

СОДЕРЖАНИЕ

Том 38, номер 1, 2021

ОБЗОРЫ

Баланс двух ветвей РАС может препятствовать тяжелому течению COVID-19 <i>Н. В. Бобкова</i>	3
Математическое моделирование фотосинтеза и анализ продуктивности растений <i>Е. М. Сухова, В. А. Воденев, В. С. Сухов</i>	20
Везикулярные системы доставки биологически активных соединений: от липосом к керасомам <i>З. Г. Дениева, У. А. Буданова, Ю. Л. Себякин</i>	44

Появление признаков дифференцировки и провоспалительного фенотипа у клеток острого миелоидного лейкоза ТНР-1 при повышении их TRAIL-резистентности в агрегатах <i>in vitro</i> <i>М. И. Кобякова, Я. В. Евстратова, А. С. Сенотов, А. И. Ломовский, В. В. Минайчев, А. И. Звягина, М. Е. Соловьева, И. С. Фадеева, В. С. Акатов, Р. С. Фадеев</i>	61
Применение SPR-биосенсора для анализа белок-белковых взаимодействий в водной среде и бислоистой липидной мембране на примере P450scs (CYP11A1) <i>П. В. Еришов, Л. А. Калужский, Е. О. Яблоков, О. В. Гнеденко, А. А. Ковалевский, А. М. Тумилович, А. А. Гилеп, Н. В. Струшкевич, А. С. Иванов</i>	71

Contents

Vol. 38, No. 1, 2021

REVIEWS

- The Balance between Two Branches of RAS Can Protect from Severe COVID-19 Course
N. V. Bobkova 3
- Simulation of Photosynthesis and Analysis of Plant Productivity
E. M. Sukhova, V. A. Vodeneev, V. S. Sukhov 20
- Vesicle Delivery Systems of Biologically Active Compounds:
From Liposomes to Cerasomes
Z. G. Denieva, U. A. Budanova, Yu. L. Sebyakin 44
-

- Appearance of Signs of Differentiation and Pro-inflammatory Phenotype
in Acute Myeloid Leukemia Cells THP-1 with Cell
Aggregation-Induced Increase of TRAIL Resistance *In Vitro*
*M. I. Kobyakova, Ya. V. Evstratova, A. S. Senotov, A. I. Lomovsky, V. V. Minaichev,
A. I. Zvyagina, M. E. Solovieva, I. S. Fadeeva, V. S. Akatov, R. S. Fadeev* 61
- Application of the SPR Biosensor for the Analysis of Protein–Protein Interactions
in Aqueous Environment and Bilayer Lipid Membrane
As Exemplified by P450scc (CYP11A1)
*P. V. Ershov, L. A. Kaluzhskiy, E. O. Yablokov, O. V. Gnedenko, A. A. Kavaleuski,
A. M. Tumilovich, A. A. Gilep, N. V. Strushkevich, A. S. Ivanov* 71
-
-

УДК 612.062;57.053

БАЛАНС ДВУХ ВЕТВЕЙ РАС МОЖЕТ ПРЕПЯТСТВОВАТЬ ТЯЖЕЛОМУ ТЕЧЕНИЮ COVID-19

© 2021 г. Н. В. Бобкова*

Федеральный исследовательский центр “Пушкинский научный центр биологических исследований Российской академии наук”, Институт биофизики клетки РАН, Пушкино, Московской обл., 142290 Россия

*e-mail: nbobkova@mail.ru

Поступила в редакцию 13.08.2020 г.

После доработки 09.09.2020 г.

Принята к публикации 22.09.2020 г.

Пандемия COVID-19 охватила весь мир и потребовала мобилизации усилий ученых и клиницистов во всем мире для борьбы с этим тяжелым недугом. Наряду с исследованиями вирусологии SARS-CoV-2 особую значимость приобретает понимание фундаментальных физиологических процессов, молекулярно-клеточных механизмов и путей внутриклеточной сигнализации, лежащих в основе клинических проявлений COVID-19, знание которых важно для разработки эффективной терапии данного заболевания. В обзоре подробно рассмотрено взаимодействие компонентов ренин-ангиотензиновой системы (РАС) и рецепторов конечных гликозилированных продуктов (RAGE), которое играет особую роль в нормальной физиологии легких и в условиях патологии при COVID-19, вплоть до развития острого респираторного дистресс-синдрома и “цитокинового шторма”. Отдельный раздел посвящен знакомству читателя с новейшими разработками, направленными на коррекцию дисфункции РАС, вызываемой связыванием вируса с ангиотензин-конвертирующим энзимом 2 (ACE2) — центральным элементом этой системы. Анализ опубликованных теоретических, клинических и экспериментальных данных свидетельствует о необходимости комплексного воздействия для предотвращения тяжелого течения COVID-19 с использованием агонистов MasR, блокаторов AT1R и NF-kB сигнального пути, а также соединений с нейропротекторным и нейрорегенеративным действием.

Ключевые слова: COVID-19, патогенез, ренин-ангиотензиновая система, ACE2, ANGI, AT1R, MasR, RAGE, NF-kB, лиганды

DOI: 10.31857/S0233475521010035

ВВЕДЕНИЕ

Пандемия, вызванная новым штаммом коронавируса, которому Международный комитет по таксономии вирусов 11 февраля 2020 г. присвоил официальное название SARS-CoV-2, охватила весь мир вследствие отсутствия эффективных способов профилактики, облегчения течения заболевания и снижения смертности [1, 2]. По данным на начало октября 2020 года в мире умерло свыше 1.2 миллионов человек, а официально заболело более 35.2 миллионов. Смертность в США составила около 2.81%, в России — 1.43%. В европейских странах, наиболее пострадавших от пандемии, погибло более 10% заболевших COVID-19. Глава ВОЗ Тедрос Аданом Гебрейесус считает, что в глобальном масштабе наблюдается ускорение распространения пандемии в мире [3, 4]. В настоящее время ожидается “вторая волна” заражения и отмечено появление новых разновидностей данного вируса с повышенной вирулентностью.

Поэтому остро стоит проблема разработки вакцин и новых эффективных фармакологических препаратов для лечения данного заболевания.

Основные симптомы COVID-19

Ранее сходные инфекционные заболевания возникали в 2002–2003 годах и в 2011 году, получившие названия Тяжелого острого респираторного синдрома (SARS) и Средневосточного респираторного синдрома (MERS), возбудителями которых были другие штаммы коронавирусов SARS-CoV и MERS-CoV соответственно. SARS-CoV-2 имеет высокое сходство с возбудителем SARS (79%). Наиболее распространенным клиническим проявлением нового варианта коронавирусной инфекции является двусторонняя пневмония, у 3–4% пациентов зарегистрировано развитие острого респираторного дистресс-синдрома, который у 75% таких больных сопровож-

дается тромботической коагулопатией, а в терминальных стадиях развиваются тромбозы и “цитокиновый шторм”, характеризующийся системным выделением провоспалительных цитокинов: интерлейкинов ИЛ-2, ИЛ-6, ИЛ-7, гранулоцит колониестимулирующего фактора, хемокина 10 (CXCL10), хемокина лиганда 2 (CCL2) и фактора некроза опухолей- α (TNF- α), отмечается лейкопения, свидетельствующая о сниженном клеточном иммунитете [5, 6]. Изменение обоняния (гипосмия) или ухудшение вкуса наблюдаются у 15–30% больных на ранней стадии заболевания и может рассматриваться как один из диагностических признаков COVID-19 [7, 8].

Краткая характеристика SARS-CoV-2

Новый коронавирус SARS-CoV-2 представляет собой одноцепочечный РНК-содержащий вирус и относится к семейству *Coronaviridae* к линии Beta-CoV В. Он характеризуется высокой контагиозностью и в основном распространяется людьми с бессимптомным течением заболевания, которые составляют более 30% среди лиц с позитивным тестом на присутствие в организме вируса [9].

Основной первоначальной мишенью вируса является ангиотензин-конвертирующий фермент 2 (ACE2), локализованный на наружной мембране клеток во многих органах и тканях [10–12], хотя нельзя полностью исключить возможность его взаимодействия с другими рецепторами, такими как CD147, CD26, DPP4, TMPRSS2 [13–15].

Для проникновения в клетку SARS-CoV-2, как и вирус “атипичной пневмонии” SARS-CoV, использует S-белок, состоящий из двух субъединиц [16]. На S1 субъединице расположен сайт связывания вируса с N-концом внеклеточного домена ACE2 рецептора. S2 субъединица необходима для активации эндоцитоза и проникновения вируса в клетку хозяина. Вирус SARS-CoV-2 преимущественно взаимодействует с многочисленными клетками в легких – пневмоцитами II типа, составляющими менее 10%, которые одновременно с ACE2 коэкспрессируют сериновую протеазу TMPRSS2, которая через взаимодействие с сайтом, находящимся на стыке S1/S2 субъединиц S-белка вируса, осуществляет праймирование другого сайта, локализованного на S2 субъединице и ответственного за ее протеолиз и проникновение вируса в клетку. Следует отметить, что для активации непосредственно этого сайта протеолиза требуется фуриновая протеаза хозяина, что является отличительной чертой SARS-CoV-2 [17, 18]. В настоящее время определена кристаллическая структура ACE2 молекулы и участка связывания с SARS-CoV-2 [12]. В большинстве случаев ACE2 находится в комплексе с внутриклеточным мембранным транспортером аминокислот VAT1

и существует в виде гетеродимера. Два таких комплекса, в свою очередь, формируют гомодимер. Его целостность обеспечивают взаимодействия одноименных участков двух молекул ACE2, к которым за счет полярных взаимодействий присоединяется S1 субъединица SARS-CoV-2 в районе участка, который не связан с протеазной активностью (протеазным доменом) ACE2, обеспечивающим в норме отрыв одного аминокислотного остатка от пептида ангиотензина II (ANGII, ANG1–8), включенного как и ACE2 в регуляторную ренин-ангиотензивную систему (РАС). При этом с одним ACE2 может быть связан тример вирусных белков, а с димером ACE2 соединено два тримера соответственно [12]. Вначале вирус поражает поверхностные бокаловидные клетки слизистой оболочки носа, языка и гортани; а затем пневмоциты типа II в легких, секретирующие сурфактант, который в норме препятствует слипанию альвеол и обладает выраженным противомикробным действием [19, 20]. Здесь уместно отметить, что активность протеаз, способствующих проникновению вируса в клетку хозяина, снижается при повышении рН во внеклеточной и внутриклеточной среде. Это, например, достигается при лечении Гидроксихлорохином или Хлорохином [21]. Поэтому логично, что во время пандемии COVID-19 при отсутствии эффективных противовирусных препаратов и вакцины, в качестве профилактического средства целесообразна ингаляция парами 1% раствора гидрокарбоната натрия. Этим методом, не задумываясь о механизмах его действия, давно пользовались при различных респираторных, легочных инфекциях и гриппе, эмпирически доказав его эффективность [22]. Многочисленные ACE2 рецепторы также присутствуют на эндотелиальных клетках сосудов сердца и почек, на нейронах и глии, а также на энтероцитах, выстилающих тонкую кишку и участвующих в процессе всасывания питательных веществ. Усиление проницаемости стенки кишечника в результате воспаления, вызванного вирусом, сопровождается изменением микробиоты и попаданием вирусных частиц и токсинов в кровотока [23].

В настоящее время уже получены прямые доказательства присутствия SARS-CoV-2 в мозге у человека [20]. Диссеминация вируса в мозг может происходить как из системного кровотока в результате нарушения гематоэнцефалического барьера, так и непосредственно из носовой и ротовой полости по обонятельному и языкоглоточному нервам, а также по веточкам лицевого и блуждающего нервов. Проникновение вируса в головной мозг, богатый ACE2 рецепторами, расположенными на мембранах нейронов и глии, может приводить к нарушению мозговых функций [20, 24, 25]. Ранее в экспериментах на трансгенных мышах, несущих человеческий ген ACE2,

была установлена возможность проникновения вируса SARS-CoV в мозг, поражение нейронов во многих мозговых структурах, включая и дыхательный центр, расположенный в продолговатом мозге. Причиной гибели этих животных была патология, сходная с острым респираторным дистресс-синдромом, развивающимся и при тяжелом течении COVID-19 у человека [26]. В связи с этим важно отметить, что нарушение дыхательной функции при COVID-19 может быть как следствием локального нарушения газообмена в альвеолах легких, так и нарушением работы дыхательного центра в мозге на поздних этапах развития инфекции [27–29]. Регуляция активности инспираторных нейронов в дыхательном центре в основном осуществляется хеморецепторами, которые очень чувствительны к увеличению уровня в крови CO_2 , H^+ и в значительно меньшей степени к O_2 . Эти факторы усиливают деятельность дыхательного центра, воздействуя на центральные и периферические хеморецепторы, что необходимо учитывать как при подключении больных COVID-19 к аппаратам искусственной вентиляции легких (ИВЛ), так и при снятии с них. Наблюдения за больными с COVID-19 свидетельствуют о развитии у них неврологических и психиатрических осложнений в виде инсультов, полинейропатий, депрессий, последствий посттравматического стресса. Высказываются предположения, что у переболевших COVID-19 могут развиваться нейродегенеративные заболевания, включая болезнь Паркинсона и болезнь Альцгеймера [30–32]. В настоящее время установлено, что проникновение вируса в клетку вызывает усиление экспрессии генов, ответственных за синтез белков, связанных с апоптозом [33], что и приводит к гибели инфицированной клетки. Ранее нами было установлено, что повреждение обонятельной луковицы, первой мозговой структуры, связанной с обонятельным нервом, действительно может вызвать развитие нейродегенеративного процесса альцгеймеровского типа у животных, а интраназальное введение таких нейропротекторов, как белок теплового шока или YB-1 , способно предотвратить гибель нейронов и защитить мозг от развития дегенерации [34–36].

Известно, что биология вируса во многом зависит от организма хозяина. Так, SARS-CoV-2 для своего внедрения в клетку и репликации, как уже указывалось ранее, использует целый ряд протеаз хозяина, включая катепсин L, катепсин B, трипсин, фактор X, эластазу, фурин и TMPRSS2 (трансмембранную сериновую протеазу 2), при этом сам факт связывания вируса с ACE2 влияет на эффективность экспрессии этого энзима, играющего существенную роль в защите ткани легких от повреждений [37–39]. Поэтому торможение синтеза вирусных белков или воздействие на механизмы репликации вируса через блокаду эн-

догенных протеаз может наносить вред организму хозяина, что выражается в тяжелых побочных реакциях при использовании ряда фармакологических средств [40–49]. В настоящее время наиболее эффективным препаратом для лечения COVID-19, по мнению ВОЗ, является Ремдесивир, созданный в США, который блокирует синтез РНК вируса путем торможения вирусной РНК-полимеразы, конкурируя за включение в ее молекулу с эндогенным АТФ [50, 51]. В настоящее время основное внимание уделяется разработке вакцин, однако следует иметь в виду, что вакцина, являясь специфичной по отношению к данному вирусу, может оказаться неэффективной для предотвращения заражения другими вирусными инфекциями, даже родственными с SARS-CoV-19. Хорошие результаты дает метод, применявшийся еще в прошлом веке – введение сыворотки крови переболевших инфекцией людей [52]. К сожалению, только 30% такой сыворотки имеет достаточный титр противовирусных антител (IgG), необходимый для терапевтического эффекта. У значительной части носителей вирусной инфекции болезнь протекает бессимптомно, что свидетельствует о наличии в организме хозяина протекторных механизмов, активация которых способна нивелировать проявления заболевания, но не избавиться от носительства вируса. Хотя предполагается, что такую защитную функцию, прежде всего, выполняет неспецифический врожденный иммунитет [53], тем не менее в последнее время появились данные о важной роли состояния РАС [23, 38, 39, 54]. Однако в арсенале врачей практически отсутствуют препараты, влияющие на ACE2 – центральный рецептор связывания вируса и основной регулятор РАС. Даже возможность применения блокаторов ангиотензинового рецептора 1 (AT1R) у больных COVID-19 с гипертонией вызвала горячие дискуссии среди врачей [55–57].

Мы попытались восполнить недостающую информацию новыми данными о включении РАС в патогенез COVID-19 и возможных мишенях терапевтического воздействия.

Физиология РАС

В настоящее время уже установлено, что риском тяжелого течения COVID-19 является не столько сам возраст пациента, сколько так называемые возрастные заболевания, такие как гипертония, диабет, сердечно-сосудистые патологии, в развитии которых прямо или опосредованно задействована РАС и ACE2 рецептор [23]. Уже более 20 лет известно, что ACE2 представляет собой один из важнейших элементов РАС, которая обеспечивает поддержание гомеостаза путем регуляции взаимодействия сердечно-сосудистой и дыхательной систем, водно-солевого и углевод-

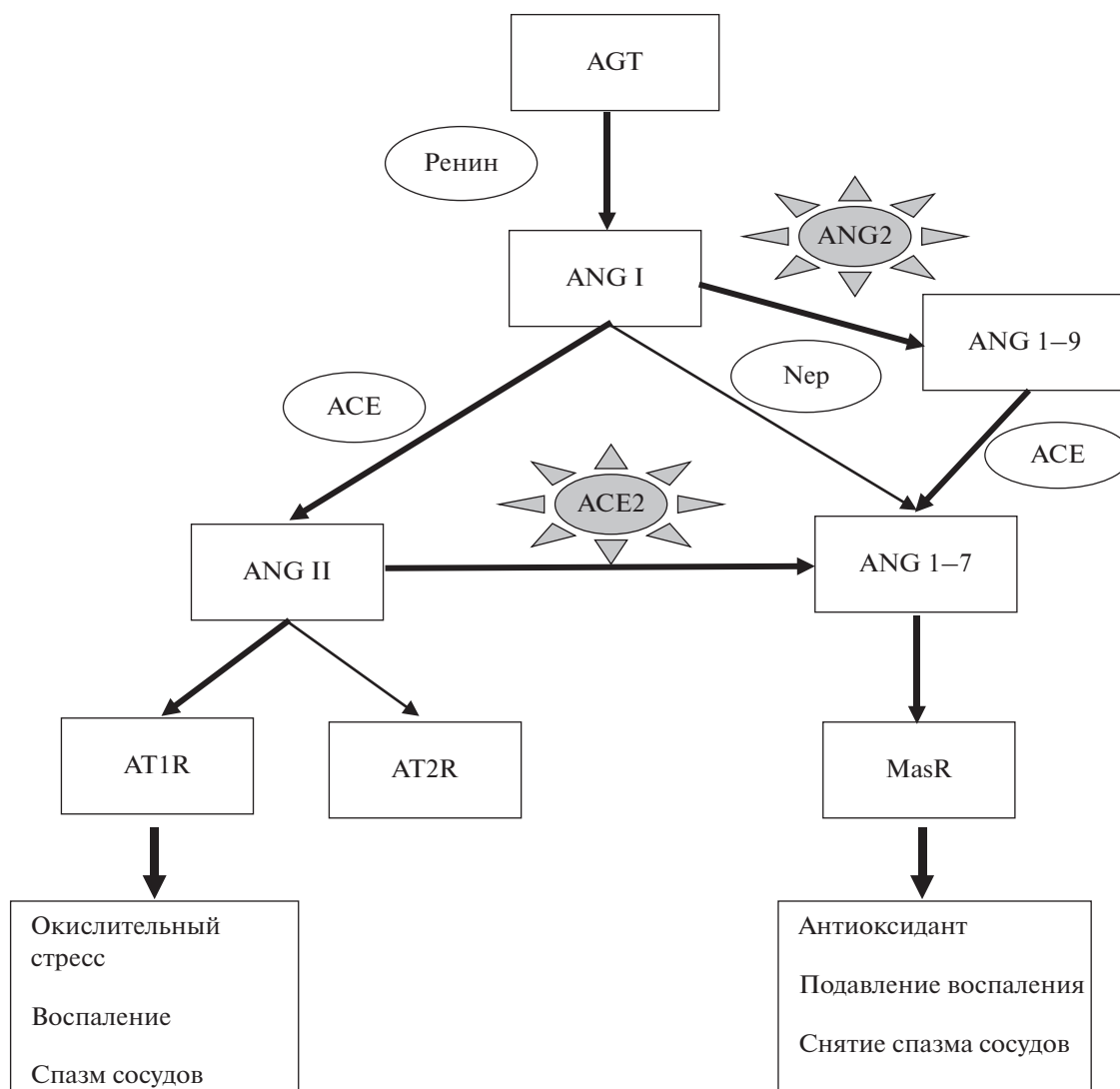


Рис. 1. Основные компоненты РАС. Слева – первая ветвь РАС; справа – вторая компенсаторная ветвь РАС. Прямоугольники – биологически активные ангиотензины и их рецепторы, овалы – конвертирующие их ферменты. AGT – ангиотензиноген, сывороточный глобулин, являющийся предшественником ANG I. ACE2 – ангиотензин-конвертирующий фермент 2, центральный регулятор баланса активности ветвей РАС, взаимодействующий с SARS-CoV-2 при COVID-19.

ного обмена, а также регуляции кровяного давления [23]. На рис. 1 представлены основные элементы РАС и их регуляторы в норме и при заражении SARS-CoV-19.

Классическая РАС состоит из двух ветвей, первая из которых включает ангиотензиноген/ренин/ANG I (ANG1–10)/ангиотензин-конвертирующий фермент (ACE)/ангиотензин II (ANGII, ANG1–8)/ангиотензиновый рецептор типа I (AT1R). В норме эта ветвь активирует центральные и периферические механизмы, ответственные за регуляцию кровяного давления. Однако именно ее активность ассоциируется с развитием различных патологий, включая фиброзы, воспаление, сердечно-сосудистую патологию, метабо-

лический синдром, рак, старение, диабет, гипертонию [58]. Установлено, что ANGI, взаимодействуя с AT1R, активирует ERK1/2 (киназы, участвующие в трансдукции экстраклеточных сигналов) и p38 MAPK сигнальные пути, что приводит к снижению экспрессии гена ACE2 [59] и повышению активности ADAM17 путем фосфорилирования ее внутриклеточного домена [60, 61]. С активацией ADAM17 связывают и появление циркулирующей формы TNF- α с последующей индукцией воспаления [23, 62]. Если первая ветвь РАС известна уже более 100 лет, вторая ветвь, включающая ACE2/ANG1–7/MasR, открыта относительно недавно, и до сих пор некоторые ас-

пекты ее функционирования остаются не до конца исследованными [63].

Активация второй ветви PAC оказывает действие, противоположное эффекту первой ветви PAC, и сопровождается снижением кровяного давления, противовоспалительными реакциями, активацией врожденного иммунитета и стимуляцией клеточной дифференцировки. ACE2 является ключевым ферментом, превращающим ANGI (ANG1–8) – лиганд AT1R, в ANGI–7 с последующей активацией MasR [64]. Следует указать, что существует и минорный шунтирующий путь, снижающий гиперактивацию первой ветви PAC, через связывание ANGI с ангиотензиновым рецептором второго типа (AT2R), опосредующим снижение кровяного давления, дилатацию сосудов. Однако плотность этого рецептора значительно уступает AT1R и резко снижается с возрастом. Учитывая все сказанное, следует с особой осторожностью относиться к разработке лекарственных средств против SARS-CoV-2, блокирующих и протеазный домен ACE2, что может существенно снизить эффективность “защитной” роли второй ветви PAC (ACE2/ANG1–7/MasR) и резко усилить связывание ANGI с AT1R, вызывая обострение течения всех сопутствующих патологий. С другой стороны, блокирование сайта связывания ACE2 на S-белке самого вируса может спровоцировать аллостерические модификации, обеспечивающие новую возможность связывания вирусного белка S с ACE2. Уже сейчас некоторые авторы предвидят возможность появления единичной мутации S-белка в позиции 501, что приведет к усилению способности вируса связываться с человеческим ACE2 с плохо прогнозируемыми последствиями [16].

Как уже указывалось, ACE2 широко распространен в организме и может существовать в двух формах – преимущественно связанной с мембранной монокарбоксипептидазы (120 кДа) и в виде циркулирующей свободной формы, состоящей из одного экстраклеточного домена, несущего сайт связывания с ANGI и участок взаимодействия с S-белком вируса. В образовании свободной формы участвует протеаза ADAM17. Важно отметить, что нокаутные ACE2^{-/-} мыши развивали ряд показателей, характерных для COVID-19: окислительный стресс, нейтрофильную инфильтрацию, выброс провоспалительных цитокинов, активацию митоген активированной протеин киназы (МАРК) [65]. По-видимому, не сам вирус, а вызываемый им дисбаланс в активности двух ветвей PAC может являться одним из базовых механизмов развития патологии. В настоящее время ведутся ожесточенные споры о том, что же реально происходит с ACE2 рецептором у больных COVID-19. В экспериментах на животных, инфицированных вирусом, было выявлено снижение активности этого рецептора преимущественно в

легких, но не в окружающих тканях, что также сопровождалось падением содержания ANGI–7 и повышением активности ANGI со всеми негативными последствиями его активации [23]. Умеренное снижение экспрессии гена ACE2 наблюдается и в клетках легких человека, инфицированных вирусом [66]. Одним из факторов большей подверженности заражению и более тяжелому течению болезни у людей пожилого возраста с сопутствующими патологиями может являться пониженный уровень этого рецептора в различных органах и тканях [67, 68]. Однако у перенесших COVID-19 пациентов не наблюдалось падение уровня этого рецептора в легких, а в исследованиях на тканях и клетках нечеловекообразных приматов и культуре клеток человека было обнаружено, что под влиянием вирусных инфекций происходит не снижение, а напротив, усиление экспрессии гена ACE2. Классическая схема формирования ответной реакции организма на внедрение вируса включает несколько этапов. Сначала вирусная РНК узнается эндосомальными РНК рецепторами хозяина, TLR3 и TLR7, а также цитозольным сенсором РНК, RIG-I/MDA5, и активируется сигнальный каскад NF-κB и IRF3 с транслокацией этих транскрипционных факторов в ядро, стимуляцией экспрессии интерферонов I типа (альфа- и гамма-интерферонов) и выделением их во внеклеточную среду. Далее интерфероны взаимодействуют с мембранными рецепторами IFNAR, в результате чего активируется JAK-STAT система. Белки STAT1 и STAT2, фосфорилированные с участием JAK1 и TYK2 киназ, формируют комплекс с IRF9 и проникают в ядро, где стимулируют определенные гены (ISGs), при этом ответная реакция находится под контролем специального элемента ISRE, расположенного на промоторе этих генов. Предполагается, что чувствительный к стимулирующему действию интерферонов элемент расположен и на промоторе гена ACE2 человека [54]. Однако установлено, что коронавирусы вмешиваются в формирование защитной реакции организма как на этапе синтеза интерферонов, так и на этапе фосфорилирования STAT1. Первоначально задержанная стимуляция ISGs затем реализуется в гиперактивации экспрессии провоспалительных цитокинов [69]. Возможно, поэтому усиленное применение интерферонов на развитой фазе инфекции может сопровождаться как улучшением, так и ухудшением течения заболевания [54, 70, 71]. Перегрузка активированной системы интерферонов действительно может привести к “цитокиновому шторму” и необходимости использования супрессоров иммунной системы [72], включая антитела к провоспалительным цитокинам, таким как ИЛ-6 и TNF-α или их рецепторам [40] Важно отметить, что мышинный ACE2, хотя и имеет 84%-ную идентичность со

структурой человеческого ACE2, и его усиленная экспрессия, так же как и у человека, наблюдается в легких, сердце и почках [73], заражение мышей SARS-CoV-19 не происходит, и активация гена ACE2 не регулируется интерферонами, что свидетельствует о необходимости с осторожностью относиться к прямой трансляции данных, полученных на нетрансгенных мышинных клеточных моделях, на человека [54].

ANG1–7 является следующим компонентом второй ветви PAC, который впервые был открыт в мозге крысы в 1983 году [74], но его важность была доказана только в 1988 году благодаря наличию гипотензивного и антипролиферативного эффектов, что было противоположно действию ANGII [75, 76]. В основном ANG1–7 превращается из ANGII с помощью ACE2, поскольку аффинность ACE2 к ANGII в 400 раз выше, чем к другим ангиотензинам [77]. Однако обнаружены, по меньшей мере, еще два минорных пути формирования ANG1–7, включающие ANG1/ANG2/ANG1–9/ACE/неприлизин/ANG1–7 и ANGI/неприлизин/ANG1–7 [78]. В 2000 году был обнаружен эффект ANG1–7 на Na⁺, K⁺-АТФ-азную активность, который при высоких концентрациях ANG1–7 сходен с действием ANGII и, по-видимому, опосредуется через A779-чувствительный рецептор, а не через MasR [79, 80]. Изменения в уровне циркулирующего ANG1–7 ассоциируются с хроническими тяжелыми заболеваниями, такими как гипертония, преэклампсия, заболевания миокарда, включая инфаркт миокарда, почечные заболевания, цирроз печени [77]. Также было установлено, что ANG1–7 понижает толерантность к глюкозе и усиливает чувствительность к инсулину, а его рецептор MasR рассматривается как компонент рецепторного инсулинового сигнального пути [81]. В экспериментах на мышях с церебральной ишемией ANG1–7 подавлял воспалительную реакцию через торможение NF-κB пути [82]. В число эффектов ANG1–7 входят подавление норадренергической нейропередачи, торможение апоптоза, усиление клеточной дифференцировки и антиоксидантное действие. Активация системы ANG1–7/MasR рекомендуется при инсульте [83]. Интересно отметить, что повышение соотношения уровней ACE/ACE2 сопровождалось острым респираторным дистресс-синдромом, который можно было предотвратить применением ANG1–7 или блокаторами AT1R [84]. Для лечения COVID-19 также важна способность этого пептида препятствовать апоптозу альвеолярных эпителиальных клеток [85]. В мозге ANG1–7 оказывает нейропротекторное действие и стимулирует синаптогенез [86]. Восстановление обоняния у выздоровевших от COVID-19 людей, возможно, происходит за счет активации нейрогенеза и дифференцировкой нейрональных прогениторов, мигрирующих из субвентрикулярной

зоны в обонятельную луковицу [87]. Однако широкое внедрение ANG1–7 в клиническую практику ограничено его быстрым разрушением в организме и, возможно, сложностью доставки в ткань легких и мозга при внутривенном его введении.

