ligase inhibitors, *Oncol. Lett.*, **15**, 8735-8743, doi: 10.3892/ol.2018.8447.
72. Villablanca, J. G., Volchenboum, S. L., Cho, H., Kang, M. H., Cohn, S. L., Anderson, C. P., Marachelian, A., Groshen, S., Tsao-Wei, D., Matthay, K. K., Maris, J. M., Hasenauer, C. E., Czarnecki, S., Lai, H., Goodarzi, F., Shimada, H., and Reynolds, C. P. (2016) A phase I new approaches to neuroblastoma therapy study of buthionine sulfoximine and melphalan with autologous stem cells for recurrent/refractory high-risk neuroblastoma, *Pediatr. Blood Cancer*, **63**, 1349-1356, doi: 10.1002/pbc.25994.
73. Tagde, A., Singh, H., Kang, M. H., and Reynolds, C. P. (2014) The glutathione synthesis inhibitor buthionine sulfoximine synergistically enhanced melphalan activity against preclinical models of multiple myeloma, *Blood Cancer J.*, **4**, 229, doi: 10.1038/bcj.2014.45.

74. Kittiratphatthana, N., Kukongviriyapan, V., Prawan, A., and Senggunprai, L. (2016) Luteolin induces cholangiocarcinoma cell apoptosis through the mitochondrial-dependent pathway mediated by reactive oxygen species, *J. Pharm. Pharmacol.*, **68**, 1184-1192, doi: 10.1111/jph.12586.
75. Liu, Y., Liu, T., Lei, T., Zhang, D., Du, S., Girani, L., Qi, D., Lin, C., Tong, R., and Wang Y. (2019) RIP1/RIP3-regulated necroptosis as a target for multifaceted disease therapy (review), *Int. J. Mol. Med.*, **44**, 771-786, doi: 10.3892/ijmm.2019.4244.
76. 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.
77. Xie, X., Zhao, Y., Ma, C. Y., Xu, X. M., Zhang, Y. Q., Wang, C. G., Jin, J., Shen, X., Gao, J. L., Li, N., Sun, Z. J., and Dong, D. L. (2015) Dimethyl fumarate induces necroptosis in colon cancer cells through GSH depletion/ROS increase/MAPKs activation pathway, *Br. J. Pharmacol.*, **172**, 3929-3943, doi: 10.1111/bph.13184.
78. Zheng, W., Zhou, C. Y., Zhu, X. Q., Wang, X. J., Li, Z. Y., Chen, X. C., Chen, F., Che, X. Y., and Xie, X. (2018) Oridonin enhances the cytotoxicity of 5-FU in renal carcinoma cells by inducing necroptotic death, *Biomed. Pharmacother.*, **106**, 175-182, doi: 10.1016/j.biopha.2018.06.111.
79. Chauhan, A. K., Min, K. J., and Kwon, T. K. (2017) RIP1-dependent reactive oxygen species production executes artesunate induced cell death in renal carcinoma Caki cells, *Mol. Cell. Biochem.*, **435**, 15-24, doi: 10.1007/s11010-017-3052-7.
80. Chen, M. S., Wang, S. F., Hsu, C. Y., Yin, P. H., Yeh, T. S., Lee, H. C., and Tseng, L. M. (2017) CHAC1 degradation of glutathione enhances cystine-starvation-induced necroptosis and ferroptosis in human triple negative breast cancer cells via the GCN2-eIF2 α -ATF4 pathway, *Oncotarget*, **8**, 114588-114602, doi: 10.18632/oncotarget.23055.
81. Lei, P., Bai, T., and Sun, Y. (2019) Mechanisms of ferroptosis and relations with regulated cell death. (Review), *Front. Physiol.*, **10**, 139, doi: 10.3389/fphys.2019.00139.
82. Ursini, F., and Maiorino, M. (2020) Lipid peroxidation and ferroptosis: the role of GSH and GPx4 (review), *Free Radic. Biol. Med.*, **152**, 175-185, doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2020.02.027.
83. Miess, H., Dankworth, B., Gouw, A. M., Rosenfeldt, M., Schmitz, W., Jiang, M., Saunders, B., Howell, M., Downward, J., Felsher, D. W., Peck, B., and Schulze, A. (2018) The glutathione redox system is essential to prevent ferroptosis caused by impaired lipid metabolism in clear cell renal cell carcinoma, *Oncogene*, **37**, 5435-5450, doi: 10.1038/s41388-018-0315-z.
84. Seibt, T. M., Proneth, B., and Conrad, M. (2019) Role of GPX4 in ferroptosis and its pharmacological implication, *Free Radic. Biol. Med.*, **133**, 144-152, doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2018.09.014.
85. Larraufie, M. H., Yang, W. S., Jiang, E., Thomas, A. G., Slusher, B. S., and Stockwell, B. R. (2015) Incorporation of metabolically stable ketones into a small molecule probe to increase potency and water solubility, *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **25**, 4787-4792, doi: 10.1016/j.bmcl.2015.07.018.
86. Han, C., Liu, Y., Dai, R., Ismail, N., Su, W., Li, B. (2020) Ferroptosis and its potential role in human diseases, *Front. Pharmacol.*, **11**, 239, doi: 10.3389/fphar.2020.00239.
87. Shibata, Y., Yasui, H., Higashikawa, K., Miyamoto, N., and Kuge, Y. (2019) Erastin, a ferroptosis-inducing agent, sensitized cancer cells to X-ray irradiation via glutathione starvation *in vitro* and *in vivo*, *PLoS One*, **14**, 0225931, doi: 10.1371/journal.pone.0225931.
88. Louandre, C., Marcq, I., Bouhlal, H., Lachaier, E., Godin, C., Saidak, Z., Francois, C., Chatelain, D., Debuysscher, V., Barbare, J.-C., Chauffert, B., and Galmiche, A. (2015) The retinoblastoma (Rb) protein regulates ferroptosis induced by sorafenib in human hepatocellular carcinoma cells, *Cancer Lett.*, **35**, 971-977, doi: 10.1016/j.canlet.2014.11.014.
89. Cao, S. S., and Kaufman, R. J. (2014) Endoplasmic reticulum stress and oxidative stress in cell fate decision and human disease, *Antioxid. Redox Signal.*, **21**, 396-413, doi: 10.1089/ars.2014.5851.
90. Guo, J., Xu, B., Han, Q., Zhou, H., Xia, Y., Gong, C., Dai, X., Li, Z., and Wu, G. (2018) Ferroptosis: a novel anti-tumor action for cisplatin, *Cancer Res. Treat.*, **50**, 445-460, doi: 10.4143/crt.2016.572.
91. Dikic, I., Johansen, T., and Kirkin, V. (2010) Selective autophagy in cancer development and therapy, *Cancer Res.*, **70**, 3431-3434, doi: 10.1158/0008-5472.CAN-09-4027.
92. Mancilla, H., Maldonado, R., Cereceda, K., Villarreal-Espindola, F., De Oca, M. M., Angulo, C., Castro, M. A., Slebe, J. C., Vera, J. C., Lavandero, S., and Concha, I. I. (2015) Glutathione depletion induces spermatogonial cell autophagy, *J. Cell. Biochem.*, **116**, 2283-2292, doi: 10.1002/jcb.25178.
93. Guo, W., Zhao, Y., Zhang, Z., Tan, N., Zhao, F., Ge, C., Liang, L., Jia, D., Chen, T., Yao, M., Li, J., and He, X. (2011) Disruption of xCT inhibits cell growth via the ROS/autophagy pathway in hepatocellular carcinoma, *Cancer Lett.*, **312**, 55-61, doi: 10.1016/j.canlet.2011.07.024.
94. Desideri, E., Filomeni, G., and Ciriolo, M. R. (2012) Glutathione participates in the modulation of starvation-induced autophagy in carcinoma cells, *Autophagy*, **8**, 1769-1781, doi: 10.4161/auto.22037.
95. Du, J., Wang, T., Li, Y., Zhou, Y., Wang, X., Yu, X., Ren, X., An, Y., Wu, Y., Sun, W., Fan, W., Zhu, Q., Wang, Y., and Tong, X. (2019) DHA inhibits proliferation and induces ferroptosis of leukemia cells through autophagy dependent degradation of ferritin, *Free Radic. Biol. Med.*, **131**, 356-369, doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2018.12.011.
96. Wu, Z., Geng, Y., Lu, X., Shi, Y., Wu, G., Zhang, M., Shan, B., Pan, H., and Yuan, J. (2019) Chaperone-mediated autophagy is involved in the execution of ferroptosis, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **116**, 2996-3005, doi: 10.1073/pnas.1819728116.
97. Hou, W., Xie, Y., Song, X., Sun, X., Lotze, M. T., Zeh, H. J., Kang, R., and Tang, D. (2016) Autophagy promotes ferroptosis by degradation of ferritin, *Autophagy*, **12**, 1425-1428, doi: 10.1080/15548627.2016.1187366.
98. Gao, M., Monian, P., Pan, Q., Zhang, W., Xiang, J., and Jiang, X. (2016) Ferroptosis is an autophagic cell death process, *Cell Res.*, **26**, 1021-1032, doi: 10.1038/cr.2016.95.
99. Santana-Codina, N., and Mancias, J. D. (2018) The role of NCOA4 mediated ferritinophagy in health and disease, *Pharmaceuticals*, **11**, 114-129, doi: 10.3390/ph11040114.
100. Lv, H. H., Zhen, C. X., Liu, J. Y., and Shang, P. (2020) PEITC triggers multiple forms of cell death by GSH-iron-ROS regulation in K7M2 murine osteosarcoma cells, *Acta Pharmacol. Sin.*, doi: 10.1038/s41401-020-0376-8.

GLUTATHIONE SYNTHESIS IN CANCER CELLS

Review

E. V. Kalinina* and L. A. Gavriliuk

Peoples's Friendship University of Russia (RUDN University), 117198 Moscow, Russia; E-mail: kalinina-ev@rudn.ru

Received May 23, 2020

Revised June 20, 2020

Accepted June 20, 2020

Tripeptide GSH is associated not only with the control and maintenance of redox cell homeostasis, but also with the processes of detoxification, proliferation, cell differentiation, and regulation of cell death. Disruptions in GSH synthesis and changes in the GSH/GSSG ratio are common for many pathological conditions, including malignant neoplasms. Numerous data indicate the importance of GSH and the GSH/GSSG ratio in the regulation of tumor cell viability, in the initiation of tumor development, progression, and drug resistance. However, control of the mechanism of GSH synthesis in malignant tumors remains poorly understood. This review discusses the features of GSH synthesis and its regulation in tumor cells. The role of GSH in the mechanisms of apoptosis, necroptosis, ferroptosis, and autophagy is considered.

Keywords: synthesis of GSH *de novo*, microRNA, apoptosis, necroptosis, ferroptosis, autophagy

УДК 577.151

ЦИНК КАК ПЕРЕКЛЮЧАТЕЛЬ ЛИПОАМИДДЕГИДРОГЕНАЗЫ ИЗ СЕРДЦА СВИНЬИ – ПРЕДСТАЦИОНАРНАЯ И СТАЦИОНАРНАЯ КИНЕТИКА ДИАФОРАЗНОЙ РЕАКЦИИ*

© 2020 И.Г. Газарян^{1,2,3,4}, В.А. Щедрина^{3,5}, Н.Л. Клячко^{3,5},
А.А. Захарянц^{4,6}, С.В. Казаков², А.М. Браун^{1**}

¹ Кафедра клеточной биологии и анатомии, Нью-Йоркский медицинский колледж, 10605 Нью-Йорк, США; электронная почта: abraham_brown@nymc.edu

² Кафедра химии и физических наук, Дайсон колледж искусств и наук, Пейс университет, 10570 Нью-Йорк, США

³ Московский государственный университет имени М.В.Ломоносова, кафедра химической энзимологии, 119899 Москва, Россия

⁴ Институт биохимии имени А.Н. Баха, ФНИЦ «Основы биотехнологии» РАН, 119071 Москва, Россия

⁵ Тамбовский государственный университет имени Г.Р. Державина, 392000 Тамбов, Россия

⁶ Институт биоорганической химии имени академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, 117997 Москва, Россия

Поступила в редакцию 27.05.2020

После доработки 11.06.2020

Принята к публикации 14.06.2020

Повышение внутриклеточного уровня Zn^{2+} вследствие ишемии способствует смерти клетки, компрометируя функцию митохондрий. Zn^{2+} является дифференциальным регулятором митохондриальной липоамид-дегидрогеназы (LADH) в области физиологических концентраций ($K_d = 0,1$ мкМ свободного цинка), ингибируя липоамид-дегидрогеназную и активируя NADH-дегидрогеназную активности. Данный эффект вызван координацией Zn^{2+} цистеинами активного центра LADH. Описан детальный кинетический механизм диафоразной (NADH-дегидрогеназной) реакции, катализируемой LADH из сердца свиньи, с использованием 2,6-дихлорфенолиндифенола (DCPIP) в качестве модельного акцептора электронов. Анаэробные эксперименты методом остановленной струи продемонстрировали, что двухэлектронно-восстановленная форма LADH в 15–25 раз менее активна по отношению к DCPIP, чем четырехэлектронная или Zn^{2+} -связанная восстановленные формы LADH (константы скорости равны $(6,5 \pm 1,5) \times 10^3 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$, $(9 \pm 2) \times 10^4 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ и $(1,6 \pm 0,5) \times 10^5 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ соответственно). Стационарная кинетика для различных субстратов диафоразы показала, что Zn^{2+} ускоряет реакцию исключительно для двухэлектронных (дурохинон, DCPIP), но не одноэлектронных акцепторов (бензохинон, убихинон, феррицианид), что косвенно указывает на низкую электрон-донорную способность двухэлектронно-восстановленной формы LADH, доминирующей при низких уровнях NADH, по сравнению с четырехэлектронной или Zn^{2+} -связанной формами восстановленного фермента. Полученные данные позволяют предположить, что связывание цинка тиолами активного центра превращает фермент из одноэлектронного в двухэлектронный донор. Такой переключатель, активируемый цинком, потенциально может изменить соотношение продуктов оксидазной активности LADH – супероксида и H_2O_2 .

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: убихинон, 2,6-дихлорфенолиндифенол, дурохинон, феррицианид, ферментативная кинетика, дигидролипоил-дегидрогеназа.

DOI: 10.31857/S0320972520080060

ВВЕДЕНИЕ

Большой объем накопленной информации указывает на токсическую роль внутриклеточ-

ного цинка, высвобождаемого в результате ишемии-реперфузии, в последующей судьбе клетки [1–4]. Повышение внутриклеточного уровня Zn^{2+} связывают с потерей мембранного потен-

Принятые сокращения: BQ – 1,4-бензохинон; DCPIP – 2,6-дихлорфенолиндифенол; DQ – дурохинон (2,3,5,6-тетраметил-1,4-бензохинон); DTT – дитиотрейтол; FC – феррицианид калия; LADH – дигидролипоил-дегидрогеназа (= липоамиддегидрогеназа); KGDHC – α -кетоглутаратдегидрогеназный комплекс; Q_o – 2,3-диметокси-5-метил-1,4-бензохинон; S – субстрат-акцептор; UQ_o – убихинон.

* Первоначально английский вариант рукописи опубликован на сайте «Biochemistry» (Moscow) <http://protein.bio.msu.ru/biochemistry>, в рубрике «Papers in Press», BM20-134, 20.07.2020.

** Адресат для корреспонденции.

циала, продукцией активных форм кислорода и смертью клетки [5,6]. Снижение накопления цинка в митохондриях путем его хелатирования приводит к уменьшению ишемических повреждений мозга в модели инсульта [7]. Нами было ранее показано, что цинк конкурирует с кальцием за вход в митохондрии, по-видимому, через митохондриальный кальциевый унипортер [8], что недавно было подтверждено другой группой исследователей [9].

Zn^{2+} является мощным ингибитором митохондриального дыхания и вызывает открытие митохондриальной поры [5,6]. Предполагается, что Zn^{2+} может регулировать митохондриальное дыхание обратимо, ингибируя α -кетоглутарат-дегидрогеназный комплекс (KGDHC) [10]. Липоамид-дегидрогеназа (LADH) — ключевой компонент митохондриальных дегидрогеназных комплексов, включая KGDHC, катализирует перенос восстановленных эквивалентов с дигидролипоата, связанного на соседней дигидролипоил-ацилтрансферазной субъединице комплекса, на NAD^+ . Эта обратимая реакция осуществляется двумя реакционными центрами — тиоловой парой, которая принимает электроны от дигидролипоата, и нековалентно-связанным FAD/FADH₂, который переносит электроны на NAD^+ . Фермент также катализирует «диафоразную» реакцию восстановления хинонов (или других акцепторов электрона) под действием NADH. Эта вторичная активность требует участия только одного каталитического центра — FAD — и значительно ускоряется под действием ионов металлов или других реагентов, которые связывают [11] или модифицируют [12–17] каталитические тиолы, необходимые для липоамид-дегидрогеназной активности. Zn^{2+} увеличивает диафоразную активность LADH по отношению к убихинону [18,19]. Усиление диафоразной активности также наблюдалось для генно-инженерных мутантов с отсутствием одного из каталитических тиолов [20]. Хотя стимулирование диафоразной активности было показано неоднократно [12–17, 20], ее кинетическая модель с точными кинетическими параметрами никогда не являлась предметом исследования.

Мы ранее показали, что Zn^{2+} ингибирует обратимую липоамид-дегидрогеназную реакцию, катализируемую очищенной LADH из сердца свиньи (K_i 0,15 мкМ) в обоих направлениях, блокируя каталитические тиолы [21]. Взаимодействие с цинком приводило к 3–4 кратному усилению оксидазной активности LADH [21], для которой нужен только каталитический центр FAD. Целью настоящей работы явилось детальное кинетическое описание диафоразной реакции, катализируемой LADH, в отсутствие и

в присутствии цинка с DCPIP в качестве модельного субстрата. Результаты стационарной и предстационарной кинетики предполагают, что кроме переключения LADH из тиол-редуктазы в хинон-редуктазу, связывание цинка может изменять предпочтение фермента — от одноэлектронных акцепторов в сторону двухэлектронных.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Реагенты/ферменты. NADH, NADPH, Tris, $ZnCl_2$, 2,6-дихлорфенолиндофенол (DCPIP), 1,4-бензохинон (BQ), феррицианид калия (FC), duroхинон — DQ (2,3,5,6-тетраметил-1,4-бензохинон), убихинон Q_o, приобретены у «Sigma-Aldrich» (США), HCl — у J.T.Baker, Inc. (NJ, США). Все растворы приготовлены на дистиллированной деионизованной воде с сопротивлением >15 МΩ/см. Все реактивы были из «Sigma Ultra grade», если такой уровень очистки был коммерчески доступен (для уменьшения возможного присутствия двухвалентных катионов). Запасные водные растворы 10 мМ NADH и 10 мМ $ZnCl_2$ готовили непосредственно перед экспериментом.

Липоамид-дегидрогеназа из сердца свиньи (LADH) от «Sigma-Aldrich», по данным SDS-PAGE, не содержала белковых примесей (<2%). Фермент очищали FPLC гель-фильтрацией для удаления сульфата аммония и FAD, порциями по 0,5 мл (1 : 3 суспензии фермента к воде), на колонке с Superdex 200 («Pharmacia Biotech»), уравновешенной 0,2 М Tris-HCl буфером, pH 7,5. Концентрацию LADH определяли по поглощению на 455 нм ($\epsilon_{455} = 11\,300\text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ [1]). Тиоредоксин-редуктаза из *Escherichia coli* была приобретена у «Sigma-Aldrich» и использована после обессоливания через Sephadex G-25.

Стационарная кинетика. Все измерения проводили на 96-луночном планшетном спектрофотометре (SpectraMax Plus, США) в 200 мкл объеме реакционной смеси на лунку в двухволновом режиме по поглощению NADH ($\epsilon_{340} = 6,22\text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$ [22]) и DCPIP ($\epsilon_{600} = 20,6\text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$ [22]) при 20 °C. Длина светового пути составляла 0,43 см. Реакции проводили в 50 мМ Tris-HCl буфере, pH 7,5. Для коррекции на неферментативное восстановление DCPIP контроли (при отсутствии фермента) ставили одновременно на одном и том же микропланшете, для последующего вычитания значения скорости неферментативного восстановления из скорости ферментативного восстановления.

Изучение восстановления DCPIP под действием NADH в отсутствие добавленного

цинка проводили, варьируя NADH в диапазоне 10–500 мкМ и DCPiP 2–50 мкМ. Реакцию инициировали добавлением 400 нМ раствора фермента. Зависимость скорости реакции от концентрации DCPiP при фиксированных различных концентрациях NADH описывали линейной регрессией, из параметров которой рассчитывали константы скорости. Значения констант скорости были определены как среднее из трех независимых экспериментов.

Для исследования эффектов цинка был использован аналогичный подход: аликвоты NADH и $ZnCl_2$ помещали в лунки, а затем инициировали реакцию добавлением 160 мкл буферной смеси фермента и варьируемых концентраций DCPiP с помощью многоканальной пипетки. Для измерения скорости восстановления DCPiP под действием NADH, концентрации реагентов варьировали в диапазоне 30–400 нМ LADH, 0,002–0,1 мМ DCPiP, 0,01–0,5 мМ NADH, 0,1–20 мкМ $ZnCl_2$. Восстановление дурохина, убихина, бензохина и феррицианида, катализируемое, соответственно, 160, 200, 50 и 150 нМ LADH, изучали по поглощению NADH на 340 нМ при его фиксированной концентрации, равной 0,02 мМ, и различных варьируемых концентрациях акцептора электрона и Zn^{2+} . В случае тиоредоксинредуктазы из *E. coli* варьировали концентрации DCPiP при фиксированной концентрации NADPH (0,02 мМ) в отсутствие и в присутствии 5 мкМ Zn^{2+} . Восстановление бензохина под действием LADH и DCPiP под действием *E. coli* TRR проводили в двойном и тройном повторе соответственно.

Данные по активации в присутствии Zn^{2+} анализировали в координатах Лайнуивера–Берка, используя метод наименьших квадратов в программе Sigma Plot 12.5 (SPSS, США). Каждый эксперимент проводили в тройном повторе. Данные представлены как среднее $\pm$ стандартная ошибка из трех независимых экспериментов. Статистическую значимость изменений в углах наклона в двойных обратных координатах проверяли, проводя парный *t*-тест («Sigmastat software», США), используя оценки наклона и стандартные ошибки измерения регрессий для высокой дозы Zn^{2+} и контрольной серии для каждой панели.

Предстабионарная кинетика. Анаэробные измерения методом остановленной струи проводили в четверном повторе на High-Tech SF-61 спектрофотометре («High-Tech Scientific», Великобритания), установленном в анаэробном боксе под N_2 с содержанием O_2 менее 1 ppm. Мертвое время прибора составляло 0,8 мс. Температуру (22 °C) контролировали с помощью термостата Techne-400 circulator («Techne Ltd.», Ве-

ликобритания) с наружной системой охлаждения. Раствор фермента и порошок субстрата помещали в закрытые сосуды и подвергали деоксигенации перед помещением в анаэробный бокс. Деоксигенацию буфера (0,05 М Tris-HCl, pH 7,5), используемого в экспериментах, проводили в течение ночи в анаэробном боксе. Запасные растворы NADH (0,75 мМ) и $ZnCl_2$ (1,875 мМ) готовили анаэробно под N_2 в боксе в данном буфере непосредственно перед экспериментом.

Изменения в поглощении связанного с белком флавина определяли в режиме быстрого сканирования с использованием ксеноновой лампы. Запасный раствор фермента (15 мкМ) выстреливали против возрастающих концентраций NADH (7,5–60 мкМ) для определения концентрации NADH, обеспечивающей максимальное поглощение на 530 нм, являющееся индикатором образования двухэлектронно-восстановленной формы LADH (LADH-2e) — комплекса с переносом заряда, имеющего один свободный восстановленный тиол и тиол, связанный через «общий электрон» с FAD [10]. Наивысшая концентрация комплекса с переносом заряда наблюдалась при использовании полуторакратного избытка NADH к ферменту.

Изменения в поглощении DCPiP регистрировали в режиме фиксированной длины волны на 600 нм. Для определения константы скорости окисления двухэлектронно-восстановленной формы фермента под действием DCPiP, фермент (2 мкМ) предварительно восстанавливали 1,5-кратным избытком NADH и затем выстреливали против возрастающих концентраций DCPiP в диапазоне 2–60 мкМ. Для определения константы скорости Zn^{2+} -связанного фермента, 2 мкМ LADH предварительно восстанавливали 1,5 эквивалентами NADH в присутствии 100 мкМ Zn^{2+} . Комплекс LADH-Zn затем восстанавливали добавлением еще 1,5 эквивалентов NADH для получения полностью восстановленного FAD (Zn-LADH-2e) и уже затем выстреливали против растущих концентраций DCPiP (2–60 мкМ).

Взаимодействие двухэлектронно-восстановленного фермента (LADH-2e) с DCPiP удовлетворяло условию одного оборота фермента в реакции псевдо-первого порядка, когда $[S]_0 \gg [E]_0$. Кинетические кривые аппроксимировали экспоненциальной функцией $A = A_0 \exp(-k[S]_0 t)$, используя метод наименьших квадратов в программе минимизации, предоставленной также фирмой «High-Tech Scientific». Константы скорости второго порядка определяли из наклона зависимости кажущейся константы скорости первого порядка от концентрации DCPiP.

Для определения константы скорости окисления четырехэлектронно-восстановленного фермента (LADH-4e) под действием DCPIP, фермент был предварительно восстановлен 50 эквивалентами NADH для обеспечения полного восстановления FAD и затем «выстреливался» против возрастающих концентраций DCPIP. Поскольку восстановление фермента NADH протекает исключительно быстро в данных условиях [23], то весь фермент можно считать находящимся в четырехэлектронной восстановленной форме (LADH-4e) в течение всей реакции восстановления DCPIP, т.е. эксперимент можно считать стационарным с детекцией уменьшения поглощения DCPIP в миллисекундном диапазоне. В этих условиях уравнение $[S] = [S]_0 \exp(-k[E]_0 t)$, при $t \rightarrow 0$, превращается в ли-

нейную функцию $[S] = [S]_0 (1 - k[E]_0 t)$, которая позволяет рассчитывать константу скорости из начального угла наклона кинетической кривой.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

Стационарная кинетика диафоразной реакции.

Зависимость начальной скорости реакции от концентрации NADH в двойных обратных координатах проявляет гиперболический характер вплоть до 0,2 мМ NADH, выше которой наблюдается субстратное ингибирование (рис. 1, а). Последнее является следствием диссоциативной инактивации фермента под действием избытка NADH, которая характерна для четырёхэлектронно-восстановленной формы LADH

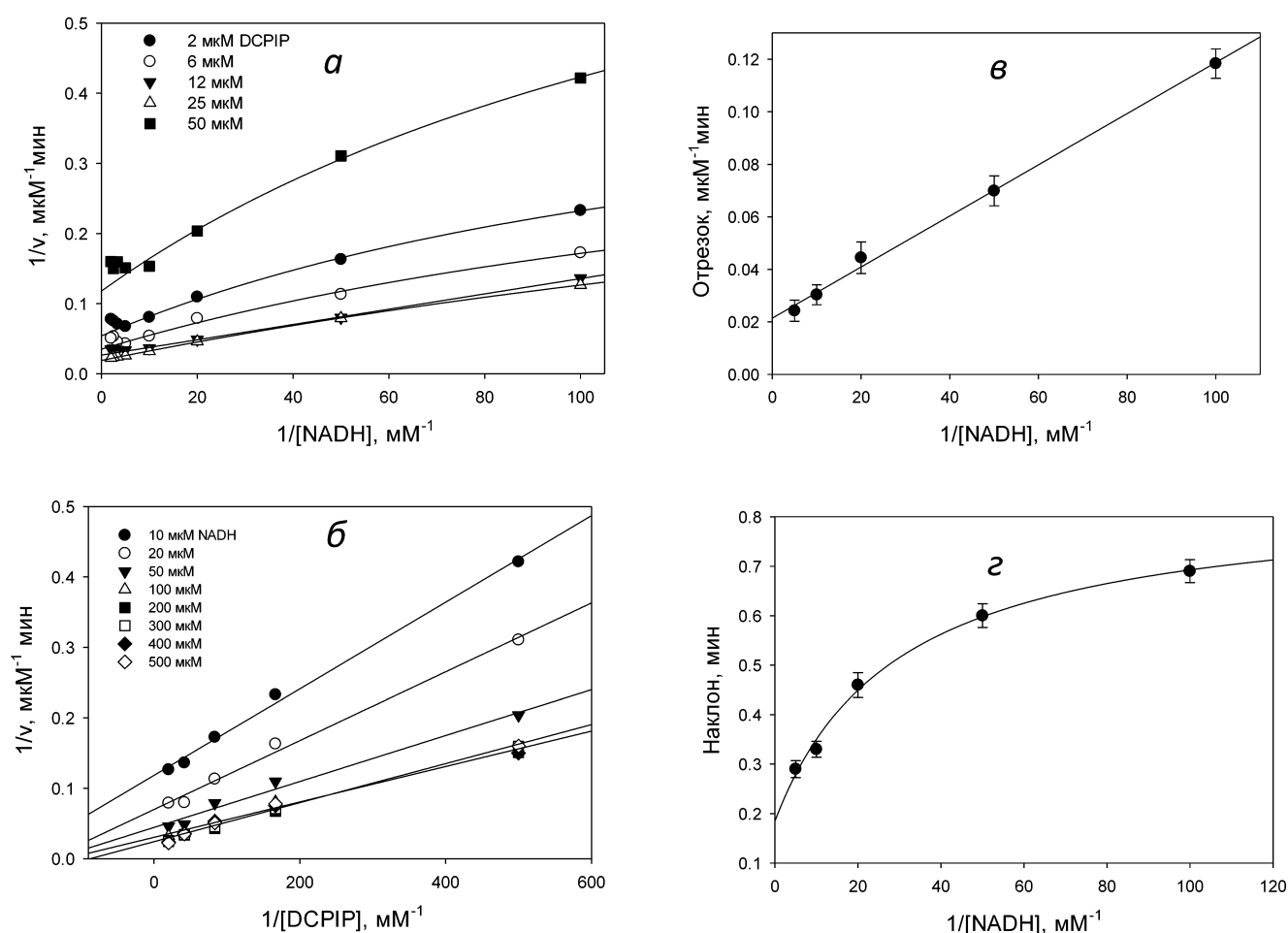


Рис. 1. Зависимость скорости восстановления DCPIP под действием NADH, катализируемым 400 нМ LADH, от концентрации одного из субстратов при варьируемой концентрации второго субстрата. а – Зависимость от $[\text{NADH}]$; б – зависимость от $[\text{DCPIP}]$; в–г – вторичные графики зависимости отрезка и угла наклона из рис. б соответственно, от концентрации NADH (концентрации NADH, вызывающие инактивацию фермента, опущены). 50 мМ Tris-HCl-буфер, pH 7,5, 22 °C. Кривые на панелях а и г описаны гиперболической зависимостью с помощью метода наименьших квадратов. Кривые на панелях б и в – линейные регрессии. Данные представляют один репрезентативный эксперимент, проведенный в режиме параллельного измерения скоростей (см. детали в разделе «Материалы и методы»)

(LADH-4e) из различных источников [24]. Предыдущие работы, по-видимому, не учитывали сложный характер реакции восстановления DCPiP под действием LADH и считали, что она протекает с образованием тройного комплекса [25, 26]. Зависимость скорости реакции в двойных обратных координатах при ненасыщающих концентрациях DCPiP (рис. 1, а) лишь с большей натяжкой можно описать линейной зависимостью, при этом прямые линии не будут пересекаться в одной точке, что явилось бы доказательством механизма с образованием тройного комплекса.

Представление экспериментальных данных в двойных обратных координатах зависимости скорости реакции от концентрации DCPiP хорошо описывается линейной зависимостью для неинактивирующих концентраций NADH, т.е. ниже 0,2 мМ (рис. 1, б), что позволяет легко провести дальнейший анализ (рис. 1, в, г). Аналогичный вид имеют зависимости скорости реакции под действием цинка: линейная зависимость от концентрации DCPiP наблюдается как при низких (рис. 2, а), так и высоких (рис. 2, б) концентрациях NADH, в то время как зависимость скорости реакции от концентрации NADH имеет гиперболический характер при низких концентрациях цинка, но превращается в линейную зависимость при высоких (рис. 2, в).

По аналогии с нашей работой по изучению влияния ионов цинка на оксидазную активность LADH [21], для объяснения гиперболической зависимости, наблюдаемой при восстановлении DCPiP под действием NADH, катализируемом LADH, предложена схема реакции, включающая два цикла. Поскольку DCPiP известен исключительно как двухэлектронный акцептор [26], мы предполагаем, что только те формы фермента, в которых FAD восстановлен полностью, способны восстановить данный субстрат. Таким образом, комплекс с переносом заряда будет очень плохим катализатором восстановления DCPiP, и мы должны предположить, что изомеризация фермента в форму с полностью восстановленным FAD происходит либо перед связыванием с DCPiP, либо после — внутри фермент-субстратного комплекса. Второй вариант механизма наиболее вероятен, поскольку в наших предыдущих работах по стационарной кинетике наблюдалось прямое образование комплекса с переносом заряда при восстановлении LADH под действием NADH [21]. При этом восстановление фермента эквимольным количеством NADH в анаэробных условиях приводило к распределению 1 : 1 между комплексом с переносом заряда и формой с полностью восстановленными тиолами [21].

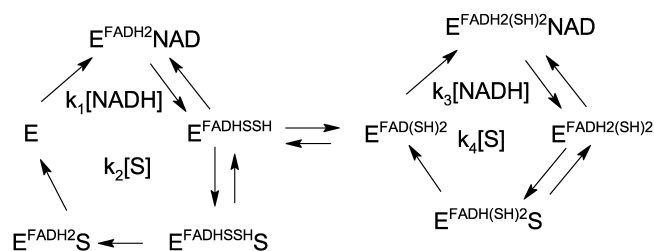


Схема 1

Для упрощения уравнения скорости смешанные кажущиеся константы скорости k_1 и k_3 приписаны стадиям связывания NADH и восстановления фермента, и смешанные кажущиеся константы скорости k_2 и k_4 для связывания и отщепления DCPiP в правом и левом циклах соответственно, как показано на схеме 1. Константа равновесия между комплексом с переносом заряда и формой с двумя восстановленными тиолами принята равной 1 [21]. Основное различие между двумя циклами состоит в относительной скорости восстановления фермента под действием NADH, с $k_1 \gg k_3$, и восстановления DCPiP с $k_4 \gg k_2$. Уравнение скорости в этом случае выглядит как сумма двух гиперболических функций:

$$\frac{E_0}{v} = \frac{1}{k_1[NADH]} \times \frac{k_2[S] + k_1[NADH]}{k_2[S] + k_3[NADH]} + \frac{1}{k_4[S]} \times \frac{k_4[S] + k_3[NADH]}{k_2[S] + k_3[NADH]}. \quad (1)$$

Вышеприведенное уравнение может быть реорганизовано (уравнение 2), чтобы показать вклад отношения констант скорости в результирующую зависимость:

$$\frac{E_0}{v} = \frac{1}{k_1[NADH]} + \frac{1}{k_4[S]} + \frac{(1 - k_3/k_1) + (1 - k_2/k_4)}{k_2[S] + k_3[NADH]}. \quad (2)$$

Таким образом, график в двойных обратных координатах должен иметь гиперболический характер зависимости по обоим субстратам, что и наблюдается в эксперименте. То, что гиперболический характер зависимости очень плохо виден для DCPiP, особенно при высоких концентрациях NADH (см. рис. 1, б и рис. 2, б) вполне ожидаемо, поскольку k_1 , в меньшей мере, в 5 раз выше, чем k_2 и k_3 [21]. С увеличением концентрации NADH и предполагая $k_3 \approx k_4 \gg k_2$, уравнение 2 упрощается до уравнения 3, которое предполагает линейную зависимость от DCPiP при высоких концентрациях NADH:

$$\frac{E_0}{v} = \frac{2}{k_3[NADH]} + \frac{1}{k_4[S]}. \quad (3)$$

Поэтому значение кажущейся константы скорости восстановления DCPiP, рассчитанное из наклона графика зависимости $1/v$ от $1/[DCPiP]$ при высоких концентрациях NADH, будет близко к значению константы скорости

восстановления четырехэлектронно-восстановленной формой фермента — k_4 . Кажущаяся константа скорости окисления NADH, рассчитанная из отрезка на оси ординат, будет равна $k_3/2$.

Кажущаяся линейность зависимости, показанной на рис. 2, б ($r^2 = 0,991 \pm 0,005$), позволяет проанализировать зависимость отрезка и наклона от концентрации NADH (рис. 1, в и г), как обсуждено выше. Величина отрезка зависит линейно от $1/[NADH]$, в то время как наклон зависит гиперболически от $1/[NADH]$. При очень высоких концентрациях NADH наклон становится равным кажущейся константе скорости реакции фермента с DCPIP ($k_4 = (2,1 \pm 0,1) \times 10^5 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$, см. рис. 1, б и г). Кажущаяся константа скорости для NADH ($k_3/2$) может быть рассчитана из наклона вторичного графика (рис. 1, в, $k_{NADH} = (4,6 \pm 0,4) \times 10^4 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$). Стационарные данные по восстановлению DCPIP были получены при относительно низких концентрациях DCPIP для уменьшения вклада неферментативного восстановления, и поэтому, точное определение k_1 и k_2 было затруднено. Однако значение k_1 известно для реакции восстановления бензохинона, которая протекает как один каталитический цикл с участием двухэлектронно-восстановленного фермента (табл. 1) [26].

В присутствии Zn^{2+} сильная активация наблюдается как для восстановления DCPIP (рис. 2, а, б), так и для окисления NADH (рис. 2, в). Как видно из рис. 2, в, при низких ненасыщающих концентрациях DCPIP Zn^{2+} ускоряет реакцию, увеличивая кажущуюся константу скорости для окисления NADH до $4 \times 10^5 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$. Концентрация полуактивации по Zn^{2+} составляет

$\sim 1,8 \text{ мкМ}$ (см. вставки в рис. 2, а и в) в 50 мМ Tris-HCl-буфере, pH 7,5. При коррекции на хелатирование цинка в трисовом буфере данная концентрация соответствует $\sim 0,1 \text{ мкМ}$ свободного Zn^{2+} [21, приложение]. Это значение близко к значению константы ингибирования цинком активности липоамид-дегидрогеназы и активации NADH-оксидазы, определенной нами ранее [21], и подтверждает гипотезу об одинаковом молекулярном механизме наблюдаемых эффектов — связывании Zn^{2+} каталитическими тилолами (схема 2).

Ион Zn^{2+} также ускоряет стадию восстановления DCPIP. Это действие лучше всего видно при низких концентрациях NADH (рис. 2, а), когда фермент функционирует преимущественно в рамках левого цикла на схеме 1. Однако и при высоких концентрациях NADH, ускорение в присутствии Zn^{2+} все еще заметно (рис. 2, б). Оценка кажущейся константы скорости восстановления DCPIP в присутствии насыщающих концентраций Zn^{2+} составляет $1,85 \times 10^5 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ (рис. 2, а).

График в двойных обратных координатах при насыщающей концентрации Zn^{2+} представляет собой параллельные прямые линии (рис. 2, г), характерные для механизма типа пинг-понг для реакции восстановления DCPIP в присутствии цинка, и позволяет определить значения констант скорости для NADH как $(8,9 \pm 2,0) \times 10^5 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ и для DCPIP как $(2,2 \pm 0,4) \times 10^5 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$. Значение константы скорости по DCPIP равно таковому при экстраполяции значения k_4 в отсутствие цинка из рис. 1, г, а значение константы скорости по NADH близко к таковому для восстановления бензохинона [26].

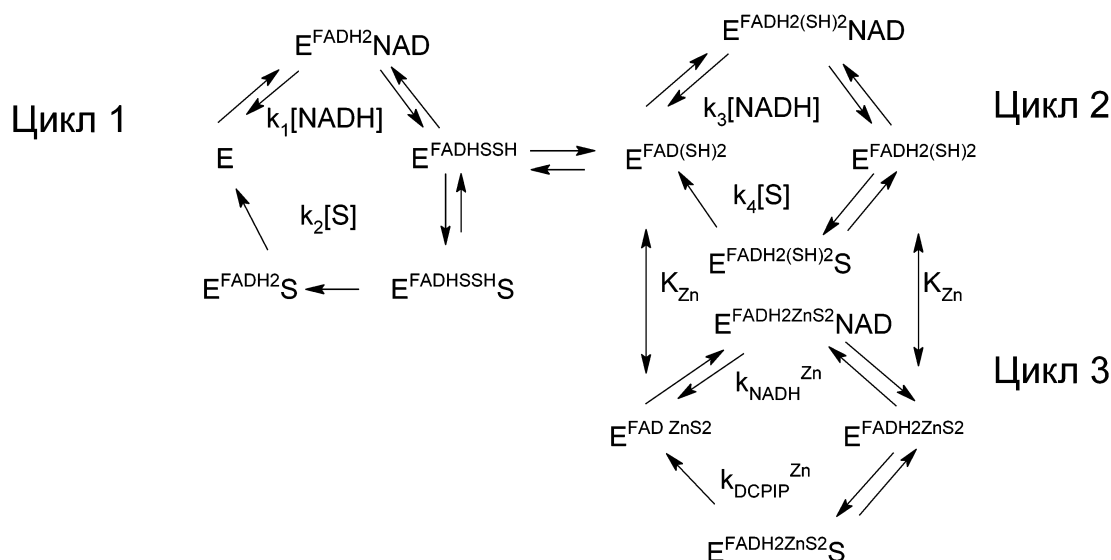


Схема 2

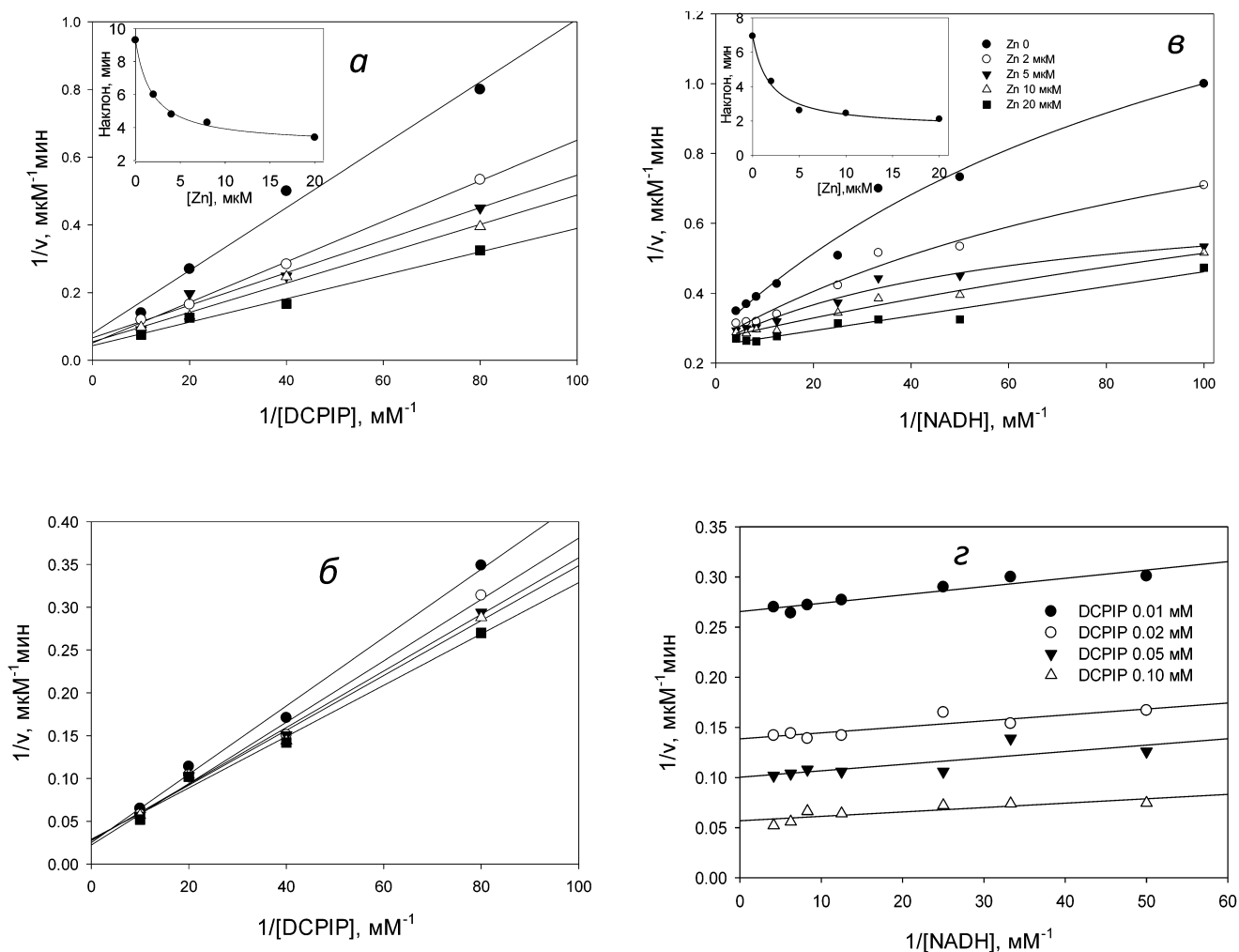


Рис. 2. Влияние цинка на стационарную кинетику восстановления DCPIP под действием NADH. Влияние 0–20 мкМ Zn^{2+} на скорость окисления NADH при варьируемых [DCPIP] и фиксированной [NADH], равной а – 20 мкМ и б – 240 мкМ. Вставка в рис. 2, а показывает зависимость кажущейся константы восстановления DCPIP от Zn^{2+} ; в – влияние Zn^{2+} на скорость восстановления 12,5 мкМ DCPIP при различных концентрациях NADH. Вставка показывает зависимость кажущейся константы окисления NADH от Zn^{2+} ; г – зависимость скорости восстановления DCPIP от NADH при варьировании концентрации обоих субстратов в присутствии 20 мкМ Zn^{2+} . Каждая панель соответствует независимому репрезентативному эксперименту. Условия реакций аналогичны представленным на рис. 1, за исключением концентрации LADH, равной 30 нМ

Предстадионарная кинетика восстановления DCPIP в отсутствие и в присутствии Zn^{2+} . Ускорение под действием ионов цинка хорошо видно при сравнении кинетических кривых взаимодействия различных восстановленных форм LADH с DCPIP (рис. 3, а). В случае восстановления DCPIP, Zn-связанный фермент ведет себя идентично четырехэлектронно-восстановленной LADH (LADH-4e), в то время как двухэлектронно-восстановленная LADH (LADH-2e) приблизительно в 20 раз менее активна по отношению к DCPIP (рис. 3, б, табл. 1). Намного меньшая активность двухэлектронно-восстановленного фермента по отношению к DCPIP (т.е. $k_2 \ll k_4, k_{DCPIP}^{Zn}$) может проистекать из допол-

нительной стадии внутримолекулярного переноса электрона в цикле 1, которая отсутствует в циклах 2 и 3 на схеме 2.