Действие ANG1–7 опосредовано через взаимодействие с MasR, который впервые был описан в 2003 году [63]. После связывания с лигандом MasR интернализуется в ранние эндосомы через механализм, опосредованный клатрином, а затем вновь встраивается в клеточную мембрану. MasR является классическим гептаспиральным рецептором, сопряженным с гетеротримерным G_{αq/11}-белком. Его взаимодействие с лигандом приводит к активации фосфолипазы C. Было установлено, что активация MasR оказывает противоположные эффекты с AT1R, с которым MasR формирует гетеродимер и, таким образом, блокирует его активность [88]. Активация MasR снижает экспрессию воспалительных генов и имеет протекторный эффект на эндотелиальные клетки, нейроны и гематоэнцефалический барьер. Связывание ANG1–7 с MasR стимулирует формирование окиси азота (NO), синтез арахидоновой кислоты, Akt и фосфорилированной ERK1/2. Недавно появились данные, что MasR может активироваться не только ANG1–7, но и другими соединениями, такими как Нейропептид FF, Аламандин, Ангиотензин III, Ангиотензин IV и Ангиопротектин. Агонисты MasR оказывают позитивное влияние в лечении хронической почечной недостаточности, приостанавливая развитие фиброза и воспаления в почках [89]. Интересно отметить, что все рецепторы PAC, включая и ACE2, расположены не только на внешней мембране клеток, но также имеют митохондриальную и ядерную локализацию [90]. Взаимодействует ли вирус с внутриклеточным ACE2, пока остается невыясненным.

Из представленных данных следует, что агонисты MasR могут нивелировать нарушения в PAC, вызываемые снижением уровня ACE2 рецептора при COVID-19, восстанавливать баланс в активности двух ветвей PAC и поэтому представляют перспективные соединения для разработки средств лечения этого заболевания.

Перспективные разработки лигандов MasR

В настоящее время наряду с ANG1–7 известны другие пептидные и неорганические лиганды MasR. Так, [Ala¹]-ANG1–7 узнается MasR и вызывает вазодилатацию сосудов, [Pro¹, Glu²]-ANGII присутствует в плазме крови человека и характеризуется высокой аффинностью к MasR [63, 90]. D-Ala⁷ ANG1–7 и D-Pro⁷ ANG1–7 являются антагонистами MasR и полностью блокируют активность ANG1–7 [63, 91]. В арсенале исследовате-

лей имеются и непептидные агонисты этого рецептора, такие как AVE 0991 и AR234960, которые оказывают противовоспалительное и противовоспалительное действие, а также снижают окислительный стресс через активацию сигнального пути MasR/PKA/CREB/UCP-2 [92]. Недостатком таких агонистов, как AR234960 и нейропептида NPFF, является быстрая десенситизация MasR и накопление внутриклеточного кальция [93]. Для лечения когнитивных нарушений и потери памяти, связанной с нейровоспалением, разработан агонист PNA5, являющийся гликозилированным ANG1–7 с заменой в седьмом положении аминокислотного остатка пролина на серин с присоединением глюкозы и образованием амидов на С-конце, который тормозит окислительный стресс в эндотелиальных клетках путем активации MasR. Для этого соединения характерна улучшенная биодоступность вследствие повышения проницаемости гематоэнцефалического барьера, что сопровождается увеличенной экспрессией и активацией MasR в мозге [94]. Высокая активация MasR отмечена при связывании с мономерами формулы FLGYCIYLNKRKRRGDPAFKRRRLRD (CGEN-856S) и SMCHRWSRAVLFPAAHRP (CGEN-857S), в которых аминокислотный остаток цистеина заменен на серин [95]. Увеличение экспрессии MasR в легких вызывает Лираглутид – агонист рецептора глюкагон-подобного пептида 1 [96]. В настоящее время на второй фазе клинических испытаний в качестве препарата против COVID-19 находится NCT01597635, рекомбинантный внеклеточный домен человеческого ACE2, который стимулирует экспрессию MasR и одновременно, взаимодействуя с вирусом, снижает его возможность связываться с мембранным ACE2 и поражать клетки [97].

Таким образом, для лечения COVID-19 и других вирусных инфекций, возбудители которых используют ACE2, для коррекции нарушений PAC предпочтение следует отдавать стойким аналогам ANG1–7, активирующим MasR, или стимуляции минорных путей, где центральным агентом является неприлизин (рис. 1).

Локальные и системная PAC

Хотя ранее PAC характеризовалась как единая эндокринная система, мишенями которой являются как центральные, так и периферические рецепторы, в настоящее время получены убедительные доказательства наличия PAC в отдельных органах и тканях, где она осуществляет влияние на локальную активность клеток и представлена внутриклеточными и внеклеточными компонентами [98, 99]. Так, в легочной ткани очень важная роль принадлежит компонентам второй ветви PAC: ACE2/ANG1–7/MasR, оказывающим защитное действие на легкие от различных повре-

ждающих факторов [100]. В норме эти локальные системы функционируют относительно независимо, о чем косвенно свидетельствуют различия в содержании компонентов PAC от фемтомолярных до наномолярных концентраций в разных органах и крайне низкие уровни ACE2 или ANG1–7 в крови [101, 102]. При ухудшении состояния хронических больных и, особенно в терминальных состояниях, отмечается повышенное системное содержание свободной внеклеточной формы ACE2 [99, 103].

Подтверждением относительной независимости функционирования локальных PAC служат и данные, свидетельствующие, что при введении в почечную артерию агонистов MasR, AT1R или AT2R, отмечались только изменения функционирования почек, что не отражалось на сердечной деятельности или на уровне артериального давления [104]. Это обстоятельство необходимо учитывать при использовании системного введения лекарственных средств, призванных воздействовать на компоненты локальных PAC.

Как уже указывалось, локальные PAC участвуют в поддержании гомеостаза тканей и их регенерации после повреждения. При этом показано, что нарушения именно в локальных PAC приводят к таким дисфункциям, как атеросклероз, гипертрофия сердца, фиброз почек, диабет второго типа, резистентность к инсулину и ожирение [105]. Причем экспрессия компонентов PAC при таких патологиях чаще всего усиливается: возрастает уровень ангиотензиногена, активность ACE и уровень ANGII [106]. Поэтому ингибиторы ACE или же AT1R показали высокую эффективность и получили очень широкое распространение в терапии гипертонии, гипертрофии сердца, инфаркта миокарда, хронической сердечной недостаточности и диабетической нефропатии, легочной патологии. Особую роль дисбаланс локальной PAC, выражающийся в росте соотношения ANGII/ANG1–7, играет в легких, вызывая острый респираторный дистресс-синдром с 30% летальностью. Повышенный локальный уровень ANGII в легких усиливает инфильтрацию иммунных клеток, которые в свою очередь увеличивают синтез провоспалительных цитокинов TNF- α , ИЛ-1, ИЛ-6. Важно отметить, что при связывании ANGII с AT1R, как и при взаимодействии ряда провоспалительных цитокинов со своими рецепторами, активируются JAK/STAT сигнальные пути [107, 108].

По мере развития заболевания поражаются эндотелиальные клетки микрососудов не только легких, но сердца, почек и кишечника. Связывание ANGII с AT1R приводит к активации p38 MAPK и NF- κ B сигнальных путей наряду с гиперактивацией иммунной системы, что и вызывает “цитокиновый шторм” [109]. Сходная картина развития событий, начинающихся в легких, по-

Таблица 1. Эффекты антигипертензивных средств на уровень вазоактивных пептидов в плазме

Класс соединений	ANGI	ANGII	ANG1–7
AR1B	↑	↑↑	↑
ACEi	↑↑	↓	↑↑
C-ACEi	↑↑	↓	↑
NEPi	↑	↑	↓
ACEi/NEPi	↑↑	↓	↑
ARNI	↑	↑↑	=
AGT-siRNA	↓↓	↓↓	↓↓
APAi	=	=	=
rhACE2	↑	↓↓	↑↑↑

Примечание. Стрелками показаны интенсивность и направленность изменений. Обозначения: ACEi – ACE блокатор; ACEi/NEPi – ACE и NEP блокаторы; AGT-siРНК – ангиотензиноген siРНК; APAi – блокатор аминопептидазы А; C-ACEi – селективный блокатор С-домена ACE; NEPi – блокатор неприлизина.

видимому, происходит и при COVID-19. Поэтому перспективными являются разработки блокаторов JAK (JAK), которые одновременно предотвращают развитие эффектов активации AT1R и ряда провоспалительных цитокинов.

Данные по влиянию различных антигипертензивных соединений на содержания компонентов PAC свидетельствуют, что самым эффективным средством повышения ANG1–7 в плазме крови является рекомбинантная форма свободного ACE2 (табл. 1) [110]. Однако важно отметить, что данное соединение не прошло клинических испытаний, поскольку несмотря на наличие ожидаемых биохимических изменений, снижение кровяного давления отмечалось только у пациентов с исходно повышенным содержанием ANGII в плазме крови, при этом эффект достигался только при очень высоких концентрациях ACE2 [97].

Размышляя о биологии вирусов SARS-CoV и SARS-CoV-19, характеризующихся относительно других вирусных инфекций невысокой контагиозностью, но усиленной аффинностью к ACE2, и учитывая значительное число случаев с бессимптомным течением инфекции, можно полагать, что не сам вирус, а ответная реакция организма на его присутствие определяет характер и тяжесть течения заболевания. Следует заметить, что вирус поражает легкодоступные крупные железистые клетки, расположенные в дыхательных путях, с хорошо развитой системой синтеза самых различных соединений, входящих в состав вырабатываемого ими секрета. О нарушении секреции с начала заболевания свидетельствуют практически отсутствие насморка и сухой кашель. Впоследствии присоединяется нарушение альвеолярного дыхания, причинами которого могут быть

как слипание альвеол из-за недостаточности сурфактанта, секретируемого пневмоцитами типа II и задействованного в газообмене, воспаление и активация бактериальной флоры, всегда присутствующей в дыхательных путях, а также нарушение водно-солевого обмена, нейтрофильная инфильтрация и т.д. Снижение уровня ACE2 в результате интернализации их комплекса с вирусом теоретически препятствовало бы дальнейшему распространению инфекции в организме данного хозяина. Но при попадании вируса в клетку отмечается стимуляция экспрессии гена ACE2 с задержанной умеренной активацией синтеза интерферонов – элементов врожденного иммунитета, наряду с появлением Т-лимфоцитов и активированных макрофагов. По-видимому, усиленный синтез ACE2 компенсирует его падение и не столь драматично отражается на функционировании второй ветви PAC и образовании ANG1–7. Процесс может протекать локально в легочной ткани и, возможно, в мозге, ограничиваясь обонятельной луковицей, являющейся мощным барьером на пути дальнейшего проникновения вирусов, микробов и других вредных соединений в разные структуры мозга [88]. Сохранности мембранного ACE2 способствует и возможность распространение именно SARS-CoV-2 путем слияния пораженных клеток со здоровыми и образования синтиция, благодаря взаимодействию фуриновой протеазы с сайтом на S2 субъединице S-белка вируса [17]. По-видимому, указанные механизмы позволяют инфекции длительное время протекать локально и бессимптомно без поражения многих систем организма, где обнаружены ACE2 рецепторы даже в большем количестве по сравнению с легкими – сердце, сосудах, почках, кишечнике, нейронах мозга. Однако у пожилых людей с сопутствующими патологиями на фоне уже сниженного содержания ACE2 в легких поражаются не только относительно малочисленные пневмоциты типа II (менее 3.6%) и цилиарные клетки (около 8%), коэкспрессирующие одновременно ACE2 и TMPRSS2, но и соседние пневмоциты I и II типов, несущие одиночные рецепторы ACE2 [19]. Клинические данные свидетельствуют и об образовании синтиция [14]. Такой неблагоприятный сценарий развития событий быстро приводит к развитию острого респираторного дистресс-синдрома, характеризующегося выраженным воспалением, окислительным стрессом и отеком, свидетельствующим о нарушении баланса жидкости в легких. Вряд ли причиной столь серьезного осложнения является только нарушение выделения сурфактанта пневмоцитами типа II, поскольку вирус поражает, как указывалось выше, относительно небольшое число этих клеток, а серьезные поражения легочной ткани отмечаются даже у лиц с относительно легким течением заболевания. В связи с этим возникло предположе-

ние, что при COVID-19 не только ослаблена деятельность второй компенсаторной ветви PAC, но в результате активации AT1R задействован дополнительный механизм, опосредованный через рецептор конечных гликозилированных продуктов (RAGE), участвующий в развитии острого респираторного дистресс-синдрома [111].

Роль RAGE в патогенезе COVID-19

Известно, что RAGE является полифункциональным рецептором с многочисленными лигандами, имеющими сайты связывания как на экстраклеточных, так и на внутриклеточном домене [112, 113]. RAGE участвует в патогенезе многих тяжелых хронических заболеваний, включая и легочные патологии, связанные с нарушением баланса жидкости и воспалением [114–116]. В легких RAGE локализован на многочисленных альвеолярных пневмоцитах I типа (95–98% всех альвеолярных клеток), ответственных за газообмен между воздухом в альвеолах и кровью в легочных капиллярах [117], но встречается также и на мембранах пневмоцитов II типа [118]. В молодом здоровом организме фоновая экспрессия RAGE незначительна, за исключением ткани легких, где этот рецептор ответствен за баланс ионов в тканевой жидкости и за регуляцию окислительно-восстановительного потенциала. Известно, что посредством окисления свободных тиолов (например, группы SH) происходит образование дисульфидов. Тиоредоксин 1 восстанавливает дисульфидные связи белков в реакции тиол-дисульфидного обмена, при этом тиоловые группы тиоредоксина окисляются, а их восстановление происходит посредством окислительно-восстановительной реакции с тиоредоксин-редуктазой. Цикл окисления и последующего восстановления служит молекулярным переключателем для регулирования физиологической функции белков и для поддержания гомеостаза, а нарушение этого процесса приводит к окислительному стрессу [119]. В экспериментах на эпителиальных клетках альвеол показано, что связывание RAGE с лигандами сопровождалось усилением окисления белков, а нокдаун RAGE, вызванный siРНК, приводил к увеличению свободных SH-групп и к снижению экспрессии антиоксидантных ферментов, таких как супероксид-дисмутаза 1, тиоредоксина и белка 17, содержащего домен тиоредоксина [120]. Интересно отметить, что на моделях поражения легких у грызунов позитивный эффект оказывали соединения с дисульфидной связью, под влиянием которых снижалась интенсивность окислительного стресса и выраженность воспалительной реакции [121, 122]. В настоящее время ингаляции тиосульфата натрия ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$) предложены для лечения пораженных легких при COVID-19 [123]. При COVID-19 даже при локальном поражении PAC в

легких наблюдается повышение уровня ANG II и активация его рецептора AT1R с последующей трансактивацией цитозольного домена RAGE и активацией сигнального пути NF-κB, приводящего к экспрессии провоспалительных генов [124], генов AT1R и RAGE.

По мере прогрессирования воспалительного процесса и разрушения эпителиального барьера в альвеолах повышенная экспрессия RAGE наблюдается в эндотелиальных клетках и гладкомышечных клетках сосудов, что сопровождается повышением их проницаемости [125, 126]. Для многочисленных эндотелиальных клеток описан несколько другой механизм активации RAGE при взаимодействии ANG II с AT1R, дополнительно включающий экспрессию гена одного из основных эндогенных лигандов RAGE – high mobility group box 1 (HMGB1). Являясь негистоновым ядерным протеином, преимущественно локализованным в ядре, он может выделяться в межклеточное пространство и взаимодействовать с RAGE, повторно запуская активацию NF-κB сигнального пути, реализуя схему последовательной активации: ANGII/AT1R/NF-κB/HMGB1/RAGE [127]. Благодаря наличию положительной обратной связи между активностью AT1R, экспрессией RAGE и его активацией, происходит дальнейшее развитие локального патологического процесса с переходом на системный уровень и поражением сосудов сердца, почек и кишечного тракта. Важно отметить, что центральная роль в патологической взаимосвязи AT1R и RAGE принадлежит NF-κB сигнальному пути [128], блокада активности элементов которого возможна с использованием ингибиторов адаптерных белков путем стабилизации белковых комплексов для удержания их в цитоплазме, а также через ингибирование фактора транскрипции, что в эксперименте имеет выраженный терапевтический эффект [129]. На рис. 2 представлены пути возможного взаимодействия PAC и RAGE, что необходимо учитывать при разработке подходов к лечению COVID-19.

В настоящее время пока нет объяснений, почему дети редко заболевают COVID-19, но если болезнь все-таки развивается и уже получила специальное название “Педиатрический мультисистемный воспалительный синдром” (PMIS), потенциально ассоциированный с COVID-19, то имеет симптоматику, сходную с болезнью Kawasaki, при которой погибают эндотелиальные клетки сосудов сердца и кишечного тракта. В модели этого заболевания на грызунах было выявлено, что апоптоз и некроз этих клеток вызывается активацией сигнального пути HMGB1/RAGE/cathepsin B [130].

Таким образом, прогрессирование COVID-19 обусловлено переходом от локального нарушения PAC в легких к ее системному дисбалансу с

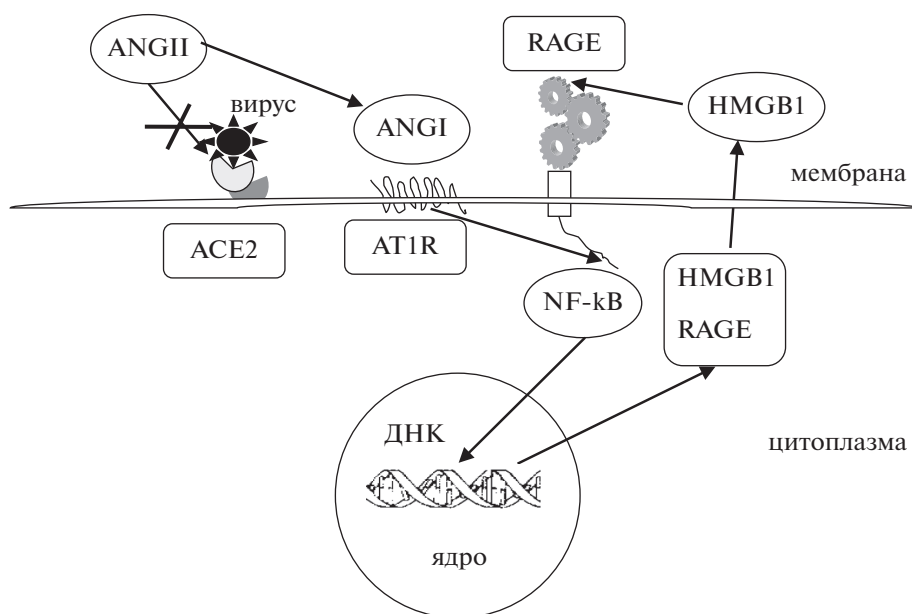


Рис. 2. Схема возможного взаимодействия PAC и RAGE сигнальных путей. Связывание вируса с ACE2 приводит к увеличению уровня ANGII, его взаимодействию с AT1R с последующей транскрипцией цитозольного домена RAGE и активацией NF-κB сигнального пути, стимулирующего экспрессию провоспалительных генов, включая RAGE и одного из центральных лигандов RAGE – HMGB1, который при выходе из клетки взаимодействует с внеклеточным доменом RAGE и вновь запускает процесс, опосредованный активацией NF-κB.

гиперактивацией первой ветви и образованием ANGII, AT1R и RAGE. Многие авторы указывают, что активация синтеза ACE2 может, с одной стороны, вызвать активацию ANG1–7/MasR, но с другой стороны, одновременно увеличить возможность вируса проникать в клетки. Создается впечатление, что только активация локальной ANG1–7/MasR системы наряду с блокадой AT1R и NF-κB сигнальных путей позволят восстановить баланс PAC и предотвратить негативный сценарий развития COVID-19.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В обзоре представлены различные механизмы SARS-CoV-2 инфекции с акцентом на влияние вируса на функционирование ренин-ангиотензиновой системы (PAC) – важнейшей системы в организме, участвующей в регуляции деятельности сердца, сосудов, мозга, почек, кишечника и особенно легких. Дисбаланс PAC вызывает острый респираторный дистресс-синдром и “цитокиновый шторм” – характерные признаки тяжелого течения COVID-19. Использование фармакологических субстанций, восстанавливающих PAC, столь же перспективно, как и таргетирование самого вируса. Однако для нормализации PAC необходимо более комплексное воздействие, включающее активацию MasR наряду с блокадой AT1R и NF-κB сигнального пути. Важно отметить, что такое лечение, основанное на знании

молекулярно-клеточных механизмов развития заболевания, применимо в отношении любых вирусов, использующих для своего внедрения в клетку ACE2 рецептор. В обзоре сознательно не освещен вопрос о роли иммунной системы в патогенезе данной вирусной инфекции, хотя имеется ряд прекрасных обзоров, посвященных этому вопросу [131, 132]. Терапевтическое воздействие на вирусную инфекцию может оказать непредсказуемое влияние на ответную реакцию дисфункциональной иммунной системы больного, от состояния которой зависит тяжесть протекания COVID-19, что важно учитывать при разработке вакцин и проведении иммунотерапии. Очевидно, что открытие механизмов бессимптомного носительства вируса и коррекция ответной реакции организма на внедрение вируса помогут не только справиться с данной пандемией, но и окажутся эффективными при других инфекционных заболеваниях.

Работа выполнена при поддержке гранта РФФИ № 18-15-00392. Автор выражает сердечную благодарность Марии Дюпонт за помощь в обсуждении особенностей биологии SARS-CoV-2.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Lu R., Zhao X., Li J., Niu P., Yang B., Wu H., Wang W., Song H., Huang B., Zhu N., Bi Y., Ma X., Zhan F., Wang L., Hu T., Zhou H., Hu Z., Zhou W., Zhao L., Chen J., Meng Y., Wang J., Lin Y., Yuan J., Xie Z., Ma J., Liu W.J., Wang D., Xu W., Holmes E.C.,

- Gao G.F., Wu G., Chen W., Shi W., Tan W. 2020. Genomic characterisation and epidemiology of 2019 novel coronavirus: implications for virus origins and receptor binding. *Lancet*. **395**, 565–574. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(20\)30251-8](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(20)30251-8)
2. Paules C.I., Marston H.D., Fauci A.S. 2020. Coronavirus infections – more than just the common cold. *JAMA*. **323** (8), 707–708. <https://doi.org/10.1001/jama.2020.0757>
 3. Данные по заразившимся коронавирусом на начало октября 2020 года. [https://www.google.com/search?client=firefox-b-d&q=статистика + по + коронавирусу + в + мире](https://www.google.com/search?client=firefox-b-d&q=статистика+%20по+%20коронавирусу+%20в+%20мире)
 4. El-Aziz T.M.A., Stockand J.D. 2020. Recent progress and challenges in drug development against COVID-19 coronavirus (SARS-CoV-2) – an update on the status. *Infect. Genet. Evol.* **83**, 104327. <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2020.1043267>
 5. Huang C., Wang Y., Li X., Ren L., Zhao J., Hu Y., Zhang L., Fan G., Xu J., Gu X., Cheng Z., Yu T., Xia J., Wei Y., Wu W., Xie X., Yin W., Li H., Liu M., Xiao Y., Gao H., Guo L., Xie J., Wang G., Jiang R., Gao Z., Jin Q., Wang J., Cao B. 2020. Clinical features of patients infected with 2019 novel coronavirus in Wuhan, China. *Lancet*. **395**, 497–506.
 6. Barrett C.D., Moore H.B., Moore E.E., McIntyre R.C., Moore P.K., Burke J., Hua F., Apgar J., Talmor D.S., Sauaia A., Liptzin D.R., Veress L.A., Yaffe M.B. 2020. Fibrinolytic therapy for refractory COVID-19 acute respiratory distress syndrome: Scientific rationale and review. *Res. Pract. Thromb. Haemost.* **4** (4), 524–531. <https://doi.org/10.1002/rth2.12357>
 7. Mao L., Jin H., Wang M., Hu Y., Chen S., He Q., Chang J., Hong C., Zhou Y., Wang D., Miao X., Li Y., Hu B. 2020. Neurologic manifestations of hospitalized patients with coronavirus disease 2019 in Wuhan, China. *JAMA Neurol.* **77** (6), 1–9. 1127. <https://doi.org/10.1001/jamaneurol>
 8. Gelardi M., Trecca E., Cassano M., Ciprandi G. 2020. Smell and taste dysfunction during the COVID-19 outbreak: A preliminary report. *Acta Biomed.* **91** (2), 230–231. <https://doi.org/10.23750/abm.v91i2.9524>
 9. Qiu J. 2020. Covert coronavirus infections could be seeding new outbreaks. *Nature*. <https://doi.org/10.1038/d41586-020-00822-x>
 10. Zhou P., Yang X.L., Wang X.G., Hu B., Zhang L., Zhang W., Si H.R., Zhu Y., Li B., Huang C.L., Chen H.D., Chen J., Luo Y., Guo H., Jiang R.D., Liu M.Q., Chen Y., Shen X.R., Wang X., Zheng X.S., Zhao K., Chen Q.J., Deng F., Liu L.L., Yan B., Zhan F.X., Wang Y.Y., Xiao G.F., Shi Z.L. 2020. A pneumonia outbreak associated with a new coronavirus of probable bat origin. *Nature*. **579**, 270–273. <https://doi.org/10.1038/s41586-020-2012-7>
 11. Hoffmann M., Kleine-Weber H., Schroeder S., Krüger N., Herrler T., Erichsen S., Schiergens T.S., Herrler G., Wu N.H., Nitsche A., Müller M.A., Drosten C., Pöhlmann S. 2020. SARS-CoV-2 cell entry depends on ACE2 and TMPRSS2 and is blocked by a clinically-proven protease inhibitor. *Cell*. **181** (2), 271–280. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2020.02.052>
 12. Wrapp D., Wang N., Corbett K.S., Goldsmith J.A., Hsieh C.L., Abiona O., Graham B.S., McLellan J.S. 2020. Cryo-EM structure of the 2019-nCoV spike in the prefusion conformation. *Science*. **367** (6483), 1260–1263. <https://doi.org/10.1126/science.abb2507>
 13. Li Y., Zhang Z., Yang L., Lian X., Xie Y., Li S., Xin S., Cao P., Lu J. 2020. The MERS-CoV receptor DPP4 as a candidate binding target of the SARS-CoV-2 spike. *iScience*. **23** (6), 101160. <https://doi.org/10.1016/j.isci.2020.101160>
 14. Lukassen S., Chua R.L., Trefzer T., Kahn N.C., Schneider M.A., Muley T., Winter H., Meister M., Veith C., Boots A.W., Hennig B.P., Kreuter M., Conrad C., Eils E. 2020. SARS-CoV-2 receptor ACE2 and TMPRSS2 are primarily expressed in bronchial transient secretory cells. *EMBO J.* **39** (10), e105114. <https://doi.org/10.15252/embj.20105114>
 15. Vankadari N., Wilce J.A. 2020. Emerging WuHan (COVID-19) coronavirus: Glycan shield and structure prediction of spike glycoprotein and its interaction with human CD26. *Emerg. Microb. Infect.* **9**, 601–604. <https://doi.org/10.1080/22221751.2020.1739565>
 16. Wan Y., Shang J., Graham R., Baric R.S., Li F. 2020. Receptor recognition by the novel coronavirus from Wuhan: An analysis based on decade-long structural studies of SARS coronavirus. *J. Virol.* **94** (7), e00127–20. <https://doi.org/10.1128/JVI.00127-20>
 17. Hoffmann M., Kleine-Weber H., Pöhlmann S. 2020. A multibasic cleavage site in the spike protein of SARS-CoV-2 is essential for infection of human lung cells. *Mol. Cell*. **78** (4), 779–784. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2020.04.022>
 18. Coutard B., Valle C., de Lamballerie X., Canard B., Seidah N.G., Decroly E. 2020. The spike glycoprotein of the new coronavirus 2019-nCoV contains a furin-like cleavage site absent in CoV of the same clade. *Antiviral Res.* **176**, 104742. <https://doi.org/10.1016/j.antiviral.104742>
 19. García-Fojeda B., González-Carnicero Z., de Lorenzo A., Minutti C.M., de Tapia L., Euba B., Iglesias-Ceacero A., Castillo-Lluva S., Garmendia J., Casals C. 2019. Lung surfactant lipids provide immune protection against haemophilus influenzae respiratory infection. *Front. Immunol.* **10**, 458. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2019.00458>
 20. Buzhdygan T.P., DeOre B.J., Baldwin-Leclair A., McGary H., Razmpour R., Galie P.A., Potula R., Andrews A.M., Ramirez S.H. 2020. The SARS-CoV-2 spike protein alters barrier function in 2D static and 3D microfluidic in vitro models of the human blood-brain barrier. *Neurobiol. Dis.* **146**, 105131. <https://doi.org/10.1016/j.nbd.2020.105131>
 21. Vincent M.J., Bergeron E., Benjannet S., Erickson B.R., Rollin P.E., Ksiazek T.G., Seidah N.G., Nichol S.T. 2005. Chloroquine is a potent inhibitor of SARS coronavirus infection and spread. *Virology*. **332**, 69. <https://doi.org/10.1186/1743-422X-2-69>
 22. Dobay O., Laub K., Stercz B., Kéri A., Balázs B., Tóthpál A., Kardos S., Jaikumpun P., Ruksakiet K., Quinton P.M., Zsembery Á. 2018. Bicarbonate inhibits bacterial growth and biofilm formation of prevalent