Отрезок на оси ординат зависимости кажущейся константы скорости от концентрации субстрата соответствует константе скорости диссоциации DCPIP из комплекса с ферментом (рис. 3, б), что позволяет рассчитать константу связывания DCPIP с ферментом, принимая во внимание величину константы скорости ассоциации, определенную из наклона зависимости. Константы связывания субстрата для Zn^{2+} -связанной и несвязанной двухэлектронно-восстановленной формы фермента равны в пределах ошибки измерения ($3,5 \pm 0,6$ мкМ). Это значе-

Таблица 1. Константы скорости диафоразной реакции, представленной на схеме 2

Обозначения констант скорости	Значения констант скорости, М ⁻¹ ·с ⁻¹	
	предстационар	стационарная кинетика
NADH и окисленная LADH, k_1	н.о.	$(0,92 \pm 0,10) \times 10^6$ *
NADH и 2е-восстановленная LADH, k_3	н.о.	$(0,92 \pm 0,10) \times 10^5$
NADH и Zn-LADH, k_{NADH}^{Zn}	н.о.	$(0,9 \pm 0,2) \times 10^6$
DCPIP и 2е-восстановленная LADH, k_2	$(6,5 \pm 1,5) \times 10^3$	н.о.
DCPIP и 4е-восстановленная LADH, k_4	$(9 \pm 2) \times 10^4$	$(2,1 \pm 0,1) \times 10^5$
DCPIP и восстановленная Zn-LADH, k_{DCPIP}^{Zn}	$(1,6 \pm 0,5) \times 10^5$	$(2,2 \pm 0,4) \times 10^5$

Примечание. * k_1 определена в реакции восстановления бензохинона [26].

ние соответствует ранее определенной константе связывания [25], хотя авторы и постулировали образование тройного комплекса для восстановления DCPIP. Значение константы скорости, определенное методом остановленной струи, для стадии восстановления DCPIP Zn-связанным ферментом (табл. 1) соответствует таковому, определенному из стационарной кинетики реакции, и подтверждает предложенный механизм на схемах 1 и 2.

Степень экспериментально наблюдаемой стимуляции в стационарной реакции в присутствии насыщающих концентраций Zn^{2+} варьирует от 2–2,5 раз при низких концентрациях DCPIP (потому что скорость-лимитирующая стадия изменяется с k_3 на $k_{DCPIP}^{Zn} \approx k_4$) до 4–5 раз при низких концентрациях NADH (поскольку

скорость-лимитирующая стадия меняется с k_2 на $k_{DCPIP}^{Zn} \approx k_4$). Принимая равными значения констант скорости восстановления DCPIP четырехэлектронно-восстановленной и восстановленной Zn-связанной формой — $k_4 \approx k_{DCPIP}^{Zn}$, и констант скорости окисления NADH окисленным нативным ферментом и Zn-связанным ферментом — $k_1 \approx k_{NADH}^{Zn}$, уравнения для стационарной скорости реакции в присутствии Zn^{2+} может быть записано как:

$$\frac{E_0}{v} = \frac{1}{k_1[NADH]} + \frac{1}{k_4[S]} + \frac{(1-k_3/k_1)+(1-k_2/k_4)}{k_2[S]+k_3[NADH]+k_1[NADH][Zn]/K_{Zn}}. \quad (4)$$

Таким образом, степень ускорения реакции в стационарных условиях под действием Zn^{2+} определяется соотношением смешанных констант скорости k_1 , k_2 , k_3 , k_4 и диапазоном concentra-

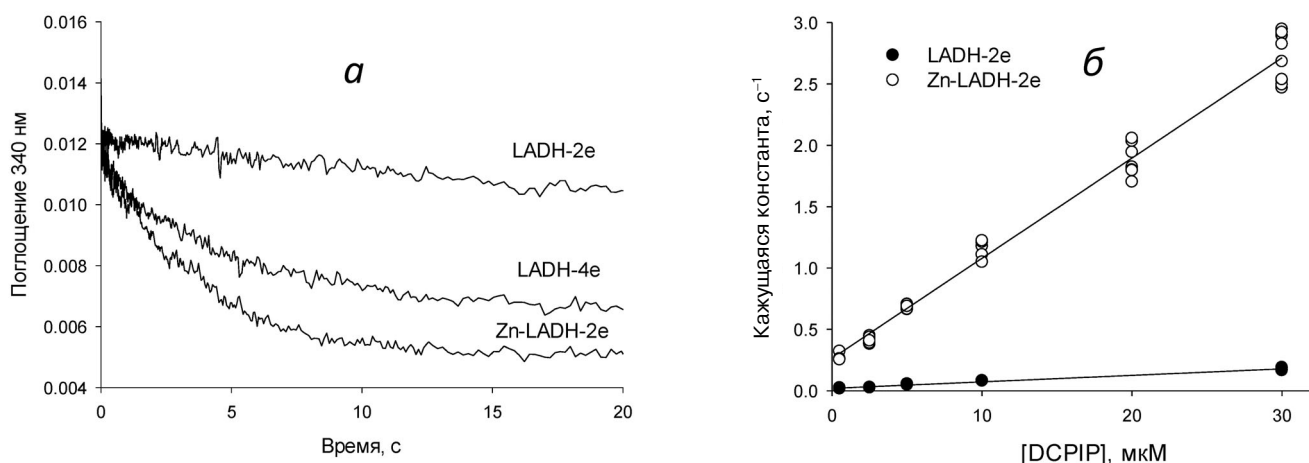


Рис. 3. Кинетика восстановления 5 мкМ DCPIP тремя формами LADH. Приготовление соответствующих форм восстановленной LADH описано в разделе «Материалы и методы». а — Оригинальные кривые; б — определение констант скорости восстановления DCPIP двухэлектронно-восстановленной формой (LADH-2е) (черный кружок) и Zn-связанной формой (Zn-LADH-2е) (светлый кружок). Каждая точка соответствует индивидуальному «выстрелу». Константы скорости определены из наклонов. Условия реакции: 1 мкМ LADH и 1,5 мкМ NADH в 50 мМ Tris-HCl буфере, pH 7,5, 22 °C

ций субстратов в отдельном эксперименте (уравнение 4). Последствия этого для каталитического поведения LADH и близких к ней ферментов обсуждаются далее.

Отсутствие стимулирования Zn^{2+} в реакции восстановления бензохинона LADH и в реакциях, катализируемых тиоредоксин-редуктазой *E. coli*. Каталитический дисульфид, присутствующий во всех FAD-тиол оксидоредуктазах, включающих LADH, глутатион-редуктазу и тиоредоксин-редуктазу, усложняет механизм диафоразной реакции вследствие существования двух- и четырехэлектронно-восстановленных форм ферментов. Как показано выше, Zn^{2+} переключает механизм фермента с двух циклов на один-единственный каталитический цикл, предотвращая перенос электронов между двумя реакционными центрами. Стимулирование в присутствии Zn^{2+} не будет наблюдаться, если фермент в отсутствие Zn^{2+} функционирует лишь в рамках одного из циклов, т.е. либо в правом, либо в левом цикле на схеме 1. Если $k_2 \geq k_1 > k_3$ (т.е. скорость-лимитирующая стадия представляет собой двухэлектронное восстановление фермента NADH), тогда фермент осциллирует между окисленной и двухэлектронно-восстановленной формами. Это условие выполняется для восстановления бензохинона, где $k_{NADH} = 9,2 \times 10^5 \text{ М}^{-1}\text{с}^{-1} < k_{BQ} = 1,3 \times 10^6 \text{ М}^{-1}\text{с}^{-1}$ [26]. В этом случае связывание Zn^{2+} каталитическими тиолами не должно оказывать влияния на измеряемую скорость реакции. Экспериментальные данные, показанные на рис. 4, а, подтверждают этот вывод — добавление Zn^{2+} не влияет на скорость восстановления бензохинона ($k_{BQ} \approx k_{BQ}^Z \approx 1,5 \times 10^6 \text{ М}^{-1}\text{с}^{-1}$).

Если $k_3 \geq k_1 > k_2$, то фермент осциллирует между двух- и четырехэлектронно-восстановленной формой, т.е. с полностью восстановленным FAD. Такой сценарий никогда не реализуется для LADH, глутатион и тиоредоксин редуктаз млекопитающих, которые образуют стабильные комплексы с переносом заряда, где один из электронов находится в совместном владении FAD и каталитического тиола [21, 27]. А вот тиоредоксин редуктаза *E. coli*, напротив, не образует комплекса с переносом заряда и поэтому работает в каталитическом цикле с полностью восстановленным FAD [28–30]. Как и ожидалось, в таком случае добавление Zn^{2+} не влияет на активность тиоредоксин редуктазы *E. coli* (рис. 4, б).

Различие эффектов Zn^{2+} при восстановлении одно- и двухэлектронных субстратов. Как предполагалось выше, более низкая активность двухэлектронно-восстановленного фермента по отношению к DCPIP ($k_2 \ll k_4, k_{DCPIP}^Z$) может являться следствием скорости-лимитирующего внутримолекулярного переноса электронов (см. цикл 1 схемы 2), который предоставляет второй электрон для обязательного двухэлектронного восстановления DCPIP [31]. Если такое предположение верно, то замена DCPIP на одноэлектронный акцептор уберет различия между k_2 и k_{DCPIP}^Z .

Это именно тот случай, когда восстанавливается одноэлектронный акцептор — феррицианид — под действием NADH: Zn^{2+} явно влияет на стадию окисления NADH, как видно из уменьшения отрезка с увеличением концентрации Zn^{2+} на рис. 5, а, но практически не влияет

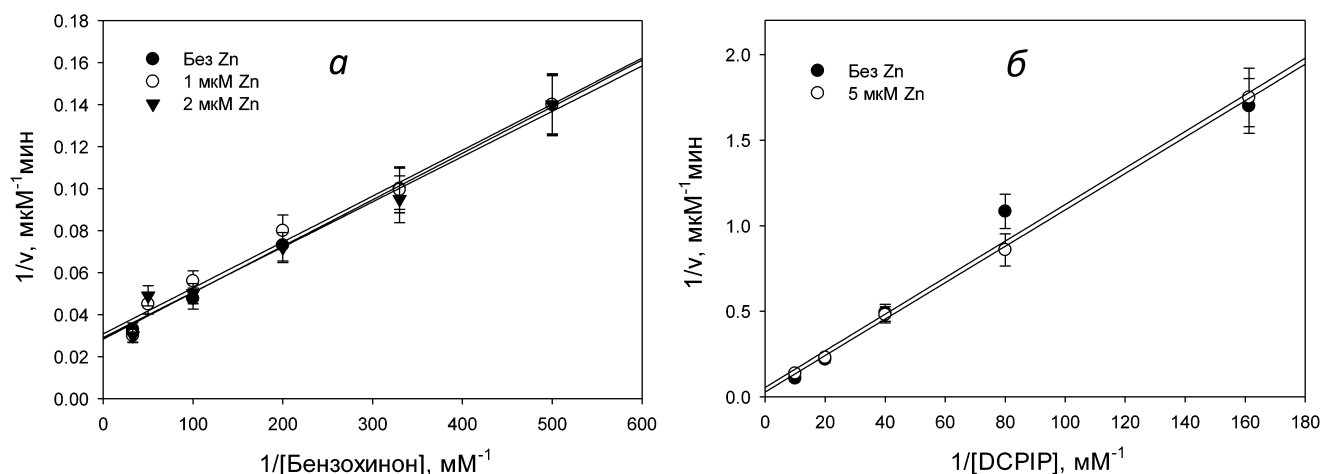


Рис. 4. Отсутствие ускорения реакции под действием Zn^{2+} в реакции восстановления (а) бензохинона 20 мкМ NADH, катализируемой 50 нМ LADH; (б) DCPIP 20 мкМ NADPH, катализируемой 0,2 мкМ тиоредоксин редуктазой *E. coli*. а — Черный кружок — без Zn^{2+} , светлый кружок — в присутствии 1 мкМ Zn^{2+} , черный треугольник — 2 мкМ Zn^{2+} ; б — черный кружок — без Zn^{2+} , светлый кружок — 5 мкМ Zn^{2+} . Кажущиеся константы скорости, определенные из наклонов: (а) $1,5 \times 10^6 \text{ М}^{-1}\text{с}^{-1}$ и (б) $1,0 \times 10^4 \text{ М}^{-1}\text{с}^{-1}$

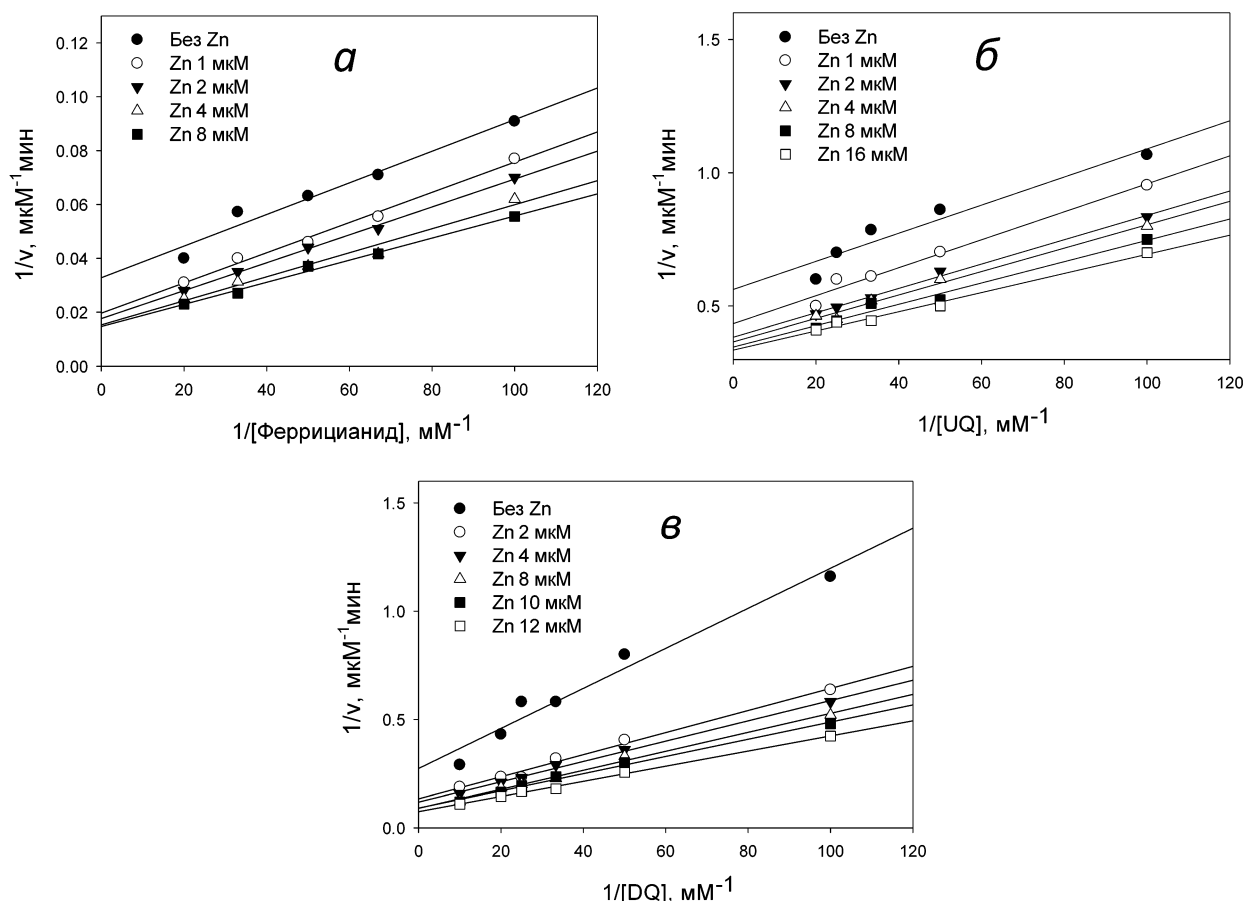


Рис. 5. Влияние Zn^{2+} на восстановление различных электрон-акцепторных субстратов $20 \mu M$ NADH при катализе LADH. а – Феррицианид, $0,15 \mu M$ LADH; б – убихинон, $0,20 \mu M$ LADH; в – duroхинон, $0,18 \mu M$ LADH

на стадию восстановления феррицианида, поскольку наклон не изменяется ($p = 0,063$). Кажущаяся константа скорости для восстановления феррицианида – $(2,5 \pm 0,2) \times 10^5 M^{-1} s^{-1}$ – такая же, как и ранее определенная Vienozinskis et al. [26].

Поскольку $k_1 \gg k_3$ в случае LADH из сердца свиньи, Ур.4 может быть упрощено до:

$$\frac{E_0}{v} = \frac{1}{k_1[NADH]} + \frac{1}{k_4[S]} + \frac{2-k_2/k_4}{k_2[S] + k_3[NADH] + k_1[NADH][Zn]/K_{Zn}}. \quad (5)$$

При равных константах восстановления акцептора электронов двух- и четырехэлектронно-восстановленными формами LADH ($k_2 \approx k_4 \ll \ll k_1$) и сопоставимых концентрациях NADH и субстрата, ускорение под действием Zn^{2+} будет наблюдаться только при варьировании концентрации NADH:

$$\frac{E_0}{v} = \frac{1}{k_1[NADH]} + \frac{1}{k_4[S]} + \frac{1}{k_1[NADH]} \times \frac{1}{\frac{k_4[S]}{k_1[NADH]} + \frac{[Zn]}{K_{Zn}}} \approx \frac{1+K_{Zn}}{k_1[NADH]} + \frac{1}{k_4[S]} \quad (6)$$

Данная модель предсказывает увеличение кажущейся константы скорости стадии восста-

новления субстрата под действием Zn^{2+} только если имеется значительное различие в константах скорости восстановления субстрата двух- и четырехэлектронно-восстановленными формами LADH ($k_2 \ll k_4$ в схеме 1). Максимальный эффект на стадию восстановления субстрата при добавлении Zn^{2+} будет наблюдаться при низких концентрациях NADH, удовлетворяющих условию $k_3[NADH] \leq k_2[S]$, где в отсутствие цинка стационарной формой фермента является его двухэлектронно-восстановленная форма:

$$\frac{E_0}{v} = \frac{1}{k_1[NADH]} + \frac{1}{k_4[S]} + \frac{2}{k_2[S] \left(1 + \frac{k_3[NADH]}{k_2[S]} + \frac{k_1[NADH][Zn]}{k_2[S]K_{Zn}} \right)}. \quad (7)$$

В этом случае добавление цинка в концентрации, равной K_{Zn} , увеличит кажущуюся константу скорости для акцептора электронов с $(1/k_4 + 1/k_2)$ до $1/k_4$. Для наглядности влияния Zn^{2+} на стадии восстановления субстрата, наклоны на рис. 5 рассматриваются только для невысоких концентраций NADH.

Еще два субстрата были исследованы на предмет проверки предположения, что Zn^{2+} ус-

коряет восстановления только двухэлектронных акцепторов. Влияние Zn^{2+} на скорость стадии восстановления убихинона (рис. 5, б) такое же, как и на восстановление феррицианида (рис. 5, а), в то время как влияние цинка на восстановление duroхинона (рис. 5, в) такое же, как и для DCPIP (рис. 2, а). Константы скорости стадии восстановления duroхинона и убихинона Zn^{2+} -связанным двухэлектронно-восстановленным ферментом одинаковы в пределах ошибки измерения и равны $(2,4 \pm 0,2) \times 10^4 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$. Однако ускорение в стационарных условиях для убихинона несильное и различие в наклонах не достигает статистической значимости ($p = 0,065$), в отличие от индуцированного Zn^{2+} ускорения для duroхинона, которое статистически значимо ($p = 0,0003$) и составляет 2–3 раза, как наблюдалось ранее и для DCPIP. Такое различие между субстратами соответствует предложенной модели, а именно – убихинон может выступать как одно-, так и двухэлектронный акцептор, в то время как duroхинон является исключительно двухэлектронным акцептором (стандартный потенциал восстановления duroхинона в семихинон составляет -240 мВ , а для семихинона в duroгидрохинон – $+350 \text{ мВ}$, что делает двухэлектронное восстановление предпочтительным). Таким образом, цинк увеличивает константу скорости восстановления двухэлектронных акцепторов, поскольку двухэлектронно-восстановленный Zn^{2+} -связанный фермент содержит $FADH_2$.

ОБСУЖДЕНИЕ

Данная работа в совокупности с предыдущей публикацией [21] ясно указывает на действие Zn^{2+} как дифференциального регулятора дегидрогеназной и диафоразной активностей LADH. За счет координации восстановлен-

ных цистеинов активного центра Zn^{2+} переключает фермент из режима дегидрогеназы в диафоразу и избирательно активирует восстановление исключительно двухэлектронных субстратов-акцепторов. Это переключение происходит в интервале физиологических концентраций Zn^{2+} .

Величина эффекта Zn^{2+} на стадию восстановления субстрата определяется отношением k_2/k_4 , которое оказывается зависящим от того, является ли субстрат одно- или двухэлектронным акцептором (см. табл. 2). Феррицианид известен исключительно как одноэлектронный акцептор, в то время как большинство хинонов может выступать в обоих качествах [26]. Данные, представленные здесь, согласуются с рассмотрением DCPIP и duroхинона как двухэлектронных акцепторов, в отличие от одноэлектронных феррицианида и убихинона. Бензохинон также может выступать как одноэлектронный акцептор, что объясняет отсутствие ускорения вод воздействием Zn^{2+} . Однако отсутствие ускорения стадии окисления NADH заставляет предполагать, что основным фактором при восстановлении бензохинона является соотношение констант скорости $k_2 \geq k_1 > k_3$ (т.е. лимитирующей скоростью является двухэлектронное восстановление фермента под действием NADH).

Вывод о том, что двухэлектронно-восстановленный фермент в отсутствие Zn^{2+} является плохим двухэлектронным донором в сравнении с четырехэлектронно-восстановленным ферментом (LADH-4e) или восстановленным Zn-связанным ферментом (Zn-LADH-2e), напрямую подтверждается значениями констант скорости, определенными методом остановленной струи (рис. 3 и табл. 1). Таким образом, можно спекулировать на тему переключения фермента под действием Zn^{2+} из одноэлектронной в двухэлектронную редуктазу. Среди семейства

Таблица 2. Влияние цинка на элементарные стадии диафоразной реакции для различных акцепторных субстратов

Субстрат-акцептор	Фермент	Соотношение констант скорости	Число принимаемых электронов	Ускорение цинком стадии	
				окисления NADH	восстановления субстрата
Бензохинон	LADH	$k_2 \geq k_1$	1	нет	нет
Феррицианид	LADH	$k_2 \cong k_4 < k_1$	1	да	нет
Убихинон	LADH	$k_2 \cong k_4 < k_1$	1 или 2	да	нет
Дурохинон	LADH	$k_2 < k_4 < k_1$	2	да	да
DCPIP	LADH	$k_2 < k_4 < k_1$	2	да	да
DCPIP	<i>E. coli</i> TRR	$k_3 \geq k_1$	2	нет	нет

FAD-дителил оксидоредуктаз эффект переключения будет наиболее сильным для ферментов, у которых разница редокс-потенциалов двух- и четырехэлектронно-восстановленных форм фермента наиболее велика.

Характер влияния Zn^{2+} на кинетику восстановления феррицианида и убихинона, катализируемого LADH, напоминает его влияние на катализируемую LADH реакцию восстановления кислорода [21]. В частности, отсутствие изменений в наклоне прямых в двойных обратных координатах $1/v - 1/[O_2]$ в присутствии насыщающей концентрации цинка привело к заключению о равных константах скорости взаимодействия двух- и четырехэлектронно-восстановленного фермента с кислородом (k_2 и k_4) [21]. Однако такое заключение не означает, что продукты этих реакций одинаковы. Кислород может выступать и как одно-, и как двухэлектронный акцептор, образуя соответственно супероксид-радикал и пероксид водорода. Можно предположить, что восстановление кислорода комплексом с переносом заряда приведет к образованию значительно больших количеств супероксида, чем сообщалось ранее [21, 32]. В этой связи необходимо проведение дополнительных исследований по влиянию цинка на соотношение продуктов восстановления кислорода. Связывание цинка LADH может иметь физиологически значимый эффект, переключая с производства супероксида на пероксид водорода.

Предполагается, что внутриклеточная концентрация Zn^{2+} важна для поддержания митохондриального обмена между пулами восстановленных нуклеотидов (NAD(P)H) и тиолов (LADH, тиоредоксин и глутатион редуктазные активности) [21,33]. По-видимому, изменяя внутриклеточную концентрацию Zn^{2+} можно изменить соотношение одно- и двухэлектронных продуктов восстановления. Цинк сильно активирует восстановление убихинона до убихинола, катализируемое липоамид-дегидрогеназой и глутатион-редуктазой, но ингибирует селено-содержащую тиоредоксин-редуктазу [34]. Продукты одноэлектронного восстановления под действием LADH – такие как семихиноны и супероксид-радикал – высокореактивные и потенциально опасные соединения, поэтому цинк может играть защитную роль, способствуя образованию двухэлектронных продуктов восстановления, таких как гидрохиноны или H_2O_2 , которые в гораздо меньшей степени повреждают клеточные структуры.

Двойственная роль цинка в повреждении тканей при ишемии-реперфузии широко об-

суждается [35–37], поскольку недавно сообщалось о его нейропротекторной роли как медикамента [38, 39]. Очевидно, что превентивное действие цинка может быть связано с активацией антиоксидантной (запускаемой Nrf2) и антигипоксической генетическими программами (стабилизация HIF за счет ингибирования цинком негативного регулятора стабильности HIF – HIF пролилгидроксилазы [40]), однако эти механизмы не могут объяснить положительные эффекты администрации высоких доз цинка после инсульта. Количество связанного цинка в клетках млекопитающих составляет порядка 200–300 мкМ [41], тогда как свободного цинка в матриксе митохондрий клеточной линии PC12 определяется всего 0,2 нМ с помощью радиометрической флуоресцентной пробы [42]. Переключение активностей, описанное в данной работе, происходит с кажущейся константой ингибирования цинком, равной 2 мкМ в присутствии Tris-буфера, что с поправкой на хелатирование составляет порядка 100 нМ свободного цинка (в соответствии с расчетами, приведенными в [21]). Выход свободного цинка при окислительном стрессе, приводящем к окислению тиолов белков, включая «хранилища» цинка – металлотионеины, может легко достичь субмикромольного уровня, достаточного для превращения LADH в диафоруазу. LADH является модельным ферментом для семейства флавин-дителил- NAD(P)H-зависимых оксидоредуктаз, таких как глутатион- и тиоредоксин-редуктазы. Наблюдения, приведенные в данной статье, указывают на возможную роль цинка в механизме выживания клетки за счет его координации тиолами активного центра данных ферментов, переключая диафоразную активность этих ферментов из одноэлектронного в двухэлектронный режим восстановления.

Финансирование. Работа была выполнена при финансовой поддержке РФФИ (проекты 20-04-00921, 17-54-33027 и 18-29-09154).

Благодарности. Авторы глубоко признательны миссис Джилл Эшби и проф. Роджеру Н. Ф. Торнли (Великобритания) за неоценимую помощь в проведении анаэробных экспериментов методом остановленной струи.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Соблюдение этических норм. В данной работе не было исследований, в которых были использованы в качестве объектов люди или животные.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Koh, J.-Y., Suh, S. W., Gwag, B. J., He, Y. Y., Hsu, C. Y., and Choi, D. W. (1996) The role of zinc in selective neuronal death after transient global cerebral ischemia, *Science*, **272**, 1013-1016, doi: 10.1126/science.272.5264.1013.
- Choi, D. W., and Koh, J. Y. (1998) Zinc and brain injury, *Ann. Rev. Neurosci.*, **21**, 347-375, doi: 10.1146/annurev.neuro.21.1.347.
- Sensi, S. L., Paoletti, P., Bush, A. I., and Sekler, I. (2009) Zinc in the physiology and pathology of the CNS, *Nat. Rev. Neurosci.*, **10**, 780-791, doi: 10.1038/nrn2734.
- Shuttleworth, C. W., and Weiss, J. H. (2011) Zinc: new clues to diverse roles in brain ischemia, *Trends Pharmacol. Sci.*, **32**, 480-486, doi: 10.1016/j.tips.2011.04.001.
- Skulachev, V. P., Christyakov, V. V., Jasaitis, A. A., and Smirnova, E. G. (1967) Inhibition of the respiratory chain by zinc ions, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **26**, 1-6, doi: 10.1016/0006-291x(67)90242-2.
- Sensi, S. L., Yin, H. Z., Carriedo, S. G., Rao, S. S., and Weiss, J. H. (1999) Preferential Zn^{2+} influx through Ca^{2+} -permeable AMPA/kainate channels triggers prolonged mitochondrial superoxide production, *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, **96**, 2414-2419, doi: 10.1073/pnas.96.5.2414.
- Dong, W., Qi, Z., Liang, J., Shi, W., Zhao, Y., Luo, Y., Ji, X., and Liu, K. J. (2015) Reduction of zinc accumulation in mitochondria contributes to decreased cerebral ischemic injury by normobaric hyperoxia treatment in an experimental stroke model, *Exp. Neurol.*, **272**, 181-189, doi: 10.1016/j.expneurol.2015.04.005.
- Gazaryan, I. G., Krasinskaya, I. P., Kristal, B. S., and Brown, A. M. (2007) Zinc irreversibly damages major enzymes of energy production and antioxidant defense prior to mitochondrial permeability transition, *J. Biol. Chem.*, **282**, 24373-24380, doi: 10.1074/jbc.M611376200.
- Ji, S. G., Medvedeva, Yu. V., and Weiss, J. H. (2020) Zn^{2+} entry through the mitochondrial calcium uniporter is a critical contributor to mitochondrial dysfunction and neurodegeneration, *Exp. Neurol.*, **325**, 113161, doi: 10.1016/j.expneurol.2019.113161.
- Brown, A. M., Kristal, B. S., Effron, M. S., Shestopalov, A. I., Ullucci, P. A., Sheu, K.-F. R., Blass, J. P., and Cooper, A. J. L. (2000) Zn^{2+} inhibits alpha-ketoglutarate-stimulated mitochondrial respiration and the isolated alpha-ketoglutarate dehydrogenase complex, *J. Biol. Chem.*, **275**, 13441-13447, doi: 10.1074/jbc.275.18.13441.
- Casola, L., Brumby, P. E., and Massey, V. (1966) The reversible conversion of lipoyl dehydrogenase to an artifactual enzyme by oxidation of sulfhydryl groups, *J. Biol. Chem.*, **241**, 4977-4984.
- Veege, C., and Massey, V. (1962) Inhibition of lipoyl dehydrogenase by trace metals, *Biochim. Biophys. Acta*, **64**, 83-100, doi: 10.1016/0006-3002(60)90108-6.
- Casola, L., and Massey, V. (1966) Differential effects of mercurial on the lipoyl reductase and diaphorase activities of lipoyl dehydrogenase, *J. Biol. Chem.*, **241**, 4985-4993.
- Nakamura, M., and Yamazaki, I. (1972) One-electron transfer reactions in biochemical systems. VI. Changes in electron transfer mechanism of lipoamide dehydrogenase by modification of sulfhydryl groups, *Biochim. Biophys. Acta*, **267**, 249-257, doi: 10.1016/0005-2728(72)90113-2.
- Thorpe, C., and Williams, C. H., Jr. (1975) Modification of pig heart lipoamide dehydrogenase by cupric ions, *Biochemistry*, **14**, 2419-2424, doi: 10.1021/bi00682a023.
- Lowe, C. R. (1977) Immobilised lipoamide dehydrogenase. 2. Properties of the enzyme immobilised to agarose through spacer molecules of various lengths, *Eur. J. Biochem.*, **76**, 401-409, doi: 10.1111/j.1432-1033.1977.tb11608.x.
- Gutierrez Correa, J., and Stoppani, A. O. M. (1993) Inactivation of lipoamide dehydrogenase by cobalt(II) and iron(II) Fenton systems: effect of metal chelators, thiol compounds and adenine nucleotides, *Free Radic. Res. Commun.*, **19**, 303-314, doi: 10.3109/10715769309056519.
- Olsson, J. M., Xia, L., Eriksson, L. C., and Bjornstedt, M. (1999) Ubiquinone is reduced by lipoamide dehydrogenase and this reaction is potently stimulated by zinc, *FEBS Lett.*, **448**, 190-192, doi: 10.1016/s0014-5793(99)00363-4.
- Xia, L., Bjornstedt, M., Nordman, T., Eriksson, L. C., and Olsson, J. M. (2001) Reduction of ubiquinone by lipoamide dehydrogenase. An antioxidant regenerating pathway, *Eur. J. Biochem.*, **268**, 1486-1490, doi: 10.1046/j.1432-1327.2001.02013.x.
- Hopkins, N., and Williams, C. H., Jr. (1995) Characterization of lipoamide dehydrogenase from *Escherichia coli* lacking the redox active disulfide: C44S and C49S, *Biochemistry*, **34**, 11757-11765, doi: 10.1021/bi00037a013.
- Gazaryan, I. G., Krasnikov, B. F., Ashby, G. A., Thorneley, R. N., Kristal, B. S., and Brown, A. M. (2002) Zinc is a potent inhibitor of thiol oxidoreductase activity and stimulates reactive oxygen species production by lipoamide dehydrogenase, *J. Biol. Chem.*, **277**, 10064-10072, doi: 10.1074/jbc.M108264200.
- Popov, V. O., Gazarian, I. G., Egorov, A. M., and Berezin, I. V. (1985) NAD-dependent hydrogenase from the hydrogen-oxidizing bacterium *Alcaligenes eutrophus* Z-1. Kinetic studies of the NADH-dehydrogenase activity, *Biochim. Biophys. Acta*, **827**, 466-471.
- Maeda-Yorita, K., Russell, G. C., Guest, J. R., Massey, V., and Williams, C. H., Jr. (1991) Properties of lipoamide dehydrogenase altered by site-directed mutagenesis at a key residue (I184Y) in the pyridine nucleotide binding domain, *Biochemistry*, **30**, 11788-11795, doi: 10.1021/bi00115a008.
- Van Berkel, W. J. H., Regelink, A. G., Beintema, J. J., and de Kok, A. (1991) The conformational stability of the redox states of lipoamide dehydrogenase from *Azotobacter vinelandii*, *Eur. J. Biochem.*, **202**, 1049-1055, doi: 10.1111/j.1432-1033.1991.tb16469.x.
- Tsai, C. S. (1980) Kinetic studies of multifunctional reactions catalysed by lipoamide dehydrogenase, *Int. J. Biochem.*, **11**, 407-413, doi: 10.1016/0020-711x(80)90311-0.
- Vienozinskis, J., Butkus, A., Cenas, N., and Kulys, J. (1990) The mechanism of the quinone reductase reaction of pig heart lipoamide dehydrogenase, *Biochem. J.*, **269**, 101-105, doi: 10.1042/bj2690101.
- Williams, C. H., Arscott, L. D., Muller, S., Lennon, B. W., Ludwig, M. L., Wang, P. F., Veine, D. M., Becker, K., and Schirmer, R. H. (2000) Thioredoxin reductase two modes of catalysis have evolved, *Eur. J. Biochem.*, **267**, 6110-6117, doi: 10.1046/j.1432-1327.2000.01702.x.
- Lennon, B. W., and Williams, C. H., Jr. (1996) Enzyme-monitored turnover of *Escherichia coli* thioredoxin reductase: insights for catalysis, *Biochemistry*, **35**, 4704-4712, doi: 10.1021/bi952521i.
- Lennon, B. W., Williams, C. H., Jr., and Ludwig, M. L. (2000) Twists in catalysis: alternating conformations of *Escherichia coli* thioredoxin reductase, *Science*, **289**, 1190-1194, doi: 10.1126/science.289.5482.1190.
- Williams, C. H., Jr. (1995) Mechanism and structure of thioredoxin reductase from *Escherichia coli*, *FASEB J.*, **9**, 1267-1276, doi: 10.1096/fasebj.9.13.7557016.
- Dooijewaard, G., and Slater, E. C. (1976) Steady-state kinetics of high molecular weight (type-I) NADH dehydrogenase, *Biochim. Biophys. Acta*, **440**, 1-15, doi: 10.1016/0005-2728(76)90109-2.

32. Bando, Y., and Aki, K. (1991). Mechanisms of generation of oxygen radicals and reductive mobilization of ferritin iron by lipoamide dehydrogenase, *J. Biochem.*, **109**, 450-454, doi: 10.1093/oxfordjournals.jbchem.a123402.
33. Gaballa, A., and Helmann, J. D. (2002) A Peroxide-induced zinc uptake system plays an important role in protection against oxidative stress in *Bacillus subtilis*, *Mol. Microbiol.*, **45**, 997-1005, doi: 10.1046/j.1365-2958.2002.03068.x.
34. Nordman, T., Xia, L., Björkhem-Bergman, L., Damdimopoulos, A., Nalvarte, I., Arnér, E. S., Spyrou, G., Eriksson, L. C., Björnstedt, M., and Olsson, J. M. (2003) Regeneration of the antioxidant ubiquinol by lipoamide dehydrogenase, thioredoxin reductase and glutathione reductase, *Biofactors*, **18**, 45-50, doi: 10.1002/biof.5520180206.
35. Galasso, S. L., and Dyck, R. H. (2007) The role of zinc in cerebral ischemia, *Mol. Med.*, **13**, 380-387, doi: 10.2119/2007-00044.Galasso.
36. Levenson, C. W. (2005) Zinc supplementation: neuroprotective or neurotoxic? *Nutr. Rev.*, **63**, 122-125, doi: 10.1111/j.1753-4887.2005.tb00130.x.
37. Ischia, J., Bolton, D. M., and Patel, O. (2019) Why is it worth testing the ability of zinc to protect against ischaemia reperfusion injury for human application, *Metallomics*, **11**, 1330-1343, doi: 10.1039/c9mt00079h.
38. Aquilani, R., Baiardi, P., Scocchi, M., Iadarola, P., Verri, M., Sessarego, P., Boschi, F., Pasini, E., Pastoris, O., and Viglio, S. (2009) Normalization of zinc intake enhances neurological retrieval of patients suffering from ischemic strokes, *Nutr. Neurosci.*, **12**, 219-225, doi: 10.1179/147683009X423445.
39. Kitamura, Y., Iida, Y., Abe, J., Ueda, M., Mifune, M., Kasuya, F., Ohta, M., Igarashi, K., Saito, Y., and Saji, H. (2006) Protective effect of zinc against ischemic neuronal injury in a middle cerebral artery occlusion model, *J. Pharmacol. Sci.*, **100**, 142-148, doi: 10.1254/jphs.fp0050805.
40. Osipyants, A. I., Smirnova, N. A., Khristichenko, A. Yu., Nikulin, S. V., Zakhariants, A. A., Tishkov, V. I., Gazaryan, I. G., and Poloznikov, A. A. (2018) Metal ions as activators of hypoxia inducible factor, *Moscow University Chem. Bull.*, **73**, 13-18.
41. Maret, W. (2015) Analyzing free zinc(II) ion concentrations in cell biology with fluorescent chelating molecules, *Metallomics*, **7**, 202-211, doi: 10.1039/c4mt00230j.
42. McCranor, B. J., Bozym, R. A., Vitolo, M. I., Fierke, C. A., Bambrick, L., Polster, B. M., Fiskum, G., and Thompson, R. B. (2012) Quantitative imaging of mitochondrial and cytosolic free zinc levels in an *in vitro* model of ischemia/reperfusion, *J. Bioenerg. Biomembr.*, **44**, 253-263, doi: 10.1007/s10863-012-9427-2.

ZINC SWITCH IN PIG HEART LIPOAMIDE DEHYDROGENASE: STEADY-STATE AND TRANSIENT KINETIC STUDIES OF THE DIAPHORASE REACTION*

I. G. Gazaryan^{1,2,3,4}, V. A. Shchedrina³, N. L. Klyachko^{3,5},
A. A. Zakhariants^{4,6}, S. V. Kazakov², and A. M. Brown^{1**}

¹ Department of Cell Biology and Anatomy, New York Medical College, 10605 NY, USA; E-mail: abraham_brown@nymc.edu

² Department of Chemistry and Physical Sciences, Dyson College of Arts and Sciences, Pace University, 861 Bedford Road, Pleasantville, 10570 NY, USA

³ Department of Chemical Enzymology, Lomonosov Moscow State University, 119899 Moscow, Russia

⁴ Bach Institute of Biochemistry, Federal Research Centre "Fundamentals of Biotechnology" of the Russian Academy of Sciences, 119071 Moscow, Russia

⁵ Derzhavin Tambov State University, 392000 Tambov, Russia

⁶ Shemyakin and Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry of Russian Academy of Sciences, 117997 Moscow, Russia

Submitted May 27, 2020

Revised June 11, 2020

Accepted June 14, 2020

Elevation of intracellular Zn^{2+} following ischemia contributes to cell death by affecting mitochondrial function. Zn^{2+} is a differential regulator of the mitochondrial enzyme lipoamide dehydrogenase (LADH) at physiological concentrations ($K_a = 0.1 \mu M$ free zinc), inhibiting lipoamide and accelerating NADH dehydrogenase activities. These differential effects have been attributed to coordination of Zn^{2+} by LADH active-site cysteines. A detailed kinetic mechanism has now been developed for the diaphorase (NADH-dehydrogenase) reaction catalyzed by pig heart LADH using 2,6-dichlorophenol indophenol (DCPIP) as a model quinone electron acceptor. Anaerobic stopped-flow experiments show that two-electron reduced LADH is 15-25-fold less active towards DCPIP reduction than four-electron reduced enzyme, or Zn^{2+} -modified reduced LADH (the corresponding values of the rate constants are $(6.5 \pm 1.5) \times 10^3 M^{-1} \cdot s^{-1}$, $(9 \pm 2) \times 10^4 M^{-1} \cdot s^{-1}$, and $(1.6 \pm 0.5) \times 10^5 M^{-1} \cdot s^{-1}$, respectively). Steady-state kinetic studies with different diaphorase substrates show that Zn^{2+} accelerates reaction rates exclusively for two-electron acceptors (duroquinone, DCPIP), but not for one-electron acceptors (benzoquinone, ubiquinone, ferricyanide). This implies that the two-electron reduced form of LADH, prevalent at low NADH levels, is a poor two-electron donor compared to the four-electron reduced or Zn^{2+} -modified reduced LADH forms. These data suggest that zinc binding to the active-site thiols switches the enzyme from one- to two-electron donor mode. This zinc-activated switch has the potential to alter the ratio of superoxide and H_2O_2 generated by the LADH oxidase activity.

Keywords: ubiquinone, 2,6-dichlorophenol indophenol, duroquinone, ferricyanide, enzyme kinetics, dehydrolipoyl dehydrogenase

УДК 577.1

ИДЕНТИФИЦИРОВАННЫЕ В ЖИВОТНЫХ ТКАНЯХ ИЗОФОРМЫ 2-ОКСОАДИПАТДЕГИДРОГЕНАЗЫ, КОДИРУЕМОЙ ГЕНОМ *DHTKD1*, НЕ ОБРАЗУЮТСЯ ПРИ ЭКСПРЕССИИ *DHTKD1* ЧЕЛОВЕКА В БАКТЕРИАЛЬНОЙ ИЛИ ДРОЖЖЕВОЙ СИСТЕМАХ*

© 2020 А.И. Бойко^{1**}, А.В. Артюхов^{1,2}, Т. Кэне³, М. Луиджи ди Сальво⁴,
М.К. Бонаккорси ди Патти⁴, Р. Контестабиле⁴, А. Трамонти^{4,5}, В.И. Буник^{1,2,6**}

¹ Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, факультет биоинженерии и биоинформатики, 119991 Москва, Россия; электронная почта: boiko.sash@gmail.com, bunik@belozersky.msu.ru

² НИИ физико-химической биологии имени А.Н. Белозерского, Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, 119991 Москва, Россия

³ Институт экспериментальной медицины Университета имени Отто фон Гюрке, 39120 Магдебург, Германия

⁴ Римский университет Ла Сапиенца, Департамент биологических наук имени А. Росси Фанелли, 00185 Рим, Италия

⁵ Институт молекулярной биологии и патологии, Национальный исследовательский совет, 00185, Рим, Италия

⁶ Первый московский государственный медицинский университет имени И.М. Сеченова, кафедра биологической химии, 119146 Москва, Россия

Поступила в редакцию 16.06.2020

После доработки 25.06.2020

Принята к публикации 26.06.2020

В отличие от представленной во всех тканях животных 2-оксоглутаратдегидрогеназы (ОГДГ, ген *OGDH*), наличие в тканях ее изофермента — 2-оксоадипатдегидрогеназы (ОАДГ, ген *DHTKD1*) — зависит от многих факторов, и фенотип при мутациях *DHTKD1* выражен редко. Поскольку оба изофермента катализируют превращения как 2-оксоглутарата, так и 2-оксоадипата, физиологическая роль ОАДГ не очевидна. По аналогии с другими представителями семейства дегидрогеназ 2-оксокислот считают, что ОАДГ является компонентом полиферментного комплекса, катализирующего окислительное декарбоксилирование 2-оксоадипата. Целью настоящего исследования являлась молекулярная характеристика ОАДГ животных тканей. Филогенетический анализ дегидрогеназ 2-оксокислот обнаружил ОАДГ лишь у животных и слизевика *Dictyostelium discoideum* в составе общей с бактериальными ОГДГ ветви. Исследование частично очищенной из животных тканей ОАДГ методами иммуноблоттинга и масс-спектрометрии показало, что фермент представлен двумя изоформами с мол. массами ~130 и 70 кДа. Эти изоформы не детектируются при получении ОАДГ человека в бактериальной или дрожжевой системах экспрессии, где молекулярная масса ОАДГ соответствует ожидаемой (~100 кДа). Таким образом, обнаруженные изоформы ОАДГ могут быть продуктами специфической для животных регуляции экспрессии *DHTKD1* и/или посттрансляционных модификаций фермента. Положение идентифицированных пептидов ОАДГ в структуре белка свидетельствует о том, что у изоформы 70 кДа отсутствует N-концевой фрагмент, но сохранен активный центр. Поскольку N-концевой домен ОГДГ необходим для формирования полиферментного комплекса, можно предположить, что изоформа ОАДГ 70 кДа катализирует неокислительные превращения дикарбоновых 2-оксокислот, которые не требуют полиферментной структуры. В этом случае соотношение охарактеризованных изоформ ОАДГ в тканях животных может отражать соотношение окислительного и неокислительного декарбоксилирования 2-оксоадипата, катализируемого ОАДГ.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: *DHTKD1*, *OGDH*, изофермент 2-оксоглутаратдегидрогеназы, изоформы 2-оксоадипатдегидрогеназы, карболигаза, посттрансляционные модификации.

DOI: 10.31857/S0320972520080072

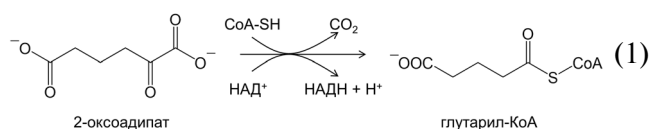
Принятые сокращения: *DHTKD1* — ген, кодирующий 2-оксоадипатдегидрогеназу (белок 1, содержащий дегидрогеназный и транскетотазный домены); ОАДГ — 2-оксоадипатдегидрогеназа; ОАДК — полиферментный комплекс 2-оксоадипатдегидрогеназы; ОГДГ — 2-оксоглутаратдегидрогеназа.

* Ускоренная публикация. Первоначально английский вариант рукописи опубликован на сайте «Biochemistry» (Moscow) <http://protein.bio.msu.ru/biokhimiya>, в рубрике «Papers in Press», BM20-167, 30.07.2020.

** Адресат для корреспонденции.

ВВЕДЕНИЕ

Продукт гена *DHTKD1* 2-оксоадипатдегидрогеназа (ОАДГ) является одним из белков, который был обнаружен путем автоматической аннотации геномов животных. По сумме идентичных аминокислот и консервативных замен последовательность ОАДГ имеет 56% сходство с кодируемой геном *OGDH* 2-оксоглутаратдегидрогеназой (ОГДГ) [1] — ключевым ферментом цикла трикарбоновых кислот. При этом оба фермента катализируют превращения дикарбоновых 2-оксокислот 2-оксоглутарата и 2-оксоадипата, хоть и с разной эффективностью [2–4]. Структурное и функциональное сходство позволяет рассматривать ОАДГ и ОГДГ как изоферменты. Энзимологические исследования рекомбинантной ОАДГ [5] показали, что в составе 2-оксоадипатдегидрогеназного полиферментного комплекса (ОАДК), собранного *in vitro* из продуцируемых в бактериальной системе компонентов, ОАДГ катализирует аналогичную ОГДГ реакцию окислительного декарбоксилирования 2-оксоадипата (реакция 1):



Однако проявления мутаций гена *DHTKD1* у человека, как и накопление 2-оксо- и 2-аминоадипата — промежуточных соединений катаболизма лизина и триптофана — при таких мутациях [6, 7], принципиально отличаются от последствий мутаций *OGDH*, которые несовместимы с жизнью [8], вследствие тяжелых нарушений функции ЦНС [9]. Полученные при исследовании мутантов данные указывают на отсутствие взаимозаменяемости ОАДГ и ОГДГ на уровне организма, несмотря на сходство их каталитических функций. Таким образом, *in vivo* функции ОАДГ и ОГДГ отличаются значительно сильнее, чем *in vitro*.

Изучение физиологического значения катализируемой ОАДГ реакции окислительного декарбоксилирования 2-оксоадипата — общего интермедиата катаболизма лизина и триптофана — затруднено ввиду того, что эти метаболические пути мало изучены и в разной степени выражены в разных типах клеток и тканей. Кроме того, значительная вариабельность экспрессии *DHTKD1* как в разных органах и тканях одного организма, так и на уровне популяции, приводит к отсутствию четко выраженного фенотипа при мутациях этого гена. Подавление синтеза ОАДГ в клетках нарушает биоге-

нез и энергетический метаболизм митохондрий [10], а на уровне организма изменения экспрессии *DHTKD1* ассоциированы с развитием системных патологий обмена глюкозы, таких как диабет и ожирение [11–13]. Накопление 2-оксо- и 2-аминоадипата вследствие мутаций функционально важных остатков ассоциировано с нервно-мышечными патологиями [6, 7, 14]. С другой стороны, 2-аминоадипат показал нейротропное действие в моделях болезни Паркинсона [15], что свидетельствует о неоднозначности (пато)физиологической роли катализируемой ОАДГ реакции. Таким образом, исследования ОАДГ весьма актуальны как с фундаментальной, так и медицинской точки зрения.

В данной работе охарактеризованы структурные особенности ОАДГ, которые лежат в основе физиологически значимой регуляции функций фермента в тканях животных. Показаны отличия мол. массы ОАДГ, существующей в тканях крысы, от массы, рассчитанной по первичной структуре и свойственной рекомбинантному белку, синтезируемому в бактериальной или дрожжевой системах экспрессии гена *DHTKD1* человека. Это свидетельствует о существовании альтернативных белковых продуктов гена *DHTKD1* и/или их посттрансляционных модификаций, которые отсутствуют у рекомбинантной ОАДГ.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Материалы. Все использованные реактивы были наивысшей доступной чистоты. Реактивы приобретали у следующих производителей: полиэтиленгликоль-6000, ЭДТА, PMSF — «Serva» (Германия), коктейль ингибиторов протеаз — «Roche» (Швейцария), метанол — «Merck» (Германия), Triton-X100, KH_2PO_4 , NaCl — «Panreac», (Испания), глицерол, сахароза — «Biomedicals, LLC» (США), MgCl_2 , CaCl_2 — «ДИА-М» (Россия), MOPS — «Хеликон» (Россия), дрожжевой экстракт — «Fluka» (США), Trypton — «GeneSpin» (Италия), глюкоза — «VWR» (США), остальные органические соединения — «Sigma» (США).

Животные. Для получения гомогенатов тканей крыс использовали белых крыс-самцов линии Wistar массой 300–350 г, содержащихся на стандартном рационе в виварии биологического факультета МГУ им. М.В. Ломоносова. Животные имели постоянный доступ к воде и пище и находились при световом цикле 12/12 ч (световая фаза с 9:00 до 21:00 по местному времени), температуре $(21 \pm 2)^\circ\text{C}$ и относительной влажности воздуха $(53 \pm 5)\%$. Крыс умерщвля-

ли методом декапитации с помощью гильотины.

Приготовление гомогенатов и обогащенных ОАДК фракций из тканей крысы. Гомогенаты тканей крыс готовили по опубликованному ранее протоколу [16]. Препараты сердца, печени и мозга, обогащенные ОАДК, получали согласно опубликованной методике [3].

Экспрессия *DHTKD1* в бактериальной системе. кДНК гена *DHTKD1* была встроена в вектор pET28 для экспрессии в клетках *E. coli* BL21(DE3) по стандартному протоколу [17]. Клетки осаждали центрифугированием в течение 5 мин при 2550 g и замораживали при -20°C . Лизат бактерий получали путем инкубации ресуспендированных клеточных осадков с лизоцимом и разрушения мембран ультразвуком. Рекомбинантный белок с дополнительным гексагистиридиновым пептидом на С-конце был очищен из бактериального лизата на гранулах Ni-NTA агарозы с использованием 50 mM KH_2PO_4 , pH 8,0, содержащем 300 mM KCl с 300 mM имидазолом.

Экспрессия *DHTKD1* в дрожжевой системе. Вектор pIB2, содержащий кДНК гена *DHTKD1* под GAP-промотором, линейаризовали с помощью рестриктазы SalI и использовали для трансформации компетентных клеток *Pichia pastoris* GS115 (his4) путем электропорации по описанному протоколу [18]. Дрожжи растили в стерильной среде YPD с 2%-ной глюкозой в течение ~48 ч при температуре 28°C и перемешивании, затем осаждали и замораживали. Клетки лизировали с помощью стеклянных бусин с добавлением ДНКазы I и РНКазы. Очистку ОАДГ с гексагистиридиновым пептидом на С-конце проводили на колонке Ni-NTA Superflow 1 ml Cartridge («Qiagen», Германия), уравновешенной буфером 50 mM KH_2PO_4 , pH 8,0, 300 mM KCl. Элюцию ОАДГ с колонки проводили тем же буфером с градиентным увеличением концентрации имидазола с 30 mM до 300 mM на хроматографической системе ÄKTA Prime («GE Healthcare», США).

Ds-Na-ПААГ электрофорез и иммуноблоттинг. К образцам добавляли солюбилизирующий буфер (250 mM Tris-HCl, 8%-ный Ds-Na, 40%-ный (v/v) глицерин, 20%-ный β -меркаптоэтанол и 0,04%-ный бромфеноловый синий, pH 6,8) в соотношении 3 : 1. Образцы кипятили в течение 5 мин и остужали до комнатной температуры перед нанесением.

Для детекции ОАДГ методом иммуноблоттинга использовали стандартный протокол и антитела мыши к ОАДГ #H00055526-B01P (1:500, «Abnova», Тайвань). В качестве вторичных антител использовали антитела, конъюги-

рованные с пероксидазой хрена («Boehringer Mannheim GmbH», Германия) со свежеприготовленным хемилюминесцентным субстратом (10 мг 3-амино-9-этил-карбазола растворяли в 25 мл 50 mM CH_3COONa , pH 5,0, содержащем 5%-ный диметилформамид, и смешивали с 30%-ной перекисью водорода в соотношении 1 : 2000) или P-GAM Iss (1:1000 «Имтек», Россия) с набором субстратов ECL («Bio-Rad», США). Фотографии полос были получены с помощью гель-документирующей системы ChemiDoc MP («Bio-Rad»).

Мол. массу белковых полос, реагирующих с антителами на ОАДГ, определяли из линейной зависимости логарифма мол. массы белка от его подвижности в геле, используя калибровочный график, построенный для белков-маркеров Unstained Protein Standards («Bio-Rad»).

Идентификация пептидов ОАДГ в тканях крысы. Идентификацию белков в полосах, соответствующих мол. массам 130 ± 10 кДа и 70 ± 5 кДа на гелях после Ds-Na-ПААГ электрофореза проводили методом tandemной масс-спектрометрии (LC-MS/MS) после трипсинолиза как описано ранее [19]. Белки крысы идентифицировали с использованием последовательностей из базы данных SwissProt для крысы.

Построение филогенетического дерева семейства дегидрогеназ 2-оксокислот. Для построения филогенетического дерева был проведен поиск гомологов последовательности ОАДГ крысы (идентификатор UniProt Q4KLP0) с помощью сервиса BLASTP [20] по базам данных Swiss-Prot и RefSeq с параметрами поиска, выставленными по умолчанию, за исключением порога E-value 10^{-3} и размера слова 2. При этом исключали последовательности, полученные автоматической трансляцией ДНК (префикс XM_/XP_), и неуникальные последовательности (префикс WP_). Результаты поиска по двум базам данных скачивали в виде последовательностей в формате fasta, исключая повторяющиеся находки. Строили их множественное выравнивание с помощью алгоритма Muscle в программе MEGA X [21]. Результат выравнивания визуализировали в виде филогенетического дерева, построенного методом объединения соседей (Neighbour-joining).

Моделирование. Для предсказания трехмерной структуры мономера ОАДГ млекопитающих использовали аминокислотную последовательность белка крысы, доступную в базе UniProt по идентификатору Q4KLP0 (DHTK1_RAT). С учетом результатов нашего филогенетического анализа о близости ОАДГ к бактериальным ОАДГ, для построения модели ОАДГ была выбрана разрешенная пространственная структура

холофермента микобактериальной ОГДГ (идентификатор RSCB PDB 2XT6). Модель была построена с помощью сервера I-TASSER [22]. Для визуализации структуры белка использовали программу PyMOL 2.0.4. (Schrödinger, Inc.).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Филогенетический анализ возникновения белка ОАДГ. На рис. 1 представлено филогенетическое дерево дегидрогеназ 2-оксокислот, из которого видно, что отделение кодируемой геном *DHTKD1* ОАДГ от ветви ОГДГ произошло в ходе ранней эволюции многоклеточных эукариот. В настоящее время кодируемая геном *DHTKD1* ОАДГ аннотирована лишь у животных и слизевика *Dictyostelium discoideum* (рис. 1). Отсюда можно заключить, что ОАДГ возникла у организмов, перешедших на питание другими организмами и в связи с этим утративших способность к биосинтезу ряда необходимых для метаболизма соединений. В частности, в ходе эволюции как животные, так и *Dictyostelium* независимо утратили способность синтезировать лизин и триптофан [23], в катаболизме которых участвует ОАДГ.

Другим интересным результатом проведенного филогенетического анализа является обнаруженная близость эукариотического белка ОАДГ к бактериальным ОГДГ (рис. 1), с которыми ОАДГ эукариот образует один кластер. Такое структурное сходство может свидетельствовать об эволюционной потребности в сохранении некоторых функций и свойств бактериальных ОГДГ, утраченных эукариотическими ОГДГ вследствие их специализации. В частности, по сравнению с бактериальными комплексами, эукариотические используют дополнительные белок-белковые взаимодействия при самосборке полиферментных комплексов и характеризуются усилением селективности превращений 2-оксо субстрата [24].

Таким образом, отделение ОАДГ от ее гомолога ОГДГ, по-видимому, отражает процесс разделения функций ОГДГ и ОАДГ в ходе эволюции и необходимость независимой от ОГДГ регуляции функции ОАДГ.

Изоформы ОАДГ в тканях крыс. Анализ гомогенатов тканей крыс методом иммуноблоттинга показал, что специфичные по отношению к ОАДГ антитела реагируют с двумя белковыми полосами (рис. 2, а). Кажущиеся молекулярные массы данных белковых полос были определены усреднением результатов анализа 25 образцов в пяти независимых экспериментах и составили 127 ± 2 кДа и 69 ± 1 кДа. При этом в некоторых

случаях низкомолекулярная полоса была представлена двумя близкорасположенными полосами, характерными для белков, образующих внутримолекулярные дисульфидные связи [25]. С учетом ошибки определения для простоты изложения массы изоформ округлены до 130 и 70 кДа. Ни одна из данных полос не соответствует 100 кДа — массе нативной ОАДГ, рассчитанной на основе аминокислотной последовательности белка без пептида митохондриальной локализации, вес которого составляет 2,5 кДа. При этом высокомолекулярная полоса 130 кДа обнаруживалась, в основном, в печени (рис 2, а), где уровень экспрессии *DHTKD1* и представленность ОАДГ максимальны по сравнению с другими тканями [3]. С помощью масс-спектрометрии показано наличие пептидов ОАДГ крысы в обеих белковых полосах, реагирующих с антителами на ОАДГ (рис. 2, б). Полученные данные указывают на то, что идентифицированные иммуноблоттингом изоформы ОАДГ, наблюдаемые мол. массы которых существенно отличаются от массы, рассчитанной для белковой последовательности, связаны с изменениями структуры ОАДГ.

По результатам высокопроизводительных исследований известно, что ОАДГ взаимодействует с убиквитином и убиквитин-подобными белками (NEDD8, SUMO1) [26, 27], и в одном из таких исследований было показано убиквитинилирование ОАДГ по остаткам Lys537, Lys881 и Lys886 (рис. 3). Данная модификация, в отличие от других, показанных для ОАДГ (рис. 3), может увеличивать массу фермента от 100 кДа до наблюдаемой нами массы 130 кДа и более.

При идентификации убиквитинилированных белков с помощью масс-спектрометрии после трипсинолиза были обнаружены пептиды, содержащие характерные триплеты Lys-ε-Gly-Gly [28]. Однако авторы не смогли детектировать пептиды с такими триплетами в исследованных образцах печени крысы, поэтому возможность модификации ОАДГ убиквитином или убиквитин-подобными белками требует дальнейших исследований. Тем не менее, пептид, позволяющий детектировать белок ОАДГ, был идентифицирован и при анализе области геля выше 130 кДа. Этот результат свидетельствует о существовании и более высокомолекулярных, чем детектируемая форма 130 кДа, вариантов ОАДГ, хотя уровень таких высокомолекулярных форм низок по сравнению с основными формами, детектированными методом иммуноблоттинга (рис. 2, а).

Определенные масс-спектрометрическим анализом пептиды ОАДГ в области белков с

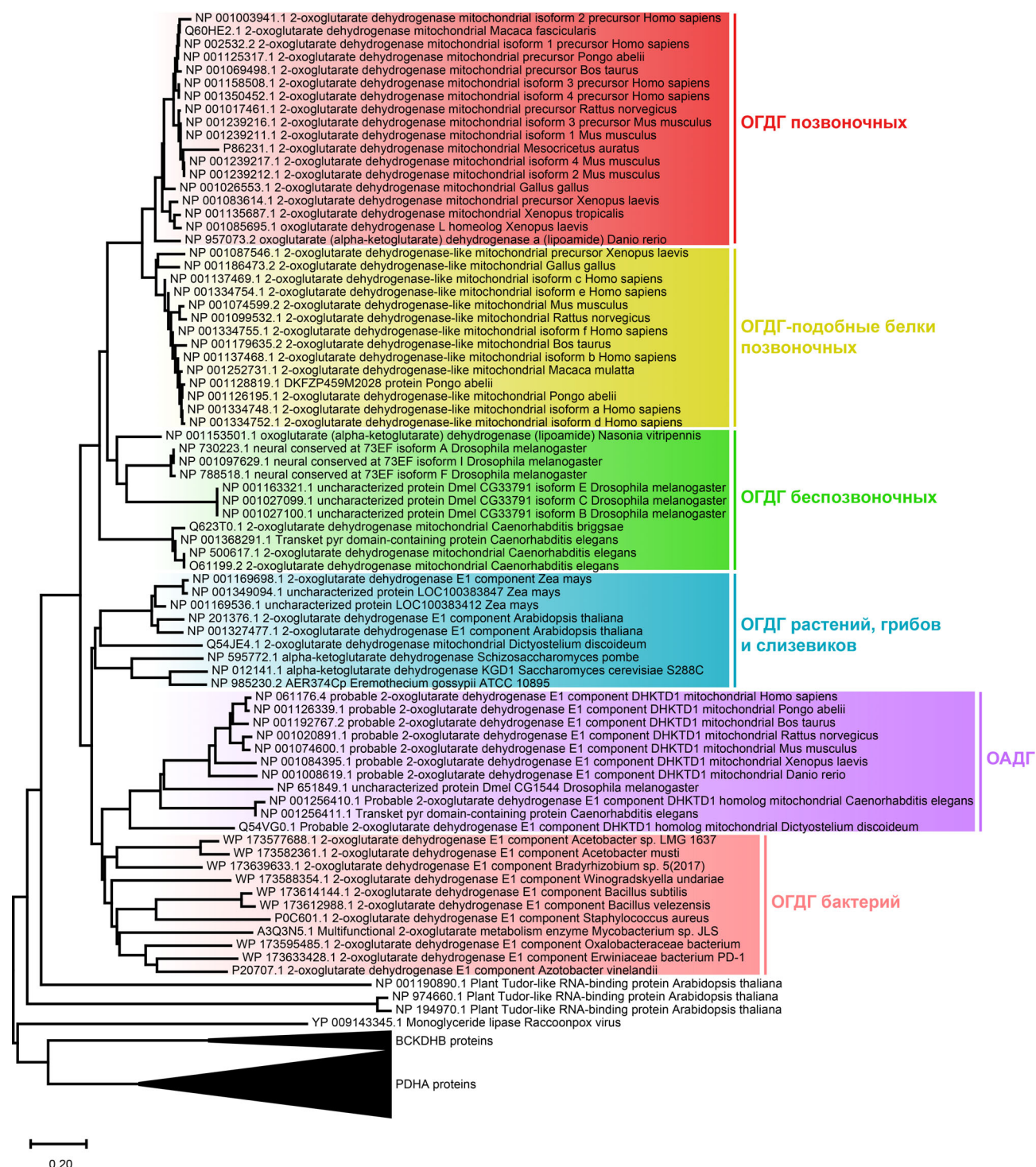


Рис. 1. Филогенетическое дерево белковых последовательностей дегидрогеназ 2-оксоислот. Для оптимальной визуализации результатов α -субъединицы пируватдегидрогеназы (PDHA proteins) приведены в виде одной общей ветви, аналогично показаны β -субъединицы дегидрогеназы разветвленных 2-оксоислот (BCKDHB proteins). Размерность масштабной шкалы — количество аминокислотных замен на остаток. (С цветными вариантами рис. 1–4 можно ознакомиться в электронной версии статьи на сайте: <http://sciencejournals.ru/journal/biokhsm/>)

молекулярной массой 70 кДа (рис. 2, б) изображены на модели мономера белка (рис. 4), полученной с использованием структуры ОДГ *Mycobacterium smegmatis*. Как видно из рис. 4,

идентифицированные пептиды ОАДГ достаточно равномерно покрывают дегидрогеназный, транскетотазный и С-концевой домены ОАДГ, но отсутствуют в N-концевом фрагменте белка.

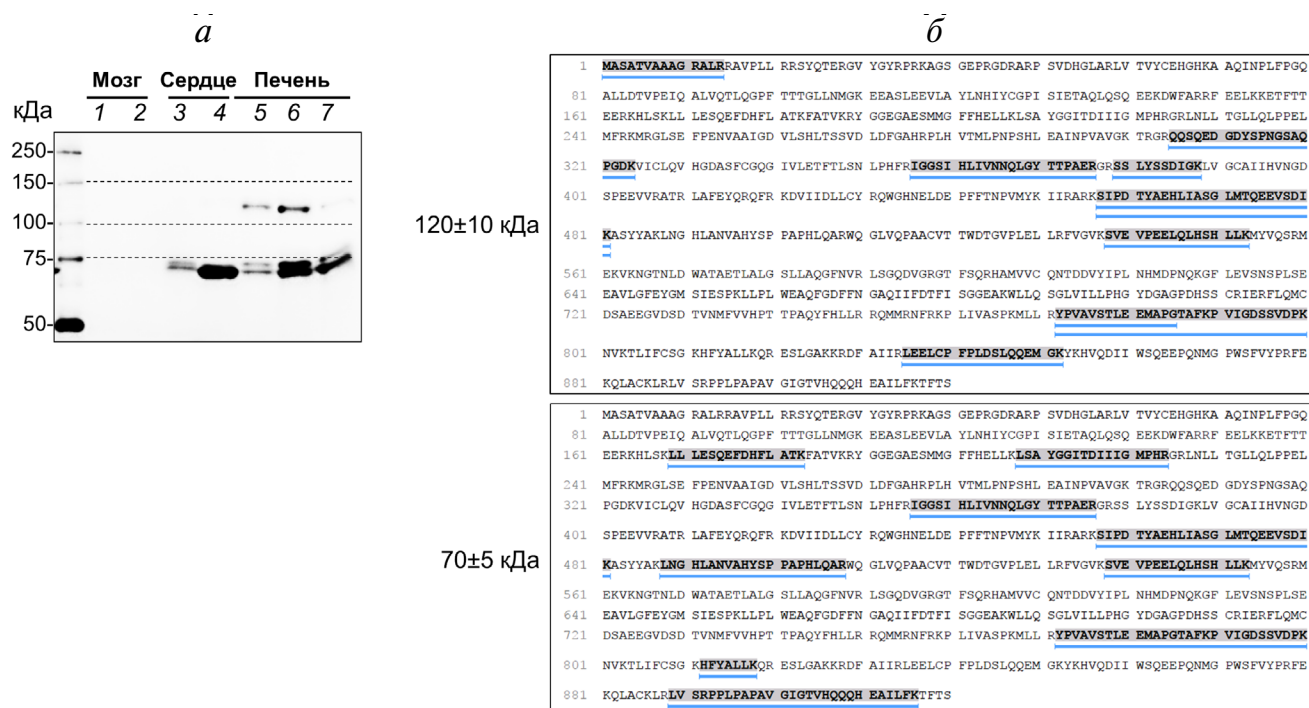


Рис. 2. Изоформы ОАДГ в тканях крысы. *а* – Белки, реагирующие с антителами на ОАДГ в препаратах фермента из мозга, сердца и печени. 1, 2 – Гомогенат коры головного мозга, 3 – гомогенат сердца, 4 – препарат сердца, обогащенный ОАДК, 5 – гомогенат печени, 6 и 7 – два препарата печени с разной степенью обогащенности ОАДК. Для каждого образца нанесено ~35 мкг белка. Пунктиром обозначены уровни мол. масс белковых маркеров 75, 100 и 150 кДа; *б* – пептиды ОАДГ, идентифицированные методом LC-MS/MS в препарате из печени крысы, выделены и подчеркнуты. Масс-спектрометрический анализ проводили в участках геля, соответствующих интервалам мол. масс 110–130 кДа и 65–75 кДа

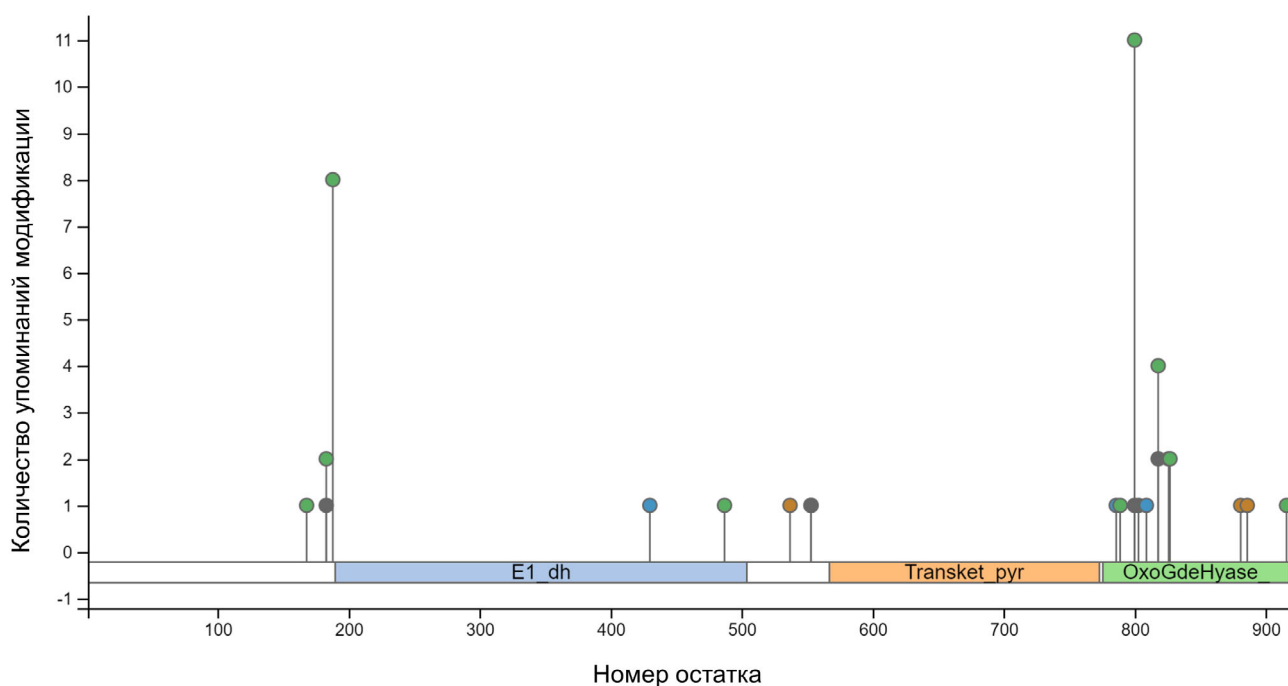


Рис. 3. Модификации ОАДГ крысы, определенные в высокопроизводительных скрининговых исследованиях, по данным базы PhosphoSitePlus v6.5.9.1. [29]. Домены последовательности ОАДГ обозначены разными цветами: голубым «E1_dh» – дегидрогеназный домен, оранжевым «Transket pyr» – транскетолазный пиримидин-связывающий домен, зеленым «OxoGdeHyase» – С-концевой домен дегидрогеназ 2-оксокислот. Модификации указанных остатков последовательности включают ацетилирование (зеленые точки), фосфорилирование (голубые точки), сукцинирование (серые точки), убиквитинилирование (коричневые точки)

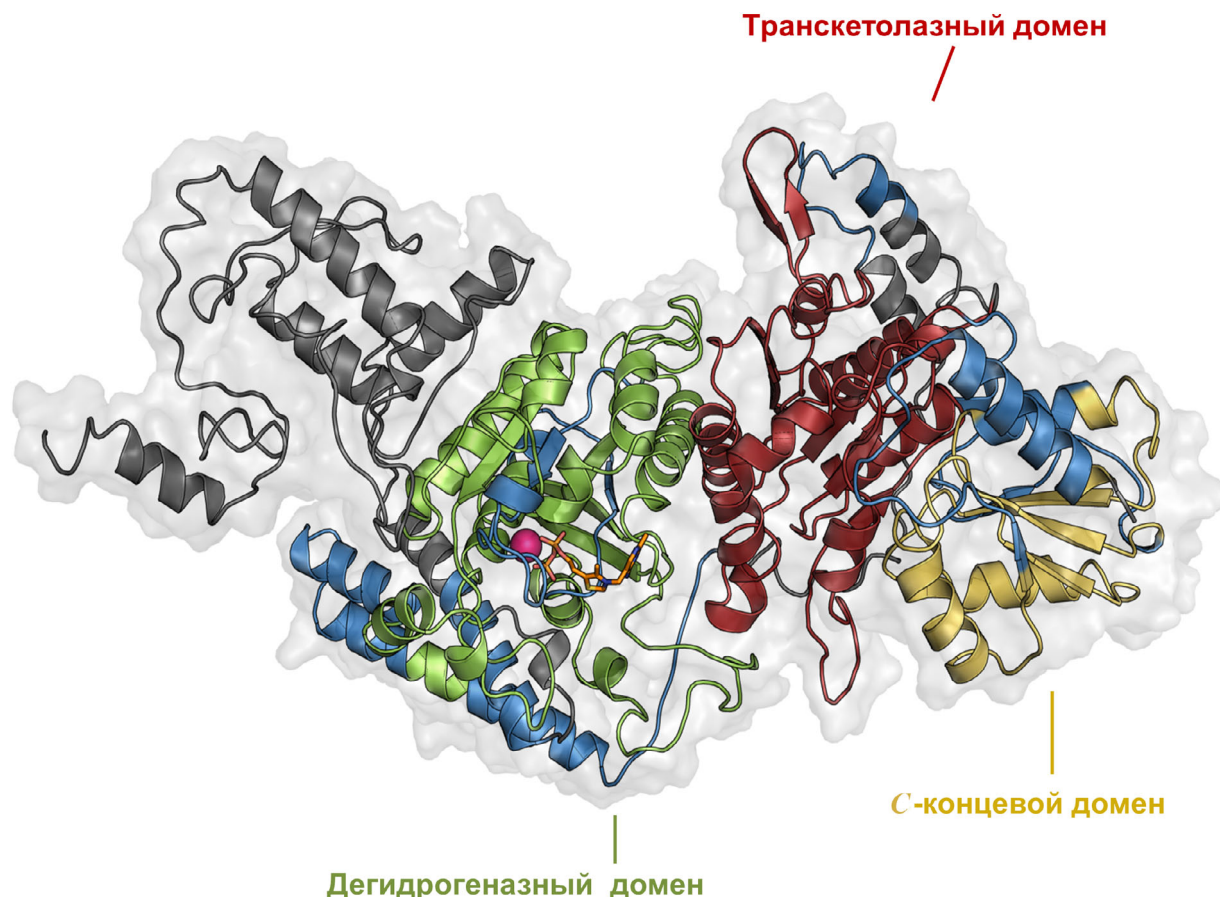


Рис. 4. Модель мономера ОАДГ крысы с коферментами тиаминдифосфатом и Mg^{2+} . Ион магния окрашен розовым цветом, молекула тиаминдифосфата — оранжевым. Домены белка обозначены разными цветами: зеленым — дегидрогеназный домен E1-компонентов комплексов дегидрогеназ 2-оксокислот, красным — транскетолазный пиримидин-связывающий домен, желтым — С-концевой домен. Голубым окрашены указанные на рис. 2, б пептиды ОАДГ, которые были определены в частично очищенном препарате ОАДГ печени среди белков с мол. массой 70 кДа

Полученные результаты свидетельствуют о том, что изоформа ОАДГ 70 кДа может быть продуктом *DHTKD1*, возникающим вследствие альтернативного старта транскрипции или сплайсинга мРНК. Кроме того, она может быть продуктом специфического протеолиза, при котором происходит отрезание *N*-концевого фрагмента белка. Функциональность 70 кДа изоформы остается под вопросом. У эукариотических ОГДГ *N*-концевой фрагмент участвует в образовании полиферментного комплекса, и протеолитическое удаление этого фрагмента делает невозможным протекание полной реакции комплекса [30]. Таким образом, существование изоформы 70 кДа может означать наличие у ОАДГ функций, которые не требуют формирования полиферментного комплекса. К таким функциям относятся, например, неокислительные реакции декарбоксилирования 2-оксокислот, включающие предсказанные для ОАДГ карболигазные реакции [1]. Следует отметить, что неокислительное де-

карбоксилирование 2-оксоглутарата, ведущее к образованию сукцинилполуальдегида или к конденсации продукта декарбоксилирования с глиоксалью в карболигазной реакции (рис. 5), достаточно сильно выражены для микобактериальной ОГДГ, обнаруживающей значительную степень структурного сходства с ОАДГ по результатам нашего филогенетического анализа (рис. 1). Биологическое значение такой неокислительной функции ОАДГ у животных может объяснять высокое содержание изоформы с массой 70 кДа в сердце (рис. 2, а), где скорость катализируемой комплексом полной реакции окислительного декарбоксилирования 2-оксоадипата (реакция (1) при его низкой концентрации, насыщающей только для ОАДГ, но не для ОГДГ, близка к нулю [3]. В этих условиях скорость полной реакции окислительного декарбоксилирования 2-оксоадипата измерима лишь для препарата из печени [3], где мы детектировали обе изоформы ОАДГ (рис. 2, а).

Таким образом, изоформа ОАДГ 70 кДа может быть необходима для реализации неокислительной функции ОАДГ (рис. 5), которая не требует образования полиферментного комплекса, необходимого для осуществления окислительного декарбоксилирования. Содержание же изоформы 130 кДа коррелирует с каталитическим превращением 2-оксоадипата в полной реакции окислительного декарбоксилирования (реакция 1).

Характеристика ОАДГ человека, продуцируемой при экспрессии *DHDKD1* в эукариотической или бактериальной системе. При экспрессии гена *DHDKD1* человека в эукариотической системе *Pichia pastoris* мы не наблюдали низкомолекулярной полосы белка ОАДГ. Более того, мол. масса наработанного белка была близка к рассчитанной по последовательности мол. массе 100 кДа (рис. 6, а). Аналогичный результат был получен при экспрессии *DHDKD1* в клетках *E. coli* (рис. 6, б).

Поскольку при экспрессии гена *DHDKD1* человека как в бактериальной, так и в дрожжевой системах, получаемая ОАДГ представлена лишь одной полосой белка с молекулярной массой около 100 кДа (Рис. 6), очевидно, что образование существующих в тканях животных изоформ ОАДГ не происходит в использованных про- и

эукариотических системах продукции рекомбинантных белков (рис. 2, рис. 6). Обнаруженная регуляция ОАДГ животных указывает на значительные ограничения исследований получаемой генно-инженерными методами ОАДГ для понимания биологических функций и механизмов регуляции данного белка.

Таким образом, в данной работе проведено сравнение свойств ОАДГ в тканях крысы и рекомбинантной ОАДГ человека, полученной в дрожжевой или бактериальной системе экспрессии. С помощью антител показано, что структура присутствующей в тканях животных ОАДГ значительно модифицирована по сравнению со структурой фермента, получаемого в бактериях или дрожжах. В первом случае ОАДГ представлена двумя изоформами с мол. массами 130 и 70 кДа, тогда как во втором случае мол. масса ОАДГ близка к ожидаемой мол. массе 100 кДа. Присутствие изоформ ОАДГ в тканях животных свидетельствует о специфической регуляции экспрессии гена *DHDKD1* и/или посттрансляционных модификациях кодируемого им белка в тканях млекопитающих. Функциональное значение такой регуляции может быть связано с реализацией неокислительной функции ОАДГ млекопитающих.

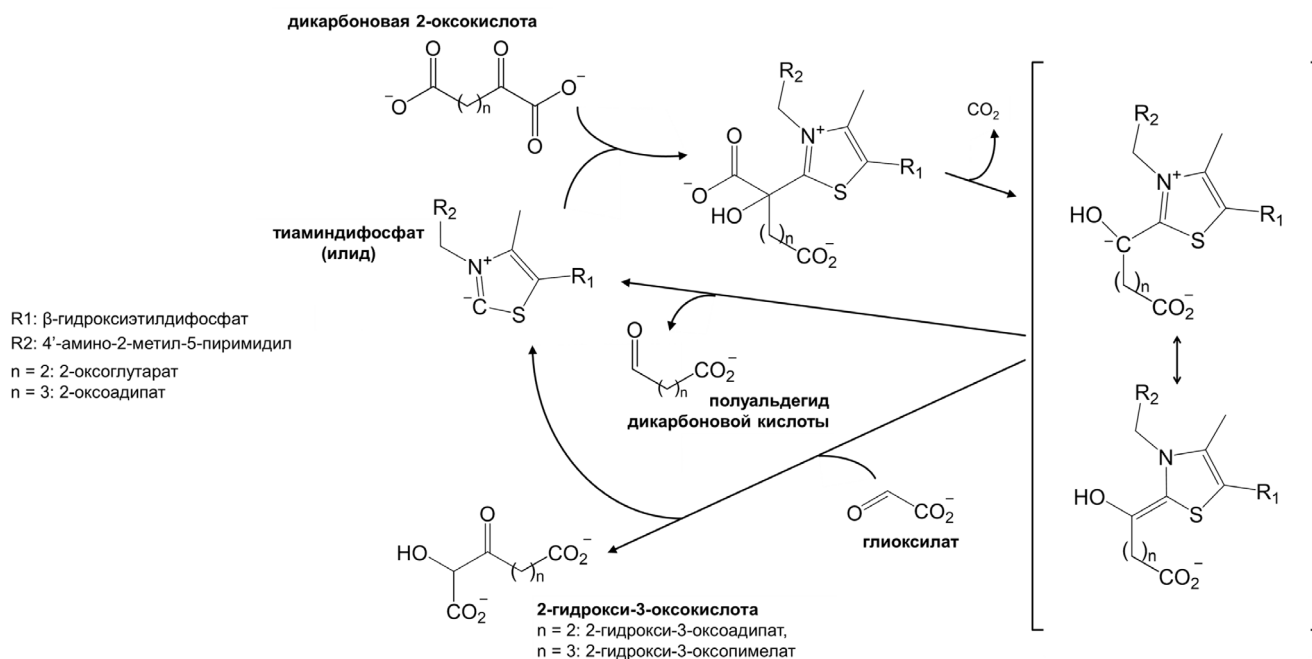
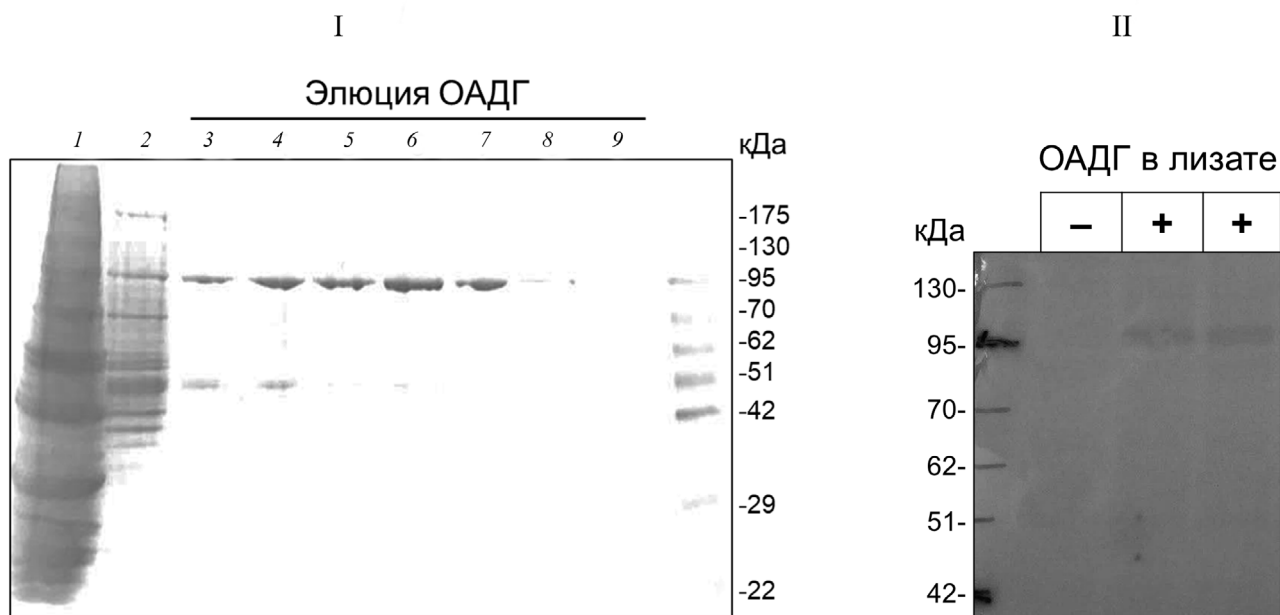


Рис. 5. Схема неокислительных превращений дикарбоновых 2-оксокислот, которые может катализировать ОАДГ. Образующийся в активном центре ОАДГ илидтиаминдифосфата взаимодействует с 2-оксоглутаратом или 2-оксоадипатом, катализируя их декарбоксилирование. Интермедиат реакции, стабилизированный резонансным переходом между его карбанионной и енаминной формами, показан в квадратных скобках. В отсутствие субстратов-акцепторов этот интермедиат распадается с образованием полуальдегида дикарбоновой кислоты. При наличии в среде соединений с активированным атомом углерода, например, глиоксилата, дегидрогеназы дикарбоновых 2-оксокислот могут катализировать карболигазную реакцию. На рисунке представлена реакция с глиоксилатом, где образуется 2-гидрокси-3-оксокислота

а

P. pastoris

б

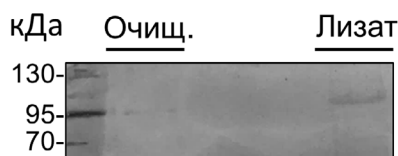
E. coli

Рис. 6. ОАДГ человека, продуцируемая при экспрессии гена *DHTKD1* в дрожжах *P. pastoris* (а) или бактериях *E. coli* (б). I) Очистка ОАДГ человека, полученной в *P. pastoris*, с помощью аффинной хроматографии: 1 – дрожжевой лизат, 2–9 – фракции элюции ОАДГ с Ni-NTA колонки с постепенным повышением концентрации имидазола в буфере элюции от 30 мМ (фракция 2) до 250 мМ (фракция 9). Белок на геле окрашен по методу Кумасси [31]. II) Иммуноблот в лизатах *P. pastoris* до и после экспрессии *DHTKD1* человека; б – иммуноблот очищенного препарата ОАДГ (очищ.) и лизата *E. coli* BL21(DE3) после экспрессии *DHTKD1* человека

Финансирование. Данная работа выполнена при финансовой поддержке РФФИ (грант 18-54-7812) и CNR (грант SAC.AD002.020.017).