- cystic fibrosis pathogens. *Front. Microbiol.* **9**, 2245. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.02245>
23. Gheblawi M., Wang K., Viveiros A., Nguyen Q., Zhong J.C., Turner A.J., Raizada M.K., Grant M.B., Oudit G.Y. 2020. Angiotensin-converting enzyme 2: SARS-CoV-2 receptor and regulator of the renin-angiotensin system: Celebrating the 20th anniversary of the discovery of ACE2. *Circ. Res.* **126** (10), 1456–1474. <https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.120.317015>
 24. Chigr F., Merzouki M., Najimi M. 2020. Autonomic brain centers and pathophysiology of COVID-19. *ACS Chem. Neurosci.* **11** (11), 1520–1522. <https://doi.org/10.1021/acchemneuro.0c00265>
 25. Orsucci D., Ienco E.C., Nocita G., Napolitano A., Vista M. 2020. Neurological features of COVID-19 and their treatment. *Drugs Context.* **9**, 2020-5-1. eCollection 2020. <https://doi.org/10.7573/dic.2020-5-1>
 26. Netland J., Meyerholz D.K., Moore S., Cassell M., Perlman S. 2008. Severe acute respiratory syndrome coronavirus infection causes neuronal death in the absence of encephalitis in mice transgenic for human ACE2. *J. Virol.* **82** (15), 7264–7275. <https://doi.org/10.1128/JVI.00737-08>
 27. Li Y.C., Bai W.Z., Hashikawa T.J. 2020. The neuroinvasive potential of SARS-CoV2 may play a role in the respiratory failure of COVID-19 patients. *Med. Virol.* **92** (6), 552–555. <https://doi.org/10.1002/jmv.25728>
 28. Tassorelli C., Mojoli F., Baldanti F., Bruno R., Benazzo M. 2020. COVID-19: What if the brain had a role in causing the deaths? *Eur. J. Neurol.* <https://doi.org/10.1111/ene.14275>
 29. Dziewas R., Warnecke T., Zürcher P., Schefold J.C. 2020. Dysphagia in COVID-19 – multilevel damage to the swallowing network? *Eur J Neurol.* <https://doi.org/10.1111/ene.14367>
 30. Montalvan V., Lee J., Bueso T., De Toledo J., Rivas K. 2020. Neurological manifestations of COVID-19 and other coronavirus infections: A systematic review. *Clin. Neurol. Neurosurg.* **194**, 105921. <https://doi.org/10.1016/j.clineuro.2020.105921>
 31. Serrano-Castro P.J., Estivill-Torrús G., Cabezudo-García P., Reyes-Bueno J.A., Ciano Petersen N., Aguilar-Castillo M.J., Suárez-Pérez J., Jiménez-Hernández M.D., Moya-Molina M.Á., Oliver-Martos B., Arrabal-Gómez C., de Fonseca F.R. 2020. Impact of SARS-CoV-2 infection on neurodegenerative and neuropsychiatric diseases: A delayed pandemic? *Neurología (English Edition)*. **35** (4), 14021–14027. <https://doi.org/10.1016/j.nrleng.2020.04.002>
 32. Iroegbu J.D., Ifenatuoha C.W., Ijomone O.M. 2020. Potential neurological impact of coronaviruses: Implications for the novel SARS-CoV-2. *Neurol Sci.* **41** (6), 1329–1337. <https://doi.org/10.1007/s10072-020-04469-4>
 33. Guzzi P.H., Mercatelli D., Ceraolo C., Giorgi F.M. 2020. Master regulator analysis of the SARS-CoV-2/human interactome. *J. Clin. Med.* **9**, 982–997. <https://doi.org/10.3390/jcm9040982>
 34. Gulyaeva N.V., Bobkova N.V., Kolosova N.G., Samokhin A.N., Stepanichev M.Y., Stefanova N.A. 2017. Molecular and cellular mechanisms of sporadic Alzheimer's disease: Studies on rodent models in vivo. *Biochem. (Mosc)*. **82** (10), 1088–1102. <https://doi.org/10.1134/S0006297917100029>
 35. Bobkova N.V., Lyabin D.N., Medvinskaya N.I., Samokhin A.N., Nekrasov P.V., Nesterova I.V., Aleksandrova I.Y., Tatarnikova O.G., Bobylev A.G., Vikhlyantsev I.M., Kukharsky M.S., Ustyugov A.A., Polyakov D.N., Eliseeva I.A., Kretov D.A., Guryanov S.G., Ovchinnikov L.P. 2015. The Y-Box binding protein 1 suppresses Alzheimer's disease progression in two animal models. *PLoS One.* **10** (9), e0138867. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0138867>
 36. Evgen'ev M.B., Krasnov G.S., Nesterova I.V., Garbuz D.G., Karpov V.L., Morozov A.V., Snezhkina A.V., Samokhin A.N., Sergeev A., Kulikov A.M., Bobkova N.V. 2017. Molecular mechanisms underlying neuroprotective effect of intranasal administration of human Hsp70 in mouse model of Alzheimer's disease. *J. Alz. Dis.* **59** (4), 1415–1426. <https://doi.org/10.3233/JAD-170398>
 37. Millet J.K., Whittaker G.R. 2015. Host cell proteases: critical determinants of coronavirus tropism and pathogenesis. *Virus. Res.* **202**, 120–134. <https://doi.org/10.1016/j.virusres.2014.11.021>
 38. Imai Y., Kuba K., Rao S., Huan Y., Guo F., Guan B., Yang P., Sarao R., Wada T., Leong-Poi H., Crackower M.A., Fukamizu A., Hui C.C., Hein L., Uhlig S., Slutsky A.S., Jiang C., Penninger J.M. 2005. Angiotensin-converting enzyme 2 protects from severe acute lung failure. *Nature.* **436** (7047), 112–116. <https://doi.org/10.1038/nature03712>
 39. Kuba K., Imai Y., Rao S., Gao H., Guo F., Guan B., Huan Y., Yang P., Zhang Y., Deng W., Bao L., Zhang B., Liu G., Wang Z., Chappell M., Liu Y., Zheng D., Leibbrandt A., Wada T., Slutsky A.S., Liu D., Qin C., Jiang C., Penninger J.M. 2005. A crucial role of angiotensin converting enzyme 2 (ACE2) in SARS coronavirus-induced lung injury. *Nat. Med.* **11** (8), 875–879. <https://doi.org/10.1038/nm1267>
 40. Методические рекомендации Минздрава России “Профилактика, диагностика и лечение новой коронавирусной инфекции COVID-19” (вер. 6 от 28.04.2020)
 41. Colson P., Rolain J.M., Lagier J.C., Brouqui P., Raoult D. 2020. Chloroquine and hydroxychloroquine as available weapons to fight COVID-19. *Int. J. Antimicrob. Agents.* **55** (4), 105932. <https://doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2020.105932>
 42. Huang C., Wang Y., Li X., Ren L., Zhao J., Hu Y., Zhang L., Fan G., Xu J., Gu X., Cheng Z., Yu T., Xia J., Wei Y., Wu W., Xie X., Yin W., Li H., Liu M., Xiao Y., Gao H, Guo L., Xie J., Wang G., Jiang R., Gao Z., Jin Q., Wang J., Cao B. 2020. Clinical features of patients infected with 2019 novel coronavirus in Wuhan, China. *Lancet.* **395** (10223), 497–506. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(20\)30183-5](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(20)30183-5)
 43. Dayer M.R., Taleb-Gassabi S., Dayer M.S. 2017. Lopinavir; a potent drug against coronavirus infection: Insight from molecular docking study. *Arch. Clin.*

- Infect. Dis.* **12** (4), 13823.
<https://doi.org/0.5812/archcid.13823>
44. Lu H. 2020. Drug treatment options for the 2019-new coronavirus (2019-nCoV). *Biosci. Trends.* **14** (1), 69–71.
<https://doi.org/10.5582/bst.2020.01020>
 45. Hart B.J., Dyllal J., Postnikova E., Zhou H., Kindrachuk J., Johnson R.F., Olinger G.G., Frieman M.B., Holbrook M.R., Jahrling P.B., Hensley L. 2014. Interferon- β and mycophenolic acid are potent inhibitors of Middle East respiratory syndrome coronavirus in cell-based assays. *J. Gen. Virol.* **95** (Pt 3), 571–577.
<https://doi.org/10.1099/vir.0.061911-0>
 46. Barlow A., Landolf K.M., Barlow B., Yeung S.Y.A., Heavner J.J., Claassen C.W., Heavner M.S. 2020. Review of emerging pharmacotherapy for the treatment of coronavirus disease 2019. *Pharmacother.* **40** (5), 416–437.
<https://doi.org/10.1002/phar.2398>
 47. Wang Y., Jiang W., He Q., Wang C., Wang B., Zhou P., Dong N., Tong Q. 2020. A retrospective cohort study of methylprednisolone therapy in severe patients with COVID-19 pneumonia. *Signal. Transduct. Target. Ther.* **5**, 57.
<https://doi.org/10.1038/s41392-020-0158-2>
 48. Randomised Evaluation of COVID-19 Therapy (RECOVERY). 2020. Low-cost dexamethasone reduces death by up to one third in hospitalised patients with severe respiratory complications of COVID-19. 2020. Available at: <https://www.recovery-trial.net/news/low-cost-dexamethasone-reduces-death-by-up-to-one-third-in-hospitalised-patients-with-severe-respiratory-complications-of-covid-19>. Accessed June 23, 2020.
 49. Richardson P., Griffin I., Tucker C., Smith D., Oechsle O., Phelan A., Rawling M., Savory E., Stebbing J. 2020. Baricitinib as potential treatment for 2019-nCoV acute respiratory disease. *Lancet.* **395** (10223), e30–e31.
[https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(20\)30304-4](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(20)30304-4)
 50. de Wit E., Feldmann F., Cronin J., Jordan R., Okumura A., Thomas T., Scott D., Cihlar T., Feldmann H. 2020. Prophylactic and therapeutic remdesivir (GS-5734) treatment in the rhesus macaque model of MERS-CoV infection. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **117** (12), 6771–6776.
<https://doi.org/10.1073/pnas.1922083117>
 51. Pardo J., Shukla A.M., Chamarthi G., Gupte A. 2020. The journey of remdesivir: From Ebola to COVID-19. *Drugs. Context.* **9**, 2020-4-14.
<https://doi.org/10.7573/dic.2020-4-14>
 52. Mair-Jenkins J., Saavedra-Campos M., Baillie J.K., Cleary P., Khaw F.M., Lim W.S., Makki S, Rooney K.D., Nguyen-Van-Tam J.S., Beck C.R. Convalescent plasma study group. 2015. The effectiveness of convalescent plasma and hyperimmune immunoglobulin for the treatment of severe acute respiratory infections of viral etiology: A systematic review and exploratory meta-analysis. *J. Infect. Dis.* **211** (1), 80–90.
<https://doi.org/10.1093/infdis/jiu396>
 53. Iwasaki A., Pillai P.S. 2014. Innate immunity to influenza virus infection. *Nat. Rev. Immunol.* **14** (5), 315–328.
<https://doi.org/10.1038/nri3665>
 54. Ziegler C.G.K., Allon S.J., Nyquist S.K., Mbanjo I.M., Miao V.N., Tzouanas C.N., Cao Y., Yousif A.S., Bals J., Hauser B.M., Feldman J., Muus C., Wadsworth M.H., Kazer S.W., Hughes T.K., Doran B., Gatter G.J., Vukovic M., Taliaferro F., Mead B.E., Guo Z., Wang J.P., Gras D., Plaisant M., Ansari M., Angelidis I., Adler H., Sucre J.M.S., Taylor C.J., Lin B., Waghray A., Mitsialis V., Dwyer D.F., Buchheit K.M., Boyce J.A., Barrett N.A., Laidlaw T.M., Carroll S.L., Colonna L., Tkachev V., Peterson C.W., Yu A., Zheng H.B., Gideon H.P., Winchell C.G., Lin P.L., Bingle C.D., Snapper S.B., Kropski J.A., Theis F.J., Schiller H.B., Zaragosi L.E., Barbry P., Leslie A., Kiem H.P., Flynn J.L., Fortune S.M., Berger B., Finberg R.W., Kean L.S., Garber M., Schmidt A.G., Lingwood D., Shalek A.K., Ordovas-Montanes J. 2020. SARS-CoV-2 Receptor ACE2 Is an interferon-stimulated gene in human airway epithelial cells and is detected in specific cell subsets across tissues. *Cell.* **181** (5), 1016–1035.e19.
<https://doi.org/10.1016/j.cell.2020.04.035>
 55. Fang L., Karakiulakis G., Roth M. 2020. Are patients with hypertension and diabetes mellitus at increased risk for COVID-19 infection? *Lancet Respir. Med.* **8** (4), E21.
[https://doi.org/10.1016/S2213-2600\(20\)30116-8](https://doi.org/10.1016/S2213-2600(20)30116-8)
 56. Liu P.P., Blet A., Smyth D., Li H. 2020. The Science underlying COVID-19: Implications for the cardiovascular system. *Circulation.* **142** (1), 68–78.
<https://doi.org/10.1161/CIRCULATION-AHA.120.047549>
 57. Liu Y., Huang F., Xu J., Yang P., Qin Y., Cao M., Wang Z., Li X., Zhang S., Ye L., Lu J., Wei J., Xie T., Gao H., Xu K.-F., Wang F., Liu L., Jang C. 2020. Anti-hypertensive Angiotensin II receptor blockers associated to mitigation of disease severity in elderly COVID-19 patients. medRxiv 2020.2003.2020.20039586).
<https://doi.org/10.1101/2020.03.20.20039586>
 58. Kreutz R., Algharably E.A.E., Azizi M., Dobrowolski P., Guzik T., Januszewicz A., Persu A., Prejbisz A., Riemer T.G., Wang J.G., Burnier M. 2020. Hypertension, the renin-angiotensin system, and the risk of lower respiratory tract infections and lung injury: Implications for COVID-19. *Cardiovasc. Res.* **116** (10), 1688–1699. cvaa097.
<https://doi.org/10.1093/cvr/cvaa097>
 59. Koka V., Huang X.R., Chung A.C., Wang W., Truong L.D., Lan H.Y. 2008. Angiotensin II up-regulates angiotensin I-converting enzyme (ACE), but down-regulates ACE2 via the AT1-ERK/p38 MAP kinase pathway. *Am. J. Pathol.* **172** (5), 1174–1183.
<https://doi.org/10.2353/ajpath.2008.070762>
 60. Patel V.B., Clarke N., Wang Z., Fan D., Parajuli N., Basu R., Putko B., Kassiri Z., Turner A.J., Oudit G.Y. 2014. Angiotensin II induced proteolytic cleavage of myocardial ACE2 is mediated by TACE/ADAM-17: A positive feedback mechanism in the RAS. *J. Mol. Cell. Cardiol.* **66**, 167–176.
<https://doi.org/10.1016/j.yjmcc.2013.11.017>
 61. Scott A.J., O’Dea K.P., O’Callaghan D., Williams L., Dokpesi J.O., Tatton L., Handy J.M., Hogg P.J., Takata M. 2011. Reactive oxygen species and p38 mitogen-activated protein kinase mediate tumor

- necrosis factor α -converting enzyme (TACE/ADAM-17) activation in primary human monocytes. *J. Biol. Chem.* **286** (41), 35466–35476.
<https://doi.org/10.1074/jbc.M111.277434>
62. Chappell M.C. 2016. Biochemical evaluation of the renin-angiotensin system: The good, bad, and absolute? *Am. J. Physiol. Heart. Circ. Physiol.* **310** (2), H137–H152.
<https://doi.org/10.1152/ajpheart.00618.2015>
63. Santos R.A.S., Simoes e Silva A.C., Maric C., Silva D.M.R., Machado R.P., Buhr I., Heringer-Walther S., Pinheiro S.V.B., Teresa Lopes M., Bader M., Mendes E.P., Lemos V.S., Campagnole-Santos M.J., Schultheiss H.-P., Speth R., Walther T. 2003. Angiotensin-(1–7) is an endogenous ligand for the G protein-coupled receptor Mas. *PNAS.* **100** (14), 8258–8263.
64. Santos R.A., Ferreira A.J., Simões e Silva A.C. 2008. Recent advances in the angiotensin-converting enzyme 2–angiotensin(1–7)–Mas axis. *Exp. Physiol.* **93** (5), 519–527.
<https://doi.org/10.1113/expphysiol.2008.042002>
65. Oudit G.Y., Kassiri Z., Patel M.P., Chappell M., Butany J., Backx P.H., Tsushima R.G., Scholey J.W., Khokha R., Penninger J.M. 2007. Angiotensin II-mediated oxidative stress and inflammation mediate the age-dependent cardiomyopathy in ACE2 null mice. *Cardiovasc. Res.* **75** (1), 29–39.
<https://doi.org/10.1016/j.cardiores.2007.04.007>
66. Guzzi P.H., Mercatelli D., Ceraolo C., Giorgi F.M. 2020. Master regulator analysis of the SARS-CoV-2. *Human. Interactome. J. Clin. Med.* **9** (4), 982–997.
<https://doi.org/10.3390/jcm9040982>
67. Verdecchia P., Cavallini C., Spanevello A., Angeli F. 2020. The pivotal link between ACE2 deficiency and SARS-CoV-2 infection. *Eur. J. Intern. Med.* **76**, 14–20.
<https://doi.org/10.1016/j.ejim.2020.04.037>
68. Magrone T., Magrone M., Jirillo E. 2020. Focus on receptors for coronaviruses with special reference to angiotensin-converting enzyme 2 as a potential drug target – a perspective. *Endocr. Metab. Immune. Disord. Drug. Targets.* **20** (6), 807–811.
<https://doi.org/10.2174/1871530320666200427112902>
69. de Wit E., van Doremalen N., Falzarano D., Munster V.J. 2016. SARS and MERS: Recent insights into emerging coronaviruses. *Nat. Rev. Microbiol.* **14** (8), 523–534.
<https://doi.org/10.1038/nrmicro.2016.81>
70. Dong L., Hu S., Gao J. 2020. Discovering drugs to treat coronavirus disease 2019 (COVID-19). *Drug Discov. & Therap.* **14** (1), 58–60. doi.org/.
<https://doi.org/10.5582/ddt.2020.01012>
71. Prompetchara, E., Ketloy C., Palaga T. 2020. Immune responses in COVID-19 and potential vaccines: Lessons learned from SARS and MERS epidemic. *Asian. Pac. J. Allergy. Immunol.* **38** (1), 1–9.
<https://doi.org/10.12932/AP-200220-0772>
72. Choy E.H., De Benedetti F., Takeuchi T., Hashizume M., John M.R., Kishimoto T. 2020. Translating IL-6 biology into effective treatments. *Nat. Rev. Rheumatol.* **16** (6), 335–345.
<https://doi.org/10.1038/s41584-020-0419-z>
73. Xie X.D., Chen J.Z., Wang X.X., Zhu J.H., Sun J., Tao M., Shang Y.P., Guo X.G. 2005. Cloning, expression and sequence analysis and tissue distribution of angiotensin-converting enzyme 2 (ACE2) gene in adult mice. *Zhejiang Da Xue Xue Bao Yi Xue Ban.* **34** (1), 48–54.
74. Tonnaer J.A., Engels G.M., Wiegant V.M., Burbach J.P., De Jong W., De Wied D. 1983. Proteolytic conversion of angiotensins in rat brain tissue. *Eur. J. Biochem.* **131** (2), 415–421.
<https://doi.org/10.1111/j.1432-1033.1983.tb07279.x>
75. Santos R.A., Brosnihan K.B., Chappell M.C., Pesquero J., Chernicky C.L., Greene L.J., Ferrario C.M. 1988. Converting enzyme activity and angiotensin metabolism in the dog brainstem. *Hypertension.* **11** (2 Pt 2), 1153–1157.
<https://doi.org/10.1161/01.hyp.11.2.i153>
76. Ribeiro-Oliveira A., Nogueira A.I., Pereira R.M., Boas W.W.V., dos Santos R.A.S., De Silva A.C.S. 2008. The renin–angiotensin system and diabetes: An update. *Vasc. Health. Risk. Manag.* **4** (4), 787–803.
77. Rice G.I., Thomas D.A., Grant P.J., Turner A.J., Hooper N.M. 2004. Evaluation of angiotensin-converting enzyme (ACE), its homologue ACE2 and neprilysin in angiotensin peptide metabolism. *Biochem. J.* **383** (Pt 1), 45–51.
<https://doi.org/10.1042/BJ20040634>
78. Donoghue M., Hsieh F., Baronas E., Godbout K., Gosselin M., Stagliano N., Donovan M., Woolf B., Robison K., Jeyaseelan R., Breitbart R.E., Acton S. 2000. A novel angiotensin-converting enzyme-related carboxypeptidase (ACE2) converts angiotensin I to angiotensin 1–9. *Circ. Res.* **87** (5), E1–E9.
<https://doi.org/10.1161/01.res.87.5.e1>
79. Caruso-Neves C., Lara L.S., Rangel L.B., Grossi A.L., Lopes A.G. 2000. Angiotensin-(1–7) modulates the ouabain-insensitive Na⁺-ATPase activity from basolateral membrane of the proximal tubule. *Biochim. Biophys. Acta*, **1467** (1), 189–197.
[https://doi.org/10.1016/s0005-2736\(00\)00219-4](https://doi.org/10.1016/s0005-2736(00)00219-4)
80. Lara L.S., Bica R.B.S., Sena S.L.F., Correa J.S., Marques-Fernandes M.F., Lopes A.G., Caruso-Neves C. 2002. Angiotensin-(1–7) reverts the stimulatory effect of angiotensin II on the proximal tubule Na⁺-ATPase activity via a A779-sensitive receptor. *Regul. Pept.* **103** (1), 17–22.
[https://doi.org/10.1016/s0167-0115\(01\)00322-6](https://doi.org/10.1016/s0167-0115(01)00322-6)
81. Moreira de Macêdo S., Guimarães T.A., Feltenberger J.D., Sousa Santos S.H. 2014. The role of renin-angiotensin system modulation on treatment and prevention of liver diseases. *Peptides.* **62**, 189–196.
<https://doi.org/10.1016/j.peptides.2014.10.005>
82. Jiang T., Gao L., Guo J., Lu J., Wang Y., Zhang Y. 2012. Suppressing inflammation by inhibiting the NF- κ B pathway contributes to the neuroprotective effect of angiotensin-(1–7) in rats with permanent cerebral ischaemia. *Br. J. Pharmacol.* **167** (7), 1520–1532.
<https://doi.org/10.1111/j.1476-5381.2012.02105.x>
83. Jiang T., Gao L., Lu J. 2013. ACE2-Ang-(1-7)-Mas axis in brain: A potential target for prevention and treatment of ischemic stroke. *Curr. Neuropharmacol.*

- 11** (2), 209–217.
<https://doi.org/10.2174/1570159X11311020007>
84. Wösten-van Asperen R.M., Lutter R., Specht P.A., Moll G.N., van Woensel J.B., van der Loos C.M., van Goor H., Kamilic J., Florquin S., Bos A.P. 2011. Acute respiratory distress syndrome leads to reduced ratio of ACE/ACE2 activities and is prevented by angiotensin-(1–7) or an angiotensin II receptor antagonist. *J. Pathol.* **225** (4), 618–627. Epub 2011 Oct 18. <https://doi.org/10.1002/path.2987>
 85. Uhal B.D., Li X., Xue A., Gao X., Abdul-Hafez A. 2011. Regulation of alveolar epithelial cell survival by the ACE-2/angiotensin 1–7/Mas axis. *Am. J. Physiol. Lung Cell. Mol. Physiol.* **301** (3), L269–L274. <https://doi.org/10.1152/ajplung.00222.2010>
 86. Jackson L.D., Eldahshan W., Fagan S.C., Ergul A. 2018. Within the brain: The renin angiotensin system. *Int. J. Mol. Sci.* **19** (3), 876. <https://doi.org/10.3390/ijms19030876>
 87. Loseva E.V., Karnup S.V. 2004. Neurogenesis in the mature olfactory bulb and its possible functional destination. *Usp. Fiziol. Nauk.* **35** (4), 11–18.
 88. Kostenis E., Milligan G., Christopoulos A., Sanchez-Ferrer C.F., Heringer-Walther S., Sexton P.M., Gembardt F., Kellett E., Martini L., Vanderheyden P., Schultheiss H.P., Walther T. 2005. G-protein-coupled receptor Mas is a physiological antagonist of the angiotensin II type 1 receptor. *Circulation.* **111** (14), 1806–1813. <https://doi.org/10.1161/01.CIR.0000160867.23556.7D>
 89. da Silva Saldanha A.A., Rodrigues Prestes T.R., Lauar A.O., Finotti B.B., Simoes E., Silva A.C. 2017. Renin angiotensin system and cytokines in chronic kidney disease: Clinical and experimental evidence. *Protein. Pept. Lett.* **24** (9), 799–808. <https://doi.org/10.2174/0929866524666170818160809>
 90. Dilek I., Henning R.H., van Gilst W.H., Roks A.J.M. 2008. Angiotensin-(1-7): Pharmacological properties and pharmacotherapeutic perspectives. *Eur. J. Pharmacol.* **585** (2–3), 303–312. <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2008.02.090>
 91. Santos R.A., Campagnole-Santos M.J., Baracho N.C., Fontes M.A., Silva L.C., Neves L.A., Oliveira D.R., Caligorne S.M., Rodrigues A.R., Gropen J.C. 1994. Characterization of a new angiotensin antagonist selective for angiotensin-(1-7): Evidence that the actions of angiotensin-(1-7) are mediated by specific angiotensin receptors. *Brain Res. Bull.* **35** (4), 293–298. [https://doi.org/10.1016/0361-9230\(94\)90104-x](https://doi.org/10.1016/0361-9230(94)90104-x)
 92. Wiemer G., Dobrucki L.W., Louka F.R. 2002. AVE 0991, a nonpeptide mimic of the effects of Angiotensin-(1–7) on the endothelium. *Hypertension.* **40** (6), 847–852. <https://doi.org/10.1161/01.hyp.0000037979.53963.8f>
 93. Tirupula K.C., Desnoyer R., Speth R.C., Karnik S.S. 2014. Atypical signaling and functional desensitization response of MAS receptor to peptide ligands. *PLoS One.* **9** (7), e103520. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0103520>
 94. Hay M., Polt R., Heien M.L., Vanderah T.W., Largent-Milnes T.M., Rodgers K., Falk T., Bartlett M.J., Doyle K.P., Konhilas J.P. 2019. A Novel angiotensin-(1-7) glycosylated Mas receptor agonist for treating vascular cognitive impairment and inflammation-related memory dysfunction. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **369** (1), 9–25. <https://doi.org/10.1124/jpet.118.254854>
 95. Savergnini S.Q., Beiman M., Lautner R.Q., de Paula-Carvalho V., Allahdadi K., Pessoa D.C., Costa-Fraga F.P., Fraga-Silva R.A., Cojocarú G., Cohen Y., Bader M., de Almeida A.P., Rotman G., Santos R.A.S. 2010. Vascular relaxation, antihypertensive effect, and cardioprotection of a novel peptide agonist of the MAS receptor. *Hypertension.* **56** (1), 112–120. <https://doi.org/10.1161/HYPERTENSIONAHA.110.152942>
 96. Fandiño J., Vaz A. A., Toba L., Romani-Pérez M., González-Matías L., Mallo F., Diz-Chaves Y. 2018. Liraglutide enhances the activity of the ACE-2/Ang(1–7)/Mas receptor pathway in lungs of male pups from food-restricted mothers and prevents the reduction of SP-A. *Int. J. Endocrin.* 2018, **6920620**. <https://doi.org/10.1155/2018/6920620>
 97. Khan A., Benthin C., Zeno B., Albertson T.E., Boyd J., Christie J.D., Hall R., Poirier G., Ronco J.J., Tidswell M., Hards K., Powley W.M., Wright T.J., Siederer S.K., Fairman D.A., Lipson D.A., Bayliffe A.I., Lazaar A.L. 2017. A pilot clinical trial of recombinant human angiotensin-converting enzyme 2 in acute respiratory distress syndrome. *Crit. Care.* **21**, 234. <https://doi.org/10.1186/s13054-017-1823-x>
 98. Paul M., Poyan M.A., Kreutz R. 2006. Physiology of local renin-angiotensin systems. *Physiol. Rev.* **86** (3), 747–803. <https://doi.org/10.1152/physrev.00036.2005>
 99. Chapell M.C. 2016. Biochemical evaluation of the renin-angiotensin system: The good, bad, and absolute? *Am. J. Physiol. Heart. Circ. Physiol.* **310** (2), H137–H152. <https://doi.org/10.1152/ajpheart.00618.2015>
 100. Imai Y., Kuba K., Rao S., Huan Y., Guo F., Guan B., Yang P., Sarao R., Wada T., Leong-Poi H., Crackower M.A., Fukamizu A., Hui C.C., Hein L., Uhlig S., Slutsky A.S., Jiang C., Penninger J.M. 2005. Angiotensin-converting enzyme 2 protects from severe acute lung failure. *Nature.* **436** (7047), 112–116. <https://doi.org/10.1038/nature03712>
 101. Kobori H., Katsurada A., Miyata K., Ohashi N., Satou R., Saito T., Hagiwara Y., Miyashita K., Navar L.G. 2008. Determination of plasma and urinary angiotensinogen levels in rodents by newly developed ELISA. *Am. J. Physiol. Renal. Physiol.* **294** (5), F1257–F1263. <https://doi.org/10.1152/ajprenal.005882007>
 102. Campbell D.J., Duncan A.M., Kladis A., Harrap S.B. 1995. Angiotensin peptides in spontaneously hypertensive and normotensive Donryu rats. *Hypertension.* **25** (5), 928–934. <https://doi.org/10.1161/01.hyp.25.5.928>
 103. Epelman S., Shrestha K., Troughton R.W., Francis G.S., Sen S., Klein A.L., Tang W.H. 2009. Soluble angiotensin-converting enzyme 2 in human heart failure: Relation with myocardial function and clinical outcomes. *J. Card. Fail.* **15** (7), 565–571. <https://doi.org/10.1016/j.cardfail.2009.01.014>