Благодарности. Авторы выражают благодарность А.В. Граф и М.В. Масловой (МГУ им. М.В. Ломоносова) за предоставление образцов тканей крыс, использованных в данном исследовании.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Соблюдение этических норм. Все международные, национальные и/или институциональные принципы ухода и использования животных были соблюдены. В частности, все эксперименты с животными проводили с соблюдением этических норм согласно «Правилам проведения работ с использованием экспериментальных животных», утвержденным директивой Евросоюза 2010/63/EU. Эксперименты были одобрены Комиссией по биоэтике МГУ им. М.В. Ломоносова.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Bunik, V. I., and Degtyarev, D. (2008) Structure-function relationships in the 2-oxo acid dehydrogenase family: substrate-specific signatures and functional predictions for the 2-oxoglutarate dehydrogenase-like proteins, *Proteins*, 71, 874-890, doi: 10.1002/prot.21766.
2. Tsepikova, P. M., Artiukhov, A. V., Boyko, A. I., Aleshin, V. A., Mkrtchyan, G. V., Zvyagintseva, M. A., Ryabov, S. I., Ksenofontov, A. L., Baratova, L. A., Graf, A. V., and Bunik, V. I. (2017) Thiamine induces long-term changes in amino acid profiles and activities of 2-oxoglutarate and 2-

- oxoadipate dehydrogenases in rat brain, *Biochemistry (Moscow)*, **82**, 723-736, doi: 10.1134/S0006297917060098.
3. Artiukhov, A. V., Grabarska, A., Gumbarewicz, E., Aleshin, V. A., Kahne, T., Obata, T., Kazantsev, A. V., Lukashev, N. V., Stepulak, A., Fernie, A. R., and Bunik, V. I. (2020) Synthetic analogues of 2-oxo acids discriminate metabolic contribution of the 2-oxoglutarate and 2-oxoadipate dehydrogenases in mammalian cells and tissues, *Sci. Rep.*, **10**, 1886, doi: 10.1038/s41598-020-58701-4.
 4. Nemeria, N. S., Gerfen, G., Yang, L., Zhang, X., and Jordan, F. (2018) Evidence for functional and regulatory cross-talk between the tricarboxylic acid cycle 2-oxoglutarate dehydrogenase complex and 2-oxoadipate dehydrogenase on the l-lysine, l-hydroxylysine and l-tryptophan degradation pathways from studies *in vitro*, *Biochim. Biophys. Acta Bioenerg.*, **1859**, 932-939, doi: 10.1016/j.bbambio.2018.05.001.
 5. Nemeria, N. S., Gerfen, G., Nareddy, P. R., Yang, L., Zhang, X., Szostak, M., and Jordan, F. (2018) The mitochondrial 2-oxoadipate and 2-oxoglutarate dehydrogenase complexes share their E2 and E3 components for their function and both generate reactive oxygen species, *Free Radic. Biol. Med.*, **115**, 136-145, doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2017.11.018.
 6. Danhauser, K., Sauer, S. W., Haack, T. B., Wieland, T., Stauffer, C., Graf, E., Zschocke, J., Strom, T. M., Traub, T., Okun, J. G., Meitinger, T., Hoffmann, G. F., Prokisch, H., and Kolker, S. (2012) DHTKD1 mutations cause 2-aminoadipic and 2-oxoadipic aciduria, *Am. J. Hum. Genet.*, **91**, 1082-1087, doi: 10.1016/j.ajhg.2012.10.006.
 7. Stiles, A. R., Venturoni, L., Mucci, G., Elbalalesy, N., Woontner, M., Goodman, S., and Abdenur, J. E. (2016) New cases of DHTKD1 mutations in patients with 2-ketoadipic aciduria, *JIMD Rep.*, **25**, 15-19, doi: 10.1007/8904_2015_462.
 8. Amsterdam, A., Nissen, R. M., Sun, Z., Swindell, E. C., Farrington, S., and Hopkins, N. (2004) Identification of 315 genes essential for early zebrafish development, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **101**, 12792-12797, doi: 10.1073/pnas.0403929101.
 9. Yap, Z. Y., Strucinska, K., Matsuzaki, S., Lee, S., Si, Y., Humphries, K., Tarnopolsky, M. A., and Yoon, W. H. (2020) A biallelic pathogenic variant in the *OGDH* gene results in a neurological disorder with features of a mitochondrial disease, *J. Inherit. Metab. Dis.*, doi: 10.1002/jimd.12248.
 10. Xu, W., Zhu, H., Gu, M., Luo, Q., Ding, J., Yao, Y., Chen, F., and Wang, Z. (2013) DHTKD1 is essential for mitochondrial biogenesis and function maintenance, *FEBS Lett.*, **587**, 3587-3592, doi: 10.1016/j.febslet.2013.08.047.
 11. Plubell, D. L., Fenton, A. M., Wilmarth, P. A., Bergstrom, P., Zhao, Y., Minnier, J., Heinecke, J. W., Yang, X., and Pamir, N. (2018) GM-CSF driven myeloid cells in adipose tissue link weight gain and insulin resistance via formation of 2-aminoadipate, *Sci. Rep.*, **8**, 11485, doi: 10.1038/s41598-018-29250-8.
 12. Timmons, J. A., Atherton, P. J., Larsson, O., Sood, S., Blokhin, I. O., Brogan, R. J., Volmar, C. H., Josse, A. R., Slentz, C., Wahlestedt, C., Phillips, S. M., Phillips, B. E., Gallagher, I. J., and Kraus, W. E. (2018) A coding and non-coding transcriptomic perspective on the genomics of human metabolic disease, *Nucleic Acids Res.*, **46**, 7772-7792, doi: 10.1093/nar/gky570.
 13. Lim, J., Liu, Z., Apontes, P., Feng, D., Pessin, J. E., Sauve, A. A., Angeletti, R. H., and Chi, Y. (2014) Dual mode action of mangiferin in mouse liver under high fat diet, *PLoS One*, **9**, e90137, doi: 10.1371/journal.pone.0090137.
 14. Xu, W. Y., Zhu, H., Shen, Y., Wan, Y. H., Tu, X. D., Wu, W. T., Tang, L., Zhang, H. X., Lu, S. Y., Jin, X. L., Fei, J., and Wang, Z. G. (2018) DHTKD1 deficiency causes Charcot-Marie-Tooth disease in mice, *Mol. Cell. Biol.*, **38**, doi: 10.1128/MCB.00085-18.
 15. O'Neill, E., Chiara Goisis, R., Haverty, R., and Harkin, A. (2019) L-alpha-aminoadipic acid restricts dopaminergic neurodegeneration and motor deficits in an inflammatory model of Parkinson's disease in male rats, *J. Neurosci. Res.*, **97**, 804-816, doi: 10.1002/jnr.24420.
 16. Graf, A., Kabysheva, M. S., Klimuk, E. I., Trofimova, L., Dunaeva, T., Zundorf, G., Kahlert, S., Reiser, G., Storozhevskiy, T. P., Pinelis, V. G., Sokolova, N., and Bunik, V. (2009) Role of 2-oxoglutarate dehydrogenase in brain pathologies involving glutamate neurotoxicity, *J. Mol. Catal. B Enzym.*, **61**, 80-87, doi: 10.1016/j.molcatb.2009.02.016.
 17. Musayev, F. N., Di Salvo, M. L., Ko, T. P., Schirch, V., and Safo, M. K. (2003) Structure and properties of recombinant human pyridoxine 5'-phosphate oxidase, *Protein Sci.*, **12**, 1455-1463, doi: 10.1110/ps.0356203.
 18. Wu, S., and Letchworth, G. J. (2004) High efficiency transformation by electroporation of *Pichia pastoris* pre-treated with lithium acetate and dithiothreitol, *Biotechniques*, **36**, 152-154, doi: 10.2144/04361DD02.
 19. Aleshin, V. A., Mkrtchyan, G. V., Kaehne, T., Graf, A. V., Maslova, M. V., and Bunik, V. I. (2020) Diurnal regulation of the function of the rat brain glutamate dehydrogenase by acetylation and its dependence on thiamine administration, *J. Neurochem.*, **153**, 80-102, doi: 10.1111/jnc.14951.
 20. Altschul, S. F., Gish, W., Miller, W., Myers, E. W., and Lipman, D. J. (1990) Basic local alignment search tool, *J. Mol. Biol.*, **215**, 403-410, doi: 10.1016/S0022-2836(05)80360-2.
 21. Kumar, S., Stecher, G., Li, M., Niyaz, C., and Tamura, K. (2018) MEGA X: molecular evolutionary genetics analysis across computing platforms, *Mol. Biol. Evol.*, **35**, 1547-1549, doi: 10.1093/molbev/msy096.
 22. Roy, A., Kucukural, A., and Zhang, Y. (2010) I-TASSER: a unified platform for automated protein structure and function prediction, *Nat. Protoc.*, **5**, 725-738, doi: 10.1038/nprot.2010.5.
 23. Payne, S. H., and Loomis, W. F. (2006) Retention and loss of amino acid biosynthetic pathways based on analysis of whole-genome sequences, *Eukaryot. Cell*, **5**, 272-276, doi: 10.1128/EC.5.2.272-276.2006.
 24. Bunik, V. (2017) *Vitamin-Dependent Multienzyme Complexes of 2-Oxo Acid Dehydrogenases: Structure, Function, Regulation and Medical Implications*, Hauppauge, NY, Nova Science Publishers Inc.
 25. Bunik, V., Shoubnikova, A., Bisswanger, H., and Follmann, H. (1997) Characterization of thioredoxins by sodium dodecyl sulfate-slab gel electrophoresis and high performance capillary electrophoresis, *Electrophoresis*, **18**, 762-766, doi: 10.1002/elps.1150180517.
 26. Bonacci, T., Audebert, S., Camoin, L., Baudelet, E., Bidaut, G., Garcia, M., Witzel, H., Perkins, N. D., Borg, J. P., Iovanna, J. L., and Soubeyran, P. (2014) Identification of new mechanisms of cellular response to chemotherapy by tracking changes in post-translational modifications by ubiquitin and ubiquitin-like proteins, *J. Proteome Res.*, **13**, 2478-2494, doi: 10.1021/pr401258d.
 27. Akimov, V., Barrio-Hernandez, I., Hansen, S. V. F., Hallenborg, P., Pedersen, A. K., Bekker-Jensen, D. B., Puglia, M., Christensen, S. D. K., Vanselow, J. T., Nielsen, M. M., Kratchmarova, I., Kelstrup, C. D., Olsen, J. V., and Blagoev, B. (2018) UbiSite approach for comprehensive mapping of lysine and N-terminal ubiquitination sites, *Nat. Struct. Mol. Biol.*, **25**, 631-640, doi: 10.1038/s41594-018-0084-y.
 28. Udesi, N. D., Mertins, P., Svinkina, T., and Carr, S. A. (2013) Large-scale identification of ubiquitination sites by

- mass spectrometry, *Nat. Protoc.*, **8**, 1950-1960, doi: 10.1038/nprot.2013.120.
29. Hornbeck, P. V., Zhang, B., Murray, B., Kornhauser, J. M., Latham, V., and Skrzypek, E. (2015) PhosphoSitePlus, 2014: mutations, PTMs and recalibrations, *Nucleic Acids Res.*, **43**, D512-520, doi: 10.1093/nar/gku1267.
 30. McCartney, R. G., Rice, J. E., Sanderson, S. J., Bunik, V., Lindsay, H., and Lindsay, J. G. (1998) Subunit interactions in the mammalian alpha-ketoglutarate dehydrogenase complex. Evidence for direct association of the alpha-ketoglutarate dehydrogenase and dihydrolipoamide dehydrogenase components, *J. Biol. Chem.*, **273**, 24158-24164.
 31. Arndt, C., Koristka, S., Feldmann, A., Bartsch, H., and Bachmann, M. (2012) Coomassie-Brilliant Blue staining of polyacrylamide gels, *Methods Mol. Biol.*, **869**, 465-469, doi: 10.1007/978-1-61779-821-4_40.

ISOFORMS OF THE *DHTKD1*-ENCODED 2-OXOADIPATE DEHYDROGENASE, IDENTIFIED IN ANIMAL TISSUES, ARE NOT OBSERVED UPON THE HUMAN *DHTKD1* EXPRESSION IN BACTERIAL OR YEAST SYSTEMS*

A. I. Boyko^{1**}, A. V. Artiukhov^{1,2}, T. Kaehne³, M. L. di Salvo⁴, M. C. Bonaccorsi di Patti⁴,
R. Contestabile⁴, A. Tramonti^{4,5}, and V. I. Bunik^{1,2,6**}

¹ Faculty of Bioengineering and Bioinformatics, Lomonosov Moscow State University, 119991 Moscow, Russia; E-mail: boiko.sash@gmail.com, bunik@belozersky.msu.ru

² Belozersky Institute of Physico-Chemical Biology, Lomonosov Moscow State University, 119991 Moscow, Russia

³ Institute of Experimental Internal Medicine, Otto-von-Guericke University, 39120 Magdeburg, Germany

⁴ Department of Biological Sciences A. Rossi Fanelli, Sapienza University, 00185 Rome, Italy

⁵ Institute of Molecular Biology and Pathology, Council of National Research, 00185 Rome, Italy

⁶ Department of Biological Chemistry, Sechenov First Moscow State Medical University, 119146 Moscow, Russia

Received June 16, 2020

Revised June 25, 2020

Accepted June 26, 2020

Unlike the *OGDH*-encoded 2-oxoglutarate dehydrogenase (OGDH), which is an essential enzyme present in all animal tissues, expression of the *DHTKD1*-encoded isoenzyme, 2-oxoadipate dehydrogenase (OADH), depends on a number of factors, and mutant *DHTKD1* phenotypes are rarely manifested. Physiological significance of OADH is also obscured by the fact that both isoenzymes transform 2-oxoglutarate and 2-oxoadipate. By analogy with other members of the 2-oxo acid dehydrogenases family, OADH is assumed to be a component of the multienzyme complex that catalyzes oxidative decarboxylation of 2-oxoadipate. This study aims at molecular characterization of OADH from animal tissues. Phylogenetic analysis of 2-oxo acid dehydrogenases reveals OADH only in animals and *Dictyostelium discoideum* slime mold, within a common branch with bacterial OGDH. Examination of partially purified animal OADH by immunoblotting and mass spectrometry identifies two OADH isoforms with molecular weights of about 130 and 70 kDa. These isoforms are not observed upon the expression of human *DHTKD1* protein in either bacterial or yeast system, where the synthesized OADH is of expected molecular weight (about 100 kDa). Thus, the OADH isoforms present in animal tissues, may result from the animal-specific regulation of the *DHTKD1* expression and/or post-translational modifications of the encoded protein. Mapping of the peptides identified in the OADH preparations, onto the protein structure suggests that the 70-kDa isoform is truncated at the N-terminus, but retains the active site. Since the N-terminal domain of OGDH is required for the formation of the multienzyme complex, it is possible that the 70-kDa isoform catalyzes non-oxidative transformation of dicarboxylic 2-oxo acids that does not require the multienzyme structure. In this case, the ratio of the OADH isoforms in animal tissues may correspond to the ratio between the oxidative and non-oxidative decarboxylation of 2-oxoadipate.

Keywords: DHTKD1, OGDH, carboligase, isoenzyme of 2-oxoglutarate dehydrogenase, isoform of 2-oxoadipate dehydrogenase, post-translational modifications

УДК 577.352.5

ЭЛЕКТРОГЕНЕЗ ВО ФРАКЦИИ ПЛАЗМАТИЧЕСКИХ МЕМБРАН ИЗ ГАЛОТОЛЕРАНТНОЙ МИКРОВОДОРОСЛИ *Dunaliella maritima* И ЭФФЕКТЫ *N,N'*-ДИЦИКЛОГЕКСИЛКАРБОДИИМИДА*

© 2020 Л.Г. Попова**, Д.А. Маталин, Ю.В. Балнокин

ФГБУН Институт физиологии растений им. К.А. Тимирязева РАН,
127276 Москва, Россия; электронная почта: lora_gp@mail.ru

Поступила в редакцию 22.06.2020

После доработки 22.06.2020

Принята к публикации 26.06.2020

В опытах на везикулярных препаратах плазматической мембраны, выделенных из клеток зеленой галотолерантной микроводоросли *Dunaliella maritima*, исследовали влияние *N,N'*-дициклогексилкарбодиимида (*N,N'*-dicyclohexylcarbodiimide, DCCD) – неспецифического ингибитора транспортных систем, функционирующих в биологических мембранах, – на Na^+ -транспортирующую АТФазу Р-типа этого организма. Исследовали эффекты DCCD на электрогенную/ион-транспортирующую функцию фермента и его АТФ-гидролазную активность. Электрогенную/ион-транспортирующую функцию фермента регистрировали с помощью потенциал-чувствительного зонда оксонол VI по Na^+ -зависимой генерации электрического потенциала на везикулярных мембранах. Найдено, что, в отличие от множества других ион-транспортирующих АТФаз, Na^+ -АТФаза *D. maritima* нечувствительна к действию DCCD. Этот агент не подавлял ни гидролиз АТФ, катализируемый данным ферментом, ни его транспортную активность. Вместе с тем, DCCD влиял на способность везикулярных мембран поддерживать электрический потенциал, создаваемый Na^+ -АТФазой *D. maritima*. Наблюдаемые эффекты объясняются, исходя из предположения, что DCCD взаимодействует с Na^+/H^+ антипортером в плазматической мембране *D. maritima*.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: *Dunaliella maritima*, Na^+ -АТФаза, *N,N'*-дициклогексилкарбодиимид, микроводоросли, мембранный потенциал, плазматическая мембрана.

DOI: 10.31857/S0320972520080084

ВВЕДЕНИЕ

Животные и растительные клетки различаются по способу энергизации плазматической мембраны. В животных клетках основную роль в энергизации клеточной мембраны играет активный транспорт Na^+ и K^+ , осуществляемый Na^+ , K^+ -АТФазой. Этот фермент поддерживает неравновесное распределение Na^+ и K^+ по обе стороны мембраны и создает отрицательный со стороны цитоплазмы электрический потенциал на мембране [1, 2]. Создаваемый АТФазой градиент электрохимического потенциала Na^+

обеспечивает движущую силу для процессов пассивной диффузии других ионов, а также процессов вторично-активного ко-транспорта различных веществ через мембрану. В растительных клетках транспортные процессы на плазматической мембране обусловлены наличием протонного градиента, который создает электрогенная H^+ -помпа – H^+ -АТФаза [3]. Она выводит протоны из клетки в окружающую среду/апопласт с затратой метаболической энергии, что также сопровождается генерацией на мембране отрицательного со стороны цитоплазмы электрического потенциала.

Однако и у представителей растительного царства – галотолерантных зеленых микроводорослей *Tetraselmis viridis* и *Dunaliella maritima* – в плазматической мембране были обнаружены электрогенные Na^+ -помпы [4, 5]. Na^+ -помпы микроводорослей принадлежат семейству АТФаз Р-типа, к которому также относятся протонная помпа высших растений и Na^+ , K^+ -АТФаза животных клеток [6, 7]. Интересно отметить, что у данных видов микроводорослей Na^+ -АТФазы в плазмалемме сосуществуют с H^+ -помпами – АТФазами Р-типа, что было показа-

Принятые сокращения: СССР – карбонилцианид *m*-хлорфенилгидразон (carbonyl cyanide *m*-chlorophenylhydrazine); DCCD – *N,N'*-дициклогексилкарбодиимид (*N,N'*-dicyclohexylcarbodiimide); ETH157 – sodium ionophore II (*N,N'*-dibenzyl-*N,N'*-diphenyl-1,2-phenylenedioxycetamide); $\Delta\psi$ – трансмембранный электрический потенциал; ПМ – плазматическая мембрана.

* Первоначально английский вариант рукописи опубликован на сайте «Biochemistry» (Moscow) <http://protein.bio.msu.ru/biochemistry>, в рубрике «Papers in Press», BM20-173, 30.07.2020.

** Адресат для корреспонденции.

но в экспериментах на выделенных из клеток водорослей везикулярных препаратах плазматической мембраны [5, 8]. Эти экспериментальные данные согласуются с результатами, полученными при анализе секвенированных геномов зеленых (*Chlophyta*) микроводорослей *Ostreococcus tauri* и *Chlamydomonas reinhardtii*, которые также показывают сосуществование у этих организмов Na^+ -АТФаз и H^+ -АТФаз Р-типа [9].

Зеленые микроводоросли рода *Dunaliella* являются удобными модельными объектами в исследованиях физиологии устойчивости растительных организмов к абиотическим стрессам. Они способны выдерживать экстремальные условия окружающей среды, включая высокую соленость [10]. У этих водорослей отсутствует крупная центральная вакуоль, и, следовательно, за ионное гомеостатирование цитоплазмы отвечают исключительно механизмы, локализованные в плазматической мембране. В частности, у галотолерантной микроводоросли *Dunaliella maritima* в плазматической мембране обнаружена электрогенная Na^+ -транспортирующая АТФаза, которая, по-видимому, и отвечает за Na^+ -гомеостатирование клеток этой водоросли [5]. Представленная работа продолжает исследование свойств Na^+ -АТФазы *D. maritima*.

В первичной структуре Na^+ -транспортирующих мембранных белков отсутствуют консервативные последовательности, ответственные за связывание ионов Na^+ , а способность к переносу Na^+ обусловлена особенностями трехмерной архитектуры белков. В трансмембранной области она консервативна и сходна со структурой краун-эфира, где роль центрального координирующего иона играет Na^+ [11, 12]. Для формирования подобной структуры, способной избирательно связывать ионы Na^+ , могут быть важными отдельные аминокислотные остатки, занимающие соответствующее положение в белке. На примере Na^+ , K^+ -АТФазы животных клеток и Na^+ -специфичных бактериальных F_1F_0 -АТФаз установлено, что специфичность этих ферментов по отношению к переносимым катионам может быть изменена единичными аминокислотными заменами в белке [13, 14]. Первым шагом в идентификации подобных аминокислотных остатков может быть исследование взаимодействия белка с определенными ингибиторами, механизм действия которых известен. Примером подобного ингибитора является *N,N'*-дициклогексилкарбодиимид (*N,N'*-dicyclohexylcarbodiimide, DCCD) — неспецифический ингибитор различных транспортных систем, функционирующих в биологических мембранах,

включая АТФазы разных типов: F-типа [15–17], V-типа [18, 19], Р-типа [20, 21]. Хорошо установлен механизм подавления транспортной активности белков этим ингибитором. DCCD — карбоксилмодифицирующий агент, который ковалентно связывается с определенным аминокислотным остатком (как правило, это Glu или Asp) в трансмембранном участке транспортной системы, в сайте, по которому осуществляется связывание переносимого катиона, и тем самым ингибирует активность транспортной системы [15, 19].

В данной работе представлены результаты экспериментов по исследованию возможного взаимодействия Na^+ -АТФазы *D. maritima* с DCCD, а именно: исследовали влияние DCCD на электрогенную/ион-транспортирующую функцию этого фермента и его АТФ-гидролазную активность. Эксперименты проведены на обогащенной плазматической мембраной (ПМ) фракции мембранных везикул, выделенных из клеток *D. maritima*.

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Объект исследования и условия выращивания.

Исследования проводили на зеленой галотолерантной микроводоросли *Dunaliella maritima* Massjuk [22]. Водоросль культивировали в однолитровых стеклянных цилиндрах (средняя толщина слоя суспензии водорослей 5 см) в среде следующего состава (мМ): NaCl — 500, NaNO_3 — 10, KH_2PO_4 — 5, MgSO_4 — 6, $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ — 1,5, FeSO_4 — 0,01, EDTA — 0,1, раствор микроэлементов по Абдуллаеву и Семененко [23] в количестве 1 мл/л; pH доводили до 8,0 раствором NaOH . Культуру непрерывно продували воздухом с 1,5%-ной CO_2 и освещали белым светом люминесцентных ламп ЛБ-20 при освещенности 15 000 лк 14 ч в сутки.

Выделение везикул плазматической мембраны из клеток *D. maritima*. Выделение везикул плазматической мембраны (ПМ) из клеток микроводоросли осуществляли согласно методу, описанному в работе [5]. Мембранную фракцию, обогащенную плазмалеммой, получали дифференциальным центрифугированием и центрифугированием в ступенчатом (30/38%) сахарозном градиенте. Во всех экспериментах, включая определение АТФ-гидролазной активности фермента, использовали свежевыделенную фракцию ПМ.

Полученные препараты ПМ водоросли представляли смесь инвертированных (цитоплазматическая сторона обращена в наружную среду) и нормально ориентированных везикул.

В экспериментах наблюдали активность только инвертированных везикул, в которых активные центры АТФазы были экспонированы в наружную среду

Регистрация электрогенной активности Na^+ -АТФазы *D. maritima*. Электрогенную активность Na^+ -АТФазы в выделенных везикулах ПМ регистрировали по Na^+ - и АТФ-зависимой генерации электрического потенциала на везикулярной мембране, как это описано в работе [5]. Генерацию электрического потенциала на везикулярной мембране наблюдали по изменениям дифференциальной абсорбции ($A_{621}-A_{582}$) потенциал-чувствительного оптического зонда оксонол VI. Измерения, осуществляемые в двухволновом режиме (длина волны измерения $\lambda_2 = 621$, длина волны сравнения $\lambda_1 = 582$ нм), проводили с помощью спектрофотометра Hitachi 557. Стандартная реакционная среда (в спектрофотометрической кювете объемом 2 мл) имела следующий состав: 0,4 М сахараза, 5 мМ MgSO_4 , 1 мМ EGTA, 20 мМ Mes/BTP-буфер, pH 7,5, 2 мкМ оксонол VI, ~100 мкг мембранного белка. Генерацию электрического потенциала на везикулярных мембранах инициировали внесением АТФ (конечная концентрация 2 мМ; АТФ использовали в форме Tris-соли) и ионов Na^+ (в виде Na_2SO_4).

Аналитические методы. АТФ-гидролазную активность мембранных фракций определяли по высвобождению P_i из добавленного АТФ. Гидролиз АТФ фракциями ПМ осуществлялся в среде следующего состава: 0,4 М сахараза, 20 мМ Mes/BTP-буфер (pH 5,5–9,0), 1 мМ MgSO_4 , 1 мМ EGTA, 50 мкМ СССР, 10–15 мкг мембранного белка. Реакцию инициировали внесением 0,5 мМ Na_2ATP и останавливали через 20 мин. Остальные добавки указаны в подписи к рисунку. Высвобожденный P_i определяли по методу Carter и Karl [24].

Белок в получаемых препаратах определяли методом Simpson и Sonne [25] для определения микроколичеств белка в мембранных фракциях. Метод основан на дезинтеграции мембран в щелочной среде и определении интенсивности окрашивания комплекса белок-Кумасси G-250.

В работе использовали свежеприготовленные спиртовые растворы DCCD. Конечная концентрация вносимого с DCCD этанола в реакционных смесях при измерениях активности АТФазы не превышала 0,2%. Контрольные варианты содержали этанол в таких же концентрациях.

На рисунках и графиках представлены данные репрезентативных экспериментов из (по крайней мере) трех независимых повторностей.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

В плазматической мембране микроводоросли *D. maritima* функционирует электрогенная Na^+ -транспортирующая АТФаза, как было показано ранее в экспериментах на выделенных из клеток водоросли везикулах ПМ [5]. Работу электрогенной Na^+ -АТФазы *D. maritima* иллюстрирует рис. 1, а. Внесение АТФ в суспензию везикул ПМ индуцирует генерацию электрического потенциала ($\Delta\psi$) на везикулярных мембранах, обусловленную работой H^+ -АТФазы *D. maritima* [5]. Добавка ионов Na^+ приводит к существенной стимуляции генерации $\Delta\psi$ на везикулярных мембранах, которая, очевидно, обусловлена переносом ионов Na^+ в везикулярный люмен, осуществляемым Na^+ -АТФазой. Генерация $\Delta\psi$ на везикулах ПМ может быть индуцирована также Li^+ , но не K^+ (не представлено). Подобная ионная специфичность характерна для многих мембранных Na^+ -транспортирующих механизмов, которые, наряду с ионами Na^+ , способны переносить и Li^+ [26, 27].

В отсутствие ионов Na^+ внесение DCCD в реакционную смесь в ходе АТФ-зависимой генерации $\Delta\psi$ на везикулярных мембранах приводило к распаду сформированного потенциала (рис. 1, б, трек 1). Однако при добавлении DCCD к суспензии везикул ПМ в ходе АТФ- и Na^+ -зависимой генерации $\Delta\psi$, скорость генерации $\Delta\psi$ не только не уменьшалась (чего следовало бы ожидать при ингибировании Na^+ -зависимой АТФазы), а даже возрастала (рис. 1, б, трек 2).

Известно, что переносимый ион защищает транспортную систему от ингибирования DCCD [16, 17, 28]. Для того, чтобы предотвратить возможное протекторное действие ионов Na^+ на Na^+ -АТФазу, везикулы ПМ предварительно инкубировали с DCCD в течение 15 мин в отсутствие Na^+ , после чего генерацию $\Delta\psi$ на везикулярной мембране индуцировали последовательным внесением АТФ и Na^+ . В этом случае, в зависимости от концентрации присутствующего в реакционной смеси DCCD, начальная скорость АТФ- и Na^+ -индуцируемой генерации $\Delta\psi$ также возрастала (рис. 2, а, б), но величина $\Delta\psi$, создаваемого Na^+ -АТФазой на мембране везикул, уменьшалась (рис. 2, а, в).

Возрастание начальной скорости генерации $\Delta\psi$ говорит об отсутствии ингибирующего действия DCCD на Na^+ -АТФазу. Последнее подтверждается результатами экспериментов по исследованию АТФ-гидролазной активности этого фермента.

Фракция ПМ *D. maritima* катализирует гидролиз АТФ в широком диапазоне pH; АТФ-гидролазную активность Na^+ -АТФазы отражает

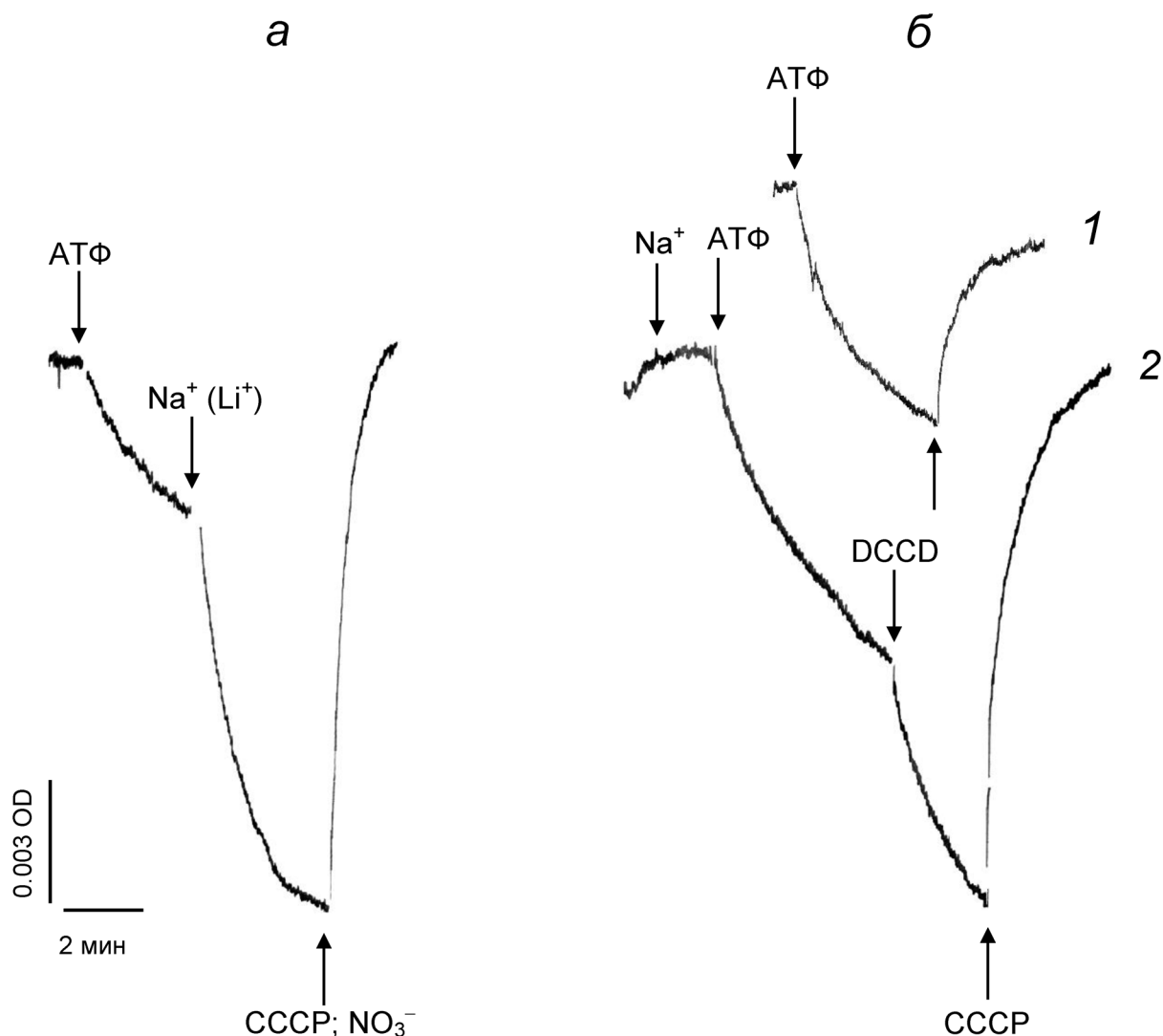


Рис. 1. АТФ- и Na^+ -зависимая генерация электрического потенциала на везикулах плазматической мембраны *D. maritima*. Эффекты DCCD. О генерации электрического потенциала ($\Delta\psi$) на везикулярных мембранах («+» в везикулярном люмене) свидетельствует уменьшение дифференциальной абсорбции потенциал-чувствительного зонда оксонол VI. Генерацию $\Delta\psi$ инициировали добавлением АТФ (в форме Трис-соли) до конечной концентрации 1 мМ. Моменты внесения добавок отмечены стрелками. *а* – Исходно: стандартная реакционная среда без Na^+ . Добавка Na^+ (в виде 10 мМ Na_2SO_4) ускоряет генерацию $\Delta\psi$ (аналогичный эффект наблюдается при внесении Li^+). Протонофор CCCP (50 мкМ) или проникающий анион NO_3^- (50 мМ, в форме соли ВТР NO_3 , pH 7,5) возвращают дифференциальную абсорбцию зонда к исходному уровню, что говорит о распаде сформированного $\Delta\psi$ (соответственно вследствие выхода H^+ из везикул или вследствие компенсации избыточного положительного заряда внутри везикул анионом); *б* – эффекты DCCD (100 мкМ), добавленного в реакционную смесь в ходе генерации $\Delta\psi$ на везикулярных мембранах. Трек 1: стандартная реакционная среда без Na^+ . Трек 2: стандартная реакционная среда содержала Na^+ (в виде 1 мМ Na_2SO_4)

Na^+ -стимулируемый прирост гидролиза АТФ, максимум которого наблюдается при pH 7,5–8,0 (рис. 3, *а*, кривая 2). Преинкубация везикул ПМ с DCCD до добавления АТФ и Na^+ не приводит к существенным изменениям величины Na^+ -стимулируемого прироста гидролиза АТФ (рис. 3, *а*, сравнить попарно кривые 1 и 2, кривые 3 и 4; рис. 3, *б*). Последнее, очевидно, свидетельствует об отсутствии ингибирования Na^+ -АТФазы этим агентом.

Уменьшение стационарной величины $\Delta\psi$, создаваемого Na^+ -АТФазой на мембране везикул, преинкубированных с DCCD, может объясняться увеличением ионной проводимости мембраны вследствие взаимодействия DCCD с каким-то другим (не Na^+ -АТФазой) ион-транспортующим белком в ПМ *D. maritima*. Возможными претендентами на эту роль являются H^+ -АТФаза и/или Na^+/H^+ антипортёр, которые также функционируют в этой мембране [5, 29].

Как H^+ -АТФаза, так и Na^+/H^+ антипортер могут взаимодействовать с DCCD [30–32].

Предположение о том, что преинкубация везикул ПМ с DCCD приводит к увеличению ионной проводимости мембраны, было проверено в экспериментах, где электрический потенциал на везикулярной мембране создавали АТФ-независимым образом в виде Na^+ - или K^+ -диффузионного потенциала, внося в суспензию везикул катион и соответствующий ионофор — ЕТН157 для Na^+ и валиномицин для K^+ (рис. 4).

DCCD, добавленный к везикулам, на мембране которых предварительно был создан Na^+ -диффузионный потенциал, не оказывал видимого влияния на последний (рис. 4, а). Однако если везикулы были преинкубированы с DCCD до добавления Na^+ , Na^+ -диффузионный потенциал, который формировался на везикулярной

мембране при внесении Na^+ , быстро и самопроизвольно распадался (рис. 4, б). Если на мембране везикул, преинкубированных с DCCD, создавали K^+ -диффузионный потенциал, последний достаточно долго сохранялся и распадался только при внесении протонофора СССР (рис. 4, в). Вместе с тем, K^+ -диффузионный потенциал, созданный на везикулах ПМ, преинкубированных с DCCD, распадался при добавлении ионов Na^+ (рис. 4, г). Эти результаты приводят к выводу, что диссипация электрического потенциала на везикулярных мембранах, преинкубированных с DCCD, зависит от наличия Na^+ в реакционной смеси.

Отметим, что в описанных экспериментах электрический потенциал на везикулярных мембранах распадался вследствие выхода из везикулярного люмена катионов, отличных от Na^+

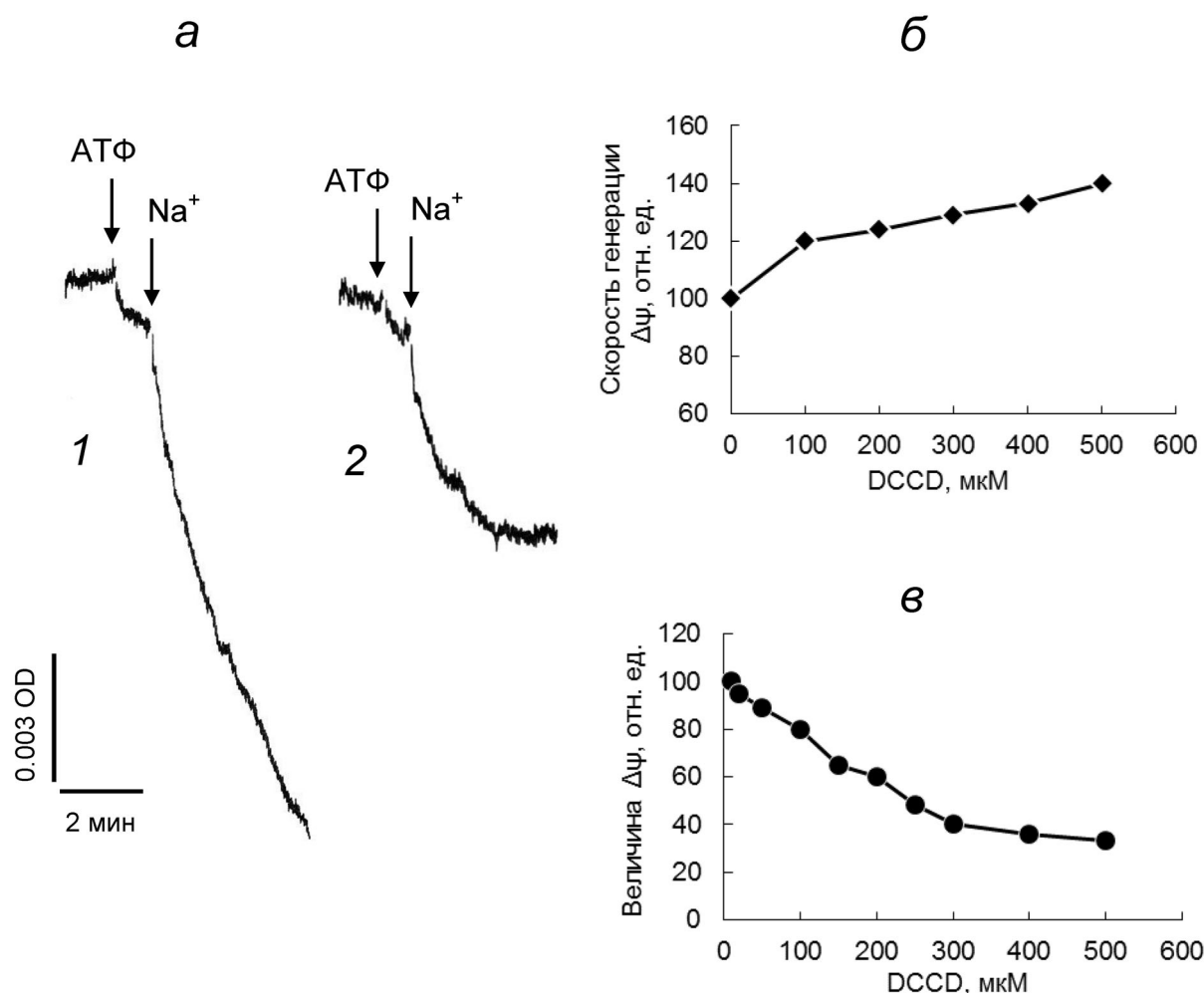


Рис. 2. Влияние DCCD на создаваемый Na^+ -АТФазой на везикулах ПМ *D. maritima* электрический потенциал. Везикулы инкубировали (15 мин, 22 °C) в стандартной реакционной смеси, содержащей DCCD, после чего инициировали генерацию $\Delta\psi$ последовательным добавлением АТФ и Na^+ (10 мМ Na_2SO_4). а — Кинетика генерации $\Delta\psi$ в отсутствие DCCD (трек 1) и в присутствии 300 мкМ DCCD (трек 2). Зависимость начальной скорости генерации $\Delta\psi$ (б) и стационарной величины создаваемого $\Delta\psi$ (в) от концентрации DCCD, присутствующего в реакционной смеси

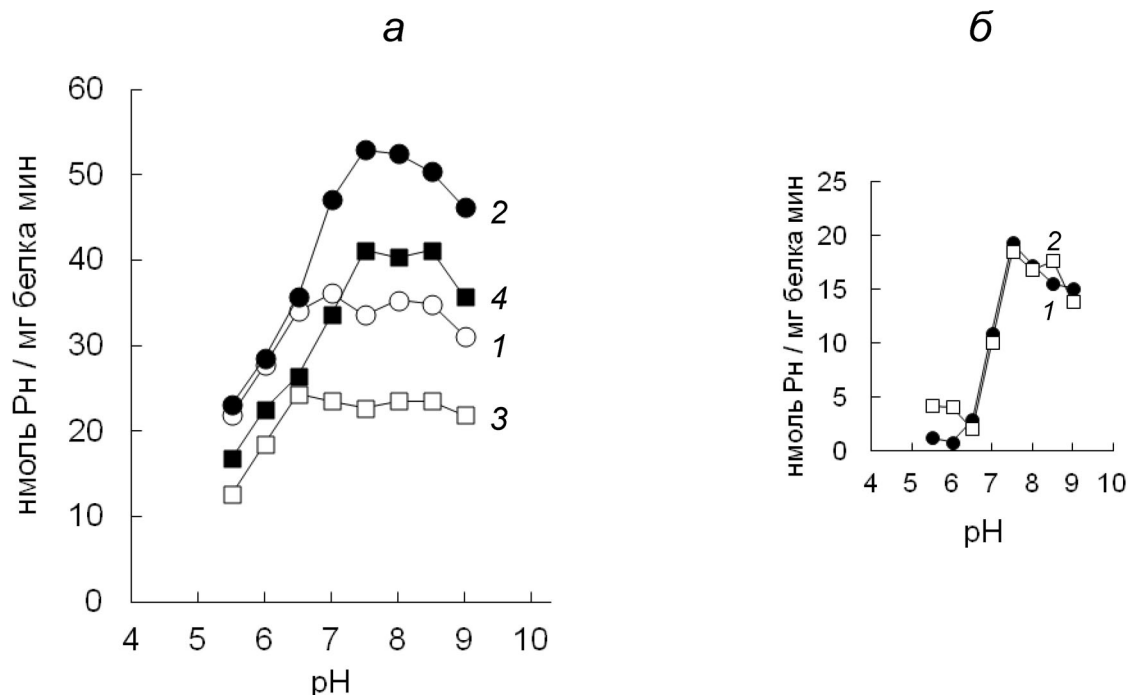


Рис. 3. pH-Зависимость гидролиза АТФ фракциями плазматической мембраны (ПМ) *D. maritima* и эффекты DCCD. *а* – Стандартная реакционная среда содержала дополнительно: 1 (светлые кружки) – 25 мМ KNO₃; 2 (черные кружки) – 25 мМ NaNO₃; 3 (светлые квадраты) – 25 мМ KNO₃, 100 мкМ DCCD; 4 (черные квадраты) – 25 мМ NaNO₃, 100 мкМ DCCD. В вариантах с DCCD везикулы были преинкубированы в стандартной реакционной среде, содержащей дополнительно DCCD, в течение 15 мин до добавления Na⁺ и АТФ; *б* – Na⁺-индуцируемое увеличение гидролиза АТФ фракциями ПМ в отсутствие (кривая 1, черные кружки) и в присутствии DCCD (кривая 2, светлые квадраты)

(или соответственно K⁺), поскольку в присутствии ЕТН157 (соответственно валиномицина), обеспечивающего высокую проводимость везикулярной мембраны для Na⁺ (или K⁺), последний находится в состоянии электрохимического равновесия по обе стороны везикулярной мембраны («+» внутри везикул) и, следовательно, отсутствуют движущие силы для выхода Na⁺ (или K⁺) из везикул. Наиболее вероятно, что в данном случае избыточный положительный заряд из везикулярного люмена уносит протон, движущей силой для выхода которого служит Na⁺-диффузионный (или K⁺-диффузионный) потенциал. Путь утечки H⁺, очевидно, формируется вследствие взаимодействия DCCD с некоторым белком/белками везикулярной мембраны и является потенциал-зависимым, поскольку Na⁺-диффузионный потенциал мог быть создан на мембране везикул, преинкубированных с DCCD, и лишь при достижении определенной величины потенциала начинался его распад (рис. 4, б).

Таким образом, полученные данные свидетельствуют о том, что: 1) Na⁺-АТФаза *D. maritima* нечувствительна к DCCD; 2) в отсутствие ионов Na⁺ DCCD взаимодействует с неким бел-

ком/белками везикулярной мембраны; 3) Na⁺ защищает этот белок от взаимодействия с DCCD; 4) взаимодействие DCCD с этим белком приводит к увеличению H⁺-проводимости везикулярной мембраны, причем последнее требует наличия ионов Na⁺; 5) для осуществления DCCD-индуцируемой Na⁺-зависимой H⁺-проводимости мембраны необходимо также наличие электрического потенциала на мембране.

Наиболее очевидным является предположение, что наблюдаемые эффекты обусловлены взаимодействием DCCD с Na⁺/H⁺ антипортером в ПМ *D. maritima*. Последний способен связывать и переносить через мембрану как Na⁺, так и H⁺. Взаимодействие с DCCD приводит к тому, что антипортер сохраняет способность переносить H⁺, но не Na⁺. Тем не менее, наличие иона Na⁺, вероятно, связанного в определенном сайте белка, необходимо для осуществления переноса H⁺. Другими словами, при взаимодействии с DCCD электронейтральный Na⁺/H⁺ антипортер из катион-обменного механизма превращается в потенциал-чувствительный H⁺-унипортер.

Остается открытым вопрос, почему на везикулах ПМ *D. maritima*, преинкубированных с

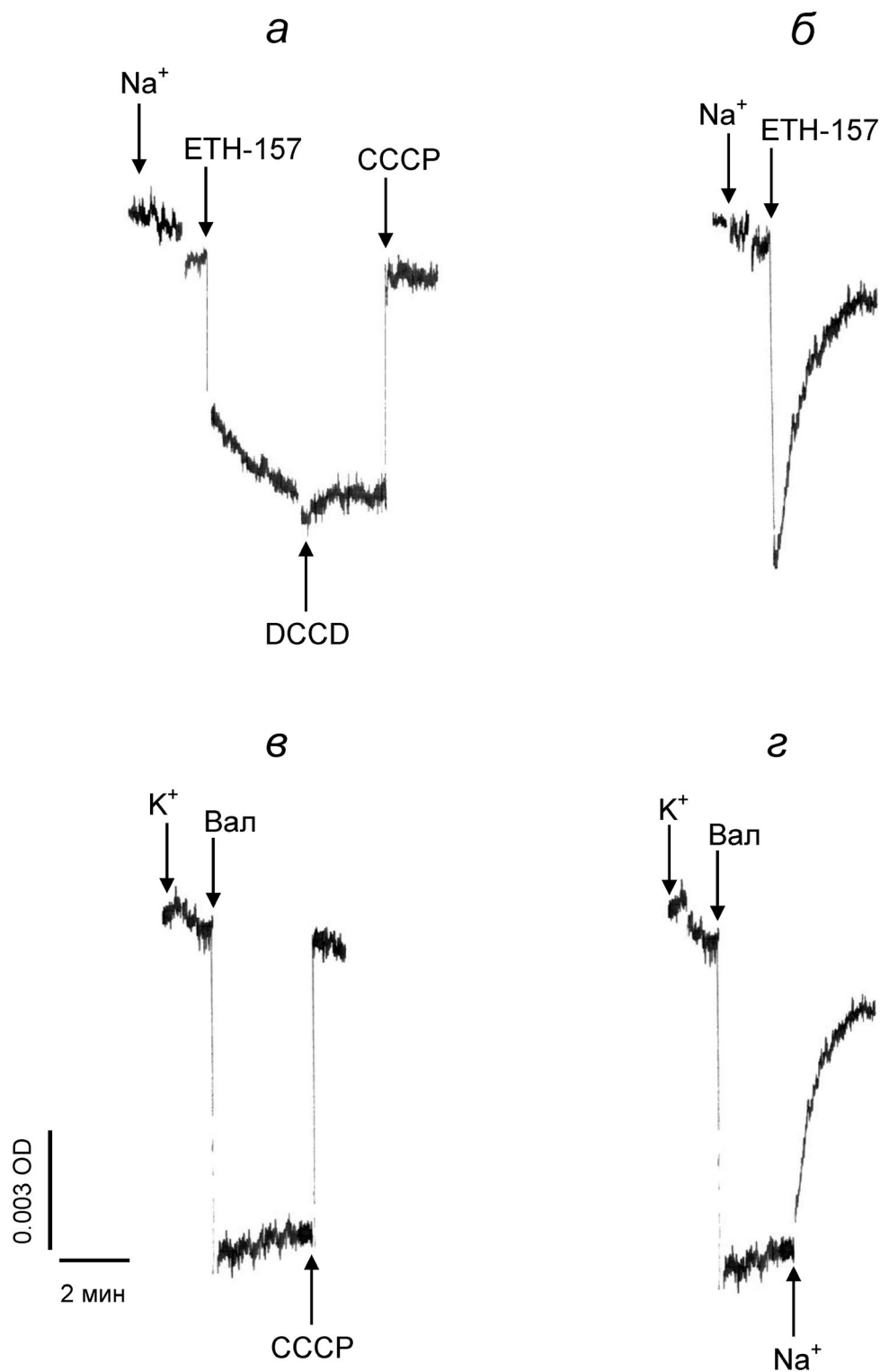


Рис. 4. Влияние DCCD на Na⁺- или K⁺-диффузионный потенциал, созданный на везикулах плазматической мембраны (ПМ) *D. maritima*. Генерацию $\Delta\psi$ на везикулярных мембранах («+» в везикулярном люмене) инициировали внесением 10 мМ Na₂SO₄ + 3 мкМ ETH-157 (а, б) либо 10 мМ K₂SO₄ + 3 мкМ валиномицин (в, г). Концентрация DCCD в реакционной смеси составляла 100 мкМ. а) DCCD добавлен после формирования Na⁺-диффузионного потенциала. (б–г): везикулы ПМ были преинкубированы в течение 15 мин в стандартной реакционной смеси, содержащей 100 мкМ DCCD, до внесения остальных добавок (10 мМ Na₂SO₄ + 3 мкМ ETH-157 либо 10 мМ K₂SO₄ + 3 мкМ валиномицин). Внесение протонофора CCCP (50 мкМ) (а, в) возвращает дифференциальную абсорбцию оксонола VI к исходному уровню, что говорит о распаде сформированного $\Delta\psi$. г) Внесение 10 мМ Na₂SO₄ приводит к распаду сформированного $\Delta\psi$.

DCCD, начальная скорость генерации потенциала при добавлении АТФ и Na^+ увеличивается (рис. 2, б), при том, что DCCD не оказывает стимулирующее действие на АТФ-гидролазную активность Na^+ -АТФазы (рис. 3).

Одним из возможных объяснений этого явления может быть следующее. По-видимому, Na^+/H^+ антипортер не единственный белок в ПМ *D. maritima*, с которым связывается DCCD. DCCD может связаться с H^+ -помпой, функционирующей в этой мембране. Известно, что DCCD инактивирует H^+ -АТФазу, блокируя транслокацию протонов этим ферментом [15, 19, 30]. Таким образом, взаимодействие DCCD с H^+ -АТФазой (а также, вероятно, и с определенными ионными каналами) приводит к уменьшению общей протонной проводимости мембраны, что, в свою очередь, в условиях эксперимента приводит к снижению ионных (протонных) утечек из везикулярного люмена и росту величины электрического потенциала, генерируемого на везикулярной мембране при включении Na^+ -АТФазы. По мере работы Na^+ -АТФазы, при достижении определенных значений $\Delta\psi$ на везикулярной мембране, протонная проводимость мембраны резко возрастает вследствие увеличения протонной проводимости Na^+/H^+ антипортера, который, предположительно, в результате взаимодействия с DCCD превратился из электронейтрального катион-обменного механизма в потенциал-чувствительный H^+ -унипортер.

В плазматической мембране галотолерантной микроводоросли *D. maritima* (отдел Chlo-

phyta, класс Chlorophyceae) функционирует первичный Na^+ -насос, электрогенная Na^+ -транспортирующая АТФаза Р-типа, которая определяет Na^+ -гомеостаз у этого организма [5]. Найдено, что, в отличие от множества других ион-транспортирующих АТФаз, этот фермент является нечувствительным к действию DCCD. DCCD не подавляет ни гидролиз АТФ, катализируемый данным ферментом, ни его транспортную активность. По своей нечувствительности к действию DCCD Na^+ -АТФаза *D. maritima* сходна с Na^+ -АТФазой другой галотолерантной микроводоросли, *Tetraselmis viridis* (отд. Chlorophyta, класс Prasinophyceae) [4]. Для Na^+ -АТФазы *T. viridis* также ранее было продемонстрировано, что DCCD не оказывает ингибирующее действие на этот фермент [8]. Нечувствительность Na^+ -транспортирующих АТФаз, найденных у двух видов водорослей, к DCCD может отражать структурное сходство этих ферментов, обусловленное их эволюционной близостью.

Финансирование. Работа выполнена при финансовой поддержке РФФИ (грант 20-04-00903).

Конфликт интересов. У авторов отсутствует конфликт интересов в финансовой или какой-либо иной сфере.

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

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Boldyrev, A. A. (2001) Na/K-ATPase as an oligomeric ensemble, *Biochemistry (Moscow)*, **66**, 821-831, doi: 10.1023/a:1011964832767.
2. Scheiner-Bobis, G. (2002) The sodium pump, *Eur. J. Biochem.*, **269**, 2424-2433, doi: 10.1046/j.1432-1033.2002.02909.x.
3. Gaxiola, R. A., Palmgren, M. G., and Schumacher, K. (2007) Plant proton pumps, *FEBS Lett.*, **581**, 2204-2214, doi: 10.1016/j.febslet.2007.03.050.
4. Balnokin, Y. V., and Popova, L. G. (1994) The ATP-driven Na^+ -pump in the plasma membrane of the marine unicellular alga *Platymonas viridis*, *FEBS Lett.*, **343**, 61-64, doi: 10.1016/0014-5793(94)80607-1.
5. Popova, L. G., Shumkova, G. A., Andreev, I. M., and Balnokin, Y. V. (2005) Functional identification of electrogenic Na^+ -translocating ATPase in the plasma membrane of the halotolerant microalga *Dunaliella maritima*, *FEBS Lett.*, **579**, 5002-5006, doi: 10.1016/j.febslet.2005.07.087.
6. Axelsen, K., and Palmgren, M. G. (1998) Evolution and substrate specificities in the P-type ATPase superfamily, *J. Mol. Evol.*, **46**, 84-101, doi: 10.1007/pl00006286.
7. Palmgren, M. G., and Nissen, P. (2011) P-type ATPases, **40**, 243-266, doi: 10.1146/annurev.biophys.093008.131331.
8. Pagis, L. Y., Popova, L. G., Andreev, I. M., and Balnokin, Y. V. (2003) Comparative characterization of the two primary pumps, H^+ -ATPase and Na^+ -ATPase, in the plasma membrane of the marine alga *Tetraselmis viridis*, *Physiol. Plant.*, **118**, 514-522, doi: 10.1034/j.1399-3054.2003.00113.x.
9. Pedersen, Ch. N. S., Axelsen, K. B., Harper, J. F., and Palmgren, M. G. (2012) Evolution of plant P-type ATPases, *Front. Plant Sci.*, **3**, doi: 10.3389/fpls.2012.00031.
10. Oren, A. (2005) A hundred years of *Dunaliella* research: 1905-2005, *Saline Systems*, **1**, 1-14, doi: 10.1186/1746-1448-1-2.
11. Gouaux, E., and MacKinnon, R. (2005) Principles of selective ion transport in channels and pumps, *Science*, **310**, 1461-1465, doi: 10.1126/science.1113666.
12. Meier, T., Krah, A., Bond, P. J., Pogoyelov, D., Diederichs, K., and Faraldo-Gomez, J. D. (2009) Complete ion-coordination structure in the rotor ring of Na^+ -dependent F-ATP synthases, *J. Mol. Biol.*, **391**, 498-507, doi: 10.1016/j.jmb.2009.05.082.
13. Imagawa, T., Yamamoto, T., Kaya, Sh., Sakaguchi, K., and Taniguchi, K. (2005) Thr-774 (transmembrane segment M5), Val-920 (M8), and Glu-923 (M9) are involved in Na^+ -transport, and Gln-923 (M8) is essential for Na^+ , K^+ -

- ATPase activity, *J. Biol. Chem.*, **280**, 18736-18744, doi: 10.1074/jbc.M500137200.
14. Kaim, G., and Dimroth, P. (1994) Construction, expression and characterization of a plasmid-encoded Na⁺-specific ATPase hybrid consisting of *Propionigenium modestum* F₀-ATPase and *Escherichia coli* F₁-ATPase, *Eur. J. Biochem.*, **222**, 615-623, doi: 10.1111/j.1432-1033.1994.tb18904.x.
 15. Toei, M., and Noji, H. (2013) Single-molecule analysis of F₀F₁-ATP synthase inhibited by N,N'-dicyclohexylcarbodiimide, *J. Biol. Chem.*, **288**, 25717-25726, doi: 10.1074/jbc.M113.482455.
 16. Ferguson, S., Keis, S., and Cook, G. M. (2006) Biochemical and molecular characterization of a Na⁺-translocating F₁F₀-ATPase from the thermoalkaliphilic bacterium *Clostridium paradoxum*, *J. Bacteriol.*, **188**, 5045-5054, doi: 10.1128/JB.00128-06.
 17. Soontharapirakkul, K., and Incharoensakdi, A. (2010) Na⁺-stimulated ATPase of alkaliphilic halotolerant cyanobacterium *Aphanothece halophytica* translocates Na⁺ into proteoliposomes via Na⁺ uniport mechanism, *BMC Biochemistry*, **11**, doi: 10.1186/1471-2091-11-30.
 18. Murata, T., Kawano, M., Igarashi, K., Yamato, I., and Kakinuma, Y. (2001) Catalytic properties of Na⁺-translocating V-ATPase in *Enterococcus hirae*, *Biochim. Biophys. Acta*, **1505**, 75-81, doi: 10.1016/S0005-2728(00)00278-4.
 19. Yokoyama, K., Nakano, M., Imamura, H., Yoshida, M., and Tamakoshi, M. (2003) Rotation of the proteolipid ring in the V-ATPase, *J. Biol. Chem.*, **278**, 24255-24258, doi: 10.1074/jbc.M303104200.
 20. Corbalan-Garsia, S., Teruel, J. A., and Gomez-Fernandez, J. C. (1992) Characterization of Ruthenium Red-binding sites of the Ca²⁺-ATPase from sarcoplasmic reticulum and their interaction with Ca²⁺-binding sites, *Biochemistry*, **287**, 767-774, doi: 10.1042/bj2870767.
 21. Wiangnon, K., Raksajit, W., and Incharoensakdi, A. (2007) Presence of a Na⁺-stimulated P-type ATPase in the plasma membrane of the alkaliphilic halotolerant cyanobacterium *Aphanothece halophytica*, *FEMS Microbiol. Lett.*, **270**, 139-145, doi: 10.1111/j.1574-6968.2007.00667.x.
 22. Massyuk, N. P. (1973) *Morphology, taxonomy, ecology and geographic distribution of the genus Dunaliella* Teod. and prospects for its potential utilization, Naukova Dumka, Kiev, p. 244.
 23. Abdullaev, A. A., and Semenenko, V. E. (1974) Intensive cultivation and certain physiological characteristics of *Dunaliella salina* Teod., *Soviet Plant Physiol.*, **21**, 947-955.
 24. Carter, S. G., and Karl, D. W. (1982) Inorganic phosphate assay with malachite green: an improvement and evaluation, *J. Biochem. Biophys. Methods*, **7**, 7-13, doi: 10.1016/0165-022x(82)90031-8.
 25. Simpson, I. A., and Sonne, O. (1982) A simple, rapid and sensitive method for measuring protein concentration in subcellular membrane fractions prepared by sucrose density ultracentrifugation, *Anal. Biochem.*, **119**, 424-427, doi: 10.1016/0003-2697(82)90608-x.
 26. Krulwich, T. A. (1983) Na⁺/H⁺ antiporters, *Biochim. Biophys. Acta*, **726**, 245-264, doi: 10.1016/0304-4173(83)90011-3.
 27. Pagis, L. Ya., Popova, L. G., Andreev, I. M., and Balnokin, Yu. V. (2001) Ion specificity of Na⁺-transporting systems in the plasma membrane of the halotolerant alga *Tetraselmis (Platymonas) viridis*, *Russ. J. Plant Physiol.*, **48**, 281-286, doi: 10.1023/A:1016645829002.
 28. Kluge, C., and Dimroth, P. (1993) Specific protection by Na⁺ or Li⁺ of the F₁F₀-ATPase of *Propionigenium modestum* from the reaction with dicyclohexylcarbodiimide, *J. Biol. Chem.*, **268**, 14557-14560.
 29. Popova, L. G., Shumkova, G. A., Andreev, I. M., and Balnokin, Yu. V. (2000) Na⁺-dependent electrogenic ATPase from the plasma membrane of the halotolerant microalga *Dunaliella maritima*, *Doklady Biochemistry*, **375**, 235-238, doi: 10.1023/A:1026675923730.
 30. Sussman, M. R., and Slayman, C. W. (1983) Modification of the *Neurospora crassa* plasma membrane H⁺-ATPase with N,N'-dicyclohexylcarbodiimide, *J. Biol. Chem.*, **258**, 1839-1843.
 31. Kinsella, J. L., Wehrle, J., Wilkins, N., and Sacktor, B. (1987) Inhibition of Na⁺-H⁺-exchange by N,N'-dicyclohexylcarbodiimide in isolated rat renal brush border membrane vesicles, *J. Biol. Chem.*, **262**, 7092-7097.
 32. Murakami, N., and Konishi, T. (1989) Mechanism of function of dicyclohexylcarbodiimide-sensitive Na⁺/H⁺-antiporter in *Halobacterium halobium*: pH effect, *Arch. Biochem. Biophys.*, **271**, 515-523, doi: 10.1016/0003-9861(89)90303-2.

ELECTROGENESIS IN PLASMA MEMBRANE FRACTIONS ISOLATED FROM HALOTOLERANT MICROALGA *Dunaliella maritima* AND N,N'-DICYCLOHEXYLCARBODIIMIDE EFFECTS*

L. G. Popova**, D. A. Matalin, and Y. V. Balnokin

Timiryazev Institute of Plant Physiology, Russian Academy of Sciences, 127276 Moscow, Russia; E-mail: lora_gp@mail.ru

Received June 22, 2020

Revised June 22, 2020

Accepted June 26, 2020

The effects of N,N'-dicyclohexylcarbodiimide (DCCD), non-specific inhibitor of various transport systems functioning in biological membranes, on Na⁺-transporting P-type ATPase of the green halotolerant microalga *Dunaliella maritima* were studied in the experiments with vesicular plasma membranes isolated from the alga cells. The effects of DCCD on electrogenic/ion transport function of the enzyme and its ATP hydrolase activity were investigated. Electrogenic/ion transport function of the enzyme was recorded as a Na⁺-dependent generation of electric potential on the vesicle membranes with the help of the potential-sensitive probe oxonol VI. It was found that unlike many other ion-transporting ATPases, the Na⁺-ATPase of *D. maritima* is insensitive to DCCD. This agent did not inhibit either ATP hydrolysis catalyzed by this enzyme or its transport activity. At the same time DCCD affected the ability of the vesicle membranes to maintain electric potential generated by the *D. maritima* Na⁺-ATPase. The observed effects can be explained based on the assumption that DCCD interacts with the Na⁺/H⁺ antiporter in the plasma membrane of *D. maritima*.

Keywords: *Dunaliella maritima*, Na⁺-ATPase, N,N'-dicyclohexylcarbodiimide, microalgae, membrane potential, plasma membrane

УДК 577.24

НЕПРЕРЫВНАЯ УМЕРЕННАЯ ФИЗИЧЕСКАЯ НАГРУЗКА УСИЛИВАЕТ ЭКСПРЕССИЮ FGF21 И KLB У МЫШЕЙ, СТРАДАЮЩИХ ОЖИРЕНИЕМ

© 2020 И. Сюнь, Я. Чэнь, Я. Лю, Б. Чжан*

*Center of Sports and Health Research, Division of Sport Science and Physical Education,
Tsinghua University, Beijing, China; E-mail: bzhang@mail.tsinghua.edu.cn*

Поступила в редакцию 12.03.2020

После доработки 27.06.2020

Принята к публикации 27.06.2020

Фактор роста фибробластов 21 (FGF21) и белок β -Klotho (KLB) играют важную роль в предотвращении и лечении повышенного веса и ожирения. Однако не совсем ясны условия, при которых можно индуцировать экспрессию FGF21 и KLB в различных тканях. Поэтому было проведено изучение экспрессии FGF21 и KLB при двух формах физической нагрузки: непрерывная физическая нагрузка умеренной интенсивности (MICT) и физическая нагрузка высокой интенсивности с перерывами в упражнениях (HIIT) (это два популярных способа снизить вес тела). Мыши были случайным образом разбиты на три группы ($n = 8$ в каждой группе): группы с MICT, HIIT и сидячим образом жизни (SED). Чтобы вызвать у них ожирение, все мыши на протяжении 12 недель получали обогащенный жирами пищевой рацион (HFD). Физические упражнения выполнялись на моторизованной беговой дорожке в течение восьми недель, и в каждой группе животных по-прежнему соблюдалась особая диета. Показано, что как MICT, так и HIIT оказывают положительный эффект в плане снижения веса тела, индуцированного HFD, и снижения уровня белка FGF21 в сыворотке крови. HIIT может улучшить показатели веса тела и снизить уровень триглицеридов в сыворотке крови (TG), в то время как MICT был более эффективен в обеспечении экспрессии FGF21 и KLB в печени, бурой жировой ткани (BAT) и мышцах на уровне мРНК и белка.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: MICT, HIIT, FGF21, KLB, экспрессия.

DOI: 10.31857/S0320972520080096

ВВЕДЕНИЕ

Избыточный вес и ожирение являются основными причинами возникновения многих хронических заболеваний, таких как диабет, сердечно-сосудистые заболевания и рак. Согласно данным Всемирной организации здравоохранения (ВОЗ), 39% взрослых людей имеют избыточный вес и 13% страдают от ожирения. Кроме того, во всем мире более 18% детей и подростков имеют избыточный вес, и они подвержены ожирению [1]. В 2007 г. Американская ака-

демия спортивной медицины провозгласила концепцию «Физические упражнения — это лекарство», и рациональные физические упражнения как экономичный и эффективный способ управления весом и здоровьем стали фундаментальной мерой для предотвращения и лечения избыточного веса и ожирения [2]. Поэтому очень важно понимание физиологических механизмов и метаболизма при снижении веса тела, вызванном физическими нагрузками, чтобы разработать новые и более эффективные формы физических упражнений.

Фактор роста фибробластов 21 (FGF21) является ключевым фактором путей обмена липидов, который привлекает повышенное внимание на протяжении многих лет. Как член семейства белков FGF, FGF21 был впервые описан в 2000 г. [3], а в 2005 г. были установлены его функции [4]. Ранее было показано, что FGF21 обладает особой активностью в качестве гормона, регулирующего обмен глюкозы, жиров и энергии, в том числе окисление жирных кислот и глюконеогенез. Он вызывает понижение уровня жирных кислот и триглицеридов в сыворотке крови и печени, повышает чувствительность

Принятые сокращения: FGF21 (fibroblast growth factor 21) — фактор роста фибробластов 21; KLB белок (β -Klotho); FGFR, FGF — рецептор фактора роста фибробластов; MICT (moderate-intensity continuous training) — непрерывная физическая нагрузка умеренной интенсивности; HIIT (high-intensity interval training) — физическая нагрузка высокой интенсивности с перерывами; SED (sedentary lifestyle) — сидячий образ жизни; HFD (high-fat diet) — пищевой рацион, обогащенный жирами; TG (triglyceride) — триглицерид; BAT (brown adipose tissue) — бурая жировая ткань; eWAT (epididymal white adipose tissue) — белая жировая ткань придатков.

* Адресат для корреспонденции.

клеток к действию инсулина, расход энергии и способствует потере веса [5–8]. Демонстрируя различные функции, FGF21 экспрессируется в печени [3], поджелудочной железе [9], мозгу [10], сердце [11], бурой жировой ткани (BAT) [12], белой жировой ткани (WAT) [13] и скелетных мышцах [14]. Кроме того, чтобы попасть в клетку, FGF21 должен связаться с рецепторами FGF (FGFR). В этом случае, β -Klotho (KLB), как корецептор, может способствовать эффективному взаимодействию FGF21 и FGFR [15]. В некоторых работах было показано, что KLB также экспрессируется в различных тканях [16], и определение ткани, которая может служить мишенью для действия FGF21, вероятно, обуславливается тканевой экспрессией KLB [17]. Однако условия, которые влияют на экспрессию FGF21 и KLB в различных тканях, остаются до сих пор невыясненными.

В настоящей работе было проведено изучение экспрессии FGF21 и KLB при двух формах физических упражнений: непрерывные физические упражнения средней интенсивности (МИСТ) и физические упражнения высокой интенсивности с перерывами (НИПТ). Обе формы физических упражнений популярны среди тех, кто хочет похудеть. Это первая работа, посвященная влиянию форм физических упражнений на экспрессию FGF21 и KLB в различных тканях. После восьми недель физической нагрузки у мышей, страдающих от ожирения, была определена экспрессия FGF21 и KLB в различных тканях. Показано, что в случае страдающих от ожирения мышей, восемь недель в режиме МИСТ приводили к повышению экспрессии FGF21 и KLB в печени, BAT и мышцах в большей степени, чем восемь недель НИПТ. Это исследование продемонстрировало ранее непризнанный аспект экспрессии FGF21 и KLB у мышей, страдающих от ожирения, в результате физических упражнений.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Лабораторные животные и пищевой рацион. Мыши-самцы дикого типа породы C57BL/6 ($n = 24$) в возрасте 3-х недель были получены из Центра изучения лабораторных животных Университета Циньхуа (Китай). Мышей содержали в вентилируемых клетках при контролируемой температуре ($22 \pm 2^\circ\text{C}$) и влажности ($50 \pm 5\%$) с 12-часовым режимом дня и ночи и свободным доступом к воде и пище. После завершения процесса адаптации в течение одной недели, мышей случайным образом делили на три группы ($n = 8$ в каждой группе): группы с МИСТ, НИПТ и

сидячим образом жизни (SED). Все мыши получали рацион, обогащенный жирами (HFD, 60% ккал в виде жира), и в результате в течение последующих 12 нед. у них развивалось ожирение. По окончании приема HFD в течение 12 нед. начинали использовать режимы физической нагрузки и, в то же время каждая группа животных продолжала получать все тот же обогащенный жирами пищевой рацион.

Протокол физических упражнений. Сначала мыши привыкали к беговой дорожке в течение 3 дней (каждый день по 15 мин). Затем их подвергали испытаниям на моторизованной беговой дорожке для мышей в течение 8 нед. (5 дней в неделю). Использовали две формы физических упражнений (МИСТ и НИПТ). Обе группы начинали с разминки при режиме 5 м/мин в течение 10 мин. В случае МИСТ тренировку на беговой дорожке проводили при 14 м/мин (50% интенсивности $\text{VO}_{2\text{макс}}$) в течение 45 мин. В случае НИПТ тренировка на беговой дорожке состояла из 10 забегов по 1 мин и упражнений высокой интенсивности (25 м/мин, 90% интенсивности $\text{VO}_{2\text{макс}}$), перемежающихся (2 мин) с упражнениями с умеренной интенсивностью (14 м/мин). Темпы движения во время прохождения НИПТ и МИСТ повышали постепенно от 25 до 27 м/мин и от 14 до 16 м/мин более 8 нед. соответственно. Определение максимальных значений поглощения O_2 проводили с помощью прибора TSE Systems Phenomaster (Университет Циньхуа) [18–20].

Забор крови и образцов тканей. После завершения процедуры физических упражнений мышей оставляли без пищи в течение 12 ч и затем подвергали анестезии. Удаляли печень, белую жировую ткань придатков (eWAT), BAT, четырехглавую мышцу бедра, поджелудочную железу. Образцы крови собирали, и сыворотку крови получали путем центрифугирования в течение 15 мин при 3000 об/мин и 4°C . Все образцы быстро замораживали в жидком азоте и хранили при -80°C для дальнейшего использования.

Определение параметров крови. Определение в сыворотке уровня триглицеридов (TG) производили на автоматическом анализаторе Kehua ZY KHB-1280 (Китай). Содержание FGF21 определяли с помощью набора mouse FGF21 ELISA kit (MM-44032M1, MEIMIAN).

Окрашивание гематоксилином и эозином (H и E). Кусочки eWAT вырезали, промывали охлажденным до температуры льда фосфатным солевым раствором (PBS) и фиксировали в 10%-ом формалине. После дегидрирования с помощью серии обработок спиртом и помещения в парафин полученные кусочки ткани окрашивали гематоксилином и эозином (H и E), чтобы их на-

блюдать на микроскопе Nikon Eclipse E100 (200×) и получить изображения с помощью Nikon DS-U3. Полученные изображения анализировали с помощью программы Image-Pro Plus 6.0 («Media Cybernetics, Inc.», США).

ПЦР в реальном времени. Препарат общей РНК получали в результате экстракции из замороженных тканей с помощью набора PureLink™ RNA Mini Kit («Thermo Fisher Scientific») и подвергали обратной транскрипции в кДНК с помощью набора Revert Aid First Strand cDNA Synthesis Kit («Thermo Fisher Scientific»). Количественную ПЦР проводили на приборе Step One Plus Real-Time PCR instrument («Applied Biosystems»). Праймеры представлены в таблице. Все образцы были проанализированы в трех экземплярах, и результаты были получены с использованием метода $\Delta\Delta C_t$.

Вестерн-блоттинг. Белки из замороженных тканей экстрагировали с помощью лизисного буфера RIPA (CW2334, «CWBio»). Концентрацию белка в белковых экстрактах определяли с помощью набора BCA Protein Assay Kit (CW0014S, «CWBio»). Все образцы белков анализировали с помощью электрофореза в полиакриламидном геле в присутствии додецилсульфата натрия (SDS-PAGE). Разделенные белки переносили на поливинилиденфлуоридные мембраны. Блоты инкубировали с разведенными соответствующими первыми антителами против FGF21 (ab171941, «Abcam», разведение 1 : 1000), KLB (ab233416, «Abcam», разведение 1 : 1000) или внутренним контролем, в качестве которого использовали β -актин («Proteintech», разведение 1 : 3000) после блокирования мембран 10%-ным обезжиренным молоком в течение 1 ч при 37 °C. Затем блоты инкубировали в течение 2 ч с конъюгированными с пероксидазой хрена козлиными антителами против кроличьих IgG («Proteintech»). Полосы белков выявляли с помощью системы визуализации Bio-Rad

ChemiDoc™ MP imaging system. Относительные количества измеряли с помощью программного пакета ImageJ.

Статистическая обработка данных. Все данные выражали в виде среднего значения $\pm$ стандартная ошибка среднего (S.E.M) и анализировали с помощью программы SPSS 25.0 для статистической обработки данных. Сравнение данных групп проводили с использованием программы ANOVA и последующего анализа наименьших различий значений. Значение $p < 0,05$ рассматривали как статистически достоверное.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Метод НПТ показал лучший эффект в достижении снижения веса. Чтобы изучить влияние физических упражнений на снижение содержания жира, мышей линии C57BL/6 подвергали физической нагрузке в режиме МІСТ и НІТ. В сравнении с сидячим образом жизни (SED) как МІСТ, так и НІТ вызывали снижение веса тела после восьми недель упражнений. Кроме того, НІТ способствовал большей потере веса по сравнению с МІСТ (рис. 1, а). Также в каждой группе животных были проанализированы некоторые параметры крови. Было обнаружено, что режим НІТ в значительной степени снижал уровни триглицеридов (TG) сыворотки крови в сравнении с мышами, ведущими сидячий образ жизни (SED) (рис. 1, в). Что касается уровня FGF21, то полученные данные позволяют предположить, что у мышей, подвергшихся физическим нагрузкам обоих типов (МІСТ и НІТ), уровни этого фактора роста снижены по сравнению с мышами, ведущими сидячий образ жизни. Однако не было обнаружено статистически значимых различий в уровне сывороточного FGF21 у подвергшихся физическим нагрузкам мышей из обеих групп (МІСТ и НІТ) (рис. 1, с). Кроме того, у мышей, употреблявших HFD, повышался средний размер адипоцитов, который в результате физических нагрузок снова уменьшался. НІТ оказывал более выраженный эффект на сокращение объема адипоцитов в сравнении с режимом МІСТ (рис. 1, d, рис. 1, e). Следовательно, долгосрочный режим НІТ оказался более эффективным способом, чем МІСТ, для снижения содержания жира.

МІСТ повышает экспрессию генов FGF21 и KLB в печени, бурой жировой ткани (BAT) и мышцах. FGF21 регулирует метаболизм липидов и обладает способностью предотвращать и лечить избыточный вес и ожирение [21]. KLB способен опосредовать биологическую функцию FGF21, выступая в качестве ко-рецептора [22]. Исходя

Последовательности праймеров для ПЦР

Ген	Последовательность 5'–3'
Актин	F: CGTTGACATCCGTAAAGACC R: CTAGGAGCCAGAGCAGTAATC
FGF21	F: ACCTGGAGATCAGGGAGGAT R: CACCCAGGATTTGAATGACC
KLB	F: AAACAAGACCATCCCAGTGTC R: AGAGGTCCAGTCCAGAGCAA

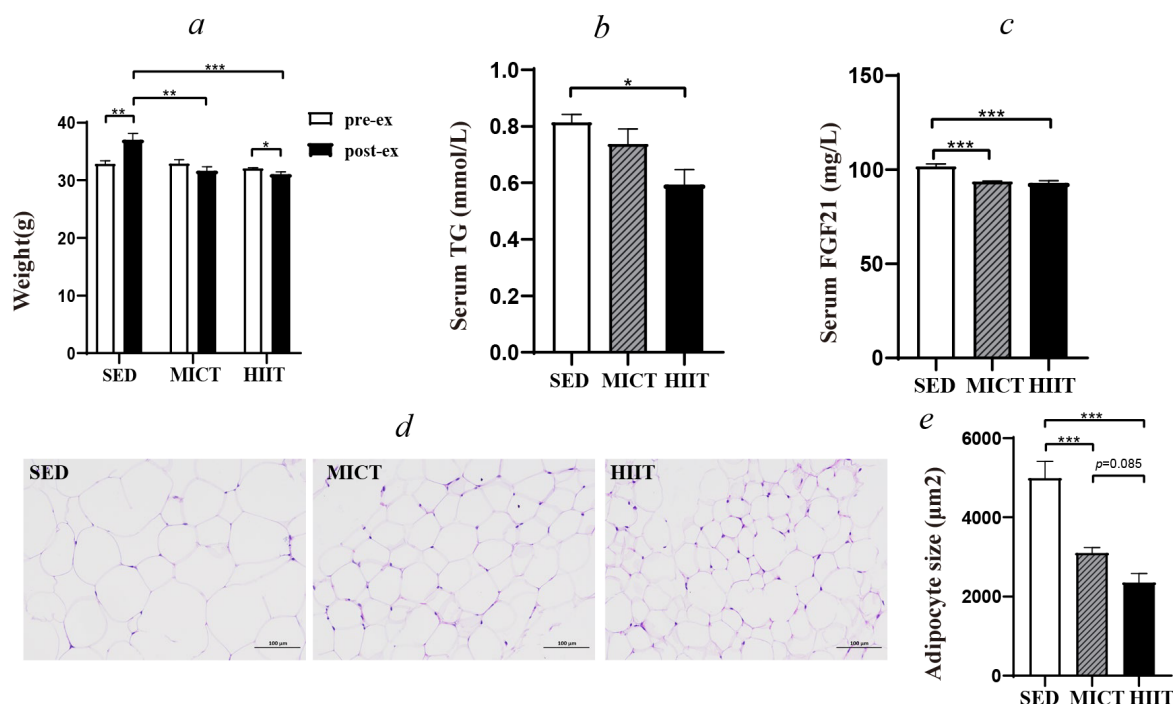


Рис. 1. Вес тела (a), уровни триглицеридов (b) и FGF21 (c) в сыворотке крови; изображение адипоцитов (d) и размер адипоцитов (e). За исключением веса тела, все остальные данные были получены после завершения упражнений ($n = 6$); данные представлены в виде среднего значения $\pm$ S.E.M., * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$. (С цветным вариантом рисунка можно ознакомиться в электронной версии статьи на сайте: <http://sciencejournals.ru/journal/biokhsm/>)

из вышеизложенного, было изучено, может ли HIIT лучше повышать экспрессию FGF21 и KLB. Поэтому было проанализировано влияние MICT и HIIT на экспрессию мРНК FGF21 и KLB в различных тканях (печень, eWAT, BAT, мышцы и поджелудочная железа). Вопреки ожиданиям и большому удивлению MICT оказался более эффективным в повышении экспрессии FGF21 и KLB на уровне мРНК в печени, BAT и мышцах, и выявленные различия были значительными (рис. 2). Однако не было обнаружено заметной разницы между влиянием MICT и HIIT на eWAT и поджелудочную железу (результаты не представлены). Показано, что физическая нагрузка практически не влияла на экспрессию FGF21 и KLB в белой жировой ткани (WAT) и поджелудочной железе. Основываясь на этих результатах, была исследована экспрессия белков FGF21 и KLB в печени, BAT и мышцах.

MICT способствует экспрессии белков FGF21 и KLB. Как показано на рис. 3, a, не было обнаружено значительных различий в уровне белка FGF21 в печени, однако MICT в большей степени способствовал экспрессии белка KLB по сравнению с HIIT. В случае бурой жировой ткани (BAT) и мышц, было обнаружено, что MICT в основном способствовал экспрессии белка FGF21 и KLB (рис. 3, b и c). Эти данные почти в

полной мере соответствовали данным по экспрессии мРНК. В целом, MICT может в большей степени способствовать экспрессии FGF21 и KLB, чем HIIT.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

В некоторых работах было показано, что FGF21, который участвует в регуляции гомеостаза глюкозы и липидов, связан с физической нагрузкой, а для взаимодействия с клетками-мишенями ему необходим белок KLB [23–25]. У человека исследования в основном затрагивали выявление изменений уровня циркулирующего FGF21 при резкой физической нагрузке или длительной умеренной физической нагрузке. При работе с мышами основное внимание было уделено изучению уровня FGF21 и KLB в различных тканях, а применяемые формы физической нагрузки включали острую физическую нагрузку, долгосрочный MICT или добровольное кручение колес. Долгосрочный HIIT представляет собой другую популярную форму физической нагрузки для снижения веса тела. Лишь в некоторых работах были изучены FGF21 или KLB. Настоящая работа является первой работой, в которой было изучено влияние долгосрочных MICT и HIIT на экспрессию FGF21-

KLB в различных тканях. Полученные данные свидетельствуют в пользу того, что в результате восьми недель прохождения МІСТ экспрессия FGF21 и KLB наиболее всего выражена в печени, бурой жировой ткани (BAT) и мышцах.

Печень является основным источником циркулирующего в крови белка FGF21 [26], и физические упражнения вносят вклад в повышение уровня FGF21 в печени и сыворотке крови у здоровых людей и мышей [27]. Однако

как у людей, так и у мышей с метаболическими заболеваниями, такими как ожирение, диабет и неалкогольное жировое поражение печени, наблюдается повышение уровня циркулирующего белка FGF21 по сравнению со здоровыми индивидами, и это может приводить к возникновению резистентности к действию FGF21 [28–30]. Вероятно, это связано с тем, что при метаболических заболеваниях происходит нарушение экспрессии KLB в тканях-мишенях и

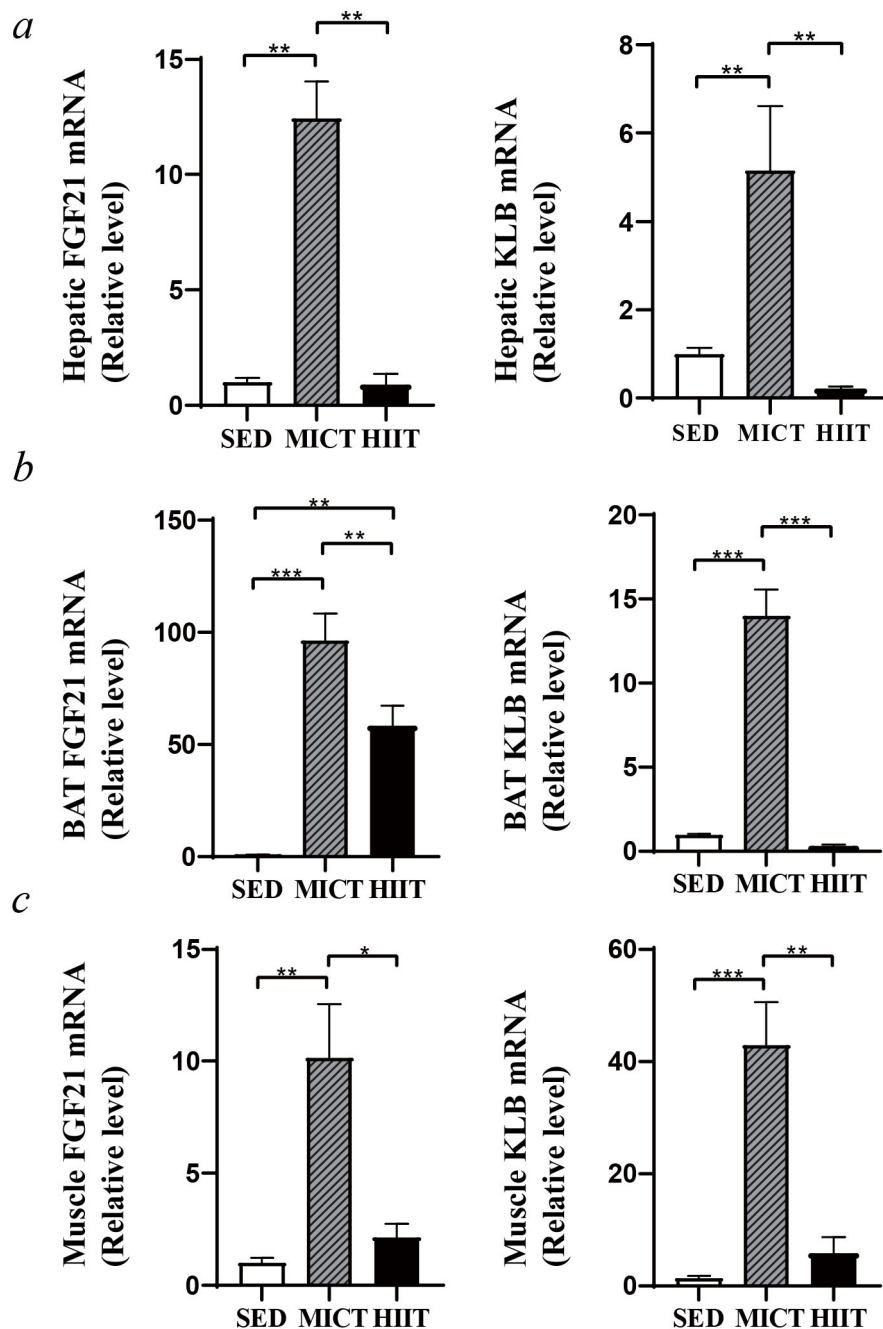


Рис. 2. Уровни экспрессии мРНК FGF21 и KLB в печени (a), BAT (b) и мышцах (c) ($n = 4-6$); результаты представлены в виде среднего значения $\pm$ S.E.M., * $p < 0,05$, $p < 0,01$, *** $p < 0,001$

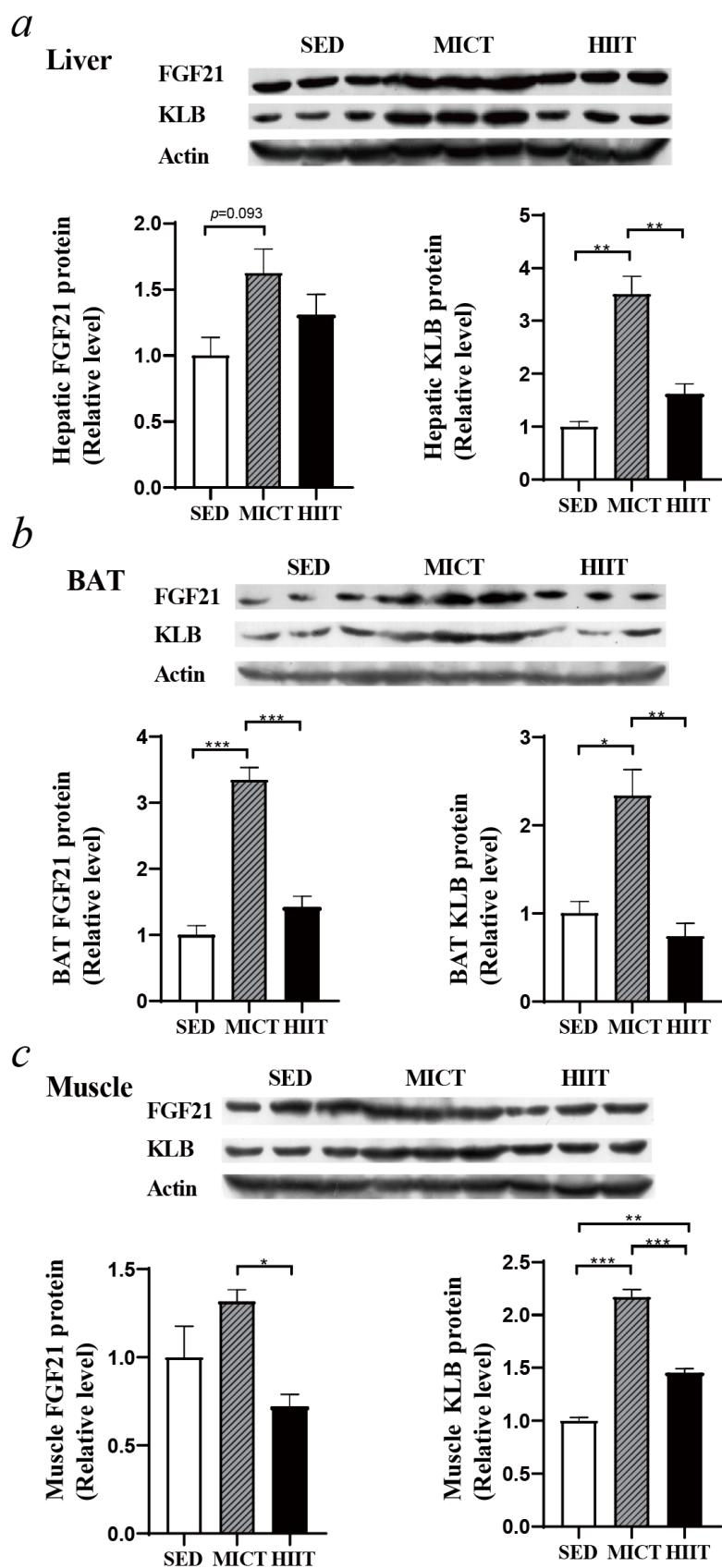


Рис. 3. Уровни экспрессии FGF21 и KLB в печени (a), BAT (b) и мышцах (c) ($n = 3$); результаты представлены в виде среднего значения $\pm$ S.E.M.; * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$

ослабление чувствительности к действию FGF21, образуемому в печени [31, 32]. Показано, что МІСТ в значительной степени повышает экспрессию KLB в печени, мышцах и ВАТ, что может содействовать проникновению в клетки циркулирующих молекул FGF21 и снижению уровня FGF21 в сыворотке крови. Предположено, что может быть направленное движение FGF21 из печени через кровь к клеткам-мишеням, и восемь недель МІСТ может способствовать более лучшему прохождению по этому пути образующегося в печени белка FGF21 по сравнению с НІІТ. Это возможный механизм, с помощью которого физические упражнения понижают устойчивость клеток к действию FGF21, вызванную ожирением. Ранее было показано, что физическая нагрузка может индуцировать синтез в печени FGF21 через ATF4/PPAR α -опосредованный путь, соотношение глюкогон/инсулин и уровни свободных жирных кислот (FFA) [33, 34]. На самом деле имеются противоречивые данные о влиянии долгосрочной физической нагрузки на печеночный и циркулирующий FGF21 у людей или мышей с метаболическими расстройствами. В случае уровня циркулирующего белка, в отдельных работах [35, 36] было показано, что физическая нагрузка может понижать уровень сывороточного FGF21, в то время как в других работах этот факт не нашел подтверждения [37, 38]. В случае печени в одних работах было показано, что физические упражнения могут способствовать повышению экспрессии FGF21 [39], но это не было подтверждено в других работах [40, 41]. Следует особо отметить, что есть некоторые методологические проблемы. Во-первых, мыши получали HFD и подвергались физическим нагрузкам в течение различного периода времени. Во-вторых, в этих работах были использованы различные формы физических упражнений, и есть различия в продолжительности их использования. Наконец, экспрессия FGF21 может также меняться в зависимости от условий питания и циркадных ритмов [42]. В целом, общепризнанно, что длительная физическая нагрузка, безусловно, влияет на уровни FGF21 в печени и т.д., однако механизм этого явления не ясен.

Бурая жировая ткань (ВАТ) функционирует как ткань, вырабатывающая тепло, и как секретирующий орган [43]. В предыдущих работах было показано, что холод может приводить к увеличению выхода FGF21 из бурой жировой ткани и экономии расхода энергии организмом. Физическая нагрузка может вызывать активацию ВАТ через PGC1 α -FGF21-UCP1, однако роль физической нагрузки в высвобождении

FGF21 из бурой жировой ткани не была установлена [44, 45].

Настоящая работа является первым исследованием, в котором было обнаружено, что продолжительная умеренная физическая нагрузка (МІСТ) может повышать экспрессию FGF21 и KLB непосредственно в бурой жировой ткани. Также показано, что долгосрочная НІІТ может повышать экспрессию белка FGF21 (но не KLB) в ВАТ, и влияние НІІТ на образующийся в ВАТ белок FGF21 было слабее, чем влияние МІСТ. Недавно было также показано, что FGF21 может индуцировать снижение веса тела через центрально-опосредованный и независимый от бурой жировой ткани механизм [46]. Это может стимулировать интерес к метаболизму бурой жировой ткани. Чтобы определить терапевтический потенциал бурой жировой ткани как мишени для действия лекарств и бороться с ожирением, в будущих исследованиях возможно совместное изучение механизма действия FGF21, образующегося в бурой жировой ткани, и физической нагрузки.

Мышечные клетки могут секретировать FGF21 в качестве миокина, что впервые было обнаружено в 2008 г. [47, 48]. Как правило, миокины непосредственно связаны с физической нагрузкой, так как мышцы являются основным двигательным органом. Однако недавние исследования поставили под сомнение, индуцирует ли физическая нагрузка экспрессию FGF21 в мышцах [33, 34], поскольку сохранение соотношения глюкогон/инсулин приводит к блокировке индукции синтеза FGF21. Это предполагает возможную роль печени, а не мышц, в секреции FGF21 во время физических упражнений. И наоборот, полученные результаты показывают, что продолжительная умеренная физическая нагрузка может усиливать в значительной степени экспрессию FGF21 и KLB в мышцах мышей, страдающих от ожирения. Мы предполагаем, что наши результаты могут отличаться по нескольким причинам. Во-первых, митохондриальная дисфункция или резистентность к инсулину, вызванная аномальным метаболизмом жиров у мышей, страдающих от ожирения, могут способствовать экспрессии FGF21 в мышцах [49, 50]. Во-вторых, продолжительность физической нагрузки или тип упражнения могут оказывать влияние. Поэтому необходимо в будущих исследованиях совместно использовать долгосрочную МІСТ и мышей, нокаутированных по специфичному для мышц гену *FGF21*, в различных метаболических условиях и изучить фактическое влияние МІСТ на экспрессию FGF21 и KLB и физиологические последствия этих изменений.