104. Luo H., Wang X., Chen C., Wang J., Zou X., Li C., Xu Z., Yang X., Shi W., Zeng C. 2015. Oxidative stress causes imbalance of renal renin-angiotensin system (RAS) components and hypertension in obese Zucker rats. *J. Am. Heart Assoc.* **4** (2), e001559. <https://doi.org/10.1161/JAHA.114.001559>
105. Nehme A., Zouein F.A., Zayeri Z.D., Zibara K. 2019. An update on the tissue renin-angiotensin system and its role in physiology and pathology. *J. Cardiovasc. Dev. Dis.* **6** (2), 14. <https://doi.org/10.3390/jcdd6020014>
106. Engeli S., Negrel R., Sharma A.M. 2000. Physiology and pathophysiology of the adipose tissue renin-angiotensin system. *Hypertension.* **35** (6), 1270–1277. <https://doi.org/10.1161/01.hyp.35.6.1270>
107. Lee E.B., Fleischmann R., Hall S., Wilkinson B., Bradley J.D., Gruben D., Konec T., Krishnaswami S., Wallenstein G.V., Zang C., Zwillich S.H., van Vollenhoven R.F. 2014. Tofacitinib versus methotrexate in rheumatoid arthritis. *N. Engl. J. Med.* **370** (25), 2377–2386. <https://doi.org/10.1161/01.hyp.35.6.1270>
108. Aazami F.S.H., Khoshmirsafa M., Kamali M., Mohsenzadegan M., Pornour M., Mansouri D. 2020. JAK inhibition as a new treatment strategy for patients with COVID-19. *Int. Arch. Allergy. Immunol.* **181** (6), 467–475. <https://doi.org/10.1159/000508247>
109. Li Y., Cao Y., Zeng Z., Liang M., Xue Y., Xi C., Zhou M., Jiang W. 2015. Angiotensin-converting enzyme 2/angiotensin-(1–7)/Mas axis prevents lipopolysaccharide-induced apoptosis of pulmonary microvascular endothelial cells by inhibiting JNK/NF- κ B pathways. *Sci. Rep.* **5**, 8209. <https://doi.org/10.1038/srep08209>
110. Arendse L.B., Danser A.H.J., Poglitsch M., Touyz R.M., Burnett J.C., Llorens-Cortes C., Ehlers M.R. 2019. Therapeutic approaches targeting the renin-angiotensin system and associated peptides in hypertension and heart failure. *Pharmacol. Rev.* **71** (4), 539–570. <https://doi.org/10.1124/pr.118.017129>
111. Rojas A., Gonzalez I., Morales M.A. 2020. SARS-CoV-2-mediated inflammatory response in lungs: Should we look at RAGE? *Inflamm. Res.* **69** (7), 641–643. <https://doi.org/10.1007/s00011-020-01353-x>
112. Rojas A., Delgado-Lopez F., Gonzalez I., Perez-Castro R., Romero J., Rojas I. 2013. The receptor for advanced glycation end-products: A complex signaling scenario for a promiscuous receptor. *Cell. Signal.* **25** (3), 609–614. <https://doi.org/10.1016/j.cellsig.2012.11.022>
113. Bongarzone S., Savickas V., Luzi F., Gee A.D. 2017. Targeting the receptor for advanced glycation end-products (RAGE): A medicinal chemistry perspective. *J. Med. Chem.* **60** (17), 7213–7232. <https://doi.org/10.1021/acs.jmedchem.7b00058>
114. Rojas A., Mercadal E., Figueroa H., Morales M.A. 2008. Advanced glycation and ROS: A link between diabetes and heart failure. *Curr. Vasc. Pharmacol.* **6** (1), 44–51. <https://doi.org/10.2174/157016108783331312>
115. Frank J.A., Briot R., Lee J.W., Ishizaka A., Uchida T., Matthay M. A. 2007. Physiological and biochemical markers of alveolar epithelial barrier dysfunction in perfused human lungs. *Am. J. Physiol. Lung. Cell. Mol. Physiol.* **293** (1), L52–59. <https://doi.org/10.1152/ajplung.00256.2006>
116. Su X., Looney M.R., Gupta N., Matthay M.A. 2009. Receptor for advanced glycation end-products (RAGE) is an indicator of direct lung injury in models of experimental lung injury. *Am. J. Physiol. Lung. Cell. Mol. Physiol.* **297** (1), L1–5. <https://doi.org/10.1152/ajplung.90546.2008>
117. Shirasawa M., Fujiwara N., Hirabayashi S., Ohno H., Iida J., Makita K., Hata Y. 2004. Receptor for advanced glycation end-products is a marker of type I lung alveolar cells. *Genes. Cells.* **9** (2), 165–174. <https://doi.org/10.1111/j.1356-9597.2004.00712.x>
118. Katsuoka F., Kawakami Y., Arai T., Imuta H., Fujiwara M., Kanma H., Yamashita K. 1997. Type II alveolar epithelial cells in lung express receptor for advanced glycation end products (RAGE) gene. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **238** (2), 512–516. <https://doi.org/10.1006/bbrc.1997.7263>
119. Helms M.N., Jain L., Self J.L., Eaton D.C. 2008. Redox regulation of epithelial sodium channels examined in alveolar type 1 and 2 cells patch-clamped in lung slice tissue. *J. Biol. Chem.* **283** (33), 22875–22883. <https://doi.org/10.1074/jbc.M801363200>
120. Downs C.A., Johnson N.M., Tsapralis G., Helms M.N. 2018. RAGE-induced changes in the proteome of alveolar epithelial cells. *J. Proteomics.* **177**, 11–20. <https://doi.org/10.1016/j.jprot.2018.02.010>
121. Faller S., Hausler F., Goeft A., von Itter M.N.A., Gyllenram V., Hoetzel A., Spassov S.G. 2018. Hydrogen sulfide limits neutrophil transmigration, inflammation, and oxidative burst in lipopolysaccharide-induced acute lung injury. *Sci. Rep.* **8** (1), 14676. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-33101>
122. Zhang Z., Wang J., Xu G., Ding M., Liu F., Yuan L., Wang T., Xu J., Xie X., Deng B., Sun D., Lu W. 2019. Inhalation of sodium hydrosulfide (NaHS) alleviates NO and induced pulmonary function and hematological impairment in rats. *Life. Sci.* **232**, 116650. doi.org/10.1016/j.lfs.2019.116650
123. Evgen'ev M.B., Frenkel A. 2020. Possible application of H₂S-producing compounds in therapy of coronavirus (COVID-19) infection and pneumonia. *Cell. Stress and Chaperones.* **25** (5), 713–715. <https://doi.org/10.1007/s12192-020-01120-1>
124. Pickering R.J., Tikellis C., Rosado C.J., Tsorotes D., Dimitropoulos A., Smith M., Huet O., Seeber R.M., Abhayawardana R., Johnstone E.K., Gollidge J., Wang Y., Jandeleit-Dahm K.A., Cooper M.E., Pflieger K.D., Thomas M.C. 2019. Transactivation of RAGE mediates angiotensin-induced inflammation and atherogenesis. *J. Clin. Invest.* **129** (1), 406–421. <https://doi.org/10.1172/JCI99987>
125. Polverino F., Celli B.R., Owen C.A. 2018. COPD as an endothelial disorder: Endothelial injury linking lesions in the lungs and other organs? *Pulm. Circ.* **8** (1), 2045894018758528. <https://doi.org/10.1177/2045894018758528>

126. Prasad K. 2019. AGE-RAGE Stress in the pathophysiology of pulmonary hypertension and its treatment. *Int. J. Angiol.* **28** (2), 71–79. <https://doi.org/10.1055/s-0039-1687818>
127. Jeong J., Lee J., Lim J., Cho S., An S., Lee M., Yoon N., Seo M., Lim S., Park S. 2019. Soluble RAGE attenuates AngII-induced endothelial hyperpermeability by disrupting HMGB1-mediated crosstalk between AT1R and RAGE. *Exp. Mol. Med.* **51** (9), 1–15. <https://doi.org/10.1038/s12276-019-0312-5>
128. Pickering R.J., Tikellis C., Rosado C.J., Tsorotes D., Dimitropoulos A., Smith M., Huet O., Seeber R.M., Abhayawardana R., Johnstone E.K.M., Golledge J., Wang Y., Jandeleit-Dahm K.A., Cooper M.E., Pflieger K.D.G., Thomas M.C. 2019. Transactivation of RAGE mediates angiotensin-induced inflammation and atherogenesis. *J. Clin. Invest.* **129** (1), 406–421. <https://doi.org/10.1172/JCI99987>
129. Gilmore T.D., Garbati M.R. 2011. Inhibition of NF- κ B signaling as a strategy in disease therapy. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* **349**, 245–263. https://doi.org/10.1007/82_2010_105
130. Jia C., Zhang J., Chen H., Zhuge Y., Chen H., Qian F., Zhou K., Niu C., Wang F., Qiu H., Wang Z., Xiao J., Rong H., Chu M. 2019. Endothelial cell pyroptosis plays an important role in Kawasaki disease via HMGB1/RAGE/cathepsin B signaling pathway and NLRP3 inflammasome activation. *Cell. Death. Dis.* **10** (10), 778–794. doi.org/. <https://doi.org/10.1038/s41419-019-2021-3>
131. Tay M.Z., Poh C.M., Rénia L., MacAry P.A., Ng L.F.P. 2020. The trinity of COVID-19: Immunity, inflammation and intervention. *Nat. Rev. Immunol.* **20** (6), 363–374. <https://doi.org/10.1038/s41577-020-0311-8>
132. Prompetchara E., Ketloy C., Palaga T. 2020. Immune responses in COVID-19 and potential vaccines: Lessons learned from SARS and MERS epidemic. *Asian. Pac. J. Allergy. Immunol.* **38** (1), 1–9. <https://doi.org/10.12932/AP-200220-0772>

The Balance between Two Branches of RAS Can Protect from Severe COVID-19 Course

N. V. Bobkova*

Institute of Cell Biophysics, Federal Research Center “Pushchino Scientific Center for Biological Research of the Russian Academy of Sciences”, Pushchino, Moscow oblast, 142290 Russia

*e-mail: nbobkova@mail.ru

The COVID-19 pandemic has spread all over the world and required the mobilization of the efforts of scientists and doctors to develop new methods of treatment this serious disease. Along with research of the SARS-CoV-2 virology, understanding of the fundamental physiological processes, molecular cell mechanisms and intracellular signaling pathways underlying the clinical manifestations of COVID-19 is important for the rational design of effective therapy. The review describes in details the interaction of the components of the renin-angiotensin system (RAS) and receptor for advanced glycation end products (RAGE), which plays a special role in normal lung physiology and pathology in COVID-19, up to the development of acute respiratory distress syndrome and cytokine storm. A separate section presents modern approaches for correcting RAS dysfunction caused by binding the virus to angiotensin converting enzyme 2 (ACE2), a central component of this system. Analysis of published theoretical, clinical, and experimental data suggests the need for complex treatment to prevent severe COVID-19 course using MasR agonists, blockers of AT1R and NF- κ B signaling pathway, as well as compounds with neuroprotective and regenerative effects.

Keywords: COVID-19, pathogenesis, renin-angiotensin system (RAS), angiotensin converting enzyme 2 (ACE2), ANGI, AT1R, MasR, RAGE, NF- κ B, ligands

МАТЕМАТИЧЕСКОЕ МОДЕЛИРОВАНИЕ ФОТОСИНТЕЗА И АНАЛИЗ ПРОДУКТИВНОСТИ РАСТЕНИЙ

© 2021 г. Е. М. Сухова^а, В. А. Воденев^а, В. С. Сухов^{а, *}

^аНижегородский государственный университет им. Н.И. Лобачевского,
Нижний Новгород, 603950 Россия

*e-mail: vssuh@mail.ru

Поступила в редакцию 20.08.2020 г.

После доработки 13.09.2020 г.

Принята к публикации 21.09.2020 г.

Фотосинтез лежит в основе продукционного процесса растений, что делает крайне актуальным разработку методов его оценки и прогнозирования при различных условиях окружающей среды. Сложность фотосинтетических процессов и наличие многочисленных обратных связей делает значимым развитие комплексных подходов к его анализу, включая математическое моделирование. В обзоре проведен анализ математических моделей фотосинтетических процессов различного уровня (от процессов в тилакоидных мембранах — до уровня целого растения и экосистемы) и оценка потенциальных путей их применения для исследования продуктивности растений. При этом, прежде всего, были отмечены модели, описывающие функционирование фотосинтетических реакционных центров (включая первичное разделение зарядов, флуоресценцию, тепловую диссипацию и т.д.), которые широко используются для интерпретации экспериментальных данных при анализе фотосинтетических процессов у растений. Следующая группа моделей фокусируется на описании переноса электронов фотосинтетической электрон-транспортной цепью или ее участками (в частности, фотосистемой II). Такие модели могут быть использованы как для анализа экспериментальных данных, так и для прогнозирования повреждения фотосинтетического аппарата в условиях быстрых изменений условий среды (например, колебаний интенсивности освещения). Модели, учитывающие темновую стадию фотосинтеза, опираются на представление о лимитирующих для фиксации CO₂ стадиях либо на детализированные описания реакций цикла Кальвина. Модели этой группы уже могут быть непосредственно использованы для описания продукционного процесса. Более комплексные модели, помимо описания фотосинтеза, могут также учитывать распределение освещения и потоки CO₂ в листе и взаимодействие фотосинтеза с другими физиологическими процессами; это позволяет использовать такие модели для прогнозирования продуктивности растений в различных условиях или при модификациях фотосинтетического аппарата. В обзоре также анализируются “надорганизменные” фотосинтетические модели, которые опираются на достаточно простые описания фотосинтетических процессов и могут быть использованы для анализа продуктивности на уровне растительного покрова, естественных или искусственных экосистем. В целом, многочисленные математические модели фотосинтеза различного уровня направлены на решение широкого спектра исследовательских и практических задач. В частности, они могут быть потенциально использованы для оценки нарушений продуктивности сельскохозяйственных растений в нестабильных условиях выращивания или для ее оптимизации в стабильных условиях защищенного грунта. Перспективным направлением развития фотосинтетического моделирования является интеграция отдельных моделей различного уровня в единую среду моделирования фотосинтеза.

Ключевые слова: фотосинтез, математическое моделирование, фотофизические реакции, световая стадия фотосинтеза, темновая стадия фотосинтеза, продукционный процесс

DOI: 10.31857/S023347521010060

1. ВВЕДЕНИЕ

Фотосинтез, который лежит в основе продуктивности, является одним из ключевых процессов в жизни растений. Его исследования имеют как фундаментальное, так и прикладное значение; в частности, понимание механизмов функционирования фотосинтеза и его адаптации к

действию стрессоров может стать основой для разработки методов повышения урожая сельскохозяйственных растений и снижения его потерь в неблагоприятных условиях [1–3].

В то же время фотосинтез является комплексным процессом, который включает в себя фотофизические, фотохимические и биохимические реакции, протекающие на уровне тилакоидных

мембран, стромы и люмена хлоропластов; характерные времена таких реакций варьируют от пикосекунд – до секунд и более [4, 5] (рис. 1). При этом реакции с различными характерными временами могут оказывать взаимное влияние друг на друга [4–7]. Например, фотохимические реакции в электрон-транспортной цепи (ЭТЦ) тилакоидных мембран и цикл Кальвина могут оказывать взаимное влияние друг на друга через соотношение АТФ/АДФ и NADPH/NADP⁺ в строме хлоропластов [8, 9]: замедление одной группы процессов приводит к снижению скорости другой и наоборот. Взаимодействие фотосинтетических процессов еще в большей степени усложняется вследствие многочисленных регуляторных механизмов [10–12], которые могут модифицировать их протекание. В частности, растения имеют разнообразные механизмы защиты фотосинтетического аппарата, включая процессы на уровне ЭТЦ (энергозависимое нефотохимическое тушение флуоресценции, “state transition” [13–16] и фотоингибирование [17, 18], активация циклического потока вокруг фотосистемы I (ФСI) [19–21], изменение активности ферредоксин-NADP⁺-редуктазы [22, 23] и другое), активности ферментов цикла Кальвина [24–26], активности Н⁺-АТФ-синтазы [27–30], поступления СО₂ в строму хлоропластов [31–33], оттока сахаров в русло дальнего транспорта [34, 35] и т.д.

Комплексный характер фотосинтетических процессов затрудняет их экспериментальное исследование и, в частности, создает ограничения для прогнозирования фотосинтеза в различных условиях или для интерпретации экспериментальных данных, получаемых с использованием достаточно сложных систем [11, 12, 36] (например, листа растения). Одним из путей решения подобных проблем является использование метода математического моделирования, которое позволяет теоретически изучить различные аспекты процессов фотосинтеза и продуктивности растений. В настоящее время разработано значительное число фотосинтетических моделей [5, 7, 33, 37, 38], которые могут базироваться на разных принципах описания (от простых аппроксимаций [39, 40] – до детализированных описаний [41–43]), фокусироваться на различных фотосинтетических реакциях [37, 38], описывать или не описывать взаимодействие с другими процессами [31–33, 42, 44], иметь точечный [45–47] или пространственный характер [31, 33, 48, 49] и т.д.

Применение математического моделирования может иметь значение как для фундаментальных исследований в области физиологии фотосинтеза [31–33, 37, 38, 46, 47], так и для прикладных работ в области культивирования сельскохозяйственных растений [44, 45, 50, 51]. В частности, можно отметить несколько потенциальных

областей прикладного применения математических моделей фотосинтеза.

– Долгосрочный прогноз продуктивности растений при конкретных условиях выращивания, что может быть использовано для теоретической оценки урожая. Практическую реализуемость такой задачи демонстрирует, например, линейка математических моделей продукционного процесса, разработанных “школой de Wit” [50]; отдельные модели из этой группы (например, WOFOST) показали возможность достаточно эффективного использования для прогнозирования урожая сельскохозяйственных культур. Такие модели зачастую опираются на упрощенное описание фотосинтетических процессов и учитывают другие процессы, влияющие на продуктивность растений (дыхание, водный обмен, азотный обмен, процесс роста и другие) [50, 51].

– Прогнозирование ответов фотосинтеза на стрессовые воздействия, что, в частности, может быть потенциально использовано для оценки повреждения фотосинтетического аппарата при действии определенных стрессоров. Решение этой задачи базируется, прежде всего, на описании в моделях регуляторных процессов на уровне тилакоидных мембран, хлоропластов и растений в целом, которые участвуют в формировании быстрых ответов растения на действие стрессоров (например, нефотохимического тушения флуоресценции (NPQ) [38–40, 43, 52–56]). Модели этой группы могут быть использованы для предварительной оценки возможных рисков для продукционного процесса при заданных режимах действия неблагоприятных факторов (например, колебания температуры и освещенности).

– Выявление потенциальных “мишеней” для улучшения фотосинтетических процессов и повышения их устойчивости к действию стрессоров (например, методами генной инженерии или действием химических препаратов). Такие работы опираются на достаточно детализированные модели фотосинтеза; например, модель Farguham-von Soergel-Bergu [37, 45] и описание потоков углекислого газа используются при прогнозировании влияния на фотосинтез повышения проводимости мезофилла для СО₂ [31–33].

– Интерпретация непосредственно измеряемых в ходе исследований и/или дистанционного мониторинга показателей фотосинтеза. К таким показателям, прежде всего, относится измерение флуоресценции хлорофилла, например РАМ-флуориметрия, или измерение флуоресценции, которая индуцирована солнечным освещением [36, 57, 58].

Таким образом, математическое моделирование является важным теоретическим инструментом для исследований фотосинтеза и, в сочетании с описанием других физиологических процессов, может быть, потенциально, использовано в каче-

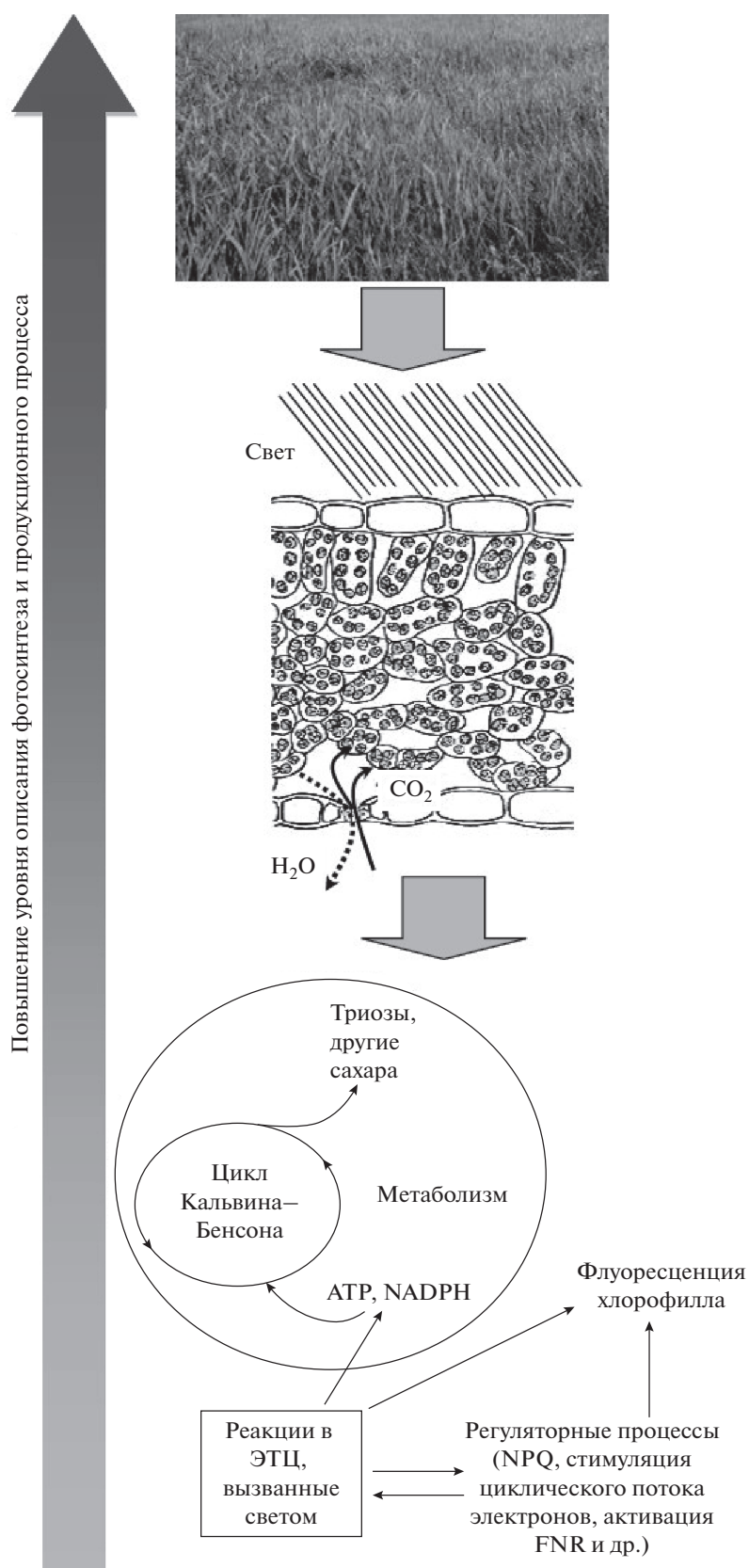


Рис. 1. Общая схема уровней описания фотосинтеза и продукционного процесса, начиная от процессов в электрон-транспортной цепи (ЭТЦ) хлоропластов до листа, целого растения и экосистем. NPQ – нефотохимическое тушение флуоресценции хлорофилла, FNR – ферредоксин-NADP⁺-редуктаза.

стве основы для прогнозирования продукционного процесса растений; возможность этого подтверждает применение некоторых групп моделей [50] для агроэкологического зонирования или для оценки сценариев воздействия на продукционные процессы изменений условий окружающей среды. Представленный обзор посвящен анализу современных фотосинтетических моделей различного уровня, включая оценку перспектив их использования для анализа продуктивности растений.

2. КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ФОТОСИНТЕТИЧЕСКИХ ПРОЦЕССОВ У ВЫСШИХ РАСТЕНИЙ

Фотосинтез, т.е. процесс фиксации CO_2 и синтеза углеводов с использованием световой энергии, является ключевым процессом в жизни растений [4]. Фотосинтетические реакции локализованы в хлоропластах и могут быть разделены на световую и темновую стадию (рис. 2).

Реакции световой стадии фотосинтеза протекают в специализированных мембранных структурах — тилакоидах [4, 7], которые входят в состав хлоропластов и представляют собой замкнутые мембранные пузырьки, либо объединенные в граны, либо расположенные отдельно друг от друга. При этом протекание световой стадии фотосинтеза требует участия как локализованных в тилакоидных мембранных мультиферментных комплексов (фотосистемы I и II, комплекс цитохромов b_6/f , светособирающие комплексы и кислородвыделяющий комплекс), так и ряда подвижных переносчиков (пул пластохинонов, пластоцианин, ферредоксин). Следует отметить, что пространственная организация фотосинтетических мембран в виде тилакоидов позволяет значительно увеличить общую площадь таких мембран на единицу объема (т.е. ускорить протекание локализованных в пределах мембраны реакций световой стадии фотосинтеза).

Процессы световой стадии фотосинтеза подробно описаны в ряде обзорных работ [4, 7, 10]. Начальным этапом таких реакций является поглощение кванта света светособирающим комплексом и миграция энергии возбуждения к реакционному центру (РЦ) фотосистемы I или фотосистемы II, которые представляют собой молекулы хлорофилла; в дальнейшем энергия возбужденного состояния используется для разделения зарядов в РЦ. В случае фотосистемы II происходит переход электрона от РЦ P_{680} (хлорофилл) к первичному акцептору электронов — феофитину, с феофитина электрон переносится на хинон Q_A , а с хинона Q_A — на хинон Q_B ; возникающий при этом положительный заряд P_{680} компенсируется электроном с первичного донора электронов (тирозин), восстановление тирозина

происходит за счет поступления электронов с молекул воды, которые последовательно окисляются кислородвыделяющим комплексом с образованием молекулярного кислорода и протонов. После получения двух электронов Q_A протонируется двумя протонами из стромы хлоропластов, превращаясь в пластохинол, и уходит в пул пластохинолов; после чего с фотосистемой II связывается окисленный пластохинон из пула. Пластохинол диффундирует к комплексу цитохромов b_6/f и окисляется; протоны уходят в люмен тилакоида. При этом один из электронов переносится на пластоцианин, а другой восстанавливает хинон в составе цитохромного комплекса; при восстановлении хинона двумя электронами он также поглощает два H^+ из стромы и уходит в пул пластохинонов, формируя дополнительный цикл переноса протонов. Восстановленный пластоцианин выступает в качестве донора электронов для фотосистемы I и восстанавливает ее РЦ P_{700} , который предварительно окисляется, отдавая электроны в цепь в ходе разделения зарядов после получения энергии кванта света. Электроны с P_{700} проходят через ряд компонент фотосистемы I и восстанавливают ферредоксин. Окисление ферредоксина может происходить различными путями [7, 10, 21]: с восстановлением NADPH из $NADP^+$ (нециклический поток электронов), с восстановлением пластохинона, которое, вероятно, происходит в составе комплекса цитохромов b_6/f (циклический поток электронов вокруг фотосистемы I), а также с восстановлением кислорода и образованием его активных форм (псевдоциклический поток электронов). Важно отметить, что при протекании реакций световой стадии фотосинтеза наиболее длительные характерные времена имеют процессы, связанные с транспортом подвижных переносчиков; в частности, одним из таких “медленных” процессов является окисление пластохинола при взаимодействии с комплексом цитохромов b_6/f , которое может рассматриваться как “узкое место” при транспорте электронов в тилакоидной мембране хлоропластов.