Таким образом, в данной работе было проведено сравнение двух наиболее популярных форм физических упражнений и определение экспрессии FGF21-KLB. Было показано, что у мышей, страдающих от ожирения, в целом, наблюдается более сильный ответ в виде повышения экспрессии FGF21 и KLB в печени, BAT и мышцах в результате прохождения ими МІСТ по сравнению с НІІТ. Между тем, к сожалению, нам не удалось полностью объяснить специфический механизм повышения экспрессии FGF21 и KLB, так как мы обнаружили лишь изменения уровня экспрессии после МІСТ или НІІТ. Мы предполагаем, что различные формы расхода энергии между МІСТ и НІІТ могут играть роль в экспрессии FGF21 и KLB. В недавно опубликованной работе FGF21 прошел клинические испытания в качестве лекарства для лечения метаболических заболеваний [51], однако его связь с физическими упражнениями не была установлена. Полученные результаты могут привлечь внимание к понятию, что «физичес-

кие упражнения — это лекарство» и способствовать появлению новых идей, касающихся профилактики и лечения различных метаболических заболеваний. Кроме того, следует рассмотреть многие другие формы физических упражнений, такие как длительная тренировка с отягощением и непрерывная физическая нагрузка высокой интенсивности.

Финансирование. Работа выполнена при финансовой поддержке Министерства образования Китайской Народной Республики (грант 20194180050).

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Соблюдение этических норм. Все эксперименты с животными проводили в соответствии с протоколом, утвержденным Институциональным комитетом по уходу и использованию лабораторных животных (IACUC) — Institutional Animal Care and Use Committee) Университета Циньхуа.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Wang, H., Qiang, L., and Farmer, S. R. (2008) Identification of a domain within peroxisome proliferator-activated receptor gamma regulating expression of a group of genes containing fibroblast growth factor 21 that are selectively repressed by SIRT1 in adipocytes, *Mol. Cell. Biol.*, **28**, 188-200, doi: 10.1128/Mcb.00992-07.
2. Lobelo, F., Stoutenberg, M., and Hutber, A. (2014) The exercise is medicine global health initiative: a 2014 update, *Brit. J. Sport Med.*, **48**, 1627-1668, doi: 10.1136/bjsports-2013-093080.
3. Nishimura, T., Nakatake, Y., Konishi, M., and Itoh, N. (2000) Identification of a novel FGF, FGF-21, preferentially expressed in the liver, *Biochim. Biophys. Acta*, **1492**, 203-206.
4. Kharitonov, A., Shiyanova, T. L., Koester, A., Ford, A. M., Micanovic, R., Galbreath, E. J., Sandusky, G. E., Hammond, L. J., Moyers, J. S., Owens, R. A., Gromada, J., Brozinick, J. T., Hawkins, E. D., Wroblewski, V. J., Li, D. S., Mehrbod, F., Jaskunas, S. R., and Shanafelt, A. B. (2005) FGF-21 as a novel metabolic regulator, *J. Clin. Invest.*, **115**, 1627-1635, doi: 10.1172/Jci23606.
5. Kharitonov, A., and Shanafelt, A. B. (2008) Fibroblast growth factor-21 as a therapeutic agent for metabolic diseases, *BioDrugs*, **22**, 37-44, doi: 10.2165/00063030-200822010-00004.
6. Coskun, T., Bina, H. A., Schneider, M. A., Dunbar, J. D., Hu, C. C., Chen, Y., Moller, D. E., and Kharitonov, A. (2008) Fibroblast growth factor 21 corrects obesity in mice, *Endocrinology*, **149**, 6018-6027, doi: 10.1210/en.2008-0816.
7. Xu, J., Stanislaus, S., Chinookoswong, N., Lau, Y. Y., Hager, T., Patel, J., Ge, H. F., Weiszmann, J., Lu, S. C., Graham, M., Busby, J., Hecht, R., Li, Y. S., Li, Y., Lindberg, R., and Veniant, M. M. (2009) Acute glucose-lowering and insulin-sensitizing action of FGF21 in insulin-resistant mouse models-association with liver and adipose tissue effects, *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.*, **297**, 1105-1114, doi: 10.1152/ajpendo.00348.2009.
8. Fazeli, P. K., Lun, M., Kim, S. M., Bredella, M. A., Wright, S., Zhang, Y., Lee, H., Catana, C., Klibanski, A., Patwari, P., and Steinhauser, M. L. (2015) FGF21 and the late adaptive response to starvation in humans, *J. Clin. Invest.*, **125**, 4601-4611, doi: 10.1172/Jci83349.
9. Wente, W., Efanov, A. M., Brenner, M., Kharitonov, A., Koester, A., Sandusky, G. E., Sewing, S., Treinies, I., Zitzer, H., and Gromada, J. (2006) Fibroblast growth factor-21 improves pancreatic beta-cell function and survival by activation of extracellular signal-regulated kinase 1/2 and Akt signaling pathways, *Diabetes*, **55**, 2470-2478, doi: 10.2337/db05-1435.
10. Bookout, A. L., de Groot, M. H., Owen, B. M., Lee, S., Gautron, L., Lawrence, H. L., Ding, X., Elmquist, J. K., Takahashi, J. S., Mangelsdorf, D. J., and Kliewer, S. A. (2013) FGF21 regulates metabolism and circadian behavior by acting on the nervous system, *Nat. Med.*, **19**, 1147-1152, doi: 10.1038/nm.3249.
11. Zhang, C., Huang, Z., Gu, J., Yan, X., Lu, X., Zhou, S., Wang, S., Shao, M., Zhang, F., Cheng, P., Feng, W., Tan, Y., and Li, X. (2015) Fibroblast growth factor 21 protects the heart from apoptosis in a diabetic mouse model via extracellular signal-regulated kinase 1/2-dependent signalling pathway, *Diabetologia*, **58**, 1937-1948, doi: 10.1007/s00125-015-3630-8.
12. Hondares, E., Iglesias, R., Giralt, A., Gonzalez, F. J., Giralt, M., Mampel, T., and Villarroya, F. (2011) Thermogenic activation induces FGF21 expression and release in brown adipose tissue, *J. Biol. Chem.*, **286**, 12983-12990, doi: 10.1074/jbc.M110.215889.
13. Fisher, F. M., Adams, A., Antonellis, P., Kharitonov, A., Flier, J., and Maratos-Flier, E. (2009) Genetic and diet induced obesity are associated with FGF21 resistance in adipose tissue and liver, *Obesity*, **17**, 68-68.
14. Mashili, F. L., Austin, R. L., Deshmukh, A. S., Fritz, T., Caidahl, K., Bergdahl, K., Zierath, J. R., Chibalin, A. V., Moller, D. E., Kharitonov, A., and Krook, A. (2011) Direct effects of FGF21 on glucose uptake in human skeletal

- muscle: implications for type 2 diabetes and obesity, *Diabetes Metab. Res. Rev.*, **27**, 286–297, doi: 10.1002/dmrr.1177.
15. Kharitonov, A., Dunbar, J. D., Bina, H. A., Bright, S., Moyers, J. S., Zhang, C., Ding, L., Micanovic, R., Mehrbod, S. F., Knierman, M. D., Hale, J. E., Coskun, T., and Shanafelt, A. B. (2008) FGF-21/FGF-21 receptor interaction and activation is determined by betaKlotho, *J. Cell. Physiol.*, **215**, 1–7, doi: 10.1002/jcp.21357.
 16. Petryszak, R., Keays, M., Tang, Y. A., Fonseca, N. A., Barrera, E., Burdett, T., Fullgrabe, A., Fuentes, A. M., Jupp, S., Koskinen, S., Mannion, O., Huerta, L., Megy, K., Snow, C., Williams, E., Barzine, M., Hastings, E., Weisser, H., Wright, J., Jaiswal, P., Huber, W., Choudhary, J., Parkinson, H. E., and Brazma, A. (2016) Expression atlas update – an integrated database of gene and protein expression in humans, animals and plants, *Nucleic Acids Res.*, **44**, 746–752, doi: 10.1093/nar/gkv1045.
 17. Diaz-Delfin, J., Hondares, E., Iglesias, R., Giralt, M., Caelles, C., and Villarroja, F. (2012) TNF-alpha represses beta-Klotho expression and impairs FGF21 action in adipose cells: involvement of JNK1 in the FGF21 pathway, *Endocrinology*, **153**, 4238–4245, doi: 10.1210/en.2012-1193.
 18. Wisløff, U., Helgerud, J., Kemi, O. J., and Ellingsen, Ø. (2001) Intensity-controlled treadmill running in rats: VO2 max and cardiac hypertrophy, *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.*, **280**, 1301–1310, doi: 10.1152/ajpheart.2001.280.3.H1301.
 19. Petot, H., Meilland, R., Le Moyec, L., Mille-Hamard, L., and Billat, V. L. (2012) A new incremental test for VO2 max accurate measurement by increasing VO2 max plateau duration, allowing the investigation of its limiting factors, *Eur. J. Appl. Physiol.*, **112**, 2267–2276, doi: 10.1007/s00421-011-2196-5.
 20. Ayachi, M., Niel, R., Momken, I., Billat, V. L., and Mille-Hamard, L. (2016) Validation of a ramp running protocol for determination of the true VO2 max in mice, *Front Physiol.*, **7**, 372, doi: 10.3389/fphys.2016.00372.
 21. Geng, L., Liao, B., Jin, L., Huang, Z., Triggler, C. R., Ding, H., Zhang, J., Huang, Y., Lin, Z., and Xu, A. (2019) Exercise alleviates obesity-induced metabolic dysfunction via enhancing FGF21 sensitivity in adipose tissues, *Cell Rep.*, **26**, 2738–2752, doi: 10.1016/j.celrep.2019.02.014.
 22. Somm, E., Henry, H., Bruce, S. J., Aeby, S., Rosikiewicz, M., Sykietis, G. P., Asrih, M., Jornayvaz, F. R., Denechaud, P. D., Albrecht, U., Mohammadi, M., Dwyer, A., Aciermo, J. S., Jr., Schoonjans, K., Fajas, L., Greub, G., and Pitteloud, N. (2017) beta-Klotho deficiency protects against obesity through a crosstalk between liver, microbiota, and brown adipose tissue, *JCI Insight*, **2**, doi: 10.1172/jci.insight.91809.
 23. Tezze, C., Romanello, V., and Sandri, M. (2019) FGF21 as modulator of metabolism in health and disease, *Front. Physiol.*, **10**, 419, doi: 10.3389/fphys.2019.00419.
 24. Staiger, H., Keuper, M., Berti, L., Hrabe de Angelis, M., and Haring, H. U. (2017) Fibroblast growth factor 21-metabolic role in mice and men, *Endocr. Rev.*, **38**, 468–488, doi: 10.1210/er.2017-00016.
 25. Fisher, F. M., and Maratos-Flier, E. (2016) Understanding the physiology of FGF21, *Annu. Rev. Physiol.*, **78**, 223–241, doi: 10.1146/annurev-physiol-021115-105339.
 26. Markan, K. R., Naber, M. C., Ameka, M. K., Anderegg, M. D., Mangelsdorf, D. J., Klierer, S. A., Mohammadi, M., and Potthoff, M. J. (2014) Circulating FGF21 is liver derived and enhances glucose uptake during refeeding and overfeeding, *Diabetes*, **63**, 4057–4063, doi: 10.2337/db14-0595.
 27. Kim, K. H., Kim, S. H., Min, Y. K., Yang, H. M., Lee, J. B., and Lee, M. S. (2013) Acute exercise induces FGF21 expression in mice and in healthy humans, *PLoS One*, **8**, e63517, doi: 10.1371/journal.pone.0063517.
 28. Dushay, J., Chui, P. C., Gopalakrishnan, G. S., Varela-Rey, M., Crawley, M., Fisher, F. M., Badman, M. K., Martinez-Chantar, M. L., and Maratos-Flier, E. (2010) Increased fibroblast growth factor 21 in obesity and nonalcoholic fatty liver disease, *Gastroenterology*, **139**, 456–463, doi: 10.1053/j.gastro.2010.04.054.
 29. Yilmaz, Y., Eren, F., Yonal, O., Kurt, R., Aktas, B., Celikel, C. A., Ozdogan, O., Imeryuz, N., Kalayci, C., and Avsar, E. (2010) Increased serum FGF21 levels in patients with nonalcoholic fatty liver disease, *Eur. J. Clin. Invest.*, **40**, 887–892, doi: 10.1111/j.1365-2362.2010.02338.x.
 30. Chavez, A. O., Molina-Carrion, M., Abdul-Ghani, M. A., Folli, F., DeFronzo, R. A., and Tripathy, D. (2009) Circulating fibroblast growth factor-21 is elevated in impaired glucose tolerance and type 2 diabetes and correlates with muscle and hepatic insulin resistance, *Diabetes Care*, **32**, 1542–1546, doi: 10.2337/dc09-0684.
 31. Ji, F., Liu, Y., Hao, J. G., Wang, L. P., Dai, M. J., Shen, G. F., and Yan, X. B. (2019) KLB gene polymorphism is associated with obesity and non-alcoholic fatty liver disease in the Han Chinese, *Aging (Albany NY)*, **11**, doi: 10.18632/aging.102293.
 32. Samms, R. J., Cheng, C. C., Kharitonov, A., Gimeno, R. E., and Adams, A. C. (2016) Overexpression of beta-klotho in adipose tissue sensitizes male mice to endogenous FGF21 and provides protection from diet-induced obesity, *Endocrinology*, **157**, 1467–1480, doi: 10.1210/en.2015-1722.
 33. Hansen, J. S., Clemmesen, J. O., Secher, N. H., Hoene, M., Drescher, A., Weigert, C., Pedersen, B. K., and Plomgaard, P. (2015) Glucagon-to-insulin ratio is pivotal for splanchnic regulation of FGF-21 in humans, *Mol. Metab.*, **4**, 551–560, doi: 10.1016/j.molmet.2015.06.001.
 34. Hansen, J. S., Pedersen, B. K., Xu, G., Lehmann, R., Weigert, C., and Plomgaard, P. (2016) Exercise-induced secretion of FGF21 and Follistatin are blocked by pancreatic clamp and impaired in type 2 diabetes, *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, **101**, 2816–2825, doi: 10.1210/jc.2016-1681.
 35. Taniguchi, H., Tanisawa, K., Sun, X., Kubo, T., and Higuchi, M. (2016) Endurance exercise reduces hepatic fat content and serum fibroblast growth factor 21 levels in elderly men, *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, **101**, 191–198, doi: 10.1210/jc.2015-3308.
 36. Yang, S. J., Hong, H. C., Choi, H. Y., Yoo, H. J., Cho, G. J., Hwang, T. G., Baik, S. H., Choi, D. S., Kim, S. M., and Choi, K. M. (2011) Effects of a three-month combined exercise programme on fibroblast growth factor 21 and fetuin-A levels and arterial stiffness in obese women, *Clin. Endocrinol. (Oxf)*, **75**, 464–469, doi: 10.1111/j.1365-2265.2011.04078.x.
 37. Andersen, T. R., Schmidt, J. F., Thomassen, M., Hornstrup, T., Frandsen, U., Randers, M. B., and Bangsbo, J. (2014) A preliminary study: effects of football training on glucose control, body composition, and performance in men with type 2 diabetes, *Scand. J. Med. Sci. Sports*, **24**, 43–56, doi: 10.1111/sms.12259.
 38. Besse-Patin, A., Montastier, E., Vinel, C., Castan-Laurell, I., Louche, K., Dray, C., and Valet, P. (2014) Effect of endurance training on skeletal muscle myokine expression in obese men: identification of apelin as a novel myokine, *Int. J. Obesity*, **38**, 707–713, doi: 10.1038/ijo.2013.158.
 39. Berglund, E. D., Lustig, D. G., Baheza, R. A., Hasenour, C. M., Lee-Young, R. S., Donahue, E. P., and Wasserman, D. H. (2011) Hepatic glucagon action is essential for exercise-induced reversal of mouse fatty liver, *Diabetes*, **60**, 2720–2729, doi: 10.2337/db11-0455.
 40. Loyd, C., Magrisso, I. J., Haas, M., Balusu, S., Krishna, R., Itoh, N., and Habegger, K. M. (2016) Fibroblast growth

- factor 21 is required for beneficial effects of exercise during chronic high-fat feeding, *J. Appl. Physiol.*, **121**, 687-698, doi: 10.1152/jappphysiol.00456.2016.
41. Fletcher, J. A., Linden, M. A., Sheldon, R. D., Meers, G. M., Morris, E. M., Butterfield, A., and Rector, R. S. (2016) Fibroblast growth factor 21 and exercise-induced hepatic mitochondrial adaptations, *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.*, **310**, 832-843, doi: 10.1152/ajpgi.00355.2015.
 42. Yu, H., Xia, F., Lam, K. S., Wang, Y., Bao, Y., Zhang, J., and Xu, A. (2011) Circadian rhythm of circulating fibroblast growth factor 21 is related to diurnal changes in fatty acids in humans, *Clin. Chem.*, **57**, 691-700, doi: 10.1373/clinchem.2010.155184.
 43. Villarroja, F., Cereijo, R., Villarroya, J., and Giral, M. (2017) Brown adipose tissue as a secretory organ, *Nat. Rev. Endocrinol.*, **13**, 26-35, doi: 10.1038/nrendo.2016.136.
 44. Sanchez-Delgado, G., Martinez-Tellez, B., Olza, J., Aguilera, C. M., Gil, A., and Ruiz, J. R. (2015) Role of exercise in the activation of brown adipose tissue, *Ann. Nutr. Metab.*, **67**, 21-32, doi: 10.1159/000437173.
 45. Peres Valgas da Silva, C., Hernandez-Saavedra, D., White, J. D., and Stanford, K. I. (2019) Cold and exercise: therapeutic tools to activate brown adipose tissue and combat obesity, *Biology (Basel)*, **8**, doi: 10.3390/biology8010009.
 46. BonDurant, L. D., Ameka, M., Naber, M. C., Markan, K. R., Idiga, S. O., Acevedo, M. R., and Potthoff, M. J. (2017) FGF21 regulates metabolism through adipose-dependent and-independent mechanisms, *Cell Metab.*, **25**, 935-944, doi: 10.1016/j.cmet.2017.03.005.
 47. Izumiya, Y., Bina, H. A., Ouchi, N., Akasaki, Y., Kharitonov, A., and Walsh, K. (2008) FGF21 is an Akt-regulated myokine, *FEBS Lett.*, **582**, 3805-3810, doi: 10.1016/j.febslet.2008.10.021.
 48. Izumiya, Y., Hopkins, T., Morris, C., Sato, K., Zeng, L., Viereck, J., Hamilton, J. A., Ouchi, N., LeBrasseur, N. K., and Walsh, K. (2008) Fast/Glycolytic muscle fiber growth reduces fat mass and improves metabolic parameters in obese mice, *Cell Metab.*, **7**, 159-172, doi: 10.1016/j.cmet.2007.11.003.
 49. Kim, K. H., Jeong, Y. T., Oh, H., Kim, S. H., Cho, J. M., Kim, Y. N., Kim, S. S., Kim, D. H., Hur, K. Y., Kim, H. K., Ko, T., Han, J., Kim, H. L., Kim, J., Back, S. H., Komatsu, M., Chen, H. C., Chan, D. C., Konishi, M., Itoh, N., Choi, C. S., and Lee, M. S. (2013) Autophagy deficiency leads to protection from obesity and insulin resistance by inducing Fgf21 as a mitokine, *Nat. Med.*, **19**, 83-92, doi: 10.1038/nm.3014.
 50. Lindegaard, B., Hvid, T., Grondahl, T., Frosig, C., Gerstoft, J., Hojman, P., and Pedersen, B. K. (2013) Expression of fibroblast growth factor-21 in muscle is associated with lipodystrophy, insulin resistance and lipid disturbances in patients with HIV, *PLoS One*, **8**, e55632, doi: 10.1371/journal.pone.0055632.
 51. Verzijl, C. R. C., Van De Peppel, I. P., Struik, D., and Jonker, J. W. (2020) Pegbelfermin (BMS-986036): an investigational PEGylated fibroblast growth factor 21 analogue for the treatment of nonalcoholic steatohepatitis, *Expert Opin. Investig. Drugs*, **29**, 125-133, doi: 10.1080/13543784.2020.1708898.

MODERATE-INTENSITY CONTINUOUS TRAINING IMPROVES FGF21 AND KLB EXPRESSION IN OBESE MICE

Yingzhe Xiong, Yan Chen, Yao Liu, and Bing Zhang*

Center of Sports and Health Research, Division of Sport Science and Physical Education, Tsinghua University, Beijing, China; E-mail: bzhang@mail.tsinghua.edu.cn

Received March 12, 2020

Revised June 27, 2020

Accepted June 27, 2020

Fibroblast growth factor 21 (FGF21) and β -Klotho (KLB) play an important role in preventing and treating overweight and obesity. However, it is unclear what conditions promote FGF21 and KLB expression in different tissues. Therefore, we studied the FGF21 and KLB expression related to two forms of exercise: moderate-intensity continuous training (MICT) and high-intensity interval training (HIIT) (two popular ways in weight loss). Mice were randomly divided into three groups ($n = 8$ per group): MICT, HIIT, and sedentary lifestyle (SED). All mice were fed a high-fat diet (HFD) for 12 weeks to induce obesity. The exercise was performed on a motorized treadmill for another eight weeks and the diet continued in each group. We found that both MICT and HIIT had positive effects on the loss of HFD-induced body weight and serum FGF21 levels. HIIT can better decrease body weight and serum triglyceride (TG) levels, while MICT was more effective at promoting FGF21 and KLB expression in the liver, brown adipose tissue (BAT), and muscle at the mRNA and protein levels.

Keywords: MICT, HIIT, FGF21, KLB, expression

УДК 577.24

ИЗМЕНЕНИЯ ПРОЦЕССА ОБРАЗОВАНИЯ ФИБРИНОГЕНА И ФИБРИНА У БОЛЬНЫХ С КОНЕЧНОЙ СТАДИЕЙ ХРОНИЧЕСКОЙ БОЛЕЗНИ ПОЧЕК, НАХОДЯЩИХСЯ НА ПЕРИТОНАЛЬНОМ ДИАЛИЗЕ

© 2020 М. Баралич¹, Д. Робаджак², А. Пенезич², Г. Мильюш²,
М. Шундерич², Н. Глигорьевич^{2*}, О. Недич²

¹ Clinical Centre of Serbia, Department of Nephrology, 11000 Belgrade, Serbia

² Institute for the Application of Nuclear Energy (INEP), Department of Metabolism, University of Belgrade, 11080 Belgrade, Serbia; E-mail: nikolag@inep.co.rs

Поступила в редакцию 30.04.2020

После доработки 14.06.2020

Принята к публикации 19.06.2020

Конечная стадия хронической болезни почек (ESRD) является патологическим состоянием, которое сопровождается воспалительными процессами, повышенным окислительным стрессом и ассоциируется с риском возникновения сердечно-сосудистых осложнений и коагулопатий. В настоящей работе проведен анализ структуры фибриногена, выделенного из образцов крови больных с ESRD, находящихся на перитонеальном диализе, и охарактеризован образующийся из него фибрин. Показано, что фибриноген, полученный от больных, отличается от фибриногена у здоровых людей высокой степенью карбонилирования. Наиболее подверженной окислению оказалась $\alpha\alpha$ -цепь, затем следовала $\beta\beta$ -цепь. В то же время γ -цепь оказалась наиболее устойчивой к окислению. На основании результатов спектрофлуориметрического анализа предположено, что у больных происходит дополнительная модификация боковых цепей аминокислотных остатков фибриногена. При этом пространственная структура фибриногена изменяется в большей степени по сравнению со вторичной структурой. При сравнении тестируемых групп не выявлено значительных различий в продолжительности и скорости (кинетика) коагуляции фибриногена. Фибрин, образующийся из выделенного фибриногена, имел сходную структуру в обеих группах. Полученные результаты подтверждают, что у пациентов с ESRD, находящихся на перитонеальном диализе, происходит окисление молекулы фибриногена и изменения её структуры. В то же время эти структурные изменения не влияли непосредственно на процесс образования фибрина. Принимая во внимание тот факт, что некоторые больные страдают от кровотечений, в то время как у других наблюдаются тромбоцитические осложнения, необходимы дальнейшие исследования в этой области, чтобы выявить другие компоненты и процессы, которые вносят вклад в исход заболевания.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: фибриноген, окисление, структура белка, свертывание крови.

DOI: 10.31857/S0320972520080102

ВВЕДЕНИЕ

Конечная стадия хронической болезни почек (ESRD) – это состояние, сопровождающееся повышенным воспалением и окислительным стрессом [1]. Как следствие, значительно возрастает риск развития сердечно-сосудистых

осложнений, что является основной причиной смертности у пациентов с ESRD [2]. Многие факторы свертывания крови, которые способствуют атеросклерозу, при ESRD повышены, в том числе фибриноген, факторы свертывания крови VII, VIII и XIII [3]. В то время как некоторые пациенты страдают от кровотечений, у других развиваются тромботические осложнения. Механизмы, приводящие к тому или иному результату, все еще не до конца понятны [4], и поэтому необходимы дальнейшие исследования в этой области.

Пациенты, которые подвергаются гемодиализу или перитонеальному диализу, испытывают усиленный окислительный стресс, уровень которого зависит от состава растворов, используемых для диализа. При этом было обнаружено

Принятые сокращения: ESRD – конечная стадия хронической болезни почек (end-stage renal disease); ROS – активные формы кислорода (reactive oxygen species); PD – peritoneal dialysis; BCA – бицинхониновая кислота (bicinchoninic acid); DNP – 2,4-динитрофенилгидразин (2,4-dinitrophenyl hydrazine); CD – круговой дихроизм (circular dichroism); SEM – сканирующая электронная микроскопия (scanning electron microscopy); PCO – карбонильные группы белков (protein carbonyl groups).

* Адресат для корреспонденции.

как увеличение продукции активных форм кислорода (АФК), так и снижение антиоксидантной способности [5]. Кроме того, сообщалось, что пациенты, проходящие процедуру перитонеального диализа, имеют более протромботический профиль по сравнению с пациентами, находящимися на гемодиализе [6].

Фибриноген (фактор свертывания крови I) представляет собой большой гликопротеин плазмы крови с мол. массой 340 кД. В основном он экспрессируется при первичном и вторичном гемостазе [7] и состоит из двух $A\alpha$ -, двух $B\beta$ - и двух γ -цепей. В целом, его структуру можно представить в виде $(A\alpha-B\beta-\gamma)_2$. Коагуляционные свойства этого белка могут изменяться вследствие изменения его концентрации, структурной или химической модификации, включая окисление белка или изменение картины его гликозирования [8, 9]. Повышенная концентрация и окисление фибриногена были обнаружены у пациентов с хроническим заболеванием почек [10], и это влияло как на образование, так и на свойства фибрина.

Несмотря на то, что ранее было показано, что фибриноген подвержен окислению [11], имеющиеся данные о последствиях этого изменения для функционирования фибриногена противоречат друг другу. Согласно некоторым авторам [12], окисленный модифицированный фибриноген приобретает тромбогенные свойства. Однако другие исследователи считают, что при определенных условиях, когда наблюдается повышенный окислительный стресс, фибриноген становится более способным лизировать тромбы и, следовательно, вызывать повышенный риск кровотечения [13]. В исследованиях, проведенных до настоящего времени по формированию и свойствам сгустка крови у пациентов с ESRD с использованием образцов цельной крови или плазмы [14, 15], была подтверждена тромбогенная природа сгустка. Чтобы исключить влияние различных компонентов крови и терапевтических препаратов на полученные результаты, целью данного исследования было анализ специфических изменений структуры фибриногена, выделенного из плазмы пациентов с ESRD, и изучение возможного влияния этих изменений на процесс образования фибрина и его свойства.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Образцы. Образцы крови ($n = 50$, 25 мужчин, 25 женщин, возраст от 22 до 87 лет) были взяты у больных с диагнозом ESRD, которых регулярно подвергали процедуре перитонеального диа-

лиза (PD) в Сербском клиническом центре. Всем больным, обследованным в данной работе, был поставлен диагноз хроническое заболевание почек 5-й степени. Все они проходили одинаковое заместительное лечение почек, т.е. перитонеальный диализ, в течение более шести месяцев. На протяжении трех месяцев перед забором крови ни у одного из пациентов не было зарегистрировано ни одного случая тромбоза или кровотечения. Кровь собирали в пробирку с антикоагулянтом (лимонной кислотой) рано утром перед проведением процедуры диализа.

Исходя из индивидуальных потребностей, все пациенты получали в качестве плановой терапии карбонат кальция, витамин D, эритропоэз-стимулирующий агент, блокатор рецепторов ангиотензина II, ингибитор ангиотензин-превращающего фермента и блокатор кальциевых каналов. Критерием исключения было наличие любой ранее известной аномалии при коагуляции. Исследование было проведено в соответствии с Хельсинкской декларацией и Руководством по этическим принципам для медицинских исследований с участием людей, и оно было одобрено Советом по этическим нормам клинического центра Сербии и INEP (приказ № 890/8). Образцы плазмы получали центрифугированием при 3500 об/мин в течение 5 мин через 1 ч после отбора проб. Контрольная группа (Н) состояла из здоровых людей соответствующего пола и возраста ($n = 30$, 14 мужчин, 16 женщин, возраст 30–85 лет). Перед выделением фибриногена были проведены рутинный биохимический и гематологический анализы образцов.

Выделение фибриногена. Фибриноген выделяли из плазмы крови путем его осаждения при насыщении сульфатом аммония до конечной концентрации соли, равной 20%. Образцы центрифугировали на центрифуге Eppendorf Minispin при 10 000 об/мин в течение 5 мин. Полученный осадок промывали 20%-ным сульфатом аммония в 50 мМ PBS, pH 7,4. Затем фибриноген растворяли в 50 мМ PBS и его чистоту определяли с помощью электрофореза. Концентрацию полученного фибриногена определяли с помощью набора с BCA («Thermo Fisher Scientific», США). В различных экспериментах использовали фибриноген в концентрациях, соответствующих определенным условиям.

Определение карбонильных групп белков. Образцы фибриногена (в конечной концентрации, равной 14,7 мкМ) инкубировали с 2,4-динитрофенилгидразином (DNP), который взаимодействует с карбонильными группами в молекуле белка (PCO), в соответствии с опубликованным ранее методом [16]. Обработанный

фибриноген анализировали путем электрофореза в 10%-ом полиакриламидном геле в присутствии додецилсульфата натрия (SDS-PAGE) в восстанавливающих условиях. После завершения электрофореза белки переносили на нитроцеллюлозную мембрану, окрашивали красителем Ponceau S и исследовали с помощью иммуноблоттинга с использованием кроличьих антител против DNP («Sigma», Германия), конъюгированных с пероксидазой хрена вторых антител против кроличьих IgG («AbD», Великобритания), и реагента для усиления хемилюминесценции («Pierce Biotechnology», США). Белки визуализировали на основе денситометрического анализа с помощью программы Image Master TotalLab («Amersham BioSciences», Великобритания). Значения интенсивности окрашивания, полученные при иммуноблоттинге, нормализовали относительно значений интенсивности окрашивания, полученных с помощью Ponceau S.

Спектрофлуориметрический анализ полученного препарата фибриногена. Были приготовлены два набора образцов фибриногена: от здоровых людей (Н) и больных, подвергающихся процедуре диализа (PD). Каждый набор образцов содержал равные количества фибриногена. Наборы фибриногена (конечная концентрация белка была равна 20 нМ) анализировали с использованием спектрофлуориметра FluoroMax®-4 («HORIBA Scientific», Япония) с шириной щели возбуждения и эмиссии, равной 5 нм. Спектры регистрировали в диапазоне длин волн 310–400 нм (после возбуждения остатков триптофана в молекуле фибриногена при 295 нм) и корректировали относительно фонового сигнала, вызванного буфером 50 мМ PBS, pH 7,4.

Анализ фибриногена с помощью метода спектрометрии кругового дихроизма (CD). Спектры кругового дихроизма (КД) двух наборов препаратов фибриногена, приготовленных так же, как в случае спектрофлуориметрии (конечная концентрация 3 мкМ), регистрировали на спектрополяриметре J-815 («Jasco», Япония). КД-спектры в дальнем ультрафиолете (Far-UV CD spectra), используемые для анализа вторичной структуры белков, регистрировали в диапазоне длин волн 185–260 нм при скорости сканирования 50 нм/мин с использованием ячейки с оптической длиной волны 0,1 мм и накоплением трех сканов. Спектры кругового дихроизма в ближнем ультрафиолете (Near-UV CD spectra), которые используются для определения пространственной структуры белка, регистрировали в диапазоне длин волн 250–350 нм при скорости сканирования 50 нм/мин, используя ячейку с длиной оптического пути, равной 10 нм, и про-

изводя запись трех последовательных сканов. Полученные спектры КД в дальнем ультрафиолете анализировали с помощью программы CDPPro.

Определение времени свертывания выделенного фибриногена. Коагуляционный анализ проводили при комнатной температуре в микропланшете для титрования. Тромбин (1 IU/мл, конечная концентрация) добавляли к фибриногену (индивидуальные образцы, конечная концентрация белка в 50 мМ PBS, дополненном 2,2 мМ CaCl₂, равна 2,9 мкМ). Полученные образцы немедленно помещали на прибор Victor3V multilabel reader, снабженный орбитальным шейкером («Perkin Elmer», США). Процесс коагуляции регистрировали при длине волны 350 нм в течение 8 мин с интервалом 10 с [17]. Полученные данные корректировали относительно контроля, содержащего все компоненты за исключением фибриногена. Скорость и время коагуляции вместе с изменениями максимальных значений поглощения, отражающих толщину фибрилл, определяли согласно уравнению: $A_{350} = f(\text{время})$, как было описано ранее [18].

Определение толщины фибрилл. Для проведения сканирующей электронной микроскопии (SEM) были приготовлены гели с использованием объединенного препарата фибриногена, приготовленного так же, как в случае спектрофлуориметрии (11,8 мкМ в 50 мМ PBS, дополненном 2,2 мМ CaCl₂), и тромбина (1 IU/мл). После лиофилизации на образцы фибрина напыляли золото и проводили сканирование с помощью сканирующего электронного микроскопа JSM 6390LV scanning electron microscope («JEOL», США). Полученные изображения изучали с помощью программы ImageJ («NIH», США) и толщину фибрилл измеряли в нескольких частях каждого изображения.

Статистическая обработка данных. Полученные результаты представлены в виде медиан с рангом 2,5 и 97,5 процентиля. Сравнение данных двух групп образцов проводили с использованием *U*-критерия Манна–Уитни. Различия считали достоверными при значениях $p < 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Биохимическая и гематологическая характеристика полученных образцов. Основные данные по биохимическим и гематологическим показателям образцов фибриногена, полученных от здоровых людей (Н) и больных с ESRD, подвергающихся перитонеальному диализу (PD) представлены в табл. 1. Аналогично результатам других авторов [14], нами также было показано,

Таблица 1. Биохимический и гематологический анализ образцов, полученных от здоровых людей (Н) и больных с ESRD, проходящих процедуру перитонеального диализа (PD)

Концентрация	Группа Н, <i>n</i> = 30	Группа PD, <i>n</i> = 50	Различия, величина <i>p</i>
Возраст	30–85	22–87	
Мужчины	14	25	
Женщины	16	25	
Общий белок (г/л)	72 (68–77)	64 (55–77)	<0,001
Альбумин (г/л)	44 (40–49)	37 (28–44)	<0,001
С-реактивный белок мг/л)	2,2 (1,1–3,8)	6,0 (0,7–124,0)	<0,001
Фибриноген (г/л)	3,5 (2,9–4,0)	4,5 (2,9–7,0)	<0,001
Мочевина (ммоль/л)	5,1 (4,3–6,1)	16,1 (8,5–26,0)	<0,001
Креатинин (мкмоль/л)	81 (48–109)	668 (384–997)	<0,001
Мочевая кислота (мкмоль/л)	230 (132–375)	310 (218–471)	0,012
Натрий (ммоль/л)	140 (137–142)	138 (131–143)	0,23
Калий (ммоль/л)	4,4 (3,9–4,5)	4,3 (3,2–5,6)	0,72
Фосфат (ммоль/л)	0,9 (0,8–1,0)	1,4 (0,8–2,4)	<0,001
Кальций (ммоль/л)	2,3 (2,1–2,4)	2,3 (1,8–2,8)	0,72
Железо (мкмоль/л)	17,6 (9,8–21,5)	11,5 (7,6–19,7)	<0,001
Эритроциты (10 ¹²)	4,5 (4,2–5,3)	3,4 (0,3–4,3)	<0,001
Гемоглобин (г/л)	141 (125–166)	103 (72–129)	<0,001
Гематокрит (л/л)	0,40 (0,36–0,47)	0,31 (0,03–0,41)	<0,001

что у больных, подвергающихся перитонеальному диализу, изменяются концентрации многих анализируемых веществ, что сказывается на их состоянии.

Определение содержания карбонильных групп в цепях фибриногена. В результате проведения реакции между образцами выделенного препарата фибриногена и динитрофенилгидразином (DNP) и последующего электрофореза белков в восстанавливающих условиях (SDS-PAGE) и иммуноблоттинга с антителами против DNP было показано, что фибриноген, выделенный из крови больных с ESRD, характеризуется значительно большим содержанием карбонильных групп по сравнению с фибриногеном, полученным от здоровых людей. На рис. 1, *a* (вместе с необработанными DNP образцами в качестве контроля) представлен репрезентативный иммуноблот, полученный с помощью антител против DNP. Результаты денситометрии иммуноблотов и статистическая обработка значений интенсивности сигналов для всех образцов показаны на рис. 1, *b*. Все значения сигналов иммуноблотов были нормализованы относительно сигналов общего белка, полученных при окрашивании мембран красителем Ponceau S. В соответствии с ранее сообщенными повышенными концентрациями конечных продуктов окис-

ления у пациентов с ESRD, подвергнутых перитонеальному диализу [10, 19, 20], нами было показано, что фибриноген был одной из модифицированных молекул. Как можно видеть на рис. 1, *a*, больше всего окислению подвержена Аα-цепь фибриногена, за которой следует Вβ-цепь. В то же время γ-цепь устойчива к действию активных форм кислорода.

Разницу в восприимчивости цепей фибриногена к окислению можно объяснить различными первичными структурами этих полипептидов, а также различной стерической доступностью специфических групп, способных взаимодействовать с АФК. Сравнение содержания карбонильных групп в отдельных цепях фибриногена (рис. 1, *c*) выявило увеличение содержания PCO в Аα- и Вβ-цепях в группе больных на 50 и 60% соответственно. В случае карбонилирования γ-цепи существенной разницы между двумя группами не обнаружено. Окисление фибриногена может влиять на его функционирование, что было показано в случае больных с диабетом [21], циррозом [22] и инфарктом миокарда [23]. Также предполагается, что окислительная модификация играет важную роль в развитии сердечно-сосудистых заболеваний у больных с ESRD, проходящих процедуру гемодиализа [24]. Окисленный фибриноген часто демон-

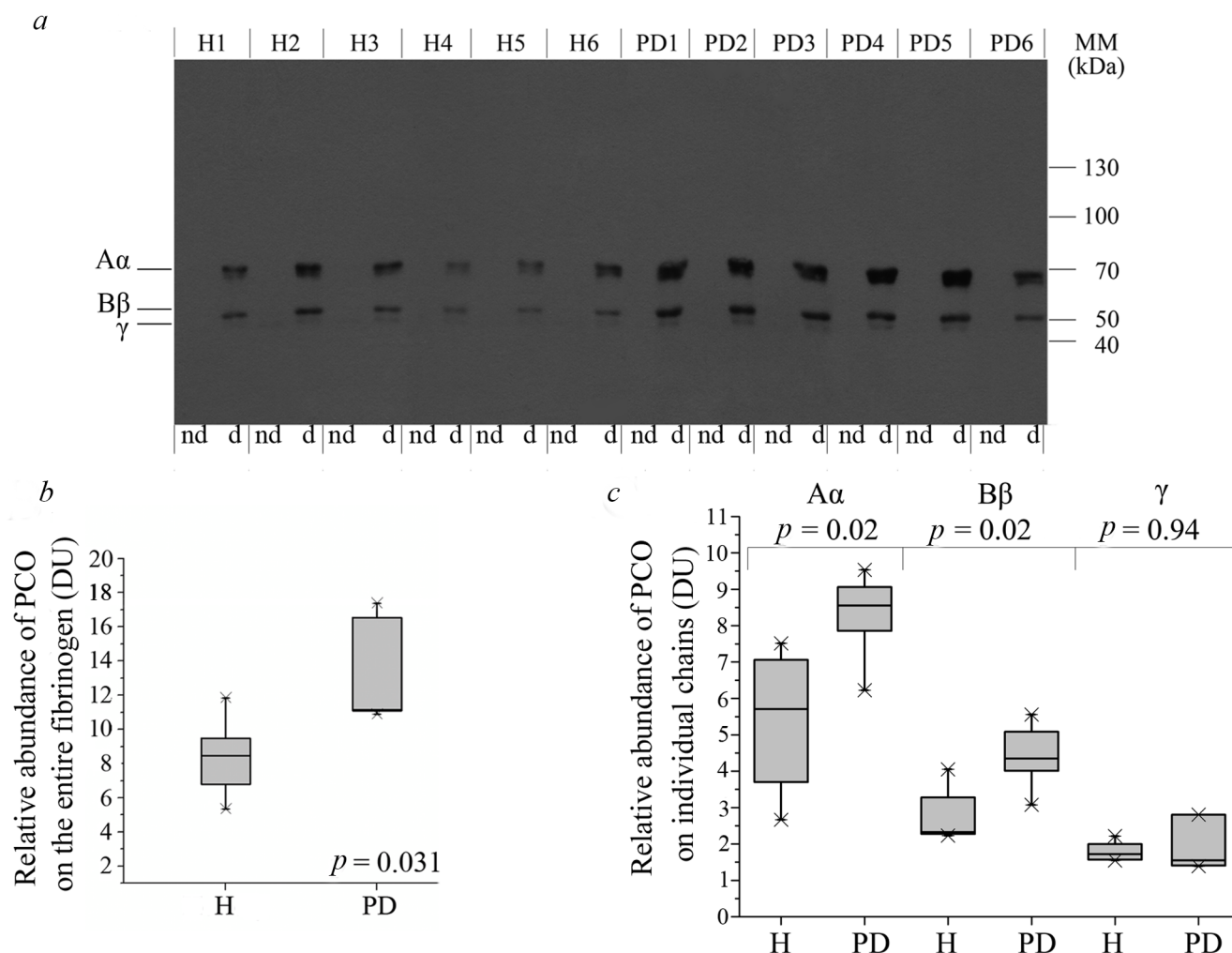


Рис. 1. *a* – Репрезентативный иммуноблот, полученный с использованием антител против DNP, в случае выделенного фибриногена, необработанного динитрофенилгидразином (nd: non-derivatised) и обработанного DNP (d: derivatised), полученного от здоровых людей (H1-6) и больных с ESRD, подвергнутых перитонеальному диализу (PD1-6); *b* – статистический анализ значений интенсивности сигнала антител против DNP для всех образцов фибриногена, нормализованных относительно сигнала общего белка, полученных при окрашивании мембран красителем Ponceau; *c* – статистический анализ значений интенсивности сигнала антител против DNP для отдельных цепей всех образцов фибриногена. Данные в боксах колеблются от 25 до 75-ого перцентиля, нижние границы данных колеблются от 25-й до 5-й перцентиля, тогда как верхние данные колеблются от 75-го до 95-го перцентиля; горизонтальные полосы в боксах представляют медианы, звездочки определяют 1-й и 99-й перцентиль, верхние горизонтальные полосы определяют максимальные значения, тогда как нижние горизонтальные полосы определяют минимальные значения

стрирует тромбогенные свойства, так как формируемый им сгусток имеет более тонкие фибриллы и является менее пористым и поэтому менее проницаемым для фибринолитических агентов [25]. В то же время иногда фибриллы фибрина и поры в сгустке, образующемся на основе окисленного фибриногена, не отличаются от фибрилл и пор нативного белка, хотя сгустки демонстрируют меньшую пористость [22]. Окисление белка может оказывать влияние на вторичную и пространственную структуру фибриногена и соответственно влиять на его свойства и поведение.

Анализ полученного препарата с помощью метода спектрофлуориметрии и спектрометрии кругового дихроизма (КД). Были получены спектры эмиссии флуоресценции фибриногена, полученного от двух наборов образцов (группы H и PD). Максимум эмиссии для обеих групп располагался при длине волны 344 нм (рис. 2, *a*), однако интенсивность максимальной внутренней эмиссии в группе PD была снижена на 17 % по сравнению с группой H. Это снижение интенсивности может являться следствием нескольких событий: изменений в химическом микроокружении остатков триптофана (т.е. увеличе-

ния экспонирования остатка триптофана в растворитель вследствие конформационных изменений белка), тушения эмиссии остатка триптофана вновь образованными флуорофорами (вследствие карбонилирования молекулы фибриногена) и/или окисления остатков триптофана [9] и последующей утраты способности вызывать эмиссию флуоресценции после её возбуждения [26, 27].

На основе результатов, полученных при регистрации спектров кругового дихроизма в ультрафиолетовой области (рис. 2, *b* и *c*), были установлены небольшие различия в пространственной и вторичной структуре образцов фибриногена из обеих групп. Наиболее явные различия наблюдали при записи спектров КД в ближнем ультрафиолете.

С помощью программного пакета CDPPro были произведены расчеты, основывающиеся на ограниченном количестве данных. Было получено на основе анализа спектров КД в дальнем ультрафиолете, что содержание α -спирали, доминирующего типа вторичной структуры в молекуле фибриногена, было равно 33% в группе Н и 34% в группе PD. На основе анализа результатов спектрометрии как в дальнем, так и ближнем ультрафиолете (вторичная и пространственная структура белка соответственно) можно предположить, что пространственная структура фибриногена у больных в большей степени изменена по сравнению со вторичной структурой, так как различия в спектрах КД в ближнем ультрафиолете выражены более значительно по сравнению с различиями спектров КД в дальнем ультрафиолете. Также было показано, что как $\text{A}\alpha$ -, так и $\text{В}\beta$ -цепи фибриногена подвержены окислительной модификации. Аминокислотные остатки, которые подвергаются окислению в этих двух типах цепей, располагаются внутри

всех элементов их структуры. В связи с тем, что $\text{A}\alpha$ -цепь особенно подвержена окислению, и в особенности этим отличается её концевой αC -домен, можно предположить, что изменения пространственной структуры фибриногена могут быть вызваны в основном в результате изменений, происходящих в $\text{A}\alpha$ -цепи. Окисление многих аминокислотных остатков в αC -домеях приводит к ослаблению взаимодействий связи αC - αC и, как следствие, к возникновению структурных изменений [28].