Фотосинтетический поток электронов в тилакоидных мембранах хлоропластов сопровождается не только образованием NADPH, но и переносом протонов через мембрану, что приводит формированию значительного транстилакоидного электрохимического градиента протонов [4, 7]. Его энергия используется для синтеза АТФ при участии H^+ -АТФ-синтазы тилакоидной мембраны, которая синтезирует одну молекулу АТФ при переносе от 3 [10] до 4–5 [4] протонов через мембрану. Важно отметить, что формирование такого градиента зависит от целостности тилакоидных мембран и нарушение замкнутости тилакоидов может снижать и даже полностью подавлять формирование электрохимического градиента про-

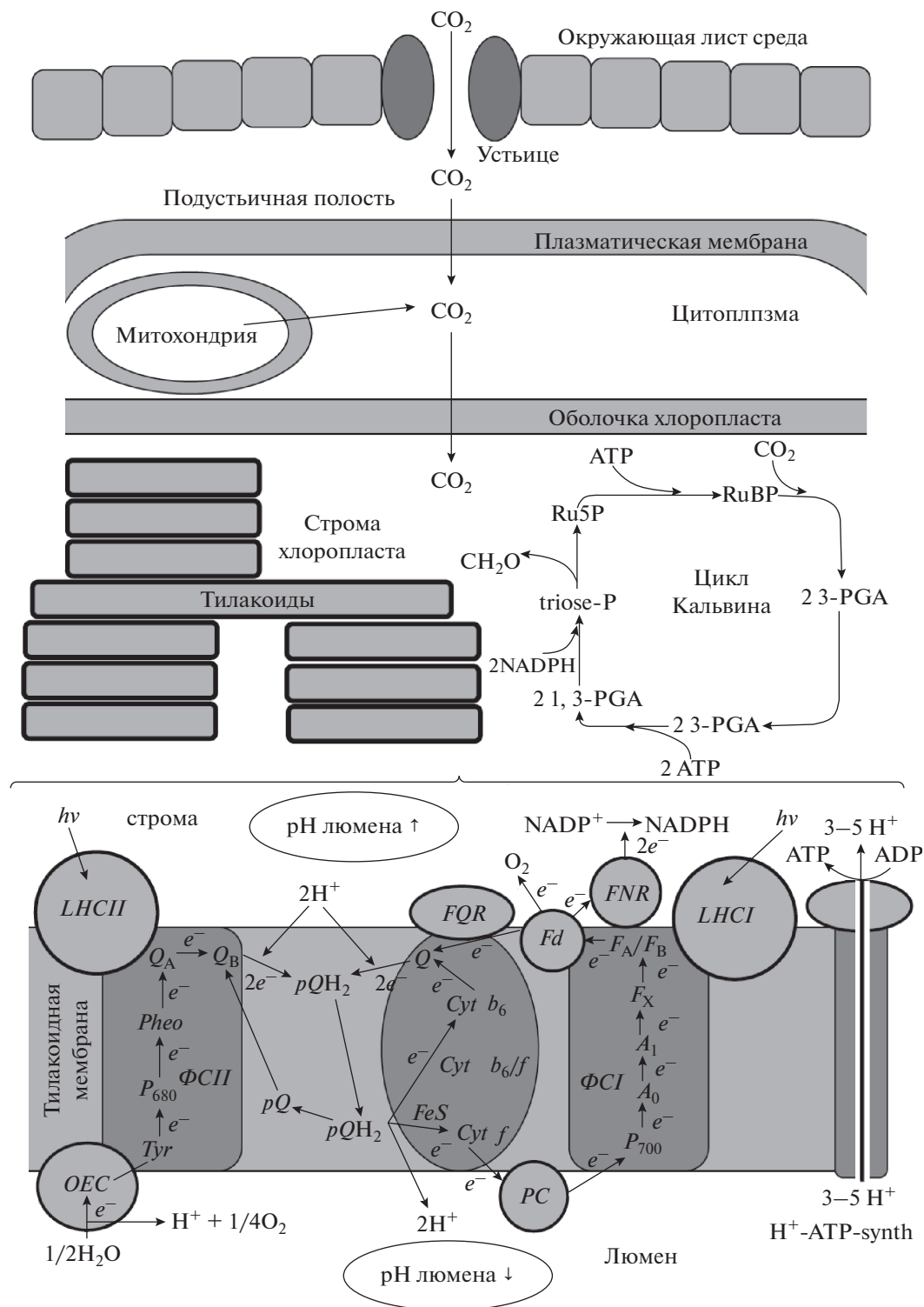


Рис. 2. Упрощенная схема фотосинтетических процессов у высшего растения (на примере C_3 фотосинтеза). Ru5P – рибулозо-5-фосфат, RuBP – рибулозо-1,5-бисфосфат, 3-PGA – 3-фосфоглицерат, 1,3-PGA – бисфосфоглицерат, triose-P – триозофосфаты, ФСИ и ФСИИ – фотосистемы I и II, LHCI и LHCII – светособирующие комплексы фотосистемы I и II, Cyt b_6/f – комплекс цитохромов b_6/f , H^+ -ATP-synth – H^+ -ATP-синтаза тилакоидной мембраны, OEC – кислородвыделяющий комплекс, Tyr – тирозин (первичный донор фотосистемы II), P_{680} – реакционный центр фотосистемы II, Pheo – феофитин (первичный акцептор фотосистемы I), Q_A и Q_B – хиноны A и B, pQ и pQH_2 – пластохинон и пластохинон из пула пластохинонов, FQR – ферредоксин-хинон-редуктаза, Cyt f и Cyt b_6 – цитохромы f и b_6 , Q – хинон в составе комплекса цитохромов b_6/f , PC – пластоцианин, Fd – ферредоксин, P_{700} – реакционный центр фотосистемы I, A_0 – хлорофилл (первичный акцептор фотосистемы I), A_1 – филохинон, F_X и F_A/F_B – железосерные кластеры, FNR – ферредоксин-NADP $^{+}$ -редуктаза. При подготовке схемы использованы работы [4, 7, 10, 25, 37].

тонов, а значит – нарушать фотосинтетические процессы.

Образующиеся в ходе функционирования световой стадии фотосинтеза в строме хлоропластов NADPH и АТФ используются в качестве основного источника энергии для протекания реакций темновой стадии фотосинтеза (цикл Кальвина) (рис. 2), в ходе которой с участием фермента РУБИСКО осуществляется фиксация углекислого газа [4, 25]; поступление CO_2 из внешней среды осуществляется через устьица и тесно связано с процессом транспирации листа; вклад в транспорт CO_2 может также вносить проводимость плазматической мембраны и оболочек хлоропласта для углекислого газа. Среди основных интермедиатов цикла Кальвина можно отметить рибулозо-5-фосфат, рибулозо-1,5-бисфосфат, 3-фосфоглицерат, бисфосфоглицерат и др. [37]; основным продуктом этого цикла являются углеводы [4], которые затем могут транспортироваться в другие части растения [35]. При этом РУБИСКО может также функционировать как оксигеназа и тем самым участвовать в поддержании фотодыхания [37, 45]. Следует также отметить, что помимо C_3 фотосинтеза, который преимущественно базируется на цикле Кальвина, у растений могут существовать и другие формы темновой стадии фотосинтеза (C_4 и САМ типы фотосинтеза) [4]. Функционирование таких путей требует дополнительного транспорта фотосинтетических метаболитов между хлоропластом и вакуолью (САМ) или между клетками мезофилла и обкладки проводящих пучков (C_4), что позволяет оптимизировать процесс фиксации CO_2 . В случае темновой стадии фотосинтеза, в качестве “узкого места” процесса может, прежде всего, рассматриваться непосредственно фиксация углекислого газа РУБИСКО [37, 45]; однако лимитирующим процессом может также быть поступление углекислого газа в строму хлоропластов.

3. МАТЕМАТИЧЕСКИЕ МОДЕЛИ, ОПИСЫВАЮЩИЕ ФОТОСИНТЕТИЧЕСКИЕ ПРОЦЕССЫ НА УРОВНЕ РЕАКЦИОННЫХ ЦЕНТРОВ

При математическом моделировании фотосинтетических процессов на уровне РЦ может быть реализовано два подхода. Первый из них фокусируется на детализированном описании поглощения света, миграции энергии возбуждения и разделения зарядов [59, 60]; для этого, в частности, может быть использовано описание индуктивно-резонансного механизма переноса энергии (переноса энергии вследствие резонанса Фёрстера), которое основано на диполь-дипольном взаимодействии при переносе возбуждения между двумя хромофорами. Такой подход пре-

имущественно направлен на выявление фундаментальных механизмов поглощения света фотосинтетическим аппаратом; перспективы его использования для решения проблем, связанных с продуктивностью растений, достаточно ограничены.

Другой подход опирается на описание конкурирующих путей утилизации энергии возбужденного состояния РЦ фотосистемы II (ФСII) ([11, 57, 58, 61–67]. При этом такая энергия может быть потрачена на флуоресценцию, нерегулируемую тепловую диссипацию, а также на разделение зарядов, которое является необходимым шагом для дальнейшего протекания реакций световой стадии фотосинтеза [4, 7]. Кроме того, в случае предварительного освещения растения у него может развиваться контролируемая диссипация энергии возбужденных состояний в РЦ ФСII (нефотохимическое тушение флуоресценции) [10, 16]. В настоящее время такую диссипацию связывают с тремя основными механизмами: (i) энергозависимое тушение флуоресценции, которое обусловлено закислением люмена в условиях освещения с высокой интенсивностью; такое закисление приводит к протонированию белков светособирающего комплекса и способствует превращению виолоксантина в зеаксантин, что, в свою очередь, повышает потери поглощаемой энергии света; (ii) “State transition”, т.е. перемещение светособирающего комплекса от фотосистемы II к фотосистеме I в условиях стрессовой интенсивности освещения; (iii) фотоповреждение фотосинтетического аппарата в условиях избыточной интенсивности освещения или других стрессовых факторов.

В некоторых моделях этой группы используется детализированное описание переходных процессов между состояниями РЦ ФСII [67]; однако важным преимуществом большинства моделей является применение относительно простых уравнений [62, 63], использующих величины констант скорости конкурирующих процессов для расчета вероятности их протекания. В качестве примера применения такого подхода можно привести стандартное уравнение для расчета квантового выхода фотохимических реакций ФСII (γ_{PSII}):

$$\gamma_{\text{PSII}} = \frac{k_{\text{Q}}qP}{k_{\text{Q}}qP + k_{\text{FI}} + k_{\text{D}} + k_{\text{NPQ}}}, \quad (1)$$

где k_{Q} , k_{FI} , k_{D} и k_{NPQ} – константы скорости разделения зарядов, флуоресценции, тепловой диссипации и NPQ соответственно, qP – это доля РЦ ФСII в “открытом состоянии” (т.е. доля РЦ, у которых отсутствует электрон на хиноне Q_A). Следует отметить, что у адаптированных к темновым условиям растений $k_{\text{NPQ}} = 0$ (NPQ в этих условиях не развивается); у растений в условиях очень слабого освещения $qP = 1$ (т.е. все РЦ ФСII “откры-

ты”), а в условиях вспышек света высокой интенсивности $qP = 0$ (т.е. все РЦ ФСII “закрыты” и имеют электроны на хиноне Q_A). Такие модели могут быть расширены; например, в них может быть включено описание влияния градиента электрического потенциала на тилакоидной мембране [64, 66] или добавлено описание переноса возбуждения между пигментами [63].

Важной особенностью фотосинтетических моделей, опирающихся на описание конкуренции различных путей утилизации энергии возбуждения в РЦ, является их широкое использование для интерпретации результатов измерения флуоресценции хлорофилла (рис. 3а). Следует отметить, что методы, базирующиеся на измерении флуоресценции и последующем анализе результатов с использованием фотосинтетических моделей, являются быстрыми, неинвазивными и информативными подходами к оценке фотосинтетических процессов у растений [11, 57, 58, 62]. Рисунок 3б показывает динамику изменений флуоресценции листа при применении метода РАМ-флуориметрии, который опирается на использование периодических импульсов света высокой интенсивности (насыщающие вспышки). При этом для каждого из приведенных параметров (F_0 – интенсивность флуоресценции у адаптированного к темноте растения, F_M – максимальный уровень флуоресценции, измеряемый при первой насыщающей вспышке после адаптации к темноте, F_t – текущий уровень флуоресценции при освещении растения актиничным светом, F_M' – максимальный уровень флуоресценции у адаптированных к свету растений при насыщающей вспышке) показаны уравнения для расчета квантового выхода флуоресценции (уравнения слева). Комбинация таких уравнений позволяет рассчитать характеристики фотосистемы II (в частности, потенциальный и эффективный квантовый выход фотохимических реакций фотосистемы II) как функцию измеряемых показателей (F_0 , F_M , F_t и F_M') (уравнения справа). Аналогичный подход можно использовать для оценки методом РАМ-флуориметрии других показателей ФСII (NPQ, qP и другие) [57, 58].

Близкий подход может быть также развит для описания квантовых выходов конкурирующих процессов в реакционном центре ФСI [68, 69]. К таким процессам будет относиться (i) использование энергии поглощенного света для разделения зарядов и транспорта электронов по ЭТЦ, (ii) потеря энергии поглощенного света из-за окисленного состояния P_{700} (P_{700}^+) и (iii) потеря энергии поглощенного света из-за восстановленного состояния акцепторной части PSI. При этом в качестве анализируемого показателя ФСI используется поглощение света на длине волны 830,

так как окисление РЦ ФСI P_{700} приводит к изменению абсорбции света в этой спектральной полосе.

При анализе временных диапазонов, равных минутам, десяткам минут, часам и более, достаточно часто принимается допущение о том, что потоки электронов через фотосистемы I и II имеют стационарный характер [19, 20, 57, 70, 71], т.е. равны на различных участках ЭТЦ. В этом случае можно принять, что поток электронов через ФСII приблизительно равен нециклическому потоку электронов (LEF), а поток электронов через ФСI приблизительно равен сумме циклического потока электронов вокруг фотосистемы I (CEF) и нециклического потока (т.е. CEF + LEF) [19, 20, 57, 70]. Принимая эти допущения, для описания LEF и CEF могут быть использованы уравнения (2) и (3) соответственно:

$$LEF = PAR\beta dII\gamma_{PSII}, \quad (2)$$

$$CEF = PAR\beta[(1 - dII)\gamma_{PSI} - dII\gamma_{PSII}], \quad (3)$$

где γ_{PSI} и γ_{PSII} – квантовые выходы ФСI и ФСII, PAR – интенсивность актиничного света, действующего на лист, β – доля PAR, которая поглощается листом, dII – доля поглощенного света, которая передается ФСII, $(1 - dII)$ – доля поглощенного света, которая передается к ФСI.

В целом, математические модели, описывающие фотосинтетические процессы на уровне реакционных центров, используются, прежде всего, для анализа результатов измерений флуоресценции ФСII и поглощения света фотосистемой I, полученных с применением РАМ-метода [11, 19, 20, 57, 58, 62, 70]. Такая область применения делает развитие этой группы математических моделей очень значимой для решения прикладных задач в рамках дистанционного мониторинга продуктивности и стрессовых изменений у растений на основании измерений их флуоресценции [57].

4. МАТЕМАТИЧЕСКИЕ МОДЕЛИ, ФОКУСИРУЮЩИЕСЯ НА ОПИСАНИИ ПОТОКА ЭЛЕКТРОНОВ В ЭТЦ ИЛИ ЕЕ КОМПОНЕНТАХ

Следующая группа математических моделей [7, 46, 54, 72–91] фокусируется на описании функционирования ЭТЦ хлоропластов (или крупных участков электрон-транспортной цепи, таких как ФСI и ФСII) и сопутствующих регуляторных процессов. В общем случае такие модели опираются на Z-схему, которая описывает перенос электрона по цепи переносчиков с учетом значений их окислительно-восстановительного потенциала [7, 46, 54, 72]. Модели этой группы могут также описывать регуляцию световой стадии фотосинтеза, формирование электрохимического градиента и функционирование H^+ -АТФ-синтазы, транспорт ионов через тилакоидную мембрану, синтез АТФ и NADPH и др. [7, 72–77].

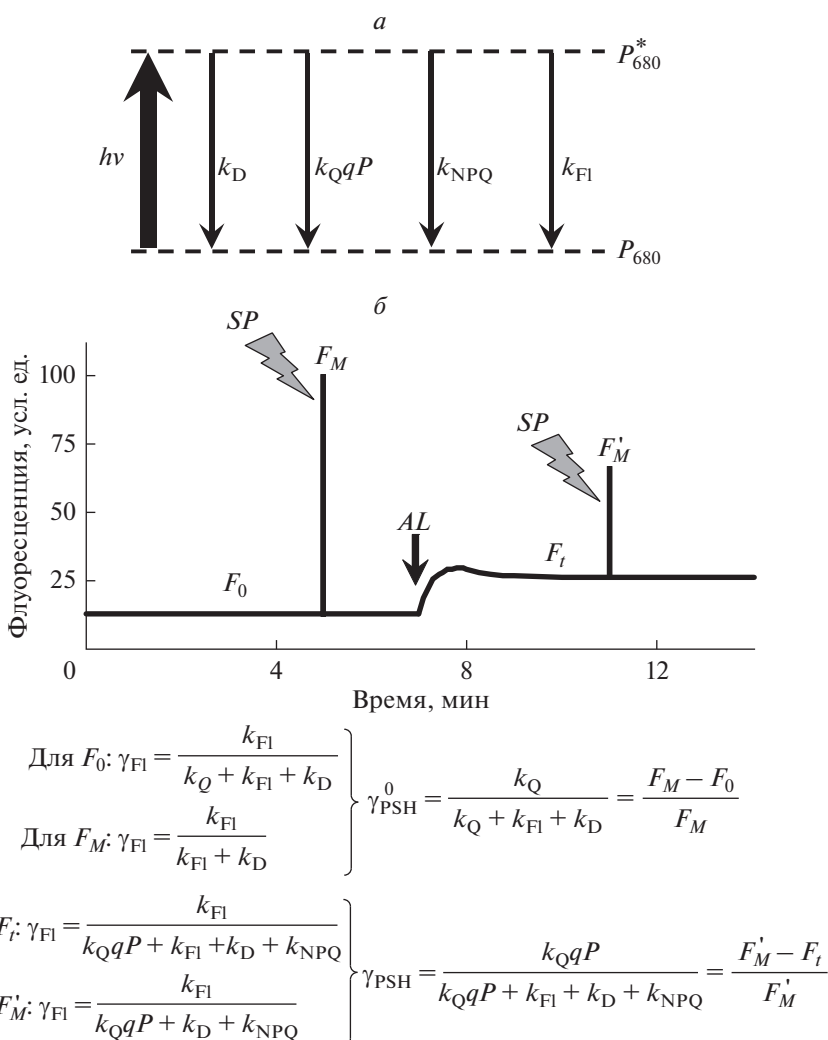


Рис. 3. Схема конкурентной модели утилизации энергии возбужденного состояния (а) и пример применения такой модели к оценке показателей фотосинтеза при использовании РАМ-флуориметрии (б). P_{680} и P_{680}^* – основное и возбужденное состояние РЦ ФСІ. k_Q , k_{F1} , k_D и k_{NPQ} – константы скорости разделения зарядов, флуоресценции, тепловой диссипации и NPQ, соответственно, qP – это доля РЦ ФСІІ в “открытом состоянии” (т.е. доля РЦ у которых отсутствует электрон на хиноне Q_A). γ_{F1} – квантовый выход флуоресценции для каждого из вариантов измерения, γ_{PSII}^0 и γ_{PSII} – потенциальный и эффективный квантовый выход фотохимических реакций у ФСІІ, SP – насыщающие вспышки, AL – актиничный свет (стрелка обозначает момент его включения), F_0 – интенсивность флуоресценции у адаптированного к темноте растения, F_M – максимальный уровень флуоресценции (первая насыщающая вспышка), F_t – текущий уровень флуоресценции при освещении растения актиничным светом, F'_M – максимальный уровень флуоресценции (насыщающая вспышка) у адаптированных к свету растений.

При разработке математических моделей этой группы, для построения систем дифференциальных уравнений часто используется комбинация двух подходов (см., например, работы [42, 46, 79, 85–88]).

(i) При описании процессов переноса электронов в рамках мультиферментных комплексов (например, ФСІ, ФСІІ или комплекс цитохромов b_6/f) в качестве переменных используют вероятности различных состояний комплекса в целом

(или концентрации этих состояний). Такой подход является более корректным для описания переноса электронов между компонентами ЭТЦ, взаимное расположение которых зафиксировано, нежели закон действующих масс, который был показан для химических реакций, протекающих в растворах. Применение такого описания позволяет моделировать процессы переноса электронов в пределах фотосинтетического мультиферментного комплекса как мономолекулярные реакции, т.е. переходить к системам линейных

дифференциальных уравнений первого порядка. Расчет констант скорости таких реакций опирается на стандартное описание транспорта электрона через энергетический барьер между компонентами ЭТЦ [42]; аналогичным образом могут рассчитывать константы скорости для рассеяния избыточной энергии в виде флуоресценции и тепла [42, 46, 72, 81, 88]. В то же время использование при моделировании вероятностей различных состояний фотосинтетического мультиферментного комплекса значительно увеличивает число переменных при моделировании; так, в работе [86] для описания только ФСII было использовано около 30 переменных.

(ii) При описании взаимодействия мультиферментных комплексов с подвижными переносчиками (компоненты пула пластохинонов, пластоцианин и ферредоксин) используется классический закон действующих масс, в соответствии с которым скорость реакции пропорциональна произведению концентраций реагентов. В этом случае для подвижных переносчиков в качестве переменных используют их концентрации.

Вследствие значительного числа используемых переменных подробное описание ЭТЦ имеет достаточно сложный характер, поэтому при разработке математических моделей широко используются упрощения. В частности, можно отметить:

(i) использование стационарных решений для быстрых процессов, т.е. для процессов, характерные времена которых значительно меньше, нежели временные интервалы, анализируемые с использованием разрабатываемой модели. Так, в некоторых работах [42, 43, 78] стационарные решения были использованы при описании распределения состояний в мультиферментных фотосинтетических комплексах, в то же время для более медленных процессов взаимодействия с подвижными переносчиками (пластохиноны, пластоцианин, ферредоксин) стационарные решения не использовались.

(ii) Обобщенное описание переменных, позволяющее представить фотосинтетические процессы максимально упрощенно [6, 56, 79, 80]. Примером такого подхода может служить модель [56], в которой вся совокупность состояний ФСII была описана с помощью двух переменных, соответствующих “открытому” и “закрытому” РЦ. При этом в условиях колебаний интенсивности освещения между экспериментальными и имитированными моделью фотосинтетическими показателями наблюдалось хорошее соответствие. Среди других примеров использования упрощенных описаний при моделировании процессов световой стадии фотосинтеза можно отметить работу [79], в которой ФСII была описана тремя переменными, или работу [49], в которой учитывалась только исходное и окисленное состояние ФСII.

(iii) Использование регрессионных функций, которые описывают определенные фотосинтетические процессы, однако не учитывают возможные механизмы протекания процессов. В качестве примеров такого подхода можно отметить применение экспоненциального описания для моделирования динамики изменения во времени электрического [81] или электрохимического [82] градиента на тилакоидной мембране. Несмотря на то, что такое описание не отражает конкретные механизмы изменения градиента, оно может быть использовано для упрощения модели.

Отдельной проблемой при моделировании фотохимических процессов фотосинтеза является описание их регуляции при изменении окружающих условий и, в частности, при действии неблагоприятных факторов. При этом важную роль играет NPQ, которое является важным ключевым механизмом фотосинтетического аппарата, позволяющим регулировать поглощение световой энергии реакционными центрами ФСII. Как уже отмечалось, NPQ включает в себя, прежде всего, энергозависимую компоненту тушения (индуцируется закислением люмена хлоропластов), state-transition (обусловлено изменениями фосфорилирования светособирающего комплекса и его перемещением между фотосистемами) и фотоингибирование. Механизм формирования энергозависимого компонента NPQ, обусловленного взаимодействием PsbS белков и ксантофиллов со светособирающими комплексами, детально моделируется в ряде работ [38, 43, 52, 54, 55]; при этом описывается взаимодействие протонированных/непротонированных PsbS с ксантофиллами.

Другой подход к моделированию развития NPQ опирается на описание связи тушения с уровнем восстановления ЭТЦ. Высокая активность ЭТЦ сопровождается как закислением люмена, так и увеличением доли пластохинолов в пуле (для интактных и не подверженных действию разобщителей тилакоидных мембран); такая особенность позволяет описать развитие энергозависимого компонента NPQ как функцию заполнения пула пластохинонов, что и было реализовано в ряде моделей [41, 43, 78, 89]. Аналогичный подход также был использован для описания state-transition: заполнение пула пластохинонов определяло активность киназы светособирающего комплекса и его фосфорилирование [43, 78].

Среди других регуляторных процессов, описанных в современных фотосинтетических моделях, можно отметить активацию ферредоксин-NADP⁺-редуктазы в условиях освещения [43, 72, 87], отток электронов от пластохинолов посредством терминальной оксидазы PTOX [43, 54] и светоиндуцированную активацию циклического потока [43, 82, 90]. Также активность ЭТЦ в моделях может зависеть от количества быстрых и

медленных PQ на один реакционный центр [46] и кинетических свойств пластохинонов [88, 91]. Еще одна группа моделей [42, 81, 86, 87] учитывает также динамику электрического и химического градиентов протонов на тилакоидной мембране, описанную на основе трансмембранного транспорта электронов и ионов.

В качестве отдельной группы можно выделить модели, которые изучают пространственное движение компонент ЭТЦ. Эти модели описывают броуновское движение исследуемых молекул, их электростатические взаимодействия и перенос электронов между такими молекулами [92–97]. В частности, такая модель позволяет прогнозировать влияние ионной силы раствора на константу скорости реакции переноса электронов [93, 96, 97]. Альтернативная модель пространственного движения молекул ЭТЦ и протонов может базироваться на уравнении диффузии и описании геометрии тилакоидов [49].

В целом, модели, описывающие световую стадию фотосинтеза растений, не содержат в явном виде описания фиксации углекислого газа. Однако они могут быть использованы для прогнозирования ответов фотосинтетического аппарата на действие ряда неблагоприятных факторов (в частности, быстрых колебаний интенсивности освещения [56, 83] или гербицидов [46]). Таким образом, модели этой группы позволяют прогнозировать уровень стрессовых изменений фотосинтетического аппарата, которые потенциально могут стать причиной снижения продуктивности. Кроме того, значительная часть моделей световой стадии фотосинтеза может описывать флуоресцентные процессы, включая процесс индукции флуоресценции в условиях освещения [46, 47, 82, 85, 86, 88]. Учитывая существенную роль анализа флуоресценции хлорофилла в исследовании растений [12, 57, 98], это открывает перспективы для использования данной группы моделей при решении прикладных задач в рамках мониторинга состояния растений.

5. МАТЕМАТИЧЕСКИЕ МОДЕЛИ, ФОКУСИРУЮЩИЕСЯ НА ОПИСАНИИ ФОТОСИНТЕТИЧЕСКОЙ АССИМИЛЯЦИИ CO_2

Фотосинтетическая ассимиляция CO_2 , связанная с функционированием цикла Кальвина, лежит в основе продуктивности растений. Вследствие этого возникает потребность в разработке математических моделей, фокусирующихся на описании ассимиляции углекислого газа. Известно, что цикл Кальвина нуждается в АТФ и NADPH, синтезируемых в результате работы ЭТЦ, а для поддержания функционирования ЭТЦ необходимо потребление таких соединений [4, 37, 42]. Это означает, что модели, фокусирующиеся на

описании фотосинтетической ассимиляции CO_2 , должны также включать в себя описание функционирования ЭТЦ в тилакоидных мембранах (возможно, в минимальном варианте) и его взаимодействия с реакциями цикла Кальвина.

Многообразие промежуточных продуктов цикла Кальвина, необходимость притока CO_2 и фотосинтетической продукции АТФ и NADPH для его функционирования, существование различных путей оттока углеводов из цикла (например, триоз и фруктозы-6-фосфата), а также наличие механизмов, регулирующих активность ферментов темновой стадии фотосинтеза, делает актуальным вопрос об оптимальной детализации описания при разработке математической модели фиксации углекислого газа [99].

В литературе представлены модели, описывающие фотосинтетическую ассимиляцию CO_2 с различной степенью детализации. В частности, такие модели могут базироваться на описании активности РУБИСКО [45] или на более подробном описании ферментов цикла Кальвина и оттока его продуктов [100, 101], при этом модели могут быть дополнены описанием процесса синтеза сахарозы [75, 102], фотодыхания [103], потоков углекислого газа в строму хлоропластов [31, 32, 104, 105] и др. При разработке этой группы моделей для описания фотосинтетической ассимиляции CO_2 может использоваться кинетика Михаэлиса–Ментен, классические уравнения химической кинетики, а также специализированные функции на основе аналитических решений и аппроксимаций (подробнее см. обзор [99]). Сравнительный анализ Arnold и Nikoloski [99] показал, что наиболее надежными для прогнозирования ассимиляции являются относительно простые модели (например, [45, 101]). Вероятно, это связано с тем, что увеличение детализации моделей ведет за собой рост неопределенности, связанный с их параметризацией, а также со сложностью описания связей между компонентами модели и регуляторными процессами.

Ярким примером относительно простой модели, которая широко используется для анализа фотосинтетической ассимиляции CO_2 растениями, является модель Farquhar-von Caemmerer-Berry (FvCB) [37, 45, 106]. Модель базируется на допущении, что стационарная скорость ассимиляции углекислого газа определяется наиболее медленным из трех лимитирующих темновую стадию фотосинтеза процессов: фиксация CO_2 при функционировании РУБИСКО, поток электронов в ЭТЦ тилакоидных мембран и отток триоз из стромы хлоропластов. При этом расчет потенциальной скорости функционирования РУБИСКО базируется на представлении о ее конкурентном взаимодействии с CO_2 в ходе цикла Кальвина и с O_2 в процессе фотодыхания [37, 45, 106]. Скорость такого взаимодействия описы-

вается с использованием формализма Михаэлиса–Ментен, что позволяет получить соотношение активности оксигенации и карбоксилирования в условиях функционирования РУБИСКО в качестве лимитирующей стадии фотосинтеза. Потенциальная скорость фотосинтетического потока электронов через ЭТЦ в классическом варианте модели FvCB описывается как эмпирическая функция интенсивности освещения [45, 106], однако могут использоваться и модифицированные варианты описания [87]. Потенциальная скорость оттока триоз может быть описана как постоянная величина [106], при некоторых модификациях модели FvCB этот процесс не учитывается [107]. Уровень дыхания, не связанный с фотосинтетическими процессами (“темновое дыхание”), в модели FvCB описывается как постоянная величина; фотодыхание описывается на основе соотношения уровней карбоксилирования и оксигенирования при функционировании РУБИСКО [103]. Важно отметить, что в настоящее время существуют многочисленные модификации модели FvCB. В частности, существуют вариант модели с описанием альтернативных потоков электронов (циклического и псевдоциклического), на ее основе разработаны модели C₄ и C₂ фотосинтеза и т.д. [37, 107].

Значительным преимуществом модели FvCB является ее простота, позволяющая анализировать процессы, которые являются ключевыми для фотосинтетической ассимиляции CO₂. В то же время существенным ограничением этой модели является недостаточно детальное описание взаимодействия процессов ассимиляции CO₂ с реакциями в ЭТЦ [106]. В частности, классическая версия модели FvCB не позволяет описать обратное влияние изменений процесса фиксации CO₂ на активность ЭТЦ. В целом, модель FvCB является эффективным инструментом для прогнозирования ассимиляции CO₂ в различных условиях, а также для анализа и интерпретации данных. В частности, она позволяет анализировать состояние растений при действии стрессоров [37, 107, 108].

Другая группа моделей фотосинтетической ассимиляции CO₂ делает акцент на подробное описание процессов в ЭТЦ, биохимических реакций фотосинтеза для C₃ и C₄ растений, взаимодействия процессов темновой и световой стадии (в частности, через концентрации АТФ и NADPH), а также на моделирование регуляторных механизмов (например, активации фотосинтетических процессов тиоредоксином) [41, 42, 75, 87, 109–111]. Преимуществом моделей такого типа является возможность анализа нестационарных изменений в ходе переходных процессов [41], что позволяет анализировать фотосинтетические процессы (включая их регуляцию) и, опосредованно, продуктивность в условиях быстрых изме-

нений условий среды. Кроме того, благодаря детализированному описанию исследуемых процессов их можно использовать как теоретический инструмент для выявления потенциальных “мишеней” для интенсификации фотосинтеза, в частности, путем метаболической инженерии и создания трансгенных растений [99, 112, 113]. В то же время сложный характер моделей этой группы затрудняет их параметризацию и повышает вероятность неустойчивого характера найденных решений при анализе моделей. Таким образом, при разработке комплексных моделей необходимо соблюдение баланса между подробным описанием процессов и надежностью параметризации и анализа модели.

6. МАТЕМАТИЧЕСКИЕ МОДЕЛИ ФОТОСИНТЕЗА, УЧИТЫВАЮЩИЕ СВЕТОВЫЕ ПОТОКИ И ТРАНСПОРТ CO₂ НА УРОВНЕ КЛЕТОК, ТКАНЕЙ И ЛИСТА В ЦЕЛОМ

В предыдущих разделах были рассмотрены преимущественно “точечные” модели или модели с описанием пространственного фактора в очень ограниченном масштабе (участки тилакоидной мембраны, хлоропласты и т.д.). Однако протекание фотосинтетических процессов может характеризоваться существенной неоднородностью в большем пространственном масштабе. Она может быть связана с пространственной неоднородностью в структуре клеток и листа, разным содержанием пигментов, особенностями расположения хлоропластов, а также с различной доступностью CO₂ (вследствие различного расстояния до устьиц) или света [114–116].

Одним из направлений моделирования фотосинтеза, учитывающим пространственный фактор, является описание профилей распределения света по толщине листа. Такие профили моделируются на основании описания поглощения, рассеяния и пропускания света различными слоями листа в зависимости от условий освещения (освещение с абаксиальной и/или адаксиальной стороны, разная интенсивность света и др.) и используются при моделировании профиля фотосинтетических процессов [114, 116, 117]. Модели этой группы позволяют оценить эффективность [116] и валовую скорость [114] фотосинтеза в различных слоях листа, а также оценить световые ограничения для функционирования ЭТЦ [117].

Другим направлением моделирования является описание механизмов перемещения CO₂ внутри листа, которое значительно влияет на эффективность ассимиляции [105]. Важно отметить, что структура листа очень неоднородна и включает множество переходов между воздушной, водной и липидной средой [115], при этом большое количество мембран, значительная толщина клеточ-

ных стенок и плотное примыкание клеток друг к другу значительно усложняет прохождение CO_2 к хлоропластам. Транспорт CO_2 часто описывается на основе последовательных эквивалентных электрических цепей, проводимость мезофилла определяется как функция проводимостей клеточной стенки и мембран [31, 32], цитоплазмы и компартментов клетки [115], а также устьиц [44, 87]. Структурные особенности клеток и компартментов, отдельных слоев по глубине листа, а также воздушные полости внутри мезофилла являются дополнительными факторами, влияющими на транспорт CO_2 [33, 104]. Такие модели могут также учитывать взаимопревращения CO_2 и HCO_3^- и их перенос между цитоплазмой, хлоропластами [31–33, 116], вакуолью [118] и митохондриями [31]. Важно отметить, что большинство моделей этой группы описывает большое число клеток, каждая из которых включает упрощенное описание ассимиляции и дыхания [31, 104, 114, 116–118].

Анализ моделей этой группы показал ряд важных результатов. В частности, выявлено, что для фотосинтетических процессов существенную роль играет соотношение площади хлоропластов и мембраны клетки, а также пространственное расположение и угол поворота хлоропластов [31, 33]. Другим лимитирующим фотосинтез фактором является проводимость для CO_2 у разных фаз (водной и липидной) и компартментов [32], а также потери CO_2 в ходе транспорта [31]. Еще одним фактором, положительно влияющим на транспорт CO_2 и фотосинтез, может выступать активность карбоангидразы [31, 33, 118], так как транспорт CO_2 и HCO_3^- в листе может различаться [115]. Эти различия могут также лежать в основе влияния на фотосинтетические процессы разной активности протонной помпы плазматической мембраны (и связанных с этим различных значений внутри- и внеклеточного pH) [119]. Такие результаты показывают значимость для фотосинтеза отдельных компонент проводимости мезофилла для CO_2 и выявляют ключевые компоненты, в частности они позволяют теоретически оценить роль транспорта CO_2 через системы активного транспорта или аквапорины [31, 32, 115, 120]. Анализ моделей может быть использован при разработке механизмов улучшения фотосинтеза и продуктивности растений (например, путем создания генетически модифицированных растений, проводимость мезофилла которых для CO_2 будет улучшена) [115, 120].

В целом, фотосинтетические модели, которые учитывают такие критичные для фотосинтеза факторы, как распределение интенсивности освещения и концентрации CO_2 в пространстве листа, обладают значительным потенциалом для прогнозирования ассимиляции CO_2 и продуктив-

ности при различных режимах освещения, модификации концентрации углекислого газа или действия стрессоров. В частности, такие модели могут стать инструментом для теоретического поиска оптимальных условий для выращивания сельскохозяйственных растений и интенсификации их продуктивности.

7. МАТЕМАТИЧЕСКИЕ МОДЕЛИ ФОТОСИНТЕЗА, УЧИТЫВАЮЩИЕ ЕГО ВЗАИМОДЕЙСТВИЕ С ДРУГИМИ ФИЗИОЛОГИЧЕСКИМИ ПРОЦЕССАМИ

Следующим важным шагом в направлении более комплексного моделирования фотосинтеза является разработка математических моделей, учитывающих взаимодействие фотосинтеза с другими физиологическими процессами.

Учитывая, что фотосинтез является ключевым процессом в метаболизме растительной клетки, в настоящее время активно разрабатываются модели фотосинтеза, основанные на классической химической кинетике, которые описывают последующее использование фотосинтетических продуктов в синтезе широкого спектра соединений. В частности, модели описывают синтез аминокислот (например, серин и глицин) или моно- и полисахаридов (включая малат, сахарозу, крахмал и др.) [41, 42, 44, 87, 103]. Кроме того, при моделировании может описываться дальнейшее использование фотосинтетических АТФ и NADPH в качестве источника энергии для других биохимических реакций [41, 42, 103]. Существуют также модели, описывающие восстановление нитритов как конкурентный процесс для синтеза крахмала, который приводит к потреблению 3-фосфоглицерата, электронов с ферредоксина и АТФ [41, 87]. Модели этой группы позволяют теоретически оценить роль фотосинтеза в поддержании соотношения C/N в растительных тканях (в частности, анализировать связь снижения доступности азота для растений с уменьшением активности фотосинтеза, а также прогнозировать влияние оттока фотосинтетических продуктов на активность фотосинтеза) и продукционный процесс [41, 42, 87, 103].

Другим важным направлением “расширения” фотосинтетических моделей является описание процесса дыхания, которое наряду с фотосинтезом является одним из основных источников энергии, а при стрессовых условиях может менять свою активность [121]. В наиболее простом варианте скорость темнового дыхания может быть описана как постоянная величина [45], при этом могут также учитываться поправки на объем митохондрий и хлоропластов [31]. Существуют и более сложные модели, учитывающие большее число компонент [122, 123]. В частности, Buckley и Adams [124] разработали стационарную модель, включающую описание процессов фотосинтеза,

дыхания и фотодыхания; при этом предполагается, что продукты метаболизма определяют скорость этих процессов. Разработанная модель позволяет оценить вклад дыхания в энергетический баланс и потребление продуктов фотосинтеза, а также выявить возможные механизмы снижения активности дыхания при освещении. В моделях фотосинтеза может также учитываться процесс фотодыхания. В простых вариантах модели [106] оно может быть описано на основе уравнения для соотношения скоростей фотосинтеза и фотодыхания. В работе Laisk с соавторами [41] реализовано детализированное описание фотодыхания, учитывающее баланс вещества и энергии. Еще более детализированной является модель Zhu с соавторами [42, 103], в которой дополнительно описывается транспорт участвующих в фотодыхании соединений через мембраны. Такие транспортные процессы являются важной составляющей регуляции фотосинтеза, поскольку обеспечивают отток триоз из хлоропластов; описание этих процессов может значительно повысить эффективность описания фотосинтеза в стрессовых условиях.

Еще одной важной задачей моделирования фотосинтеза является описание взаимодействия устьиц и фотосинтеза. При этом важно отметить, что устьица участвуют в контроле фотосинтетических процессов (обеспечивая необходимый для фотосинтеза приток воды и CO_2); с другой стороны, протекание фотосинтетических процессов является необходимым условием для работы устьиц [125]. Модель Kim и Lieth [126] объединяет классические модели ассимиляции [45] и описание проводимости устьиц и мезофилла [127]. Показано, что такая модель хорошо описывает зависимость активности РУБИСКО и ЭТЦ хлоропластов от температуры, а также возрастные изменения ассимиляции листьев. Другая модель [128] опирается на гидромеханическое описание влияния давления на проводимость устьиц. При этом предполагается, что осмотический градиент через мембраны устьичных клеток определяется концентрацией в них АТФ и тургорным давлением соседних эпидермальных клеток; концентрация АТФ выступает в качестве связующего звена между состоянием устьиц и фотосинтетическими процессами (описанными на основании классической модели ассимиляции CO_2 [45]). Существуют модификации гидромеханической модели, описывающие C_4 растения и учитывающие возможность ограниченного полива растений [129]. Подобные модели могут быть использованы для анализа роли фотосинтеза в потреблении воды растением, для оценки ассимиляции и продуктивности в условиях лимитирования фотосинтеза водным режимом, содержанием CO_2 , состоянием устьичного аппарата или активностью ферментов цикла Кальвина [125]. Детализированное описание взаимодействия устьиц и фотосинтеза было

реализовано в модели OnGuard [44, 130]. Такая модель описывает изменения открытости устьиц как функцию их объема, который зависит от функционирования систем ионного транспорта плазмалеммы и вакуоли и от активности синтеза осмотически активных сахарозы и малата в ходе фотосинтеза (а также от их взаимопревращения); кроме того, в модели учитываются буферные свойства малата для протонов. В ряде работ модель OnGuard была использована для анализа роли транспортных систем (в частности, K^+ -каналов) [131, 132] и H^+ и Ca^{2+} -сигналинга [132, 133] в регуляции устьиц. В целом, модель OnGuard может быть дополнена детализированным описанием фотосинтеза и продукционного процесса, что открывает широкие возможности для симуляции этих процессов в различных условиях [125].

Существуют и другие направления моделирования фотосинтеза. В частности, значительный интерес представляют математические модели, описывающие взаимодействие фотосинтетических процессов с процессами сигналинга [119, 134]. При этом из экспериментов известно, на фотосинтез могут оказывать влияние сигнальные процессы, происходящие в других компартментах клетки (например, сдвиги рН [27, 28], изменения концентрации Ca^{2+} [135] или распространение метаболитов [136] в цитоплазме). Такие результаты делают актуальным моделирование регуляторного влияния на фотосинтез процессов, протекающих в отдаленных от хлоропластов компартментах. В настоящее время существуют лишь ограниченное число моделей такой группы, которые могут опираться на простые регрессионные уравнения [134], на описание распространения регуляторного соединения в потоке цитоплазмы [136], а также на более детализированные модели влияния активности H^+ -АТФ-азы и Ca^{2+} -каналов плазмалеммы на потребление CO_2 клеткой [119]. В целом, подобные модели могут стать основой для прогнозирования фотосинтеза и продуктивности в условиях активации различных сигнальных систем; однако, их это направления моделирования фотосинтеза требует дальнейшего развития.

Отдельно можно выделить модели, которые связывают фотосинтетические процессы с приростом биомассы растений, т.е. с их продуктивностью [50, 137–140]. При этом описание фотосинтеза в таких моделях может значительно варьировать (от модификаций FvCB [137, 139] до максимально упрощенных эмпирических уравнений [140]). Помимо фотосинтеза, модели этой группы могут учитывать транспирацию, дыхание, азотный обмен, транспорт ассимилятов и другие процессы [50, 137, 139, 140]. Моделирование роста и увеличения биомассы базируется на описании распределения синтезированных углеводов между органами растения (корень и стебель) [137] или

элементарными структурными элементами растительного организма [140], также учитывается накопление органических соединений и их расход в ходе дыхания. Модели этой группы могут быть непосредственно использованы для оценки продукционного процесса при различных условиях среды. Кроме того, такие модели хорошо интегрируются в более сложные описания, учитывающие “надорганизменный” уровень.

8. МАТЕМАТИЧЕСКИЕ МОДЕЛИ ФОТОСИНТЕЗА, УЧИТЫВАЮЩИЕ “НАДОРГАНИЗМЕННЫЙ” УРОВЕНЬ

Рассмотренные выше модели преимущественно направлены на анализ различных аспектов фотосинтеза на уровне отдельного растения. Однако в естественных условиях фотосинтез и продукционный процесс растений могут зависеть от взаимодействия растений друг с другом, другими живыми организмами и с биотопом [51], т.е. актуальной является задача по разработке математических моделей фотосинтеза “надорганизменного” уровня.

Среди таких моделей важную роль играют математические модели, описывающие фотосинтез в растительном покрове [141–149], при этом основное внимание обычно уделяется распространению света. Такое описание может варьировать от усредненных моделей (покров как “большой” лист, серия расположенных последовательно листьев или сочетание освещенных и затененных листьев) [146, 149] до использования виртуальных моделей растений с реалистичной геометрией и описанием конкретных траекторий распространения лучей света [144, 145, 150]. В некоторых моделях может учитываться неоднородность в покрове других значимых для фотосинтеза параметров (например, температуры [146]). Для моделирования фотосинтетических процессов листа широко используется классическая модель FvCB [141, 142, 149, 150]. Однако могут быть также использованы как простые эмпирические описания [141], так и детализированные кинетические модели фотосинтетических процессов [147]. Помимо описания фотосинтеза модели этой группы могут описывать и другие процессы (например, азотный метаболизм, регуляцию активности устьиц, транспорт ассимилятов и др.) [144, 148, 149]. В целом, анализ моделей, описывающих фотосинтез в растительном покрове, позволяет выявить принципиально новые механизмы регуляции фотосинтетических процессов [142, 147, 148], которые могут оказывать существенное влияние на продукционный процесс и устойчивость растений в естественных условиях. В частности, можно отметить выявление возможности стимуляции ассимиляции CO_2 при снижении концентрации хлорофилла [147], обнаружение связи такого влияния с распределением азота

[148], оценку влияния флуктуаций интенсивности освещения на ассимиляцию растительного покрова [151] и т.д.

Следующая группа “надорганизменных” моделей фокусируется на описании естественных и искусственных экосистем [51, 137, 152–155], масштаб моделируемой экосистемы может существенно варьировать (вплоть до планетарных моделей). Такие модели в значительной степени опираются на описанные в предыдущем разделе модели продукционного процесса [50, 137–140, 144], кроме того, они могут учитывать эффекты, связанные с распространением света в растительном покрове. Особенностью таких моделей является описание взаимодействия растений с другими живыми организмами (например, почвенными микроорганизмами) и/или с компонентами биотопа [51]. В отдельных случаях модели этой группы могут иметь узкоспециализированный характер (например, моделирование функционирования фитокомплекса для выращивания конкретного сорта растений [154]). Важно отметить, что в связи с высокой прикладной значимостью этой категории моделей (сельское хозяйство, экология) для их реализации к настоящему времени создано значительное количество программных инструментов (см., например, обзор [51]), которые могут быть применены для прогнозирования продуктивности определенных видов растений в условиях конкретных биотопов. В то же время широкое использование упрощенных описаний в этой группе моделей может создавать определенные ограничения для их применения и снижать эффективность прогнозирования [156].

9. ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Анализ современной литературы, посвященной математическому моделированию фотосинтеза, показывает, что существует значительное число моделей фотосинтетических процессов различного уровня (от описания молекулярных взаимодействий в тилакоидных мембранах — до моделей на уровне целого растения и экосистемы), которые опираются на различную степень детализации описания исследуемых процессов (ряд особенностей описания приведен табл. 1). Различные типы моделей могут быть использованы для прогнозирования продуктивности растений, для оценки нарушений фотосинтетических процессов при действии стрессоров, для выявления потенциальных путей улучшения фотосинтеза и для интерпретации данных мониторинга состояния растений. В то же время обзор показывает, что множество разработанных моделей направлено на решение частных проблем при исследовании фотосинтеза; напротив, модели высокого уровня (модели фотосинтеза и продукционного процесса на уровне целого растения, растительного покрова или экосистемы) опираются на до-

Таблица 1. Некоторые особенности моделирования фотосинтетических процессов различного уровня в условиях описания в разной степени детализированности

Моделируемый процесс	Упрощенное описание	Описание с промежуточной детализацией	Детализированное описание
Поступление света в фотосинтетический аппарат	Интенсивность света описывается как постоянная величина, без учета распределения света в толще листа или в растительном покрове [72, 78, 79, 81, 91]	Описывается распределение интенсивности освещения в толще листа [117] или растительном покрове [146, 149] на основании упрощенной модели прохождения света в рассеивающей среде, которая приблизительно соответствует таким структурам	Описывается распределение интенсивности освещения в толще листа [33, 88, 104, 114] или растительном покрове [144, 145, 150] на основании виртуальных моделей, детально имитирующих геометрию этих структур
Поглощение энергии света в РЦ	Поглощение света РЦ описывается как величина, пропорциональная его интенсивности [56]	Для описания поглощения света РЦ используется стационарное описание путей миграции и утилизации энергии возбуждения [62–64]	Для описания поглощения света РЦ используется нестационарное описание динамики миграции и утилизации энергии возбуждения [61, 67]
Поток электронов в фотосинтетической ЭТЦ в тилакоидных мембранах	Поток электронов описывается с использованием стационарных функций, аппроксимирующих его зависимость от интенсивности освещения [45, 106, 108]	Поток электронов описывается с использованием упрощенных систем дифференциальных уравнений, которые учитывают лишь отдельные ключевые процессы в ЭТЦ [56, 79]	Поток электронов описывается с использованием детализированных систем дифференциальных уравнений, описывающих перенос электронов между компонентами ЭТЦ [43, 46, 72, 81, 86, 91]. При этом может учитываться распределение процессов в пространстве [49, 92–97]
Регуляция процессов в ЭТЦ	Регуляторные процессы описываются с использованием функций, аппроксимирующих зависимости активности ЭТЦ от факторов среды (в частности, интенсивности света [39]) или их динамики [40]	Регуляторные процессы упрощенно описываются как функция фотосинтетических процессов (в частности, доли “закрытых” РЦ [56], количества восстановленных пластохинонов [84] или рН [53]) без детального описания их механизмов	Описываются молекулярные механизмы регуляторных процессов (переходы в ксантофилловом цикле [38, 43, 52, 54, 55], изменения активности ферредоксин-NADP ⁺ -редуктазы на свету [43, 72, 87], активацию циклического потока электронов [43, 82, 90] и др.)

Таблица 1. Окончание

Моделируемый процесс	Упрощенное описание	Описание с промежуточной детализацией	Детализированное описание
Поддержание CO_2 в стромах хлоропластов, необходимое для функционирования цикла Кальвина	Концентрация CO_2 описывается как заданная константа [110]	Поток CO_2 в стромах описывается на основании минимальной эквивалентной схемы из проводимостей для CO_2 (в частности, часто учитывается проводимость устьиц [127, 129])	Поток CO_2 описывается на основании детализированной эквивалентной схемы и/или диффузионных уравнений [31–33]. Также учитываются регуляторные процессы (например, детально описываются устьица) [44, 130] и переходы между нейтральной и заряженной формами углекислого газа [31–33, 116, 119]
Фотосинтетическая ассимиляция CO_2 в ходе темновой стадии фотосинтеза	Описывается на основе эмпирических уравнений [138] или стационарного уравнения для лимитирующей скорости фотосинтеза процесса [45, 106, 108]	Описывается на основании упрощенной системы дифференциальных уравнений, которая учитывает ключевые компоненты цикла Кальвина [110]	Описывается на основе детализированной системы дифференциальных уравнений, которая учитывает компоненты цикла Кальвина и связанные процессы [99–103, 111]
Связанное с фотосинтезом накопление биомассы	Описывается как суммарное накопление ассимилированного CO_2 ; возможно, с учетом потоков ассимилятов [144]	Описывается, как функция фотосинтетической ассимиляции CO_2 , дыхания и оттока ассимилятов [50, 149]	При описании учитывается синтез углеводов, их потребление и распределение между частями растений [137, 140], а также часто описывается азотный обмен [137]

статочны упрощенные описания. Такая ситуация делает крайне актуальным развитие путей совместного использования существующих моделей, их адаптации к решению широкого круга задач. Опираясь на литературные данные, мы можем предложить несколько возможных путей такого развития (рис. 3).

Во-первых, это создание базы фотосинтетических моделей различного уровня, которая объединит существующие модели и обеспечит автоматический поиск подходящих описаний на основании критериев, заданных пользователем. Потенциально, такая база может быть также использована для выявления оптимальных моделей на основании предоставленных пользователем экспериментальных данных, так как эффективность различных моделей при решении разных задач может существенно варьировать [99].

Во-вторых, это разработка программной среды для совместного использования групп моделей, фокусирующихся на описании различных

фотосинтетических процессов. Следует отметить, что существующие модели могут значительно отличаться друг от друга (вследствие описания различных процессов, использования разных упрощений и т.д.); как следствие, каждая из моделей может опираться на свой набор параметров и переменных и иметь собственную область корректного применения. Программная среда для их объединения должна включать в себя алгоритм поиска оптимальной линейки моделей для решения конкретной задачи пользователя и алгоритм, обеспечивающий взаимодействие и обмен информацией между такими моделями. Несмотря на высокую сложность такого пути, он представляется наиболее перспективным, и в настоящее время предпринимаются попытки для его реализации [83, 156]. Можно ожидать, что такая среда может быть использована для прогнозирования процессов фотосинтеза и продуктивности в различных условиях (или при различных модификациях фотосинтетического аппарата).



Рис. 4. Потенциально перспективные направления развития математического моделирования фотосинтетических процессов у растений и их ограничения.

В-третьих, это разработка максимально полной модели фотосинтеза, описывающей процессы различного уровня, которая будет объединять существующие знания о фотосинтезе и его регуляции, а также суммировать опыт моделирования отдельных фотосинтетических процессов. Можно ожидать, что такая модель позволит выявить ряд новых свойств фотосинтетического аппарата, однако ее реализация связана с рядом принципиальных проблем. (i) Такая модель всегда будет ограничиваться неполнотой наших знаний о фотосинтезе, его регуляции и связях с другими процессами. Более того, появление новых знаний в этой области может потребовать существенной модификации модели. (ii) Параметризация такой комплексной модели будет представлять собой очень сложную задачу, при этом для нового объекта (вида или сорта растений) может потребоваться новая параметризация. Кроме того, наличие большого числа параметров может увеличить вероятность ошибок параметризации. (iii) Анализ такой модели потребует значительных вычислительных ресурсов (при этом часть вычислений будет не нужна для решения текущих задач), что также может ограничивать ее применимость.

В целом, несмотря на кажущуюся привлекательность, такой подход имеет существенные ограничения.

Таким образом, математическое моделирование является эффективным инструментом для анализа фотосинтетических процессов, однако в настоящее время назрела острая необходимость интеграции многочисленных разработанных моделей, которая будет направлена на решение конкретных исследовательских и прикладных задач.

Исследование выполнено при финансовой поддержке РФФИ в рамках научного проекта № 19-14-50410.

Funding: The reported study was funded by RFBR, project number 19-14-50410.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Murchie E.H., Pinto M., Horton P. 2009. Agriculture and the new challenges for photosynthesis research. *New Phytol.* **181**, 532–552.
2. Foyer C.H., Ruban A.V., Nixon P.J. 2017. Photosynthesis solutions to enhance productivity. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B Biol. Sci.* **372**, 20160374.

3. Simkin A.J., López-Calcagno P.E., Raines C.A. 2019. Feeding the world: Improving photosynthetic efficiency for sustainable crop production. *J. Exp. Bot.* **70**, 1119–1140.
4. Johnson M.P. 2016. Photosynthesis. *Essays Biochem.* **60**, 255–273.
5. *Photosynthesis in silico. Advances in Photosynthesis and Respiration.* 2009. Eds Laisk A., Nedbal L., Govindjee. Dordrecht: Springer. 504 p.
6. Nedbal L., Červený J., Schmidt H. 2009. Scaling and integration of kinetic models of photosynthesis: Towards comprehensive e-photosynthesis. In: *Photosynthesis in silico. Advances in Photosynthesis and Respiration.* Eds. Laisk A., Nedbal L., Govindjee. Dordrecht: Springer, p. 17–29.
7. Tikhonov A.N., Verhubskii A.V. 2014. Computer modeling of electron and proton transport in chloroplasts. *Biosystems.* **121**, 1–21.
8. Pavlovič A., Slovákova L., Pandolfi C., Mancuso S. 2011. On the mechanism underlying photosynthetic limitation upon trigger hair irritation in the carnivorous plant Venus flytrap (*Dionaea muscipula Ellis*). *J. Exp. Bot.* **62**, 1991–2000.
9. Sukhov V., Orlova L., Mysyagin S., Sinitsina J., Vodeneev V. 2012. Analysis of the photosynthetic response induced by variation potential in geranium. *Planta.* **235**, 703–712.
10. Бухов Н.Г. 2004. Динамическая световая регуляция фотосинтеза. *Физиология растений.* **51**, 825–837.
11. Kramer D.M., Johnson G., Kiirats O., Edwards G.E. 2004. New fluorescence parameters for the determination of Q_A redox state and excitation energy fluxes. *Photosynth. Res.* **79**, 209–218.
12. Kalaji H.M., Schansker G., Brestic M., Bussotti F., Calatayud A., Ferroni L., Goltsev V., Guidi L., Jajoo A., Li P., Losciale P., Mishra V.K., Misra A.N., Nebauer S.G., Pancaldi S., Penella C., Pollastrini M., Suresh K., Tambussi E., Yannicari M., Zivcak M., Cetner M.D., Samborska I.A., Stirbet A., Olsovska K., Kunderlikova K., Shelonzek H., Rusinowski S., Baba W. 2017. Frequently asked questions about chlorophyll fluorescence, the sequel. *Photosynth. Res.* **132**, 13–66.
13. Demmig-Adams B. 1990. Carotenoids and photoprotection in plants: A role for the xanthophylls zeaxanthin. *Biochim. Biophys. Acta.* **1020**, 1–24.
14. Li X.P., Gilmore A.M., Caffarri S., Bassi R., Golan T., Kramer D., Niyogi K.K. 2004. Regulation of photosynthetic light harvesting involves intrathylakoid lumen pH sensing by the PsbS protein. *J. Biol. Chem.* **279**, 22866–22874.
15. Jahns P., Latowski D., Strzalka K. 2009. Mechanism and regulation of the violaxanthin cycle: The role of antenna proteins and membrane lipids. *Biochim. Biophys. Acta.* **1787**, 3–14.
16. Ruban A.V. 2016. Nonphotochemical chlorophyll fluorescence quenching: Mechanism and effectiveness in protecting plants from photodamage. *Plant Physiol.* **170**, 1903–1916.
17. Murata N., Takahashi S., Nishiyama Y., Allakhverdiev S.I. 2007. Photoinhibition of photosystem II under environmental stress. *Biochim. Biophys. Acta.* **1767**, 414–421.
18. Murata N., Allakhverdiev S.I., Nishiyama Y. 2012. The mechanism of photoinhibition *in vivo*: Re-evaluation of the roles of catalase, α -tocopherol, non-photochemical quenching, and electron transport. *Biochim. Biophys. Acta.* **1817**, 1127–1133.
19. Miyake C., Shinzaki Y., Miyata M., Tomizawa K. 2004. Enhancement of cyclic electron flow around PSI at high light and its contribution to the induction of non-photochemical quenching of Chl fluorescence in intact leaves of tobacco plants. *Plant Cell Physiol.* **45**, 1426–1433.
20. Miyake C., Miyata M., Shinzaki Y., Tomizawa K. 2005. CO₂ response of cyclic electron flow around PSI (CEF-PSI) in tobacco leaves—relative electron fluxes through PSI and PSII determine the magnitude of non-photochemical quenching (NPQ) of Chl fluorescence. *Plant Cell Physiol.* **46**, 629–637.
21. Joliot P., Johnson G.N. 2011. Regulation of cyclic and linear electron flow in higher plants. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **108**, 13317–13322.
22. Alte F., Stengel A., Benz J.P., Petersen E., Soll J., Groll M., Böltner B. 2010. Ferredoxin:NADPH oxidoreductase is recruited to thylakoids by binding to a polyproline type II helix in a pH-dependent manner. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **107**, 19260–19265.
23. Benz J.P., Lintala M., Soll J., Mulo P., Böltner B. 2010. A new concept for ferredoxin-NADP(H) oxidoreductase binding to plant thylakoids. *Trends Plant Sci.* **15**, 608–613.
24. Matsumoto M., Ogawa K. 2008. New insight into the Calvin cycle regulation – glutathionylation of fructose biphosphate aldolase in response to illumination. In: *Photosynthesis. Energy from the Sun.* Eds Allen J.F., Gantt E., Golbeck J.H., Osmond B. Dordrecht: Springer, p. 871–874.
25. Michelet L., Zaffagnini M., Morisse S., Sparla F., Pérez-Pérez M.E., Francia F., Danon A., Marchand C.H., Fermani S., Trost P., Lemaire S.D. 2013. Redox regulation of the Calvin–Benson cycle: Something old, something new. *Front Plant Sci.* **4**, 470.
26. Jensen E., Clément R., Maberly S.C., Gontero B. 2017. Regulation of the Calvin–Benson–Bassham cycle in the enigmatic diatoms: Biochemical and evolutionary variations on an original theme. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B Biol. Sci.* **372**, 20160401.
27. Sukhov V., Surova L., Morozova E., Sherstneva O., Vodeneev V. 2016. Changes in H⁺-ATP synthase activity, proton electrochemical gradient, and pH in pea chloroplast can be connected with variation potential. *Front. Plant Sci.* **7**, 1092.
28. Sukhov V. 2016. Electrical signals as mechanism of photosynthesis regulation in plants. *Photosynth. Res.* **130**, 373–387.