Коагуляционный анализ выделенного фибриногена. Результаты определения продолжительности и скорости коагуляции фибриногена в присутствии тромбина свидетельствуют о том, что нет различий между двумя группами, и это можно видеть в табл. 2. Временная диаграмма процесса коагуляции представлена на рис. 3. Скорость коагуляции определяли по углу наклона начальной скорости процесса. Время коагуляции — это время, за которое достигается половина максимальной величины оптического поглощения. Изменения максимального значения оптического поглощения определяли при завершении определения времени и скорости коагуляции. Все три параметра отчетливо показаны на рис. 3.

В предыдущих работах, посвященных изучению процесса коагуляции у больных с ESRD, использовали цельную кровь или плазму [14, 15]. Обычно на основании данных о повышенной концентрации фибриногена делали вывод о том, что такие больные находятся в группе риска образования тромбов [29]. В настоящей работе с использованием одинаковых концентраций выделенного фибриногена из всех тестируемых образцов не было обнаружено значительных различий между параметрами коагуляции в двух изученных группах (у пациентов с ESRD и здо-

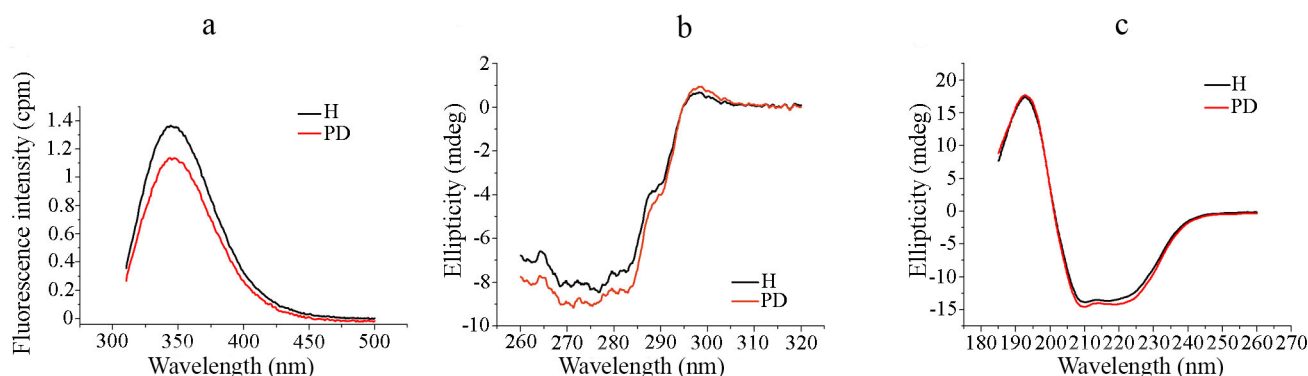


Рис. 2. Структурный анализ фибриногена, полученного от здоровых людей (Н) и больных с ESRD, проходящих процедуру перитонеального диализа (PD), с помощью (а) спектрофлуориметрии, (б) кругового дихроизма в ближнем ультрафиолете и (с) кругового дихроизма в дальнем ультрафиолете. (С цветными вариантами рис. 2 и 3 можно ознакомиться в электронной версии статьи на сайте: <http://sciencejournals.ru/journal/biokhsm/>)

Таблица 2. Коагуляционные свойства фибриногена, выделенного из крови здоровых людей (Н) и больных с ESRD, проходящих процедуру перитонеального диализа (PD)

Параметр коагуляции	Группа Н, $n = 30$	Группа PD, $n = 50$	Различия, величина p
Время коагуляции (s)	51,0 (27,9–77,5)	53,0 (38,4–71,8)	0,857
Скорость коагуляции (ΔА/мин)	0,035 (0,018–0,054)	0,030 (0,010–0,045)	0,389
Изменение максимальной величины оптического поглощения при 350 нм	0,038 (0,026–0,053)	0,038 (0,032–0,057)	0,617

ровых людей). В таком выбранном нами типе эксперимента, не только удалялись различия, которые могли быть связаны с различиями в концентрации белка, но также исключалось влияние других факторов, которые имеются в крови (например, другие компоненты каскада свертывания крови, лекарства и т.д.). Идея нашего исследования заключалась в том, чтобы изучить влияние исключительно фибриногена. Согласно полученным нами результатам, окисленный фибриноген не оказывает прямого влияния на процесс образования фибрина при ESRD. Таким образом, можно предположить, что кроме химических изменений (т.е. окисление и карбамилирование [30]) и модификации структуры фибриногена у больных с ESRD, проходящих процедуру перитонеального диализа, изменения других факторов коагуляции могут действовать синергично, приводя к возможной коагулопатии.

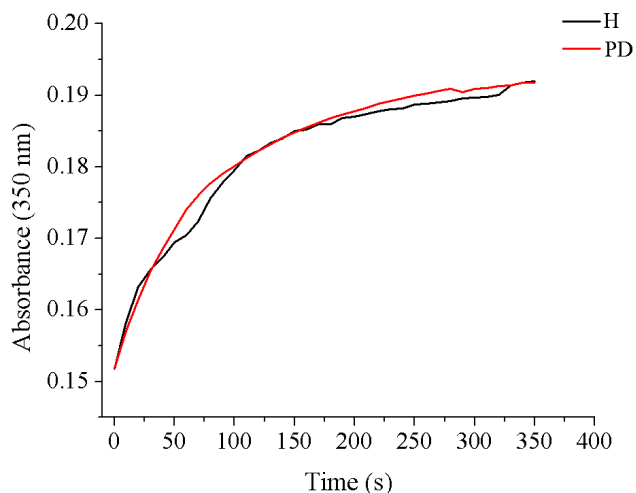
Для изучения структуры фибрилл фибрина, образующихся из выделенного фибриногена,

использовали сканирующую электронную микроскопию. На рис. 4 показаны два репрезентативных примера полученных изображений.

Результаты сканирующей электронной микроскопии соответствуют данным коагуляционного анализа, поскольку на изображениях показаны сходные сгустки в двух группах образцов при условии, что для формирования фибрина были взяты равные количества полученного фибриногена. Известно, что более толстые фибриллы фибрина могут коррелировать с большей пористостью и более быстрым лизисом [22, 31]. Значения максимального оптического поглощения при 350 нм в нашем эксперименте, которые зависят от толщины фибрилл, были идентичны в обеих исследованных группах (табл. 2), и этот результат нашел свое подтверждение при рассмотрении изображений, полученных с помощью сканирующей электронной микроскопии, на которых видны фибриллы фибрина сходной толщины.

Аα- и Вβ-цепи фибриногена являются основными участниками процесса образования фибрина после активации тромбином. После удаления А- и В-пептидов фибрина происходит промежуточное и боковое объединение мономеров фибрина. Далее в латеральную агрегацию мономеров фибрина вносят вклад αС-домены [7]. Интенсивное окисление Аα- и Вβ-цепей, сопровождающееся изменениями во вторичной и пространственной структуре, может влиять на свойства фибрина. Это предположение не было подтверждено в нашей работе, что позволило нам предположить, что модификация молекулы фибриногена и их влияние на эту молекулу являются специфичной для этой патологии. Необходимы дальнейшие исследования на молекулярном уровне для выявления механизмов, которые ответственны за аномалии процесса коагуляции в различных патологиях, ассоциированных с коагуляцией.

В экспериментах с образцами плазмы крови или выделенного фибриногена, полученных от больных с заболеваниями печени, было показа-

**Рис. 3.** Временная диаграмма процесса коагуляции в случае репрезентативных образцов из каждой группы: здоровые люди (Н) и больные с ESRD, проходящие процедуру перитонеального диализа (PD)

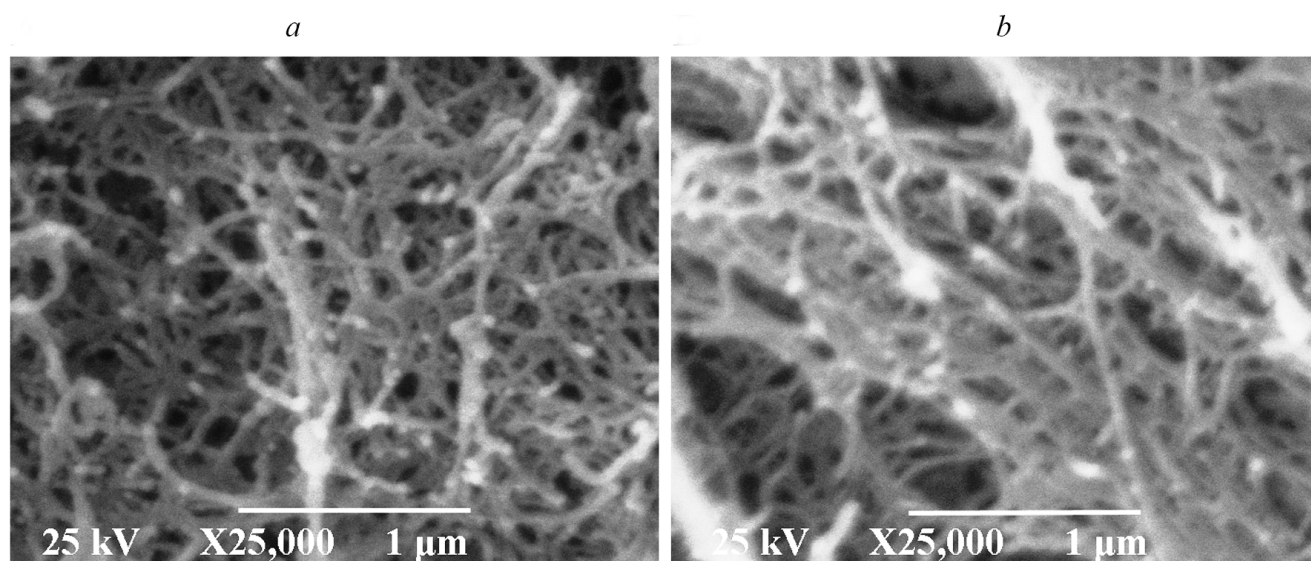


Рис. 4. Репрезентативные изображения, полученные с помощью сканирующей электронной микроскопии (SEM) фибрилл фибрина, образующихся из фибриногена, полученного от (а) здоровых людей и (b) больного с ESRD, проходящего процедуру перитонеального диализа

но, что карбонилированный фибрин способствует созданию более гидрофобного микроокружения, которое приводит к снижению его пористости даже в том случае, когда структура сгустка не изменяется [25]. Это может также быть одним из свойств фибрина у больных с ESRD, у которых фибриноген был в большей степени карбонилирован, однако при этом не происходило значительных изменений в структуре фибрина. Известно, что у больных с хроническими заболеваниями почек карбамиллирование фибриногена приводит к возникновению устойчивости фибрина к деградации, вызванной плазмином, и к снижению его механической стабильности [30]. В настоящий момент не ясна роль каждой из этих химических модификаций в обнаруживаемых изменениях структуры фибриногена. Так как фибриноген очень подвержен окислению [11], и ESRD является состоянием, которое сопровождается повышенным окислительным стрессом, можно предположить, что окисление является основной химической модификацией, ответственной за обнаруженные изменения. Очевидно, что очень сложный комплекс взаимодействий между различными факторами, которые могут иметь измененную концентрацию или структуру, обуславливает осложнения в процессе свертывания крови, наблюдаемую у больных с ESRD, проходящих процедуру перитонеального диализа. Поэтому необходимы дальнейшие исследования в этой области и, в особенности, касательно роли отдельных компонентов этого процесса. Так как ESRD

у некоторых больных сопровождается кровотечением, а у других приводит к тромботическим осложнениям [32], необходимы дополнительные исследования механизмов, приводящих к тому или иному исходу. Полученные нами результаты предоставляют детальные сведения, касающиеся изменений структуры ключевого белка процесса свертывания крови, каким является фибриноген.

Показано, что фибриноген, выделенный из крови больных с ESRD, проходящих процедуру перитонеального диализа, отличается повышенным содержанием карбонильных групп, особенно в его Aα- и Bβ-цепях, и измененной вторичной и пространственной структурой. Время и скорость его коагуляции, а также толщина фибрилл у больных и здоровых людей не различаются, что подразумевает то, что фибриноген, подвергшийся окислительной модификации, не оказывает прямого влияния на скорость образования фибрина. Полученные нами результаты говорят о том, что другие факторы, кроме окисления фибриногена, оказывают влияние на поведение этого белка у больных с ESRD, особенно если принять во внимание тот факт, что при таком патологическом состоянии регистрируются как кровотечения, так и тромбоз.

Финансирование. Работа выполнена при финансовой поддержке Министерства образова-

ния, науки и технологического развития Республики Сербия (грант 173042).

Благодарности. Авторы выражают благодарность проф. Владимиру Павловичу, сотруднику сельскохозяйственного факультета Белградского университета за проведение сканирующей электронной микроскопии и Мирьяне Радомирович, сотруднице химического факультета Белградского университета за проведение спектрофлуориметрического анализа и определение спектров кругового дихроизма.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Соблюдение этических норм. Все процедуры в настоящей работе, выполненные с участием людей, соответствуют этическим стандартам государственного Комитета по этике научных исследований и Хельсинкской декларации от 1964 г. и её последующими изменениями, а также с аналогичными этическими стандартами. От каждого участника этого исследования было получено добровольное информированное согласие.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Silverstein, D. M. (2009) Inflammation in chronic kidney disease: role in the progression of renal and cardiovascular disease, *Pediatr. Nephrol.*, **24**, 1445-1452, doi: 10.1007/s00467-008-1046-0.
2. Xu, H., Cabezas-Rodriguez, I., Qureshi, A. R., Heimbürger, O., Barany, P., Snaedal, S., Anderstam, B., Helin, A. C. B., Carrero, J. J., Stenvinkel, P., and Lindholm, B. (2015) Increased levels of modified advanced oxidation protein products are associated with central and peripheral blood pressure in peritoneal dialysis patients, *Perit. Dial. Int.*, **35**, 460-470, doi: 10.3747/pdi.2013.00064.
3. Huang, M. J., Wei, R. B., Wang, Y., Su, T. Y., Di, P., Li, Q. P., Yang, X., Li, P., and Chen, X. M. (2017) Blood coagulation system in patients with chronic kidney disease: a prospective observational study, *BMJ Open*, **7**, 7-13, doi: 10.1136/bmjopen-2016-014294.
4. Lutz, J., Menke, J., Sollinger, D., Schinzel, H., and Thümel, K. (2014) Haemostasis in chronic kidney disease, *Nephrol. Dial. Transplant.*, **29**, 29-40, doi: 10.1093/ndt/gft209.
5. Liakopoulos, V., Roumeliotis, S., Gorny, X., Eleftheriadis, T., and Mertens, P. R. (2017) Oxidative stress in patients undergoing peritoneal dialysis: a current review of the literature, *Oxid. Med. Cell. Longev.*, **2017**, doi: 10.1155/2017/3494867.
6. Brophy, D. F., Carl, D. E., Mohammed, B. M., Song, J., Martin, E. J., Bostic, J. L., and Gehr, T. W. B. (2014) Differences in coagulation between hemodialysis and peritoneal dialysis, *Perit. Dial. Int.*, **34**, 33-40, doi: 10.3747/pdi.2013.00036.
7. Mosesson, M. W. (2005) Fibrinogen and fibrin structure and functions, *J. Thromb. Haemost.*, **3**, 1894-1904, doi: 10.1111/j.1538-7836.2005.01365.x.
8. Marchi, R., Arocha-Piñango, C. L., Nagy, H., Matsuda, M., and Wiesel, J. W. (2004) The effects of additional carbohydrate in the coiled-coil region of fibrinogen polymerization and clot structure and properties: characterization of the homozygous and heterozygous forms of fibrinogen lima (A α Arg141 $\rightarrow$ Ser with extra glycosylation), *J. Thromb. Haemost.*, **2**, 940-948, doi: 10.1111/j.1538-7836.2004.00730.x.
9. Martinez, M., Weisel, J. W., and Ischiropoulos, H. (2013) Functional impact of oxidative post-translational modifications on fibrinogen and fibrin clots, *Free Radic. Biol. Med.*, **65**, 411-418, doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2013.06.039.
10. Selmeç, L. (2011) Advanced oxidation protein products (AOPP): novel uremic toxins, or components of the non-enzymatic antioxidant system of the plasma proteome? *Free Radic. Res.*, **45**, 1115-1123, doi: 10.3109/10715762.2011.602074.
11. Shacter, E., Williams, J. A., Lim, M., and Levine, R. L. (1994) Differential susceptibility of plasma proteins to oxidative modification: examination by western blot immunoassay, *Free Radic. Biol. Med.*, **17**, 429-437, doi: 10.1016/0891-5849(94)90169-4.
12. Štikarová, J., Kotlín, R., Riedel, T., Suttner, J., Pimková, K., Chrástínová, L., and Dyr, J. E. (2013) The effect of reagents mimicking oxidative stress on fibrinogen function, *Sci. World J.*, **2013**, doi: 10.1155/2013/359621.
13. White, N. J., Wang, Y., Fu, X., Cardenas, J. C., Martin, E. J., Brophy, D. F., Wade, C. E., Wang, X., St. John, A. E., Lim, E. B., Stern, S. A., Ward, K. R., López, J. A., and Chung, D. (2016) Post-translational oxidative modification of fibrinogen is associated with coagulopathy after traumatic injury, *Free Radic. Biol. Med.*, **96**, 181-189, doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2016.04.023.
14. Sjøland, J. J., Sidelmann, J. J., Brabrand, M., Pedersen, R. S., Pedersen, J. H., Esbensen, K., Standeven, K. F., Ariens, R. A. S., and Gram, J. (2007) Fibrin clot structure in patients with end-stage renal disease, *Thromb. Haemost.*, **98**, 339-345, doi: 10.1160/TH06-12-0715.
15. Holloway, S., Vagher, J. P., Caprini, J. A., Simon, N. M., and Mockros, L. F. (1987) Thromboelastography of blood from subjects with chronic renal failure, *Thromb. Res.*, **45**, 817-825, doi: 10.1016/0049-3848(87)90091-0.
16. Levine, B. R. L., Garland, D., Oliver, C. N., Amici, A., Climent, I., Lenz, A., Ahn, B., Shaltiel, S., and Stadman, E. R. (1990) Determination of carbonyl content in oxidatively modified proteins, *Methods Enzymol.*, **186**, 464-478, doi: 10.1016/0076-6879(90)86141-H.
17. Scott, D. J. A., Prasad, P., Philippou, H., Rashid, S. T., Sohrabi, S., Whalley, D., Kordowicz, A., Tang, Q., West, R. M., Johnson, A., Woods, J., Ajjan, R. A., and Ariens, A. S. (2011) Clot architecture is altered in abdominal aortic aneurysms and correlates with aneurysm size, *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.*, **31**, 3004-3010, doi: 10.1161/ATVBAHA.111.236786.
18. Tilley, D., Levit, I., and Samis, J. A. (2011) Measurement of factor V activity in human plasma using a microplate coagulation assay, *J. Vis. Exp.*, **2011**, 2-7, doi: 10.3791/3822.
19. Selmeç, L., Székely, M., Soós, P., Seres, L., Klinga, N., Geiger, A., and Acsády, G. (2006) Human blood plasma advanced oxidation protein products (AOPP) correlates with fibrinogen levels, *Free Radic. Res.*, **40**, 952-958, doi: 10.1080/10715760600818789.
20. Suzuki, Y. J., Carini, M., and Butterfield, D. A. (2010) Protein carbonylation, *Antioxid. Redox Signal.*, **12**, 323-325, doi: 10.1089/ars.2009.2887.
21. Lados-Krupa, A., Konieczynska, M., Chmiel, A., and Undas, A. (2015) Increased oxidation as an additional mechanism underlying reduced clot permeability and

- impaired fibrinolysis in type 2 diabetes, *J. Diabetes Res.*, **2015**, doi: 10.1155/2015/456189.
22. Hugenholtz, G. C. G., Macrae, F., Adelmeijer, J., Dulfer, S., Porte, R. J., Lisman, T., and Ariëns, R. A. S. (2016) Procoagulant changes in fibrin clot structure in patients with cirrhosis are associated with oxidative modifications of fibrinogen, *J. Thromb. Haemost.*, **14**, 1054-1066, doi: 10.1111/jth.13278.
 23. Becatti, M., Marcucci, R., Bruschi, G., Taddei, N., Bani, D., Gori, A. M., Giusti, B., Gensini, G. F., Abbate, R., and Fiorillo, C. (2014) Oxidative modification of fibrinogen is associated with altered function and structure in the subacute phase of myocardial infarction, *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.*, **34**, 1355-1361, doi: 10.1161/ATVBAHA.114.303785.
 24. Undas, A., Kolarz, M., Kopeć, G., and Tracz, W. (2007) Altered fibrin clot properties in patients on long-term haemodialysis: relation to cardiovascular mortality, *Nephrol. Dial. Transplant.*, **23**, 2010-2015, doi: 10.1093/ndt/gfm884.
 25. Lisman, T., Ariëns, R. A. S. (2016) Alterations in fibrin structure in patients with liver diseases, *Semin. Thromb. Hemost.*, **42**, 389-396, doi: 10.1055/s-0036-1572327.
 26. Utrera, M., and Estévez, M. (2012) Analysis of tryptophan oxidation by fluorescence spectroscopy: effect of metal-catalyzed oxidation and selected phenolic compounds, *Food Chem.*, **135**, 88-93, doi: 10.1016/j.foodchem.2012.04.101.
 27. Cao, Y., True, A. D., Chen, J., and Xiong, Y. L. (2016) Dual role (anti- and pro-oxidant) of gallic acid in mediating myofibrillar protein gelation and gel *in vitro* digestion, *J. Agric. Food Chem.*, **64**, 3054-3061, doi: 10.1021/acs.jafc.6b00314.
 28. Rosenfeld, M. A., Vasilyeva, A. D., Yurina, L. V., and Bychkova, A. V. (2018) Oxidation of proteins: is it a programmed process, *Free Radic. Res.*, **52**, 14-38, doi: 10.1080/10715762.2017.1402305.
 29. Blombäck, B., Carlsson, K., Hessel, B., Liljeborg, A., Procyk, R., and Åslund, N. (1989) Native fibrin gel networks observed by 3D microscopy, permeation and turbidity, *Biochim. Biophys. Acta*, **997**, 96-110, doi: 10.1016/0167-4838(89)90140-4.
 30. Binder, V., Bergum, B., Jaisson, S., Gillery, P., Scavenius, C., Spriet, E., Nyhaug, A. K., Roberts, H. M., Chapple, I. L. C., Hellvard, A., Delaleu, N., and Mydel, P. (2017) Impact of fibrinogen carbamylation on fibrin clot formation and stability, *Thromb. Haemost.*, **117**, 899-910, doi: 10.1160/TH16-09-0704.
 31. Li, W., Sigley, J., Pieters, M., Helms, C. C., Nagaswami, C., Weisel, J. W., and Guthold, M. (2016) Fibrin fiber stiffness is strongly affected by fiber diameter, but not by fibrinogen glycation, *Biophys. J.*, **110**, 1400-1410, doi: 10.1016/j.bpj.2016.02.021.
 32. Lu, H. Y., and Liao, K. M. (2018) Increased risk of deep vein thrombosis in end-stage renal disease patients, *BMC Nephrol.*, **19**, 9-14, doi: 10.1186/s12882-018-0989-z.

MODIFICATION OF FIBRINOGEN AND FIBRIN FORMATION IN PATIENTS WITH AN END-STAGE RENAL DISEASE SUBJECTED TO PERITONEAL DIALYSIS

**M. Baralić¹, D. Robajac², A. Penezić², G. Miljuš²,
M. Šunderić², N. Gligorijević^{2*}, and O. Nedić²**

¹ Clinical Centre of Serbia, Department of Nephrology, 11000 Belgrade, Serbia

² Institute for the Application of Nuclear Energy (INEP), Department of Metabolism,
University of Belgrade, 11080 Belgrade, Serbia; E-mail: nikolag@inep.co.rs

Received April 30, 2020

Revised June 14, 2020

Accepted June 19, 2020

An end-stage renal disease (ESRD) is a condition accompanied by increased inflammation, oxidative stress, risk of cardiovascular complications and coagulopathies. The structure of fibrinogen, isolated from plasma samples from ESRD patients on peritoneal dialysis, was investigated in this study, together with characteristics of its fibrin. A higher degree of carbonylation was detected on fibrinogen from patients than from healthy persons. The $\alpha\alpha$ chain was the most susceptible to oxidation, followed by the $B\beta$ chain, whereas the γ -chain was the most resistant. The spectrofluorimetric analysis suggested that additional modification of the amino acid side chains occurred in fibrinogen from patients. The tertiary structure of fibrinogen was more affected than the secondary. The time and the speed (kinetics) of fibrinogen coagulation did not differ between the tested groups. Fibrin prepared from isolated fibrinogen had a similar structure in both groups. Our results confirm that oxidation and structural alterations of fibrinogen occur in ESRD patients on peritoneal dialysis, although direct consequences on fibrin formation were not seen. Taking into account that some patients suffer from bleeding, whereas others develop thrombotic complications, further research on this subject is required to map other involved components and processes which contribute to the outcome.

Keywords: fibrinogen, oxidation, protein structure, coagulation

ЭЛЕКТРИЧЕСКИЕ КАБЕЛИ КЛЕТОК. II. БАКТЕРИАЛЬНЫЕ ЭЛЕКТРОННЫЕ ПРОВОДНИКИ

Обзор

© 2020 В.В. Птушенко^{1,2}

¹ НИИ физико-химической биологии имени А.Н. Белозерского Московского государственного университета имени М.В. Ломоносова, 119992 Москва, Россия; электронная почта: ptush@belozersky.msu.ru

² Институт биохимической физики имени Н.М. Эмануэля РАН, 119334 Москва, Россия

Поступила в редакцию 17.05.2020

После доработки 12.07.2020

Принята к публикации 16.07.2020

Полвека назад была предложена концепция «электрических кабелей» клетки, участвующих в её биоэнергетических процессах [Skulachev, V. P. (1971) *Curr. Top. Bioenerg.*, Elsevier, p. 127–190]. В течение многих десятилетий считалось, что эту функцию выполняют исключительно мембранные структуры клетки, причём только для переноса электрохимического трансмембранного потенциала. Однако в последние десять–пятнадцать лет был обнаружен новый тип «электрических кабелей» живой клетки. В 2005 г. были открыты «нанопровода» (электропроводящие пили) металл- и сульфатредуцирующих бактерий, обеспечивающие протекание электрического тока в масштабах десятков микрометров [Reguera, G. et al. (2005) *Nature*, **435**, 1098–1101]. Ещё через пять лет были открыты бактериальные электрические токи, циркулирующие в пространственных масштабах порядка сантиметров [Nielsen, L. P. et al. (2010) *Nature*, **463**, 1071–1074]. Новая группа бактерий, обеспечивающих протекание электрических токов на макроскопические расстояния, позже получила название «кабельных бактерий». Нанопровода и проводящие структуры кабельных бактерий служат решению специфической задачи мембранной биоэнергетики — задачи соединения двух полуреакций окислительно-восстановительной реакции. Иными словами, в отличие от мембранных «кабелей» функция электрических проводов этого типа — не передача готовой «энергетической валюты», а перенос электронов в ходе её генерации в процессах окислительного фосфорилирования. Наиболее удивительной представляется белковая природа некоторых из обнаруженных бактериальных проводов, на которую указывают последние данные, поскольку о белковых проводах для дальнего транспорта электронов в живых системах ранее не было известно.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: концепция «электрических кабелей» клетки, нанопровода, *Geobacter sulfurreducens*, кабельные бактерии.

DOI: 10.31857/S0320972520080114

ВВЕДЕНИЕ

Основные биоэнергетические процессы клетки связаны с протеканием электрических токов. Как окислительное фосфорилирование, так и фотофосфорилирование включают перенос электронов от восстановителя к окислителю, которые пространственно разделены. С переносом электронов сопряжён перенос протонов через мембрану. В результате трансмембранного переноса протонов возникает трансмембранный протонный электрохимический потенциал ($\Delta\mu_{H^+}$), который вызывает другие ионные токи через мембрану, а также распространяется далее вдоль мембраны. Распространение

$\Delta\mu_{H^+}$ также представляет собой электрический ток, только уже в направлении вдоль мембраны, а не поперёк.

Из перечисленных электрических токов только для последнего, как правило, характерны пространственные масштабы циркулирования порядка микрометров и более. Когда полвека назад В.П. Скулачевым была предложена концепция «электрических кабелей» живой клетки, ответственных за транспорт энергии между пространственно отдалёнными генератором и потребителем [1], она предполагала в качестве электрического тока именно перенос $\Delta\mu_{H^+}$ вдоль мембран. Впоследствии были найдены примеры переноса $\Delta\mu_{H^+}$ на макроскопические расстояния (порядка миллиметров) у бактерий, простейших и животных [2]. Подробное описание зарождения концепции «электрических кабелей» живой клетки, её эксперимен-

Принятые сокращения: $\Delta\mu_{H^+}$ — трансмембранный протонный электрохимический потенциал, ЭТЦ — электрон-транспортная цепь.

тального обоснования и наиболее ярких примеров было приведено в первой части настоящего обзора [3].

Что же касается протонного и электронного токов в дыхательной или фотосинтетической электрон-транспортной цепи (ЭТЦ), то характерные для них пространственные масштабы гораздо меньше. Транспорт электронов с помощью растворимых переносчиков — например, белков пластоцианина или цитохрома *c* — происходит, как правило, в пределах от единиц нанометров в суперкомплексах [4] до единиц микрометров при пространственно разделённых комплексах в тилакоидной мембране [5]. Сопряжённый с ним транспорт протонов происходит на расстояниях порядка толщины мембраны, т.е. единиц нанометров; примерно такое же расстояние типично для переноса электрона на участке ЭТЦ внутри белка [6, 7]. Тем не менее среди всего разнообразия условий обитания живых организмов встречаются и такие, при которых доноры и акцепторы электрона находятся на достаточном удалении друг от друга в окружающей среде, и их использование организмом в энергодонорной окислительно-восстановительной реакции требует ЭТЦ значительно больших пространственных размеров. Такая ситуация возникает, например, при так называемом внеклеточном дыхании, когда конечный акцептор по каким-либо причинам не может быть поглощён клеткой, и его восстановление происходит внеклеточно [8]. Клетка часто решает эту проблему использованием «электронных челноков» — соединений, которые выделяются во внеклеточную среду и могут быть затем окислены конечными неорганическими акцепторами, содержащимися в окружающей среде [9].

Однако в течение последних полутора десятилетий были обнаружены белковые структуры, осуществляющие гораздо более эффективный перенос электронов из клетки во внешнюю среду или вдоль поверхности клеток на значительные расстояния. В 2005 г. были открыты электропроводящие пили у некоторых металл- и сульфатредуцирующих бактерий, передающие электрический ток на расстояния порядка единиц—десятков микрометров [10]. Здесь необходимо сказать о правомерности использования термина «пили», который традиционно использовали для обозначения разнообразных нитевидных придатков на поверхности бактерий и архей. Название клеточной структуры дало название одному из составляющих её белков — пилину. Однако в настоящее время в терминологии возникает обратное движение: термин «пили» предлагается использовать исключительно

для придатков, построенных из пилина. В то же время электропроводящие нитевидные придатки бактериальной клетки могут обладать различной химической природой. В данной статье для внеклеточных электрически проводящих филаментов мы используем термин «нанопровода», введенный Regula et al. [10], а также «пили-подобные придатки». Однако термин «пили» также широко используется в данной статье в своём традиционном значении — в качестве общего термина для нитевидных выростов на поверхности клетки.

Через пять лет, в 2010 г., были открыты бактериальные электрические токи, циркулирующие в пространственных масштабах порядка сантиметров [11]. Позже была открыта новая группа бактерий, обеспечивающих протекание этих электрических токов на макроскопические расстояния [12], которая получила название «кабельные бактерии» [13]. Эти открытия необычайно расширили концепцию «электрических кабелей» клетки. В настоящей статье кратко описана история открытия нанопроводов и электропроводящих филаментов кабельных бактерий и приведены данные об их функционировании и строении у разных организмов.

ОТКРЫТИЕ БАКТЕРИАЛЬНЫХ НАНОПРОВОДОВ

Представления о «живых проводах» в последние полтора десятилетия получили развитие с неожиданной стороны — не из биоэнергетики, а со стороны биогеохимии и микробиологии. Две проблемы явились катализаторами поисков, которые привели к открытию нового типа биологических «электрических кабелей»: участие в метаболизме микроорганизмов нерастворимых соединений, содержащихся в окружающей среде, и биогеохимия донных отложений.

Исследования метаболизма металл- и сульфатвосстанавливающих бактерий обнаружили их удивительную способность: восстанавливать ионы металлов (железа или марганца) независимо от того, присутствуют ли они в среде в виде растворимых или нерастворимых соединений (нерастворимые соединения, образующие агрегаты или микрокристаллы, не могут быть поглощены клеткой и непосредственно взаимодействовать с дыхательной цепью). Электронно-микроскопические исследования показали, что во втором случае (при наличии в среде лишь нерастворимых соединений металла) клетки образуют длинные тонкие выросты — пили, выходящие за пределы клетки и имеющие, как мини-

мум, сопоставимые с ней размеры, т.е. порядка микрометров [10] или даже десятков микрометров [14] (рис. 1). Идея о том, что эти нитевидные образования могут служить «проводами» (nanowires) для переноса электронов от дыхательной цепи клетки к внеклеточным окислителям — частицам оксида металла — довольно быстро получила первые подтверждения в экспериментах с мутантами, не образующими пили и одновременно потерявшими способность к восстановлению оксидов металла [10].

Осуществлённые в последнее время прямые измерения электрической проводимости изолированных нанопроводов показали значения от 51 мСм/см при нейтральных pH [17] до 1,4–4,3 См/см для *Geobacter sulfurreducens* [18] (бактерия, у которой нанопровода были впервые открыты и наиболее изучены; приведённый диапазон значений соответствует сопротивлению 730 МОм вдоль нанопровода длиной 1 мкм и вызван неопределённостью его диаметра, использованного для расчётов: 2 нм или 3,5 нм по данным для иммобилизованного филамента или находящегося в растворе) и 277 См/см для нанопроводов *Geobacter metallireducens* [16].

Для иллюстрации этих данных можно сказать, что проводимость 1,4–4,3 См/см способна обеспечить скорость переноса электронов единичной пилей длиной 1 мкм $\sim 9 \times 10^8$ электронов в секунду (150 нА) при разумной разности потенциалов в 100 мВ, что на два порядка превышает фактическую скорость восстановления нерастворимого оксида железа (III) клеткой ($\sim 9 \times 10^6$ электронов в секунду на одну клетку) [18]. Примечательно, что этот механизм электронной проводимости обеспечивает величину силы тока, сравнимую с той, которая характерна для переноса энергии $\Delta\mu_{H^+}$ вдоль цианобактериального трихома (50 пА или 3×10^8 элементарных зарядов в секунду) [19].

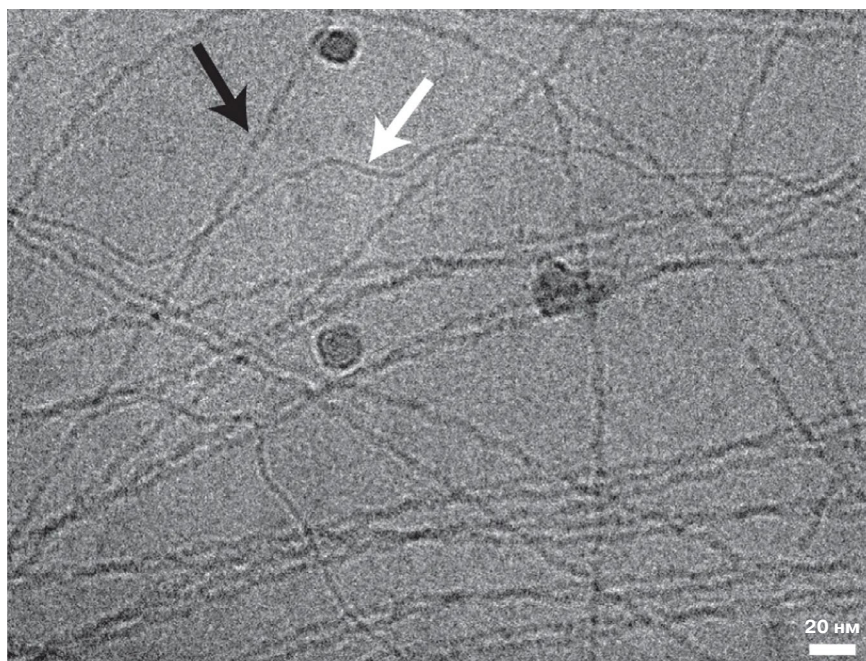
В целом, для результатов измерений проводимости бактериальных проводов характерна значительная вариабельность, что, вероятно, обусловлено их неоднородностью, которая может быть существенна для проводимости в наномасштабах [20]. У бактерии *Shewanella oneidensis* более крупные пили-подобные придатки имели проводимость в диапазоне от 60 мСм/см до 1 См/см ([21]; см. также анализ в статье Tan et al. [20]), однако они представляли комплекс белка с липидами, что дополнительно затрудняет стандартизацию исследуемого материала.

Однако ещё более впечатляющее открытие принесло изучение биогеохимических окислительно-восстановительных процессов в донных отложениях. Группа исследователей из Дании и Японии обнаружила необычное окисление со-

державшегося в донных осадках сероводорода. Удивительным было то, что окисление сероводорода наблюдалось в анаэробной области донных отложений, отделённой от доступа кислорода сантиметровым слоем осадка, исключавшим сколь-либо заметную диффузию кислорода к месту реакции [11]. Протекание окислительно-восстановительной реакции в этом случае можно было объяснить наличием электрического тока, пересекающего толщу осадка и связывающего две пространственно-разнесённые электродные полуреакции — окисление сероводорода в глубине и восстановление кислорода на поверхности осадка. Это открытие возрождало гипотезу о природных электрических токах в поверхностных слоях литосферы и о так называемых «геобатареях», существовавшую в геофизике с 1960-х гг. Эта гипотеза была высказана Sato и Mooney [22] для объяснения аномалий спонтанного потенциала поверхности Земли и предполагала роль в их образовании электрохимических процессов в земной коре, подобных процессам в гальванической ячейке. При этом пласты земной поверхности с относительно высокой электронной проводимостью могли бы соединять области с различным окислительно-восстановительным потенциалом [23].

Исходная модель геобатареи предполагала крупномасштабные (порядка сотен метров–километров) электрохимические системы, в которых высокая электрическая проводимость области, связывающей «анодную» и «катодную» зоны литосферы, была обусловлена соответствующей минерализацией [23]. Позже был предложен биогеохимический вариант этой модели — биогеобатарея, в которой различие в электрохимических потенциалах анодной и катодной областей создавалось за счёт жизнедеятельности бактерий, а проводимость разделяющего их слоя обеспечивали биоплёнки и осаждённые металлические частицы [24]. В случае же, обнаруженном группой Nielsen et al. [11], как оказалось, не только обе электродные реакции, но и электрический ток между областями их протекания обеспечивали бактерии. Как выяснилось, это были длинные нитчатые многоклеточные бактерии [12], содержащие тысячи клеток и имеющие длину порядка сантиметров [25]. Данные электронной микроскопии показали, что вдоль поверхности клеток тянутся длинные тяжи диаметром ~ 50 нм [26], уложенные параллельно оси многоклеточной бактериальной нити, как натянутые струны вдоль грифа, и занимающие почти всю её поверхность [12]. Эти тяжи расположены в периплазматическом пространстве и «укутаны» внешней мембраной; причём они не прерываются и в межклеточной

a



б

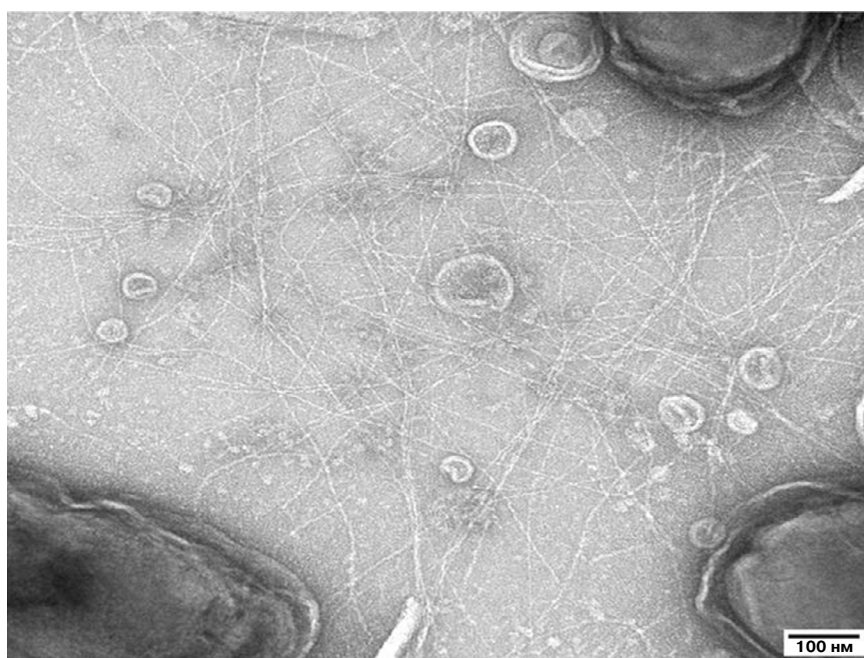


Рис. 1. *a* – Пили, изолированные из *G. sulfurreducens*, масштабный отрезок – 20 нм, криоэлектронная микроскопия, адаптировано по [15]. *б* – Клетки штамма *G. sulfurreducens*, продуцирующие пили *G. metallireducens*, масштабный отрезок – 100 нм, просвечивающая криоэлектронная микроскопия, адаптировано по [16]

области, связывая между собой таким образом все клетки (рис. 2). Уже с самого начала после их обнаружения было высказано предположение, что эти тяжи и служат теми электрическими

проводами клетки, по которым она передаёт электроны через толщу донного осадка. При этом плотно окружающая их внешняя мембрана играет роль изолятора [12].

a

Интактный
бактериальный филамент

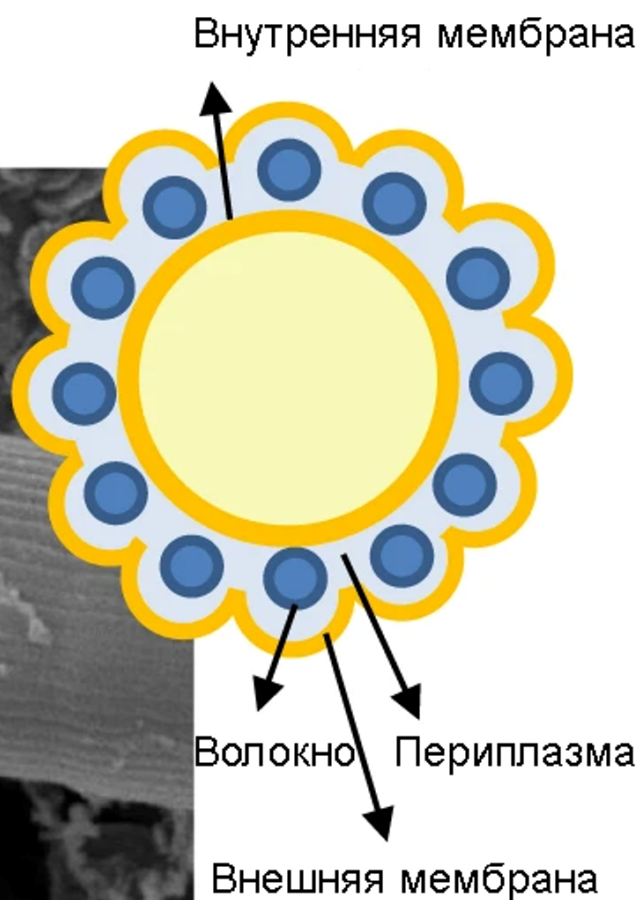
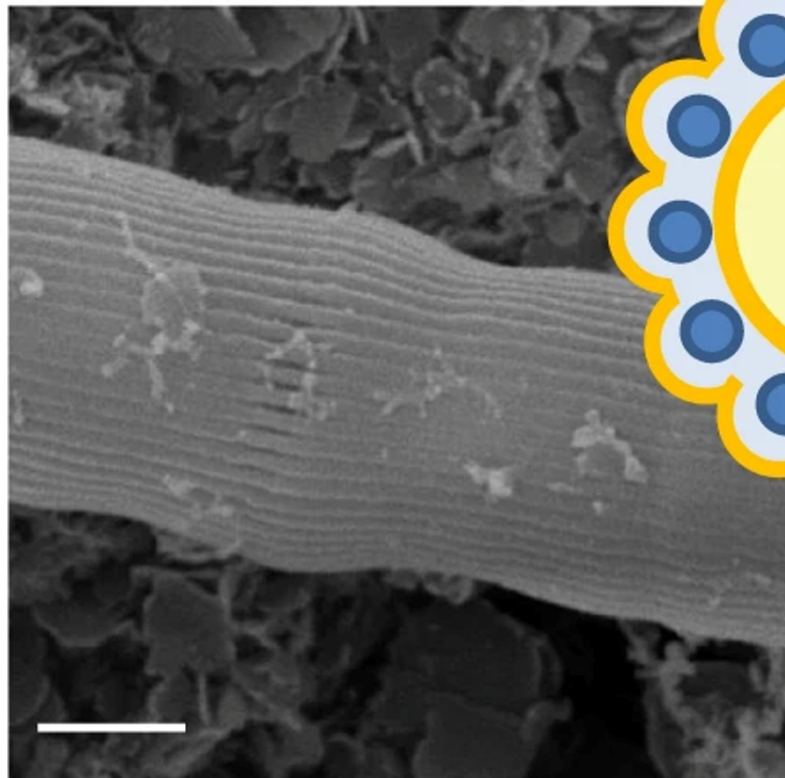
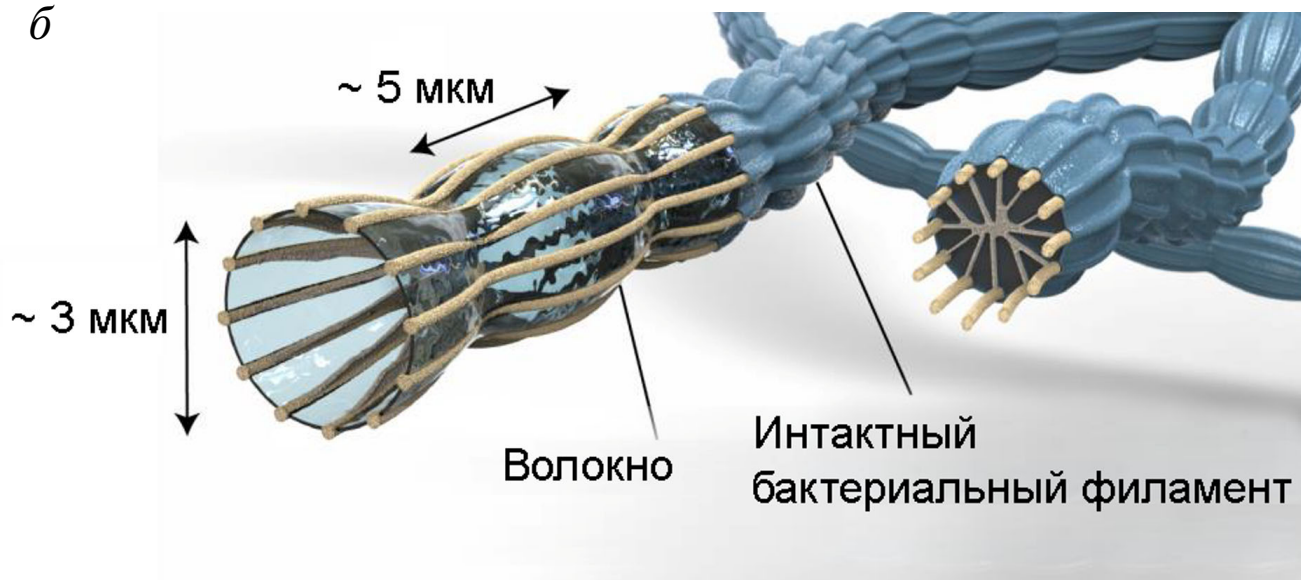
*б*

Рис. 2. Строение филамента кабельной бактерии (семейство *Desulfobulbaceae*). Интактный филамент (сканирующая электронная микроскопия, масштабный отрезок – 1 мкм), схематичное изображение поперечного сечения филамента (*a*) и филамента в целом (*б*). Адаптировано по: (*a*) – [27]; (*б*) – [28]. (С цветными вариантами рис. 2–4 можно ознакомиться в электронной версии статьи на сайте: <http://sciencejournals.ru/journal/biokhsm/>.)