29. Armbruster U., Galvis V.C., Kunz H.-H., Strand D.D. 2017. The regulation of the chloroplast proton motive force plays a key role for photosynthesis in fluctuating light. *Curr. Opin. Plant Biol.* **37**, 56–62.
30. Kohzuma K., Froehlich J.E., Davis G.A., Temple J.A., Minhas D., Dhingra A., Cruz J.A., Kramer D.M. 2017. The role of light–dark regulation of the chloroplast ATP synthase. *Front. Plant Sci.* **8**, Article 1248.
31. Tholen D., Zhu X.-G. 2011. The mechanistic basis of internal conductance: A theoretical analysis of mesophyll cell photosynthesis and CO₂ diffusion. *Plant Physiol.* **156**, 90–105.
32. Tomás M., Flexas J., Copolovici L., Galmés J., Hallik L., Medrano H., Ribas-Carbó M., Tosens T., Vislap V., Niinemets Ü. 2013. Importance of leaf anatomy in determining mesophyll diffusion conductance to CO₂ across species: Quantitative limitations and scaling up by models. *J Exp Bot.* **64**, 2269–2281.
33. Ho Q.T., Berghuijs H.N., Watté R., Verboven P., Herremans E., Yin X., Retta M.A., Aernouts B., Saeys W., Helfen L., Farquhar G.D., Struik P.C., Nicolaï B.M. 2016. Three-dimensional microscale modelling of CO₂ transport and light propagation in tomato leaves enlightens photosynthesis. *Plant Cell Environ.* **39**, 50–61.
34. Чиков В.И. 2008. Эволюция представлений о связи фотосинтеза с продуктивностью растений. *Физиология растений.* **55**, 140–154.
35. Nikinmaa E., Hölttä T., Hari P., Kolari P., Mäkelä A., Sevanto S., Vesala T. 2013. Assimilate transport in phloem sets conditions for leaf gas exchange. *Plant Cell Environ.* **36**, 655–669.
36. Schreiber U. 2004. Pulse-amplitude-modulation (PAM) fluorometry and saturation pulse method: an overview. In: *Chlorophyll a fluorescence: a signature of photosynthesis. Advances in photosynthesis and respiration.* Eds Papageorgiou G.C., Govindjee. Dordrecht: Springer, p. 279–319.
37. von Caemmerer S. Steady-state models of photosynthesis. 2013. *Plant Cell Environ.* **36**, 1617–1630.
38. Bennett D.I.G., Amarnath K., Park S., Steen C.J., Morris J.M., Fleming G.R. 2019. Models and mechanisms of the rapidly reversible regulation of photosynthetic light harvesting. *Open Biol.* **9**, 190043.
39. Serôdio J., Lavaud J. 2011. A model for describing the light response of the nonphotochemical quenching of chlorophyll fluorescence. *Photosynth. Res.* **108**, 61–76.
40. Holzwarth A.R., Lenk D., Jahns P. 2013. On the analysis of non-photochemical chlorophyll fluorescence quenching curves I. Theoretical considerations. *Biochim. Biophys. Acta.* **1827**, 786–792.
41. Laisk A., Eichelmann H., Oja V. 2009. Leaf C₃ Photosynthesis *in silico*: Integrated Carbon/Nitrogen Metabolism. In: *Photosynthesis in silico. Advances in Photosynthesis and Respiration.* Eds Laisk A., Nedbal L., Govindjee. Dordrecht: Springer, p. 295–322.
42. Zhu X.-G., Wang Y., Ort D.R., Long S.P. 2013. E-photosynthesis: a comprehensive dynamic mechanistic model of C₃ photosynthesis: From light capture to sucrose synthesis. *Plant Cell Environ.* **36**, 1711–1727.
43. Matuszyńska A., Saadat N.P., Ebenhöf O. 2019. Balancing energy supply during photosynthesis – a theoretical perspective. *Physiol Plant.* **166**, 392–402.
44. Hills A., Chen Z.-H., Amtmann A., Blatt M.R., Lew V.L. 2012. OnGuard, a computational platform for quantitative kinetic modeling of guard cell physiology. *Plant Physiol.* **159**, 1026–1042.
45. Farquhar G.D., von Caemmerer S., Berry J.A. 1980. A biochemical model of photosynthetic CO₂ assimilation in leaves of C₃ species. *Planta.* **149**, 78–90.
46. Lazár D. 2003. Chlorophyll a fluorescence rise induced by high light illumination of dark-adapted plant tissue studied by means of a model of photosystem II and considering photosystem II heterogeneity. *J. Theor. Biol.* **220**, 469–503.
47. Lazár D., Jablonský J. 2009. On the approaches applied in formulation of a kinetic model of photosystem II: Different approaches lead to different simulations of the chlorophyll a fluorescence transients. *J. Theor. Biol.* **257**, 260–269.
48. Rubin A., Riznichenko G. 2009. Modeling of the primary processes in a photosynthetic membrane. In: *Photosynthesis in silico. Advances in Photosynthesis and Respiration.* Eds Laisk A., Nedbal L., Govindjee. Dordrecht: Springer, p. 151–176.
49. Vershubskii A.V., Kuvykin I.V., Priklonskii V.I., Tikhonov A.N. 2011. Functional and topological aspects of pH-dependent regulation of electron and proton transport in chloroplasts *in silico*. *Biosystems.* **103**, 164–179.
50. Bouman B.A.M., van Keulen H., van Laar H.H., Rabbinge R. 1996. The ‘School of de Wit’ crop growth simulation models: A pedigree and historical overview. *Agric. Syst.* **52**, 171–198.
51. Brillì L., Bechini L., Bindi M., Carozzi M., Cavalli D., Conant R., Dorich C.D., Doro L., Ehrhardt F., Farina R., Ferrise R., Fitton N., Francaviglia R., Grace P., Iocola I., Klumpp K., Léonard J., Martin R., Massad R.S., Recous S., Seddaiu G., Sharp J., Smith P., Smith W.N., Soussana J.F., Bellocchi G. 2017. Review and analysis of strengths and weaknesses of agro-ecosystem models for simulating C and N fluxes. *Sci. Tot. Environ.* **598**, 445–470.
52. Zaks J., Amarnath K., Kramer D.M., Niyogi K.K., Fleming G.R. 2012. A kinetic model of rapidly reversible nonphotochemical quenching. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **109**, 15757–15762.
53. Sato R., Ohta H., Masuda S. 2014. Prediction of respective contribution of linear electron flow and PGR5-dependent cyclic electron flow to non-photochemical quenching induction. *Plant Physiol. Biochem.* **81**, 190–196.
54. Matuszyńska A., Heidari S., Jahns P., Ebenhöf O. 2016. A mathematical model of nonphotochemical quenching to study short-term light memory in plants. *Biochim. Biophys. Acta.* **1857**, 1860–1869.
55. Leuenberger M., Morris J.M., Chan A.M., Leonelli L., Niyogi K.K., Fleming G.R. 2017. Dissecting and modeling zeaxanthin- and lutein-dependent nonpho-

- tochemical quenching in *Arabidopsis thaliana*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **114**, E7009–E7017.
56. Sukhova E., Khlopkov A., Vodenev V., Sukhov V. 2020. Simulation of a nonphotochemical quenching in plant leaf under different light intensities. *Biochim. Biophys. Acta Bioenerg.* **1861**, Article 148138.
 57. Porcar-Castell A., Tyystjärvi E., Atherton J., van der Tol C., Flexas J., Pfündel E.E., Moreno J., Frankenberg C., Berry J.A. 2014. Linking chlorophyll a fluorescence to photosynthesis for remote sensing applications: mechanisms and challenges. *J. Exp. Bot.* **65**, 4065–4095.
 58. Oxborough K., Baker N.R. 1997. Resolving chlorophyll a fluorescence images of photosynthetic efficiency into photochemical and non-photochemical components – calculation of qP and F_v'/F_m' ; without measuring F_o' . *Photosynth. Res.* **54**, 135–142.
 59. van Grondelle R., Novoderezhkin V.I., Dekker J.P. 2009. Modeling light harvesting and primary charge separation in photosystem I and photosystem II. In: *Photosynthesis in silico. Advances in Photosynthesis and Respiration*. Eds Laisk A., Nedbal L., Govindjee. Dordrecht: Springer, p. 33–53.
 60. Freiberg A., Trinkunas G. 2009. Unraveling the hidden nature of antenna excitations. In: *Photosynthesis in silico. Advances in Photosynthesis and Respiration*. Eds Laisk A., Nedbal L., Govindjee. Dordrecht: Springer, p. 55–82.
 61. Yakovlev A.G., Shuvalov V.A. 2014. Modeling of reversible charge separation in reaction centers of photosynthesis: an incoherent approach. *J. Theor. Biol.* **343**, 92–101.
 62. Kitajima M., Butler W.L. 1975. Quenching of chlorophyll fluorescence and primary photochemistry in chloroplasts by dibromothymoquinone. *Biochim. Biophys. Acta Bioenerg.* **376**, 105–115.
 63. Butler W.L. 1978. Energy distribution in the photochemical apparatus of photosynthesis. *Ann. Rev. Plant Physiol.* **29**, 345–378.
 64. Булычев А.А., Ниязова М.М. 1989. Модель потенциалзависимых изменений флуоресценции хлорофилла фотосистемы II. *Биофизика*. **34**, 63–67.
 65. Bernhardt K., Trissl H.-W. 1999. Theories for kinetics and yields of fluorescence and photochemistry: How, if at all, can different models of antenna organization be distinguished experimentally? *Biochim. Biophys. Acta Bioenerg.* **1409**, 125–142.
 66. Bulychev A.A., Vredenberg W.J. 2001. Modulation of photosystem II chlorophyll fluorescence by electrogenic events generated by photosystem I. *Bioelectrochem.* **54**, 157–168.
 67. Vredenberg W.J. 2000. A three-state model for energy trapping and chlorophyll fluorescence in photosystem II incorporating radical pair recombination. *Biophys. J.* **79**, 26–38.
 68. Klughammer C., Schreiber U. 1994. An improved method, using saturating light pulses, for the determination of photosystem I quantum yield via $P700^{+}$ -absorbance changes at 830 nm. *Planta*. **192**, 261–268.
 69. Klughammer C., Schreiber U. 2008. Saturation Pulse method for assessment of energy conversion in PS I. *PAM Applic. Not.* **1**, 11–14.
 70. Zivcak M., Brestic M., Balatova Z., Drevenakova P., Olsovska K., Kalaji H.M., Yang X., Allakhverdiev S.I. 2013. Photosynthetic electron transport and specific photoprotective responses in wheat leaves under drought stress. *Photosynth. Res.* **117**, 529–546.
 71. Genty B., Briantais J.-M., Baker N.R. 1989. The relationship between the quantum yield of photosynthetic electron transport and quenching of chlorophyll fluorescence. *Biochim. Biophys. Acta Gen. Subj.* **990**, 87–92.
 72. Belyaeva N.E., Bulychev A.A., Rznichenko G.Y., Rubin A.B. 2019. Analyzing both the fast and the slow phases of chlorophyll a fluorescence and P700 absorbance changes in dark-adapted and preilluminated pea leaves using a thylakoid membrane model. *Photosynth. Res.* **140**, 1–19.
 73. Antal T.K., Kovalenko I.B., Rubin A.B., Tyystjärvi E. 2013. Photosynthesis-related quantities for education and modeling. *Photosynth. Res.* **117**, 1–30.
 74. Штирбет А., Ризниченко Г.Ю., Рубин А.Б., Говинджи. 2014. Моделирование кинетики флуоресценции хлорофилла *a*: связь с фотосинтезом. *Биохимия*. **79**, 379–412.
 75. Laisk A., Eichelmann H., Oja V. 2006. C_3 photosynthesis in silico. *Photosynth Res.* **90**, 45–66.
 76. Vershubskii A.V., Tikhonov A.N. 2013. Electron transport and transmembrane proton transfer in photosynthetic systems of oxygenic type in silico. *Biophys. J.* **58**, 60–71.
 77. Вершубский А.В., Приклонский В.И., Тихонов А.Н. 2007. Математическая модель электронного и протонного транспорта в фотосинтетических системах оксигенного типа. *Рос. хим. ж.* **LI**, 59–69.
 78. Ebenhöf O., Fucile G., Finazzi G., Rochaix J.-D., Goldschmidt-Clermont M. 2014. Short-term acclimation of the photosynthetic electron transfer chain to changing light: A mathematical model. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B Biol. Sci.* **369**, 20130223.
 79. Ebenhöf O., Houwaart T., Lokstein H., Schleder S., Tirok K. 2011. A minimal mathematical model of non-photochemical quenching of chlorophyll fluorescence. *Biosystems.* **103**, 196–204.
 80. Gorbunov M.Y., Kuzminov F.I., Fadeev V.V., Kim J.D., Falkowski P.G. 2011. A kinetic model of non-photochemical quenching in cyanobacteria. *Biochim. Biophys. Acta.* **1807**, 1591–1599.
 81. Belyaeva N.E., Bulychev A.A., Rznichenko G.Y., Rubin A.B. 2016. Thylakoid membrane model of the Chl a fluorescence transient and P700 induction kinetics in plant leaves. *Photosynth. Res.* **130**, 491–515.
 82. Vredenberg W. 2011. Kinetic analyses and mathematical modeling of primary photochemical and photochemical processes in plant photosystems. *Biosystems.* **103**, 138–151.
 83. Nedbal L., Cervený J., Rascher U., Schmidt H. 2007. E-photosynthesis: a comprehensive modeling approach to understand chlorophyll fluorescence transients and

- other complex dynamic features of photosynthesis in fluctuating light. *Photosynth Res.* **93**, 223–234.
84. Porcar-Castell A., Bäck J., Juurola E., Hari P. 2006. Dynamics of the energy flow through photosystem II under changing light conditions: A model approach. *Func. Plant Biol.* **33**, 229–239.
 85. Riznichenko G., Lebedeva G., Demin O., Rubin A. 1999. Kinetic mechanisms of biological regulation in photosynthetic organisms. *J. Biol. Phys.* **25**, 177–192.
 86. Лебедева Г.В., Беляева Н.Е., Дёмин О.В., Ризниченко Г.Ю., Рубин А.Б. 2002. Кинетическая модель первичных процессов фотосинтеза в хлоропластах. Описание быстрой фазы индукции флуоресценции хлорофилла при различной интенсивности света. *Биофизика.* **47**, 1044–1058.
 87. Morales A., Yin X., Harbinson J., Driever S.M., Molenaar J., Kramer D.M., Struik P.C. 2018. *In silico* analysis of the regulation of the photosynthetic electron transport chain in C₃ plants. *Plant Physiol.* **176**, 1247–1261.
 88. Xin C.-P., Yang J., Zhu X.-G. 2013. A model of chlorophyll a fluorescence induction kinetics with explicit description of structural constraints of individual photosystem II units. *Photosynth. Res.* **117**, 339–354.
 89. Laisk A., Oja V., Rasulov B., Eichelmann H., Sumberg A. 1997. Quantum yields and rate constants of photochemical and nonphotochemical excitation quenching (experiment and model). *Plant Physiol.* **115**, 803–815.
 90. Vredenberg W.J., Bulychev A.A. 2010. Photoelectrochemical control of the balance between cyclic- and linear electron transport in photosystem I. Algorithm for P700⁺ induction kinetics. *Biochim. Biophys. Acta.* **1797**, 1521–1532.
 91. Zhu X.-G., Govindjee, Baker N.R., deSturler E., Ort D.O., Long S.P. 2005. Chlorophyll a fluorescence induction kinetics in leaves predicted from a model describing each discrete step of excitation energy and electron transfer associated with photosystem II. *Planta.* **223**, 114–133.
 92. Ullmann G.M., Knapp E.-W., Kostic N.M. 1997. Computational simulation and analysis of dynamic association between plastocyanin and cytochrome f. Consequences for the electron-transfer reaction. *J. Am. Chem. Soc.* **119**, 42–52.
 93. Pearson D.C., Gross E.L. 1998. Brownian dynamics study of the interaction between plastocyanin and cytochrome f. *Biophys. J.* **75**, 2698–2711.
 94. De Rienzo F., Gabdoulline R.R., Menziani M.C., De Benedetti P.G., Wade R.C. 2001. Electrostatic analysis and Brownian dynamics simulation of the association of plastocyanin and cytochrome f. *Biophys. J.* **81**, 3090–3104.
 95. Ризниченко Г.Ю., Беляева Н.Е., Коваленко И.Б., Рубин А.Б. 2009. Математическое и компьютерное моделирование первичных процессов фотосинтеза. *Биофизика.* **54**, 16–33.
 96. Kovalenko I.B., Diakonova A.N., Abaturova A.M., Riznichenko G.Y., Rubin A.B. 2010. Direct computer simulation of ferredoxin and FNR complex formation in solution. *Phys. Biol.* **7**, 026001.
 97. Kovalenko I.B., Abaturova A.M., Diakonova A.N., Knyazeva O.S., Ustinin D.M., Khruschev S.S., Riznichenko G.Yu., Rubin A.B. 2011. Computer simulation of protein-protein association in photosynthesis. *Math. Model. Nat. Phenom.* **6**, 39–54.
 98. Гольцев В.Н., Каладжи Х.М., Паунов М., Баба В., Хорачек Т., Мойски Я., Коцел Х., Аллахвердиев С.И. 2016. Использование переменной флуоресценции хлорофилла для оценки физиологического состояния фотосинтетического аппарата растений. *Физиология растений.* **63**, 881–907.
 99. Arnold A., Nikoloski Z. 2011. A quantitative comparison of Calvin–Benson cycle models. *Trends Plant Sci.* **16**, 676–683.
 100. Pettersson G., Ryde-Pettersson U. 1988. A mathematical model of the Calvin photosynthesis cycle. *Eur. J. Biochem.* **175**, 661–683.
 101. Poolman M., Fell D.A., Thomas S. 2000. Modelling photosynthesis and its control. *J. Exp. Bot.* **51**, 319–328.
 102. Laisk A., Eichelmann H., Oja V., Eatherall A., Walker D.A. 1989. A mathematical model of carbon metabolism in photosynthesis: Difficulties in explaining oscillations by fructose 2,6-bisphosphate regulation. *Proc. R. Soc. Lond. B: Biol. Sci.* **237**, 389–415.
 103. Zhu, X.-G., de Sturler E., Long S.P. 2007. Optimizing the distribution of resources between enzymes of carbon metabolism can dramatically increase photosynthetic rate: a numerical simulation using an evolutionary algorithm. *Plant Physiol.* **145**, 513–526.
 104. Aalto T., Juurola E. 2002. A three-dimensional model of CO₂ transport in airspaces and mesophyll cells of a silver birch leaf. *Plant Cell Environ.* **25**, 1399–1409.
 105. Berghuijs H.N., Yin X., Ho Q.T., Driever S.M., Retta M.A., Nicolai B.M., Struik P.C. 2016. Mesophyll conductance and reaction-diffusion models for CO₂ transport in C₃ leaves; needs, opportunities and challenges. *Plant Sci.* **252**, 62–75.
 106. von Caemmerer S., Farquhar G., Berry J. 2009. Biochemical model of C₃ photosynthesis. In: *Photosynthesis in silico. Advances in Photosynthesis and Respiration.* Eds Laisk A., Nedbal L., Govindjee. Dordrecht: Springer, p. 209–230.
 107. Yin X., Harbinson J., Struik P.C. 2009. A model of the generalized stoichiometry of electron transport limited C₃ photosynthesis: development and applications. In: *Photosynthesis in silico. Advances in Photosynthesis and Respiration.* Eds Laisk A., Nedbal L., Govindjee. Dordrecht: Springer, p. 247–273.
 108. Bernacchi C.J., Rosenthal D.M., Pimentel C., Long S.P., Farquhar G.D. 2009. Modeling the temperature dependence of C₃ photosynthesis. In: *Photosynthesis in silico. Advances in Photosynthesis and Respiration.* Eds Laisk A., Nedbal L., Govindjee. Dordrecht: Springer, p.231–246.
 109. Laisk A., Edwards G.E. 2000. A mathematical model of C₄ photosynthesis: The mechanism of concentrat-

- ing CO₂ in NADP-malic enzyme type species. *Photosynth. Res.* **66**, 199–224.
110. Badretdinov D.Z., Baranova E.A., Kukushkin A.K. 2004. Study of temperature influence on electron transport in higher plants via delayed luminescence method: Experiment, theory. *Bioelectrochemistry.* **63**, 67–71.
111. Laisk A., Edwards G. 2009. Leaf C₄ Photosynthesis *in silico*: The CO₂ concentrating mechanism. In: *Photosynthesis in silico. Advances in Photosynthesis and Respiration.* Eds Laisk A., Nedbal L., Govindjee. Dordrecht: Springer, p. 323–348.
112. Poolman M., Aßmus H., Fell D.A. 2004. Application of metabolic modelling to plant metabolism. *J. Exp. Bot.* **55**, 1177–1186.
113. Baghalian K., Hajirezaei M.R., Schreiber F. 2014. Plant metabolic modeling: Achieving new insight into metabolism and metabolic engineering. *Plant Cell.* **26**, 3847–3866.
114. Ustin S. L., Jacquemoud S., Govaerts Y. 2001. Simulation of photon transport in a three-dimensional leaf: implications for photosynthesis. *Plant Cell Environ.* **24**, 1095–1103.
115. Evans J.R., Kaldenhoff R., Genty B., Terashima I. 2009. Resistances along the CO₂ diffusion pathway inside leaves. *J. Exp. Bot.* **60**, 2235–2248.
116. Xiao Y., Tholen D., Zhu X.-G. 2016. The influence of leaf anatomy on the internal light environment and photosynthetic electron transport rate: exploration with a new leaf ray tracing model. *J. Exp. Bot.* **67**, 6021–6035.
117. Buckley T.N., Farquhar G.D. 2004. A new analytical model for whole-leaf potential electron transport rate. *Plant Cell Environ.* **27**, 1487–1502.
118. Ho Q.T., Verboven P., Yin X., Struik P.C., Nicolai B.M. 2012. A microscale model for combined CO₂ diffusion and photosynthesis in leaves. *PLoS One.* **7**, e48376.
119. Сухова Е.М., Сухов В.С. 2018. Зависимость поступления CO₂ в растительную клетку от активности H⁺-АТФ-азы плазматической мембраны. Теоретический анализ. *Биол. мембраны.* **35**, 52–65.
120. Flexas J., Niinemets Ü., Gallé A., Barbour M.M., Centritto M., Diaz-Espejo A., Douthe C., Galmés J., Ribas-Carbo M., Rodriguez P.L., Rosselló F., Soolanayakanahally R., Tomas M., Wright I.J., Farquhar G.D., Medrano H. 2013. Diffusional conductances to CO₂ as a target for increasing photosynthesis and photosynthetic water-use efficiency. *Photosynth. Res.* **117**, 45–59.
121. Jacoby R.P., Taylor N.L., Millar A.H. 2011. The role of mitochondrial respiration in salinity tolerance. *Trends Plant Sci.* **16**, 614–623.
122. Cannell M.G.R., Thornley J.H.M. 2000. Modelling the components of plant respiration: Some guiding principles. *Ann. Bot.* **85**, 45–54.
123. Thornley J.H.M., Cannell M.G.R. 2000. Modelling the components of plant respiration: Representation and realism. *Ann. Bot.* **85**, 55–67.
124. Buckley T.N., Adams M.A. 2011. An analytical model of non-photorespiratory CO₂ release in the light and dark in leaves of C₃ species based on stoichiometric flux balance. *Plant Cell Environ.* **34**, 89–112.
125. Buckley T.N. 2017. Modeling stomatal conductance. *Plant Physiol.* **174**, 572–582.
126. Kim S.-H., Lieth J.H. 2003. A coupled model of photosynthesis, stomatal conductance and transpiration for a rose leaf (*Rosa hybrida* L.). *Ann. Bot.* **91**, 771–781.
127. Ball J.T., Woodrow I.E., Berry J.A. 1987. A model predicting stomatal conductance and its contribution to the control of photosynthesis under different environmental conditions. In: *Progress in Photosynthesis Research.* Eds Biggins J. Dordrecht: Springer, p. 221–224.
128. Buckley T.N., Mott K.A., Farquhar G.D. 2003. A hydromechanical and biochemical model of stomatal conductance. *Plant Cell Environ.* **26**, 1767–1785.
129. Bellasio C., Quirk J., Buckley T.N., Beerling D.J. 2017. A dynamic hydro-mechanical and biochemical model of stomatal conductance for C₄ photosynthesis. *Plant Physiol.* **175**, 104–119.
130. Chen Z.-H., Hills A., Bätz U., Amtmann A., Lew V.L., Blatt M.R. 2012. Systems dynamic modeling of the stomatal guard cell predicts emergent behaviors in transport, signaling, and volume control. *Plant Physiol.* **159**, 1235–1251.
131. Wang Y., Papanatsiou M., Eisenach C., Karnik R., Williams M., Hills A., Lew V.L., Blatt M.R. 2012. Systems dynamic modeling of a guard cell Cl⁻ channel mutant uncovers an emergent homeostatic network regulating stomatal transpiration. *Plant Physiol.* **160**, 1956–1967.
132. Wang Y., Hills A., Blatt M.R. 2014. Systems analysis of guard cell membrane transport for enhanced stomatal dynamics and water use efficiency. *Plant Physiol.* **164**, 1593–1599.
133. Minguet-Parramona C., Wang Y., Hills A., Violet-Chabrand S., Griffiths H., Rogers S., Lawson T., Lew V.L., Blatt M.R. 2016. An optimal frequency in Ca²⁺ oscillations for stomatal closure is an emergent property of ion transport in guard cells. *Plant Physiol.* **170**, 33–42.
134. Шерстнева О.Н., Воденев В.А., Сурова Л.М., Новикова Е.М., Сухов В.С. 2016. Использование математической модели переменного потенциала для анализа его влияния на фотосинтез высших растений. *Биол. мембраны.* **33**, 293–302.
135. Krupenina N.A., Bulychev A.A. 2007. Action potential in a plant cell lowers the light requirement for non-photochemical energy-dependent quenching of chlorophyll fluorescence. *Biochim. Biophys. Acta.* **1767**, 781–788.
136. Komarova A.V., Sukhov V.S., Bulychev A.A. 2018. Cyclosis-mediated long distance communications of chloroplasts in giant cells of *Characeae*. *Funct. Plant Biol.* **45**, 236–246.
137. Yin X., van Laar H.H. 2005. *Crop systems dynamics: An ecophysiological simulation model for genotype-by-*

- environment interactions*. Wageningen: Wageningen Academic Publishers, 155 p.
138. Wu A., Song Y., van Oosterom E.J., Hammer G.L. 2016. Connecting biochemical photosynthesis models with crop models to support crop improvement. *Front. Plant Sci.* **7**, 1518.
 139. Yin X., Struik P.C. 2017. Can increased leaf photosynthesis be converted into higher crop mass production? A simulation study for rice using the crop model GECROS. *J. Exp. Bot.* **68**, 2345–2360.
 140. Gu S., Zhang L., Yan Z., van der Werf W., Evers J.B. 2018. Quantifying within-plant spatial heterogeneity in carbohydrate availability in cotton using a local-pool model. *Ann. Bot.* **121**, 1005–1017.
 141. Niinemets Ü., Anten N.P.R. 2009. Packing the photosynthetic machinery: From leaf to canopy. In: *Photosynthesis in silico Advances in Photosynthesis and Respiration*. Eds Laisk A., Nedbal L., Govindjee. Dordrecht: Springer, p. 363–399.
 142. Zhu X.G., Long S.P. 2009. Can increase in Rubisco specificity increase carbon gain by whole canopy? A modeling analysis. In: *Photosynthesis in silico. Advances in Photosynthesis and Respiration*. Eds Laisk A., Nedbal L., Govindjee. Dordrecht: Springer, p. 401–416.
 143. Küppers M., Pfiz M. 2009. Role of photosynthetic induction for daily and annual carbon gains of leaves and plant canopies. In: *Photosynthesis in silico. Advances in Photosynthesis and Respiration*. Eds Laisk A., Nedbal L., Govindjee. Dordrecht: Springer, p. 417–440.
 144. Evers J.B., Vos J., Yin X., Romero P., van der Putten P.E., Struik P.C. 2010. Simulation of wheat growth and development based on organ-level photosynthesis and assimilate allocation. *J. Exp. Bot.* **61**, 2203–2216.
 145. Chen T.-W., Henke M., de Visser P.H.B., Buck-Sorlin G., Wiechers D., Kahlen K., Stützel H. 2014. What is the most prominent factor limiting photosynthesis in different layers of a greenhouse cucumber canopy? *Ann. Bot.* **114**, 677–688.
 146. Hikosaka K., Kumagai T., Ito A. 2016. Modeling canopy photosynthesis. In: *Canopy photosynthesis: from basics to applications. Advances in photosynthesis and respiration (including bioenergy and related processes)*. Eds Hikosaka K., Niinemets Ü., Anten N. Dordrecht: Springer, p. 239–268.
 147. Song Q., Wang Y., Qu M., Ort D.R., Zhu X.-G. 2017. The impact of modifying photosystem antenna size on canopy photosynthetic efficiency-Development of a new canopy photosynthesis model scaling from metabolism to canopy level processes. *Plant Cell Environ.* **40**, 2946–2957.
 148. Walker B.J., Drewry D.T., Slattery R.A., VanLoocke A., Cho Y.B., Ort D.R. 2018. Chlorophyll can be reduced in crop canopies with little penalty to photosynthesis. *Plant Physiol.* **176**, 1215–1232.
 149. Wu A., Doherty A., Farquhar G.D., Hammer G.L. 2018. Simulating daily field crop canopy photosynthesis: an integrated software package. *Funct. Plant Biol.* **45**, 362–377.
 150. Song Q., Zhang G., Zhu X.-G. 2013. Optimal crop canopy architecture to maximise canopy photosynthetic CO₂ uptake under elevated CO₂ – a theoretical study using a mechanistic model of canopy photosynthesis. *Funct. Plant Biol.* **40**, 109–124.
 151. Townsend A.J., Retkute R., Chinnathambi K., Randall J.W.P., Foulkes J., Carmo-Silva E., Murchie E.H. 2018. Suboptimal acclimation of photosynthesis to light in wheat canopies. *Plant Physiol.* **176**, 1233–1246.
 152. Pietsch S.A., Hasenauer H. 2009. Photosynthesis within large-scale ecosystem models. In: *Photosynthesis in silico. Advances in Photosynthesis and Respiration*. Eds Laisk A., Nedbal L., Govindjee. Dordrecht: Springer, p. 441–464.
 153. Friend A.D., Geider R.J., Behrenfeld M.J., Still C.J. 2009. Photosynthesis in global-scale models. In: *Photosynthesis in silico. Advances in Photosynthesis and Respiration*. Eds Laisk A., Nedbal L., Govindjee. Dordrecht: Springer, p. 465–497.
 154. Buck-Sorlin G., de Visser P.H.B., Henke M., Sarlikioti V., van der Heijden G.W., Marcelis L.F., Vos J. 2011. Towards a functional–structural plant model of cut-rose: simulation of light environment, light absorption, photosynthesis and interference with the plant structure. *Ann. Bot.* **108**, 1121–1134.
 155. Knauer J., Zaehle S., Kauwe M.G.D., Bahar N.H.A., Evans J.R., Medlyn B.E., Reichstein M., Werner C. 2019. Effects of mesophyll conductance on vegetation responses to elevated CO₂ concentrations in a land surface model. *Glob. Chang. Biol.* **25**, 1820–1838.
 156. Zhu X.-G., Lynch J.P., LeBauer D.S., Millar A.J., Stitt M., Long S.P. 2016. Plants in silico: Why, why now and what? an integrative platform for plant systems biology research. *Plant Cell Environ.* **39**, 1049–1057.