СТРУКТУРА ЭЛЕКТРОПРОВОДЯЩИХ БАКТЕРИАЛЬНЫХ ОБРАЗОВАНИЙ

При всей значимости микробиологического, экологического и биогеохимического аспектов этих открытий наиболее интригующим выглядит механизм электрической проводимости нанопроводов. Можно предполагать, что у нанопроводов, образуемых разными бактериями, есть много общего. При кардинальном различии в длине (десятки микрометров для нанопроводов и десятки миллиметров для кабельных бактерий) поперечные размеры этих структур близки: периплазматические волокна кабельных бактерий имеют диаметр 50 нм [26], поперечный размер пили-подобных придатков *S. oneidensis* также был оценен в десятки нанометров (50–150 нм) [14]. Диаметр пилей *G. sulfurreducens* существенно меньше (3 нм), а для мутанта с модифицированным пилином — всего 1,5 нм [20]. Однако на электронно-микроскопических изображениях выростов *S. oneidensis* в местах их обрыва были видны слагающие их отдельные тонкие волокна диаметром 3–5 нм [14], т.е. близкие к размерам пилей *G. sulfurreducens*.

На этом, однако, известные нам сведения о сходстве и различии этих проводящих систем практически заканчиваются. Кабельные бактерии пока не удаётся культивировать в чистой культуре, для них получены лишь черновые геномные последовательности (draft genomes) на основании метагеномных данных и геномики отдельных бактериальных филаментов [25]. На основании анализа последовательностей генов диссимиляционной сульфитредуктазы и 16S рРНК индивидуальных филаментов был выполнен филогенетический анализ и предложены два кандидатных рода, относящихся к семейству сульфатредуцирующих и серо-диспропорционирующих протеобактерий Desulfobulbaceae: *Candidatus Electrothrix*, содержащий четыре преимущественно морских кандидатных вида, и *Candidatus Electronema* с двумя преимущественно пресноводными кандидатными видами [29]. На основании электронно-микроскопических, неполногеномных и метапротеомных данных и по аналогии с бактериями, образующими электропроводящие пили, было высказано предположение, что нанопровода у кабельных бактерий образованы пилином (PilA), который является наиболее распространённым белком у изученных кабельных бактерий [25]. При этом предполагается, что пилин мог бы образовывать пили-подобные тонкие (3–5 нм) нити, которые, в свою очередь, сплетаются в электропроводящие волокна, расположенные в периплазме. В качестве альтернативной гипотезы предполагались

«бусы» из пилина или цитохрома, нанизанных на углеводную нить [25].

Однако существующие представления о структуре электропроводящих пилей металл- и сульфатредуцирующих бактерий, на которые опираются гипотезы о химической природе нанопроводов кабельных бактерий, в действительности не вполне надёжны. До сегодняшнего дня они являются предметом интенсивных исследований и постоянно сменяющих друг друга теорий. Так, для бактерии *G. sulfurreducens*, у которой впервые обнаружили электропроводящие пили, предполагали, что их образует белок пилин — продукт гена *pilA* [10]. На это указывали результаты делеции гена *pilA* из генома *G. sulfurreducens* — клетки оказывались неспособными формировать пили и восстанавливать оксид железа. В то же время вставка функциональной копии гена *pilA* в геном *pilA*-дефицитного мутанта восстанавливала эту способность [10]. Представление о пилине (конкретно, пилине типа IV), как белке, формирующем пили, было естественно также в силу того, что оно было хорошо известным фактом для других бактерий [30, 31], хотя геопилины (пилины бактерий рода *Geobacter*) и отличались довольно существенно от соответствующих пилинов (пилинов типа IV). Для протеобактерии *S. oneidensis* MR-1, образующей пили-подобные электропроводящие придатки, также было показано участие в образовании пилей продуктов гена *pilA*, наряду с псевдопилинами (*gspG*) и манноза-чувствительными гемагглютинидами (*mshA*) [14]. Однако наряду с пилином в качестве обязательного компонента для переноса электрона по нанопроводам также с самого начала рассматривались цитохромы. Так, шести- и четырёхгемовый цитохром с внешней мембраны *G. sulfurreducens*, OmcS и OmcE, экспрессировались только при наличии в среде нерастворимого оксида железа (III) (но не растворимого цитрата!) и были необходимы для его восстановления [32] — т.е. проявляли те же особенности образования и функционирования в клетке, что и пили. Позже для OmcS также было показано, что этот белок связан с пилиями и располагается вдоль них кластерами [33], а другие мультигемовые цитохромы также оказались либо секретируемыми во внешнее пространство и слабо связанными с наружными клеточными образованиями, как OmcZ [34], либо связанными с внешней мембраной и экспонированными наружу, как OmcB [35] или OmcE [36]. У *S. oneidensis* проводимость пили-подобных придатков существенно падала при делеции генов десятигемовых цитохромов MtrC и OmcA [14]. Наконец, были получены данные, свидетельствующие, вопреки представлениям предшествующих

восьми лет исследований, что эти придатки у *S. oneidensis*, по-видимому, никак не связаны с пилином, а являются выростами периплазматического пространства и внешней мембраны, содержащей целый ряд мультигеновых цитохромов (MtrC, OmcA, MtrA, MtrB) [37].

МЕХАНИЗМЫ ЭЛЕКТРОПРОВОДИМОСТИ НАНОПРОВОДОВ

В связи с приведёнными выше данными о строении нанопроводов возникли две альтернативные гипотезы механизма переноса по ним электрона: гипотеза металлоподобной проводимости [38] и гипотеза, основанная на суперобменном взаимодействии редокс-кофакторов [39]. В соответствии с первой из них перенос электрона происходит по системе остатков ароматических аминокислот белка пилина в предположении, что ароматические кольца уложены в белке параллельно друг другу, и π -системы соседних колец перекрываются. Проводимость пилей в этом случае аналогична проводимости полимеров полианилина или полипиррола. При этом молекулы цитохрома, ассоциированные с пиями, осуществляют непосредственный перенос электронов от пилей к металлу [40] либо к пиям от дыхательной цепи [36]. Суперобменная теория, наоборот, предполагает активное участие цитохромов в переносе электрона вдоль пили за счёт последовательных «перескоков» электрона между соседними гемами. Таким образом, две изначальные альтернативные гипотезы различались как по предполагаемому физическому механизму проводимости, так и по представлениям о роли разных белков в её обеспечении.

В поддержку «пилиновой/ароматической» гипотезы был получен ряд разнообразных данных: (1) мутации по ароматическим остаткам, т.е. снижающие их количество, приводили к снижению проводимости пилей [18, 41]; (2) мутации, заменяющие фенилаланин и тирозин на обеспечивающий более высокую проводимость триптофан, наоборот, увеличивали проводимость [20]; (3) сопоставление природных пилинов из разных видов рода *Geobacter* показывало сильную экспоненциальную зависимость между содержанием в них ароматических остатков и проводимостью пилей, образуемых бактериями (рост проводимости в 10^5 раз при удвоении содержания ароматических остатков в PilA [16]; рис. 3); (4) зависимость способности образовывать пили и восстанавливать нерастворимые соединения металла у бактерий от наличия активного гена пилина *pilA*, о чём уже упоминалось

выше [10]. Наконец, (5) были получены генно-инженерные пили, которые демонстрировали проводимость, сопоставимую с проводимостью природных пилей (сопротивление рекомбинантного белкового провода длиной 6 мкм составляло ~900 МОм, в то время как для природной пили в том же исследовании была получена величина 925 МОм [42]).

За «цитохромно/суперобменный» механизм говорили данные о том, что наличие наиболее массовых цитохромов клетки, для которых предполагалась связь с пиями, критично для проводимости как пилей, так и биоплёнок, формируемых бактериями [14, 21, 43]. Правда, в части работ были получены противоположные результаты — сохранение или даже увеличение проводимости пилей и биоплёнок, образуемых бактериями с инактивированными цитохромами [38], а также отсутствие положительной корреляции (или отрицательная корреляция) между содержанием цитохромов и проводимостью у разных штаммов [44]. Ещё на один существенный недостаток суперобменной гипотезы указывали теоретические модели переноса электрона: слишком малое расстояние (не более 1 нм) между соседними гемами и предельно малые значения энергии реорганизации переноса электрона, необходимые для достижения экспериментально наблюдаемой силы тока [45]. При этом фактическое расстояние между соседними молекулами цитохрома OmcS, которое было оценено по данным электронной микроскопии с окрашиванием антителами, конъюгированными с коллоидным золотом, составляло 30 нм в кластерах и 100–200 нм между кластерами ([33]; см. также анализ в статье Malvankar et al. [44]), т.е. намного больше требуемых величин. Тем не менее и здесь теоретические оценки, сделанные разными группами, существенно расходились между собой, и некоторые из них предсказывали значения силы тока, которые могут быть обеспечены суперобменным механизмом при вполне реалистичных параметрах редокс-реакций и плотностях расположения гемов вдоль длины пили, близкие к наблюдаемым [39].

В свете этих дискуссий, в ходе которых был получен огромный массив результатов, совершенно неожиданными оказались недавно полученные структурные данные. Как показали данные криоэлектронной микроскопии, нанопровода *G. sulfurreducens* образованы не пилином, а шестигемовым цитохромом *c* — OmcS [15, 46]. Иными словами, молекулы цитохрома не связываются с поверхностью пилей, образованных пилином, как предполагалось ранее, а сами образуют нанопровода (рис. 4). При этом гемы шестигемовых цитохромов образуют непрерыв-

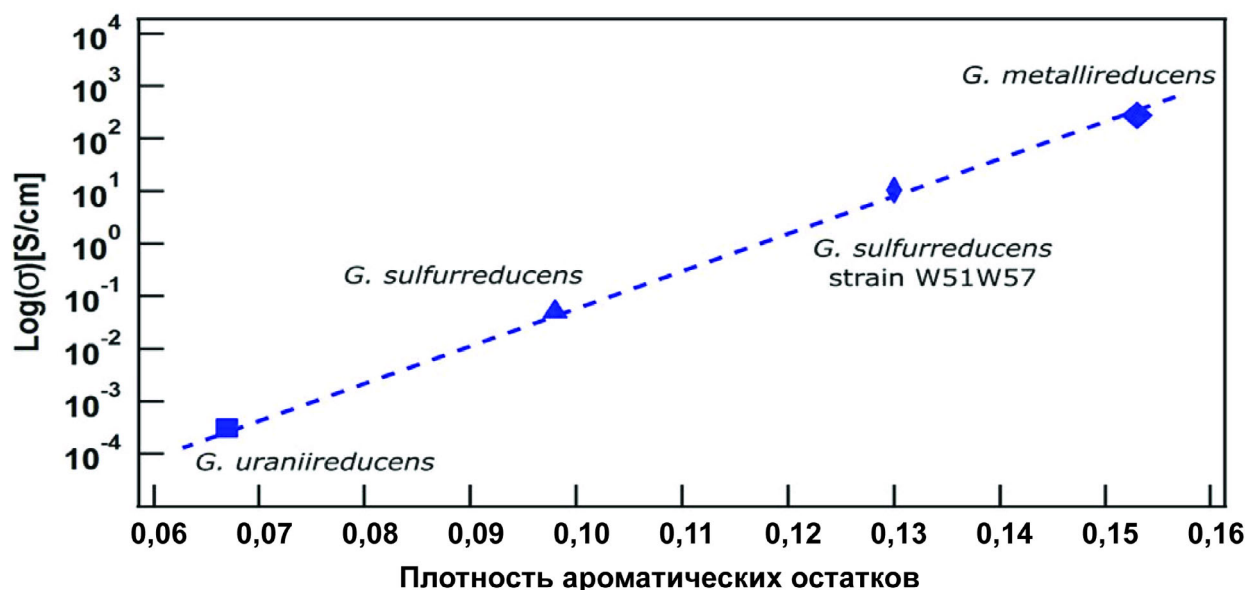


Рис. 3. Корреляция между содержанием ароматических аминокислотных остатков в PilA и проводимостью индивидуальной пили при pH 7. Каждая точка соответствует мутантному (W51W57) или одному из природных пилинов, принадлежащих бактериям *G. metallireducens*, *G. sulfurreducens* или *Geobacter uraniireducens*, адаптировано по [16]

ную цепь с расстояниями между соседними гемами не более 0,41 нм. Тем самым внутри белка образуется проводящий канал, и в наблюдаемой картине фактически совмещаются основные представления двух разных исходных гипотез о механизме переноса электрона.

Эта изящная картина, однако, порождает много вопросов о том, как интерпретировать те разнообразные данные, которые ранее рассматривались в качестве несомненных свидетельств в пользу «пилиновой» и против «цитохромной» модели. В первую очередь это относится к данным, полученным на мутантах с инактивированными пилинами или цитохромами: почему первые из них теряли способность образовывать нанопровода, а вторые, наоборот, сохраняли её? Одно из возможных объяснений заключается в том, что инактивация гена цитохрома OmcS приводит к повышению уровня экспрессии другого мультигенового цитохрома, OmcZ, гиперпродукция которого могла бы скомпенсировать отсутствие OmcS. Что же касается пилина PilA, то его в рамках новых представлений предполагают компонентом секреторной системы клетки, от которого зависит сборка электропроводящих цитохромных нанопроводов. При этом процесс сборки и конечная конформация нанопроводов каким-то образом меняются при точечных мутациях в пилине [46]. Можно также предположить, что электронная проводимость нанопровода не является лимитирующим фактором для скорости протекания окислительно-восстано-

вительной реакции в целом. При таком объяснении, однако, остаётся загадкой идеальная экспоненциальная зависимость проводимости пилей от содержания ароматических остатков в пилине, показанная на рис. 3 [16]. Наконец, нельзя исключить возможность сосуществования в клетке нанопроводов различного типа, в частности, образованных пилином или цитохромом. Однако в связи с этим возникает вопрос: почему клетке необходимо иметь несколько различных структур для обеспечения одной и той же функции? Возможно, нынешний поворот в наших представлениях о природе бактериальных нанопроводов не последний, и у пилина найдётся ещё какая-то функция, кроме секреторной, которая даст более логичное объяснение найденным ранее зависимостям проводимости пилей от присутствия в клетках пилина и его молекулярного строения (содержания ароматических групп в белке).

Отметим ещё один вопрос, возникающий в связи со структурой нанопроводов — проводов без изоляции. Каким образом возможно функционирование проводов без электрической изоляции в высокопроводящей среде, каковой является морская вода? Как видно из структурных данных, цитохромный нанопровод представляет собой чисто белковую структуру, не имеющую мембранной «оплётки». При этом расстояние от гемов до границы белок–вода сравнимо с расстояниями между соседними гемами. Следовательно, можно ожидать, что токи «утечки» через

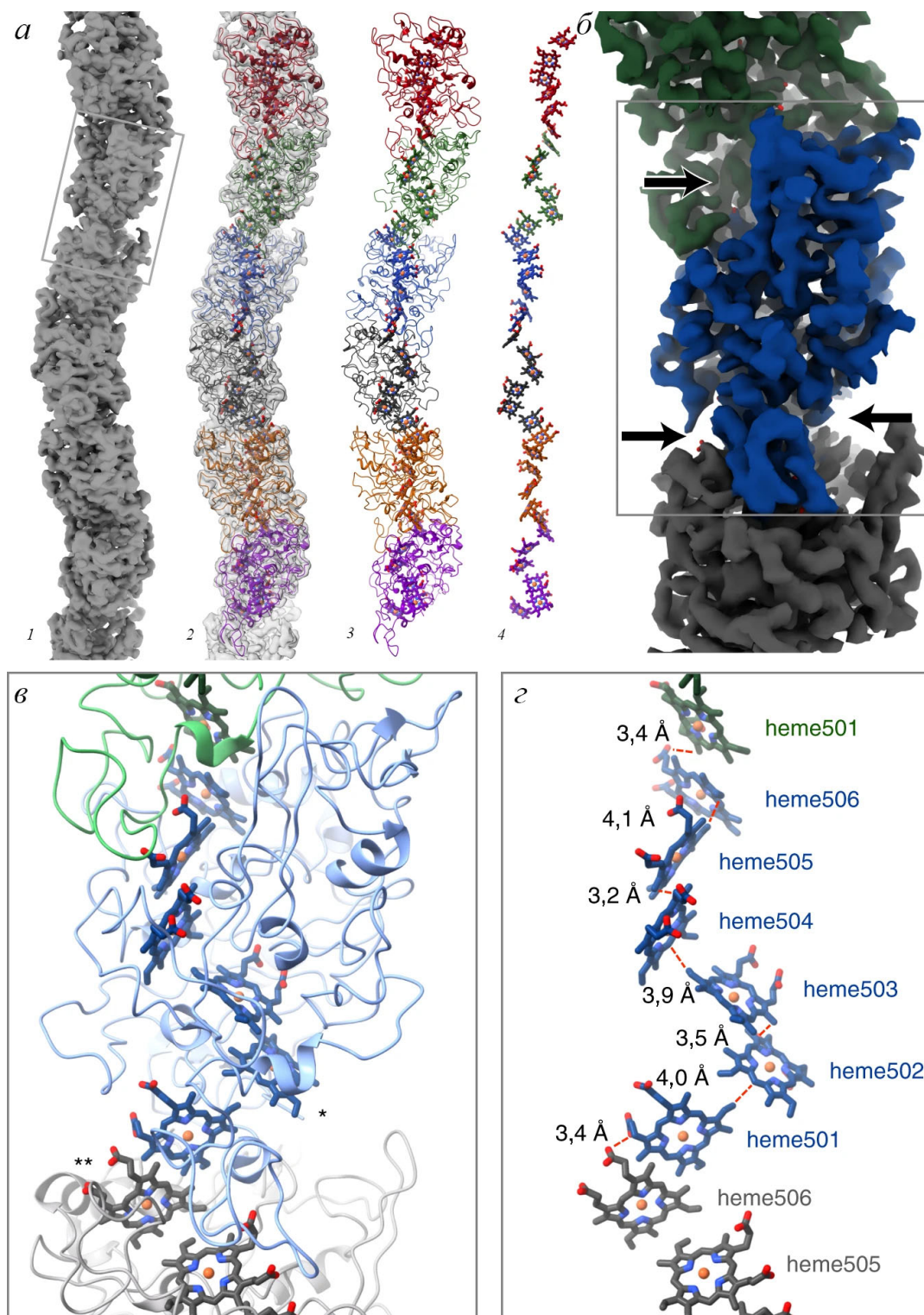


Рис. 4. Строение нанопровода металл- и сульфатредуцирующих бактерий *G. sulfurreducens* по данным криоэлектронной микроскопии. *a* – Визуализация поверхности пили (1), контуров поверхности с наложением атомной модели белка (2), атомной модели, включающей пептидную цепь белка и гемы (3), а также только гемы (4). *б* – Визуализация поверхности короткого участка пили, синим цветом выделена одна субъединица цитохрома OmcS, стрелки указывают её области контакта с соседними субъединицами. *в* – Атомная модель, показывающая укладку пептидной цепи вокруг гемов; звездочками указаны гемы, экспонированные в водную фазу: heme502 (*) и heme506 (**) соседних субъединиц. *г* – Атомная модель гемов, расположенных в соседних субъединицах цитохрома OmcS вдоль длины филамента; указаны кратчайшие расстояния (edge-to-edge) между соседними гемами. Адаптировано по [15]

боковую поверхность нанопровода будут значительны, и поддержание движения электронов вдоль нанопровода будет затруднено. Таким образом, функционирование подобной белковой структуры в качестве электрического провода на первый взгляд может показаться невозможным в электропроводящей среде. Однако, по-видимому, здесь мы сталкиваемся с тем случаем, когда недостаток конструкции оказывается её достоинством в силу её физиологических функций. Поскольку задача нанопровода — сбросить электрон на какой-либо экзогенный акцептор, то «утечка» электронов с него вполне отвечает его задаче. Более того, в условиях, при которых клетка образует электропроводящие пили, можно говорить скорее о дефиците акцепторов электрона в среде. Напомним, что когда подходящие акцепторы (растворимые соединения ионов переходных металлов) присутствуют в среде, бактерии не образуют электропроводящие пили [10].

В завершение этого раздела вернёмся к кабельным бактериям, которые пока остаются менее изученными, чем описанные выше пили-образующие бактерии. Как показывают последние данные [27], сопротивление одной клетки в составе всей нити составляет ~ 5 кОм. Если оценивать проводимость индивидуальных периплазматических волокон (которых, в зависимости от размеров клеток, может содержаться несколько десятков в одном филаменте), то она составляет в физиологических условиях ~ 20 См/см, т.е. приближается к той, что наблюдается для наиболее высокопроводящих пилей *G. metallireducens*. При этом длина волокна на три порядка превосходит длину пилей. Величина тока, который течёт через филамент при напряжениях, характерных для физиологических условий, может составлять до десятков наноампер, а для одного волокна она оценена в 1,3 нА ($\sim 8 \times 10^9$ электронов в секунду). При этом температурная зависимость проводимости соответствует закону Аррениуса, что характерно для полупроводников, но не для металлов, и исключает механизм металлоподобной проводимости [28].

Падение напряжения вдоль волокна в интактных клетках в условиях, близких к естественным, было оценено в 14 ± 4 мВ/мм. Даже для относительно короткого волокна длиной 20 мм это соответствует падению напряжения до 0,3 В, т.е. полные резистивные потери в нанопроводе достаточно велики (сравнимы с теоретическим пределом падения электрохимического потенциала при окислении сероводорода, ~ 1 В) [47], хотя при уменьшении силы электрического тока через бактериальный филамент они также

должны снижаться. Интересно сравнить эти величины с аналогичными величинами, характерными для переноса энергии $\Delta\mu_{H^+}$ вдоль цианобактериальных трихомов. Для цианобактерий типичные значения электрического тока составляли ~ 50 пА (3×10^8 элементарных зарядов в секунду) [19], а характерное расстояние, на котором происходит потеря 50% энергии, было теоретически оценено на основе данных о геометрии трихома и электрической проводимости мембраны и цитоплазмы, как ~ 7 мм [48]. Таким образом, механизм электронной проводимости у кабельных бактерий, по-видимому, превосходит механизм переноса энергии $\Delta\mu_{H^+}$ вдоль цианобактериального трихома как по величине проводимого электрического тока (десятки наноампер для кабельных бактерий [27] и 50 пА — для цианобактерий [19]), так и по дальности переноса энергии, ограниченной электрическими потерями.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Представление об «электрических кабелях», связывающих биоэнергетические процессы в разных частях живой клетки или надклеточной системы, появилось полвека назад и было связано с развитием мембранной биоэнергетики — научной дисциплины, формировавшейся в тот момент и вступавшей в период особенно интенсивного развития. Это представление было связано, прежде всего, с мембранами как структурами, обеспечивающими распространение электрического тока, и с ионами, создающими трансмембранный электрохимический потенциал, как его носителями. Электрический ток, в котором носителями являются электроны, а средой — белки, также всегда был одним из главных объектов исследований биоэнергетики, однако воспринимался в основном как «локальный», существующий в масштабах нанометров в пределах отдельных белковых комплексов. Открытие в последние полтора десятилетия бактериальных «нанопроводов» и проводящих волокон кабельных бактерий, имеющих, по-видимому, белковую природу и осуществляющих перенос электронов на расстояния в микрометровой и даже сантиметровой шкале, необычайно расширили концепцию «электрических кабелей» в живых системах. Мы пишем «по-видимому», так как исследования бактериальных электронных проводников происходят интенсивно и постоянно приносят новые данные, порой резко меняющие представления, которые успели о них сложиться за предшествующие десять—пятнадцать лет. Так, пили-подобные придатки

S. oneidensis оказались в итоге мембранными образованиями [37]. Какую роль играет в этом случае мембрана — только ли «чехла» для всей структуры, предохраняющего её от потери растворимых компонентов, или носителя мембранных белков, или же обладает также свойствами сопрягающей мембраны — вопрос пока открытый. Что же касается проводящих структур кабельных бактерий, то для них показана тесная связь с внешней мембраной бактериальных клеток, которая «укутывает» каждое из отдельных волокон по всей его длине [26]. Служит ли при этом мембрана лишь «оплёткой», изолирующей белковое волокно от растворённых в среде ионов, или же сама принимает какое-то участие в передаче электрического тока — также вопрос будущих исследований.

Однако что ясно уже сейчас и что является наиболее существенным элементом картины — широкая распространённость, практически универсальность «электрических кабелей» среди живых организмов. Мембранные кабели (или сети) оказались характерными как для многих тканей животных организмов, так и для цианобактерий, простейших и растений, хотя пространственные масштабы циркулирования электрических токов во всех этих случаях могут быть разные. Бактериальные электронные проводники также не ограничиваются лишь узкими группами металл-, сульфатредуцирующих и «кабельных» бактерий. Так пили-подобные образования, связывающие между собой несколько клеток, оказались характерными для разных групп бактерий. Они были обнаружены у цианобактерий *Synechocystis* PCC6803 [14] и у грамположительных пропионат-окисляющих бактерий *Pelotomaculum thermopropionicum* [49]. Более того, оказалось, что подобные структуры могут связывать клетки разных видов, даже предельно отдалённых друг от друга — например эубактерии

P. thermopropionicum и архебактерии *Methanothermobacter thermautotrophicus* [49]. Связывать клетки бактерий разных видов могут и сугубо белковые пили, например в смешанной культуре *G. metallireducens* и *G. sulfurreducens*; явление, обеспечиваемое такими связями, получило название прямого межвидового переноса электронов (direct interspecies electron transfer) [50]. Даже эти немногие примеры дают основание ожидать в скором времени существенное расширение наших представлений о роли «электрических кабелей» не только в биоэнергетических процессах, но и в процессах функционирования и коэволюции биологических сообществ.

Финансирование. Исследование выполнено в рамках бюджетного финансирования Московского государственного университета имени М.В. Ломоносова, гостема АААА-А17-117120570011-4, и Института биохимической физики имени Н.М. Эмануэля РАН, гостема 01201253314.

Благодарности. Автор благодарен D. Lovley, M. Strauss, J.V. Manca, J. Oemig и Ф.О. Каспаринскому за любезное предоставление рисунков для публикации. Автор благодарен анонимным рецензентам, чьи конструктивные замечания позволили улучшить статью.

Конфликт интересов. Автор заявляет об отсутствии конфликта интересов в финансовой или какой-либо иной сфере.

Соблюдение этических норм. Настоящая статья не содержит описания выполненных автором исследований с участием людей или использованием животных в качестве объектов. Приведённые в настоящей статье рисунки адаптированы из статей, указанных в подписочных подписях, оригинальные рисунки опубликованы по лицензии CC BY 4.0.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Skulachev, V. P. (1971) Energy transformations in the respiratory chain, *Curr. Top. Bioenerg.*, Elsevier, pp. 127-190.
2. Skulachev, V. P. (1980) Integrating functions of biomembranes. Problems of lateral transport of energy, metabolites and electrons, *Biochim. Biophys. Acta*, **604**, 297-320.
3. Ptushenko, V. V. (2020) Electric cables of living cells. I. Energy transfer along coupling membranes, *Biochemistry (Moscow)*, **85**, 820-832, doi: 10.1134/S000629792007010X.
4. Minagawa, J. (2016) A supercomplex of cytochrome b₆ and photosystem I for cyclic electron flow, in *Cytochrome Complexes: Evolution, Structures, Energy Transduction, and Signaling*, (Cramer, W. A., and Kallas, T., eds) Springer, pp. 453-462.
5. Dumas, L., Chazaux, M., Peltier, G., Johnson, X., and Alric, J. (2016) Cytochrome b₆ f function and localization, phosphorylation state of thylakoid membrane proteins and consequences on cyclic electron flow, *Photosynth. Res.*, **129**, 307-320.
6. Ptushenko, V. V., Cherepanov, D. A., Krishtalik, L. I., and Semenov, A. Y. (2008) Semicontinuum electrostatic calculations of redox potentials in photosystem I, *Photosynth. Res.*, **97**, 55-74.
7. Ptushenko, V. V., and Krishtalik, L. I. (2018) Reorganization energies of the electron transfer reactions involving quinones in the reaction center of *Rhodospirillum rubrum*, *Photosynth. Res.*, **138**, 167-175.
8. Gralnick, J. A., and Newman, D. K. (2007) Extracellular respiration, *Mol. Microbiol.*, **65**, 1-11.
9. Turick, C. E., Tisa, L. S., and Caccavo, F., Jr. (2002) Melanin production and use as a soluble electron shuttle for Fe (III) oxide reduction and as a terminal electron acceptor by *Shewanella* algae BrY, *Appl. Environ. Microbiol.*, **68**, 2436-2444.

10. Reguera, G., McCarthy, K. D., Mehta, T., Nicoll, J. S., Tuominen, M. T., and Lovley, D. R. (2005) Extracellular electron transfer via microbial nanowires, *Nature*, **435**, 1098-1101.
11. Nielsen, L. P., Risgaard-Petersen, N., Fossing, H., Christensen, P. B., and Sayama, M. (2010) Electric currents couple spatially separated biogeochemical processes in marine sediment, *Nature*, **463**, 1071-1074.
12. Pfeffer, C., Larsen, S., Song, J., Dong, M., Besenbacher, F., Meyer, R. L., Kjeldsen, K. U., Schreiber, L., Gorby, Y. A., El-Naggar, M. Y., Leung, K. M., Schramm, A., Risgaard-Petersen, N., and Nielsen, L. P. (2012) Filamentous bacteria transport electrons over centimetre distances, *Nature*, **491**, 218.
13. Schauer, R., Risgaard-Petersen, N., Kjeldsen, K. U., Bjerg, J. J. T., Jørgensen, B. B., Schramm, A., and Nielsen, L. P. (2014) Succession of cable bacteria and electric currents in marine sediment, *ISME J.*, **8**, 1314-1322.
14. Gorby, Y. A., Yanina, S., McLean, J. S., Rosso, K. M., Moyles, D., Dohnalkova, A., Beveridge, T. J., Chang, I. S., Kim, B. H., Kim, K. S., Culley, D. E., Reed, S. B., Romine, M. F., Saffarini, D. A., Hill, E. A., Shi, L., Elias, D. A., Kennedy, D. W., Pinchuk, G., Watanabe, K., Ishii, S., Logan, B., Neelson, K. H., and Fredrickson, J. K. (2006) Electrically conductive bacterial nanowires produced by *Shewanella oneidensis* strain MR-1 and other microorganisms, *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, **103**, 11358-11363.
15. Filman, D. J., Marino, S. F., Ward, J. E., Yang, L., Mester, Z., Bullitt, E., Lovley, D. R., and Strauss, M. (2019) Cryo-EM reveals the structural basis of long-range electron transport in a cytochrome-based bacterial nanowire, *Commun. Biol.*, **2**, 219, doi: 10.1038/s42003-019-0448-9.
16. Tan, Y., Adhikari, R. Y., Malvankar, N. S., Ward, J. E., Woodard, T. L., Nevin, K. P., and Lovley, D. R. (2017) Expressing the *Geobacter metallireducens* PilA in *Geobacter sulfurreducens* yields pili with exceptional conductivity, *mBio*, **8**, e02203-6, doi: 10.1128/mBio.02203-16.
17. Adhikari, R. Y., Malvankar, N. S., Tuominen, M. T., and Lovley, D. R. (2016) Conductivity of individual *Geobacter* pili, *RSC Adv.*, **6**, 8354-8357.
18. Lampa-Pastirk, S., Veazey, J. P., Walsh, K. A., Feliciano, G. T., Steidl, R. J., Tessmer, S. H., and Reguera, G. (2016) Thermally activated charge transport in microbial protein nanowires, *Sci. Rep.*, **6**, 23517, doi: 10.1038/srep23517.
19. Потапова Т., Кокшарова О. (2020) Нитчатые цианобактерии как прототип многоклеточных организмов, *Физиология Растений*, **67**, 20-34.
20. Tan, Y., Adhikari, R. Y., Malvankar, N. S., Pi, S., Ward, J. E., Woodard, T. L., Nevin, K. P., Xia, Q., Tuominen, M. T., and Lovley, D. R. (2016) Synthetic biological protein nanowires with high conductivity, *Small*, **12**, 4481-4485.
21. El-Naggar, M. Y., Wanger, G., Leung, K. M., Yuzvinsky, T. D., Southam, G., Yang, J., Lau, W. M., Neelson, K. H., and Gorby, Y. A. (2010) Electrical transport along bacterial nanowires from *Shewanella oneidensis* MR-1, *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, **107**, 18127-18131.
22. Sato, M., and Mooney, H. M. (1960) The electrochemical mechanism of sulfide self-potentials, *Geophysics*, **25**, 226-249.
23. Bigalke, J., and Grabner, E. W. (1997) The geobattery model – a contribution to large scale electrochemistry, *Electrochimica Acta*, **42**, 3443-3452.
24. Naudet, V., and Revil, A. (2005) A sandbox experiment to investigate bacteria-mediated redox processes on self-potential signals, *Geophys. Res. Lett.*, **32**, doi: 10.1029/2005GL022735.
25. Dueholm, M. S., Larsen, S., Risgaard-Petersen, N., Nierychlo, M., Schmid, M., Bøggild, A., van de Vossenberg, J., Geelhoed, J. S., Meysman, F. J. R., Wagner, M., Nielsen, P. H., Nielsen, L. P., and Schramm, A. (2019) On the evolution and physiology of cable bacteria, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **116**, 19116-19125.
26. Cornelissen, R., Bøggild, A., Thiruvallur Eachambadi, R., Koning, R. I., Kremer, A., Hidalgo-Martinez, S., Zetsche, E.-M., Damgaard, L. R., Bonné, R., Drijkoningen, J., Geelhoed, J. S., Boesen, T., Boschker, H. T. S., Valcke, R., Nielsen, L. P., D'Haen, J., Manca, J. V., and Meysman, F. J. R. (2018) The cell envelope structure of cable bacteria, *Front. Microbiol.*, **9**, 3044.
27. Meysman, F. J. R., Cornelissen, R., Trashin, S., Bonné, R., Martinez, S. H., van der Veen, J., Blom, C. J., Karman, C., Hou, J.-L., Thiruvallur Eachambadi, R., Geelhoed, J. S., De Wael, K., Beaumont, H. J. E., Bart Cleuren, B., Valcke, R., van der Zant, H. S. J., Boschker, H. T. S., and Manca, J. V. (2019) A highly conductive fibre network enables centimetre-scale electron transport in multicellular cable bacteria, *Nat. Commun.*, **10**, 1-8.
28. Bonné, R., Hou, J.-L., Hustings, J., Meert, M., Hidalgo-Martinez, S., Cornelissen, R., D'Haen, J., Thijs, S., Vangronsveld, J., Valcke, R., Cleuren, B., Meysman, F. J. R., and Manca, J. V. (2019) Cable bacteria as long-range biological semiconductors, *arXiv Preprint arXiv:191206224*.
29. Trojan, D., Schreiber, L., Bjerg, J. T., Bøggild, A., Yang, T., Kjeldsen, K. U., and Schramm, A. (2016) A taxonomic framework for cable bacteria and proposal of the candidate genera *Electrothrix* and *Electronema*, *Syst. Appl. Microbiol.*, **39**, 297-306.
30. Parge, H. E., Forest, K. T., Hickey, M. J., Christensen, D. A., Getzoff, E. D., and Tainer, J. A. (1995) Structure of the fibre-forming protein pilin at 2.6 Å resolution, *Nature*, **378**, 32-38.
31. Craig, L., Taylor, R. K., Pique, M. E., Adair, B. D., Arvai, A. S., Singh, M., Lloyd, S. J., Shin, D. S., Getzoff, E. D., Yeager, M., Forest, K. T., and Tainer, J. A. (2003) Type IV pilin structure and assembly: X-ray and EM analyses of *Vibrio cholerae* toxin-coregulated pilus and *Pseudomonas aeruginosa* PAK pilin, *Mol. Cell*, **11**, 1139-1150.
32. Mehta, T., Coppi, M. V., Childers, S. E., and Lovley, D. R. (2005) Outer membrane c-type cytochromes required for Fe (III) and Mn (IV) oxide reduction in *Geobacter sulfurreducens*, *Appl. Environ. Microbiol.*, **71**, 8634-8641.
33. Leang, C., Qian, X., Mester, T., and Lovley, D. R. (2010) Alignment of the c-type cytochrome OmcS along pili of *Geobacter sulfurreducens*, *Appl. Environ. Microbiol.*, **76**, 4080-4084.
34. Inoue, K., Leang, C., Franks, A. E., Woodard, T. L., Nevin, K. P., and Lovley, D. R. (2011) Specific localization of the c-type cytochrome OmcZ at the anode surface in current-producing biofilms of *Geobacter sulfurreducens*, *Environ. Microbiol. Rep.*, **3**, 211-217.
35. Qian, X., Reguera, G., Mester, T., and Lovley, D. R. (2007) Evidence that OmcB and OmpB of *Geobacter sulfurreducens* are outer membrane surface proteins, *FEMS Microbiol. Lett.*, **277**, 21-27.
36. Shi, L., Richardson, D. J., Wang, Z., Kerisit, S. N., Rosso, K. M., Zachara, J. M., and Fredrickson, J. K. (2009) The roles of outer membrane cytochromes of *Shewanella* and *Geobacter* in extracellular electron transfer, *Environ. Microbiol. Rep.*, **1**, 220-227.
37. Pirbadian, S., Barchinger, S. E., Leung, K. M., Byun, H. S., Jangir, Y., Bouhenni, R. A., Reed, S. B., Romine, M. F., Saffarini, D. A., Shi, L., Gorby, Y. A., Golbeck, J. H., and El-Naggar, M. Y. (2014) *Shewanella oneidensis* MR-1 nanowires are outer membrane and periplasmic extensions of the extracellular electron transport components, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **111**, 12883-12888.
38. Malvankar, N. S., Vargas, M., Nevin, K. P., Franks, A. E., Leang, C., Kim, B.-C., Inoue, K., Mester, T., Covalla, S. F.,

- Johnson, J. P., Rotello, V. M., Tuominen, M. T., and Lovley, D. R. (2011) Tunable metallic-like conductivity in microbial nanowire networks, *Nat. Nanotechnol.*, **6**, 573-579.
39. Strycharz-Glaven, S. M., Snider, R. M., Guiseppi-Elie, A., and Tender, L. M. (2011) On the electrical conductivity of microbial nanowires and biofilms, *Energy Environ. Sci.*, **4**, 4366-4379.
40. Boesen, T., and Nielsen, L. P. (2013) Molecular dissection of bacterial nanowires, *mBio*, **4**, e00270-13, doi: 10.1128/mBio.00270-13.
41. Vargas, M., Malvankar, N. S., Tremblay, P.-L., Leang, C., Smith, J. A., Patel, P., Synoeyenbos-West, O., Nevin, K. P., and Lovley, D. R. (2013) Aromatic amino acids required for pili conductivity and long-range extracellular electron transport in *Geobacter sulfurreducens*, *mBio*, **4**, e00105-13, doi: 10.1128/mBio.00105-13.
42. Cosert, K. M., Castro-Forero, A., Steidl, R. J., Worden, R. M., and Reguera, G. (2019) Bottom-up fabrication of protein nanowires via controlled self-assembly of recombinant *Geobacter* pilins, *mBio*, **10**, e02721-19, doi: 10.1128/mBio.02721-19.
43. Holmes, D. E., Chaudhuri, S. K., Nevin, K. P., Mehta, T., Methé, B. A., Liu, A., Ward, J. E., Woodard, T. L., Webster, J., and Lovley, D. R. (2006) Microarray and genetic analysis of electron transfer to electrodes in *Geobacter sulfurreducens*, *Environ. Microbiol.*, **8**, 1805-1815.
44. Malvankar, N. S., Tuominen, M. T., and Lovley, D. R. (2012) Lack of cytochrome involvement in long-range electron transport through conductive biofilms and nanowires of *Geobacter sulfurreducens*, *Energy Environ. Sci.*, **5**, 8651-8659.
45. Polizzi, N. F., Skourtis, S. S., and Beratan, D. N. (2012) Physical constraints on charge transport through bacterial nanowires, *Faraday Discuss.*, **155**, 43-61.
46. Wang, F., Gu, Y., O'Brien, J. P., Sophia, M. Y., Yalcin, S. E., Srikanth, V., Shen, C., Vu, D., Ing, N. L., Hochbaum, A. I., Egelman, E. H., and Malvankar, N. S. (2019) Structure of microbial nanowires reveals stacked hemes that transport electrons over micrometers, *Cell*, **177**, 361-369.
47. Bjerg, J. T., Boschker, H. T. S., Larsen, S., Berry, D., Schmid, M., Millo, D., Tataru, P., Meysman, F. J. R., Wagner, M., Nielsen, L. P., and Schramm, A. (2018) Long-distance electron transport in individual, living cable bacteria, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **115**, 5786-5791.
48. Chailakhyan, L. M., Glagolev, A. N., Glagoleva, T. N., Murvanidze, G. V., Potapova, T. V., and Skulachev, V. P. (1982) Intercellular power transmission along trichomes of cyanobacteria, *Biochim. Biophys. Acta*, **679**, 60-67.
49. Ishii, S., Kosaka, T., Hori, K., Hotta, Y., and Watanabe, K. (2005) Coaggregation facilitates interspecies hydrogen transfer between *Pelotomaculum thermopropionicum* and *Methanothermobacter thermautotrophicus*, *Appl. Environ. Microbiol.*, **71**, 7838-7845.
50. Summers, Z. M., Fogarty, H. E., Leang, C., Franks, A. E., Malvankar, N. S., and Lovley, D. R. (2010) Direct exchange of electrons within aggregates of an evolved syntrophic coculture of anaerobic bacteria, *Science*, **330**, 1413-1415.

ELECTRIC CABLES OF LIVING CELLS. II. BACTERIAL ELECTRON CONDUCTORS

Review

V. V. Ptushenko^{1,2}

¹ Belozersky Institute of Physico-Chemical Biology, Lomonosov Moscow State University,
119992 Moscow, Russia; E-mail: ptush@belozersky.msu.ru

² Emanuel Institute of Biochemical Physics of Russian Academy of Sciences, 119334 Moscow, Russia

Received May 17, 2020

Revised July 12, 2020

Accepted July 16, 2020

The concept of “electric cables” involved in bioenergetic processes of a living cell was proposed half a century ago [Skulachev, V. P. (1971) *Curr. Top. Bioenerg.*, Elsevier, pp. 127-190]. For many decades, only cell membrane structures have been considered as probable pathways for the electric current, namely, for the transfer of transmembrane electrochemical potential. However, the last ten to fifteen years have brought the discovery of bacterial “electric cables” of a new type. In 2005, “nanowires” conducting electric current over distances of tens of micrometers were discovered in metal- and sulphate-reducing bacteria [Reguera, G. et al. (2005) *Nature*, **435**, pp. 1098-1101]. The next five years have witnessed the discovery of microbial electric currents over centimeter distances [Nielsen, L. P. et al. (2010) *Nature*, **463**, 1071-1074]. This new group of bacteria allowing electric currents to flow over macroscopic distances was later called cable bacteria. Nanowires and conductive structures of cable bacteria serve to solve a special problem of membrane bioenergetics: they connect two redox half-reactions. In other words, unlike membrane “cables”, their function is electron transfer in the course of oxidative phosphorylation for the generation of membrane energy rather than of the end-product. The most surprising is the protein nature of these cables (at least of some of them) indicated by recent data, since no protein wires for the long-distance electron transport had been previously known in living systems.

Keywords: The concept of “electric cables” of a cell, nanowires, *Geobacter sulfurreducens*, cable bacteria

ПРАВИЛА ДЛЯ АВТОРОВ

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

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

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 последние 5 лет; 3) обзор не должен быть пересказом или цитирова-

нием фрагментов 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.

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.

Материал статьи – текст, включая резюме на русском и английском языках, список литературы, рисунки с подписями и таблицы – оформляется единым 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.

Одновременно с русским желательно представить аутентичный английский вариант рукописи.

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 издательств Springer и Pleiades).

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

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 (колоннитул); 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).

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 обсуждение 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 Бредфорд [7]). Если метод известен 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 использова-

нием животных и выполненными 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.

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., Laftah, A., Sessa, F., Spinetti, G., Petretto, E., Angelini, G. D., and Emanuelli, C. (2017) Human pericardial fluid contains exosomes enriched with cardiovascular-expressed microRNAs and promotes therapeutic angiogenesis, *Mol. Ther.*, **25**, 679–693, doi: 10.1016/j.yjthe.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 биoluminesцентного 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/S0006297913110035.

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.

Объем **экспериментальной статьи**, включая список литературы, таблицы, рисунки (3 рисун-

ка 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.

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.

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.

Рисунки с подрисовочными 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.

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

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. 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.

Все **физические величины** рекомендуется приводить в международной системе СИ.

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.**

Рецензирование. При подаче рукописи авторы могут указать двух потенциальных рецензентов (ФИО, адрес электронной почты) из числа специ-

алистов 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 сайтах журнала, а также на порталах Pleiades и Springer.

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 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.

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.**

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.

Переводы редактируются английской редакцией журнала, подготовленный текст направляется авторам для корректировки.

После выхода журнала в свет редакция рассылает авторам отиски русского и английского вариантов статей в виде PDF-файлов.

(С полным текстом Правил для авторов можно ознакомиться на сайте журнала: <https://www.biochemistrymoscow.com>.)