Simulation of Photosynthesis and Analysis of Plant Productivity

E. M. Sukhova¹, V. A. Vodeneev¹, V. S. Sukhov^{1, *}

¹Lobachevsky State University of Nizhny Novgorod, Nizhny Novgorod, 603950 Russia

*e-mail: vssuh@mail.ru

Photosynthesis is a basis of plant productivity; this makes it extremely important to develop methods for its assessment and forecasting under various environmental conditions. At the same time, the complexity of photosynthetic processes and the presence of numerous feedbacks require the development of mathematical

modeling and other complex approaches to its analysis. This review describes mathematical models of photosynthetic processes at different levels (from processes in thylakoid membranes to the whole plant and ecosystem) and analyzes potential ways of their application for studies of the plant productivity. First, models describing the activity of photosynthetic reaction centers are firstly considered. These models are widely used for analysis of experimental data for estimation of physiological state and productivity of plants. The next group of models focuses on describing the photochemical processes at light reactions of photosynthesis. These models can be used for analysis of experimental data as well as for prediction of damage of photosynthetic machinery under conditions of rapid changes in environmental conditions (e.g., fluctuations in light intensity). The models, which consider photosynthetic dark reactions, are based on either descriptions of processes that limit CO₂ assimilation or description of reactions of the Calvin–Benson cycle. Models of this group can be used for simple description of the plant productivity. More complex photosynthetic models can also consider distribution of light intensity and CO₂ fluxes in leaves, as well as interactions of photosynthesis with other physiological processes. These models can be used for prediction of the plant productivity under different environmental conditions or at artificial modifications of the photosynthetic machinery. The review also analyzes “supraorganism” photosynthetic models, which are based on simple descriptions of photosynthetic processes and can be used to analyze productivity at the level of vegetative cover and natural or artificial ecosystems. In general, numerous mathematical models of photosynthesis at various levels are aimed at solving a wide range of basic and practical problems. In particular, they can potentially be used to assess disturbances in crop productivity under unstable growing conditions or to optimize productivity under stable protected ground conditions. A promising direction of photosynthetic modeling is the development of simulation medium integrating individual models of various levels for solution of specific tasks.

Keywords: photosynthesis, simulation, photosynthetic light reactions, photosynthetic dark reactions, plant productivity

УДК 577.352.27

ВЕЗИКУЛЯРНЫЕ СИСТЕМЫ ДОСТАВКИ БИОЛОГИЧЕСКИ АКТИВНЫХ СОЕДИНЕНИЙ: ОТ ЛИПОСОМ К КЕРАСОМАМ

© 2021 г. З. Г. Дениева^а, *, У. А. Буданова^а, Ю. Л. Себякин^а

^аМИРЭА – Российский технологический университет, Институт тонких химических технологий им. М.В. Ломоносова, Москва, 119571 Россия

*e-mail: zaret03@mail.ru

Поступила в редакцию 16.05.2020 г.

После доработки 03.06.2020 г.

Принята к публикации 04.06.2020 г.

Современная фармацевтика ставит перед собой задачу создания новых лекарственных препаратов, которые будут обладать хорошей биодоступностью и биосовместимостью, высокой эффективностью и незначительным проявлением токсических эффектов. Решением такой задачи является получение наноразмерных частиц, содержащих небольшие эффективные дозы лекарственного вещества. Разнообразие подобных систем доставки позволяет создавать терапевтические комплексы с требуемыми характеристиками. Липосомы – липидные везикулы с двухслойной структурой мембраны – имеют необходимые свойства для транспортировки различных лекарственных соединений и генетического материала. Они интересны тем, что состоят из природных компонентов, которые могут минимизировать токсичность по отношению к клеткам организма. Кроме того, искусственные катионные липиды дают возможность корректировать свойства транспортной системы под определенные задачи. Для преодоления низкой стабильности – серьезного недостатка липосом, были разработаны кремнийорганические частицы – керасомы. Это наноразмерные агрегаты сферической формы, состоящие, как и липосомы, из липидного бислоя, но их поверхность модифицирована кремниевой полимерной сетью. При этом они обладают всеми достоинствами липосом. В обзоре представлены основные методы синтеза компонентов липосом и керасомообразующих липидов для создания стабильных транспортных систем. Приведены варианты структур катионных липидов и модификаций керасомообразующих липидов, а также области их применения, главным образом, трансфекция генетического материала, фотодинамическая терапия, визуализация и диагностика заболеваний при помощи магнитно-резонансной томографии, а также лечение опухолей.

Ключевые слова: липосомы, катионные липосомы, керасомы, средства доставки лекарственных препаратов

DOI: 10.31857/S0233475520060043

ВВЕДЕНИЕ

Генная терапия является многообещающим подходом для лечения наследственных патологий, а также негенетических болезней, например, рак, сердечно-сосудистые и аутоиммунные заболевания, путем коррекции генетических дефектов или избыточной экспрессии терапевтически значимых белков [1]. Предпосылки для успешной терапии включают не только использование подходящих генов, но и безопасную и эффективную их доставку в клетки-мишени. Однако большинство лекарственных препаратов не имеют селективного действия, тем самым они губительны для здоровых клеток человека. Чтобы решить эти проблемы, разработаны системы доставки в организм терапевтических средств с использованием нанотехнологий [2]. Они позволяют не только увеличить биодоступность и активность препарата, но и дают возможность контролируемо высво-

бождать переносимое средство для пролонгированного действия.

Различают две основные группы генных векторов: вирусные и невирусные. Из-за серьезных побочных эффектов, вызываемых вирусными векторами, таких как иммуногенность, мутагенез и канцерогенез, невирусные векторы стали привлекать все больше внимания [3].

К невирусным векторам относятся липосомы, дендримеры, магнитные и металлические наночастицы, нанокристаллы плохо растворимых лекарств, полимерные частицы, квантовые точки и др. Различные химические модификации, например, с использованием антител или углеводов, обеспечивают адресную доставку невирусных векторов к клеткам-мишеням.

Липосомы интересны благодаря структуре их мембран, аналогичной клеточной мембране, и

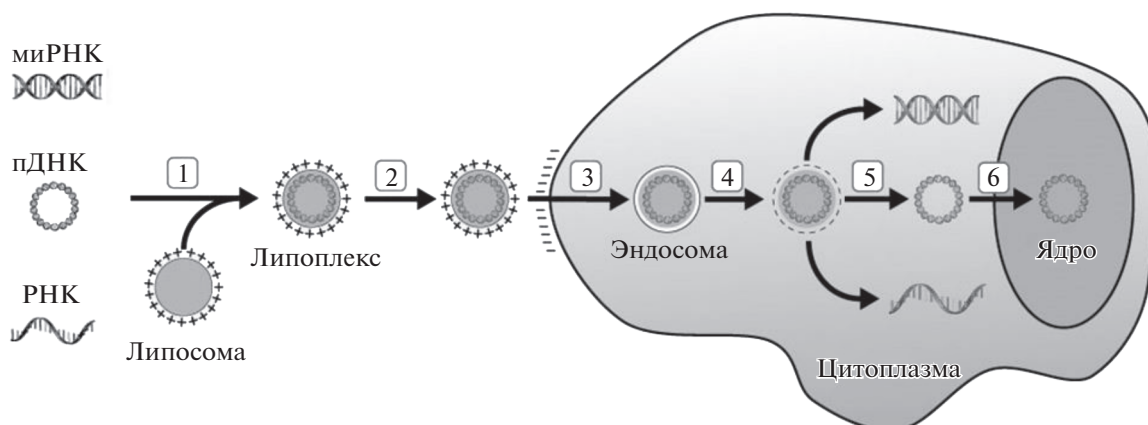


Рис. 1. Трансфекция эукариотических клеток (по [3]). 1 – Получают положительно заряженный комплекс трансфекции путем объединения липосомы с нуклеиновой кислотой. 2 – Комплексы добавляют к клеткам, они связываются с отрицательно заряженной клеточной мембраной посредством электростатических взаимодействий. 3 – Клетки поглощают комплексы посредством эндоцитоза в мембранные везикулы – эндосомы. 4 – Реагент для трансфекции дестабилизирует эндосомальную мембрану. 5 – Комплексы выходят из эндосом и высвобождают нуклеиновую кислоту в цитоплазму. 6 – ДНК локализуется в ядре, где происходит дальнейшая экспрессия генов.

способности образовывать комплексы с молекулами нуклеиновых кислот. Липиды, формирующие бислойную мембрану липосом, обеспечивают инкапсулирование молекул ДНК или РНК, а также лекарственных препаратов различной природы, их внутриклеточную доставку и выход из эндосом.

На сегодняшний день препарат Onpattro является единственным одобренным для клинических испытаний средством доставки генетического материала. Он представляет собой липидный комплекс с миРНК для лечения редкого наследственного заболевания – амилоидной полинейропатии [4].

ЛИПОСОМАЛЬНЫЕ СИСТЕМЫ ДОСТАВКИ НУКЛЕИНОВЫХ КИСЛОТ

Трансфекция относится к невирусным методам доставки ДНК в клетки и включает физические и химические методы [5]. Физические методы основаны на непосредственном физическом проникновении генетической конструкции через клеточную мембрану. Это эффективно и может использоваться на любых типах клеток. При этом иногда нарушается целостность клеточной мембраны, что приводит к гибели клетки. Химическая доставка генов – это процесс, который основан на химических реакциях или электростатических взаимодействиях между компонентами транспортной системы и нуклеиновой кислотой. В результате взаимодействия с мембраной транспортная система вместе с переносимым материалом может поглощаться клеткой посредством эндоцитоза или слияния мембран. Стратегии доставки терапевтических молекул химическим путем высокопроизводительны и часто просты в

исполнении. Наиболее широко распространена трансфекция с помощью липосом.

Липофекция, также известная как “трансфекция липидами” или “трансфекция на основе липосом”, использует липидный комплекс для доставки ДНК к клеткам (рис. 1).

Липосомы представляют собой сферические везикулы, состоящие из одного или нескольких липидных слоев, разделенных водной фазой [6]. Размер липосом, наиболее часто используемых для создания систем доставки, составляет от 50 до 450 нм в диаметре. Они формируются при смешивании липидов с водой, что объясняется амфифильной природой этих молекул и приводит к самопроизвольному образованию замкнутых бислойных структур. Липосомы характеризуются способностью к биodeградации, обладают низкой иммуногенностью, их мембрана может взаимодействовать с клеточной мембраной, способствуя внутриклеточной доставке содержимого везикул [7].

Процесс приготовления липосом отличается простотой исполнения (рис. 2). Наиболее широко распространенным методом является гидратирование тонкой липидной пленки с последующей обработкой ультразвуком для получения моноламельлярных везикул заданного размера [8].

Благодаря электростатическому взаимодействию между положительно заряженной группой в липиде и отрицательно заряженными фосфатными группами ДНК образуются комплексы липидов с нуклеиновой кислотой (липоплексы), которые могут быть использованы для трансфекции. Клетки поглощают липоплексы посредством образования в процессе эндоцитоза мембранных везикул – эндосом. Реагент для трансфекции дестабилизирует эндосомальную мембрану, ком-

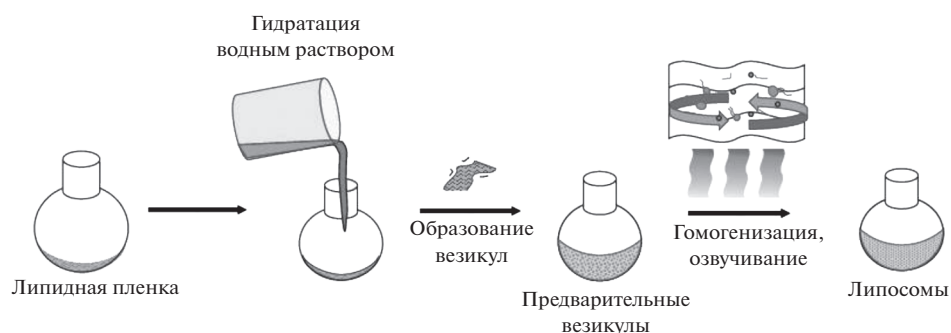


Рис. 2. Процесс приготовления липосомальных везикул (по [8]).

плексы покидают эндосомы и высвобождают РНК в цитоплазму, а ДНК локализуется в ядре, где происходит дальнейшая экспрессия генов [9].

Преимущество липофекции заключается в том, что она работает во многих типах клеток, включая культивируемые нейроны. Коммерчески доступные наборы позволяют проводить реакции трансфекции в течение 30 мин и анализировать экспрессию генов уже через нескольких часов. Однако применение липофекции часто ограничивается экспериментами в условиях *in vitro* [10].

Липосомы состоят из различных типов липидов. В основном это фосфолипиды, например фосфатидилхолин, фосфатидилэтаноламин, фосфатидилсерин, фосфатидилглицерин и фосфатидилинозитол, с насыщенными или ненасыщенными жирными цепями. Кроме того, используют сфинголипиды, например, сфингомиелин, который может дополнительно стабилизировать бислоем в присутствии молекул холестерина. Однако составы на основе природных липидов обладают значительной токсичностью для клеток [11].

В процессе поиска менее токсичных методов доставки генетического материала появились новые химические подходы, позволяющие смягчить нежелательные цитотоксические эффекты и увеличить успех транспорта нуклеиновых кислот [12]. Эти подходы используют варьирование структуры липидов, создание катионных липидов, а также керасомообразующих липидов [13, 14].

Катионные липосомы имеют ряд преимуществ. Такие частицы обладают небольшим положительным поверхностным зарядом (дзета-потенциалом), а варьирование отношения величины положительного заряда к отрицательному может влиять на эффективность конденсации липосомы и нуклеиновой кислоты, таким образом обеспечивая ее защиту от ферментативного расщепления и деградации. Положительный дзета-потенциал может направлять комплекс к отрицательно заряженной клеточной мембране, что приводит к эффективному поглощению комплекса [15]. Форма и размеры агрегатов значительно варьируются: это могут быть небольшие

однослойные везикулы размером 20–200 нм, более крупные везикулы размером от 200 нм до 1 мкм, а также гигантские однослойные везикулы размером более 1 мкм [16]. Последние также могут существовать в виде многослойных везикул, состоящих из множества липидных бислоев. На размер везикул влияют физико-химические и термодинамические свойства липидов, используемых в системе.

СТРУКТУРА КАТИОННЫХ ЛИПИДОВ

Катионные липиды (КЛ), как и природные фосфолипиды, являются амфифильными по своей природе структурами и содержат неполярную (гидрофобную) область и полярную (гидрофильную) “головку”. Кроме того, в них присутствуют соединительные звенья внутри гидрофобного/гидрофильного фрагментов – линкер [17–19] и между гидрофильными и гидрофобными доменами – спейсер [20, 21]. Положительно заряженная полярная “головка” липида взаимодействует с отрицательно заряженными биомолекулами и клеточными мембранами. Гидрофобные “хвосты” влияют на текучесть мембран, состояние сборки и стабильность агрегатов, а также профиль высвобождения захваченных молекул из липосомы [22].

Гидрофобные (неполярные) фрагменты амфифилов играют ключевую роль в образовании двухслойных везикул. Структурные вариации гидрофобного домена (схема 1), такие как число цепей, их длина, специфичность химических связей (степень ненасыщенности), ориентация углеводородных цепей [23], а также асимметрия и тип (стероиды и их производные) гидрофобного домена могут влиять на эффективность трансфекции генетического материала в клетки.

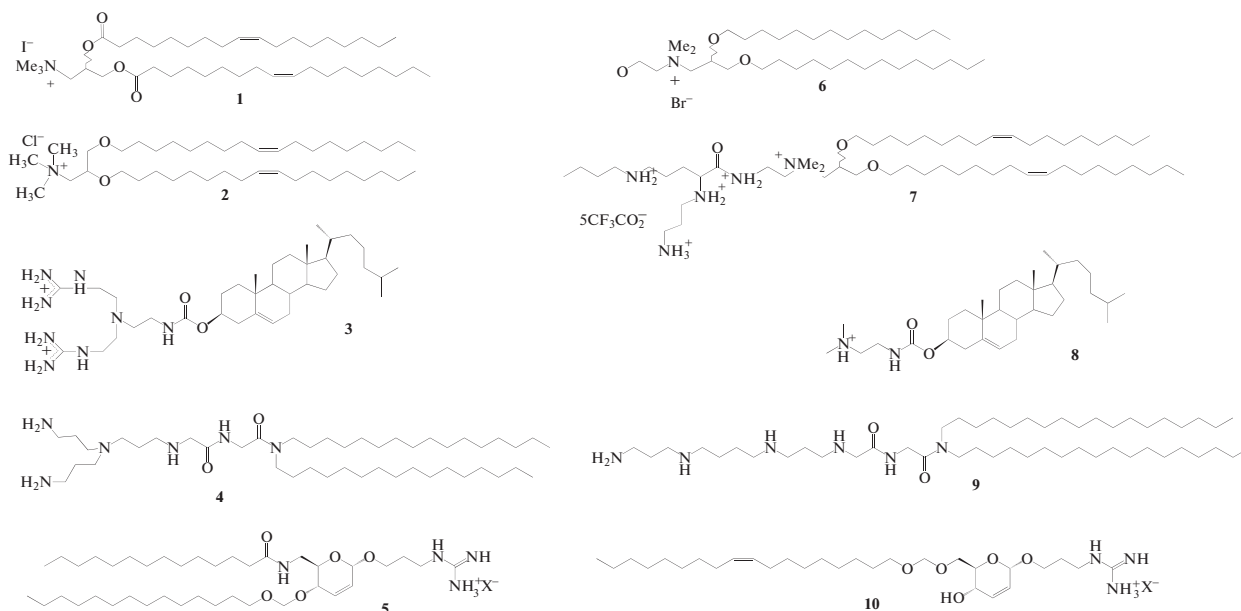


Схема 1

Для доставки плазмидной ДНК имеет важное значение наличие двух углеводородных радикалов в структуре гидрофобного блока липида. При использовании липидов, имеющих одну или три алифатические цепочки [24], эффективность трансфекции ниже, чем при наличии у липидов двух углеводородных радикалов [25, 26]. Причинами низкой эффективности трансфекции липоплексов на основе липидов с одной или тремя гидрофобными “хвостами” является склонность таких липидов к образованию мицеллярных агрегатов в водной среде, которые обладают более высокой токсичностью по сравнению с липосомальными везикулами.

Известно, что при наличии ненасыщенной связи в гидрофобном блоке эффективность трансфекции возрастает [27]. Присутствие такой связи в углеводородной цепи липида обеспечивает большую площадь поперечного сечения алифатического фрагмента, повышенную текучесть двухслойной мембраны и, следовательно, стимулирует слияние катионных липосом с клеточными мембранами и облегчает проникновение через них, что повышает эффективность трансфекции [28]. Напротив, насыщенные алкильные цепи увеличивают жесткость липидного бислоя [29, 30]. Замена двойной связи на тройную связь в алкильных цепях оказывает влияние как на структурные, так и на функциональные свойства липосом и липоплексов. Изменение положения тройной связи по направлению к концу алкильных цепей повышает стабильность липоплексов при физиологических температурах [31]. Кроме того, алкильные цепи с тройными связями обеспечивают более жесткие бислои в липосомах.

Наиболее высокая эффективность трансфекции наблюдается для липидов с более короткими алкильными цепями и обусловлена сниженной жесткостью и повышенной текучестью мембранного бислоя, что приводит к низкой температуре фазового перехода по сравнению с их более длинными аналогами. Степень эффективности трансфекции плазмидной ДНК в клетки в зависимости от длины углеводородных цепей в гидрофобном блоке липидов изменяется в ряду ди-С14:0 > ди-С18:1 > ди-С16:0 > ди-С18:0 [32, 33]. Катионные липосомы с 12 атомами углерода в алкильных цепях липидов также являются высокоэффективными в доставке плазмидной ДНК *in vitro*, однако они крайне нестабильны, и для формирования липоплексов требуется большое количество липидов.

В экспериментах *in vitro* эффективность трансфекции асимметричных липидов обычно превосходит значения их симметричных аналогов, поскольку скорость образования комплексов плазмиды и липидов с асимметрией в гидрофобном блоке выше [34, 35].

Введение в гидрофобный домен стероидных фрагментов позволяет не только повысить эффективность трансфекции, но и снизить общую цитотоксичность молекулы [36].

Линкер в катионных липидах выступает в качестве каркаса, связывающего гидрофобные фрагменты или гидрофильные “головки”. Наиболее широко используют простую или сложную эфирные связи, карбаматы, амиды, глицерин или аминокислоты (рис. 3).

Включение химических связей, подверженных внутриклеточному ферментативному расщеплению (сложноэфирная, амидная) в молекулярную

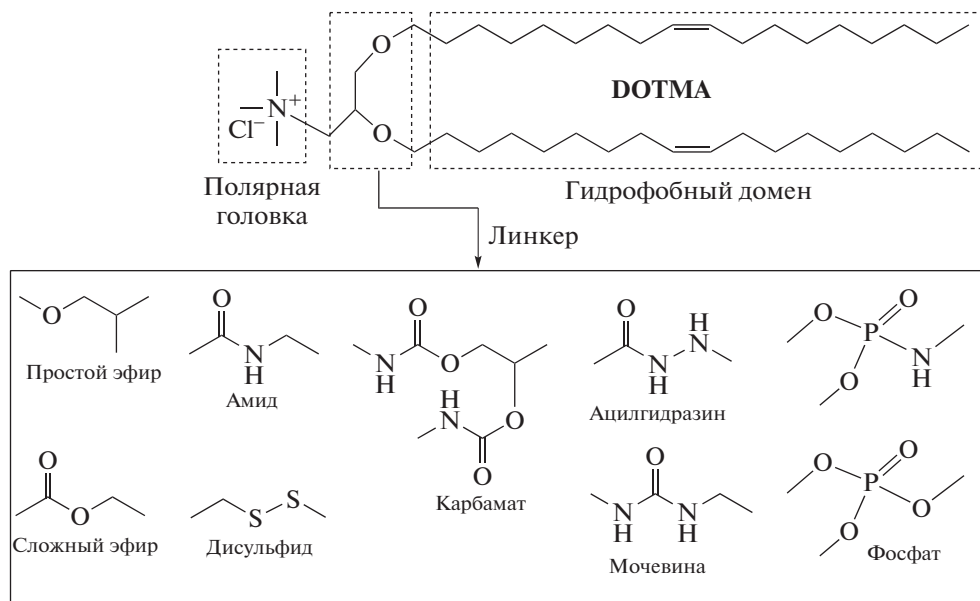


Рис. 3. Структуры наиболее распространенных линкеров в катионных липидах (по [43]).

структуру компонентов системы доставки снижает их цитотоксичность и повышает способность образовывать эффективные комплексы с ДНК [37]. Преимуществами сложноэфирной связи является ее чувствительность к изменениям pH в эндосомах и гидролиз под действием клеточных эстераз. Транспортные системы, способные эффективно обеспечить трансфекцию, должны не только защищать ДНК от клеточных ферментов, но и высвобождать ее внутри клетки. Внутриклеточная деградация лабильных амидных и сложноэфирных связей может приводить к разрушению комплексов и последующему высвобождению нуклеиновых кислот из липосом [38]. Простая эфирная связь в составе катионного липида позволяет достичь лучшей трансфекции, чем у соединений со сложноэфирным и уретановым линкером, однако она делает молекулу более токсичной [39, 40].

Для повышения эффективности доставки плазмидной ДНК в клетки рекомендуется использовать катионные липиды с более длинным линкером [27]. На вновь синтезированных соединениях [41] показано, что глутамат в качестве линкера проявляет большую эффективность трансфекции по сравнению с аспаратом. Наличие еще одного метиленового звена в структуре глутамат-содержащего липида может влиять на структуру/конформацию липоплексов и обеспечивать лучшее связывание с положительно заряженными группами липоплексов. Следовательно, взаимодействие между положительно заряженными и стабильными липоплексами и отрицательно заряженной поверхностью клеток будет более эффективным.

Ориентация линкера в молекуле влияет на физико-химические свойства липидов. Незначительные структурные изменения в ориентации суще-

ственно влияют на способность связывать ДНК, жесткость мембраны, способность к слиянию с клеточными мембранами, поглощение клетками и эффективность доставки генетического материала катионными липосомами [42]. Например, структурная ориентация амидного линкера оказывает влияние на совместимость с сывороткой крови и эффективность трансфекции катионных амфифилов. Так, группа исследователей [43] показала, что липоплексы липидов **11** демонстрируют значительно более высокую совместимость с сывороткой и селективность переноса генетического материала, чем липоплексы липидов **12** (схема 2).

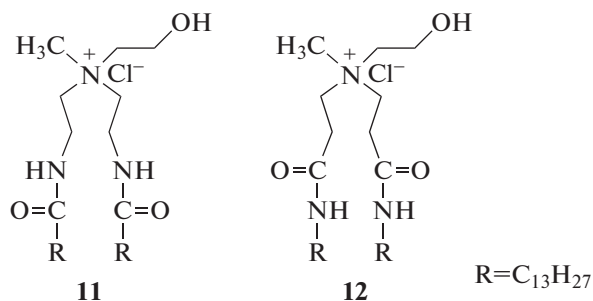


Схема 2

Для спейсера между гидрофобным и гидрофильным фрагментами основными параметрами эффективности трансфекции также являются природа, длина и ориентация в молекуле. Природа спейсера может быть гидрофильной или гидрофобной, жесткой или гибкой [44]. Длина и гидрофобность влияют на морфологию агрегатов и трансфекционные свойства димерных амфифилов [45], а также размер везикул и степень гидратации [46].

Размер агрегатов увеличивается с увеличением длины спейсера. Катионные липиды с длинным спейсером (не менее 6 атомов углерода) образуют либо трубчатые, либо стержнеподобные структуры, а не обычную везикулярную структуру, тогда как липиды без него образуют неустойчивые агрегаты. Отмечается, что лучшую трансфекцию показывают липиды с 3 атомами углерода в составе спейсера. При этом не отмечается существенного влияния длины на температуру фазового перехода агрегатов [20].

Спейсер может влиять на температуру фазового перехода в зависимости от его ориентации в молекуле липида [45, 46]. В мономерной молекуле спейсер между гидрофобным и гидрофильным блоками ориентирован вертикально, поэтому он сильно влияет на расположение гидрофильной “головки”. В димерных липидах ориентация спейсера влияет на молекулярную упаковку мембранной структуры, а не на местоположение гидрофильной “головки”, так как он расположен горизонтально. Таким образом, роль спейсера в молекулярной упаковке катионных агрегатов будет различаться в зависимости от структуры липидов.

В качестве полярных гидрофильных групп перспективно использовать гидрофильные аминокислоты, например *L*-лизин, *L*-аргинин и др.,

поскольку мультивалентные катионные липиды обладают повышенной эффективностью трансфекции и низкой общей токсичностью по сравнению с аналогами, содержащими полиамины. В качестве противоионов к ним выступают HCl или трифторуксусная кислота (TFA). Они могут влиять на поверхностный потенциал катионных липосом: липиды с трифторацетатом обладают большим дзета-потенциалом, чем липиды, содержащие хлор в качестве противоиона [20, 47].

L-Лизин представляет большой интерес для использования в качестве компонента амфифильных соединений. Это двухосновная аминокислота с одной из самых длинных боковых цепей среди всех природных аминокислот, что может быть важным для преодоления проблем стерического характера. Из-за наличия концевой ϵ -аминогруппы, *L*-лизин классифицируют как гидрофильную основную аминокислоту. Структура *L*-лизина обеспечивает универсальное использование его в качестве строительного блока в синтезе катионных амфифилов: наличие трех активных центров (одной карбоксильной группы и двух α - и ϵ -аминогрупп) позволяет получать молекулы с необходимыми ионными характеристиками [48, 49]. Синтезированы амфифилы [50] с различным расположением *L*-лизина в полярном блоке (схема 3).

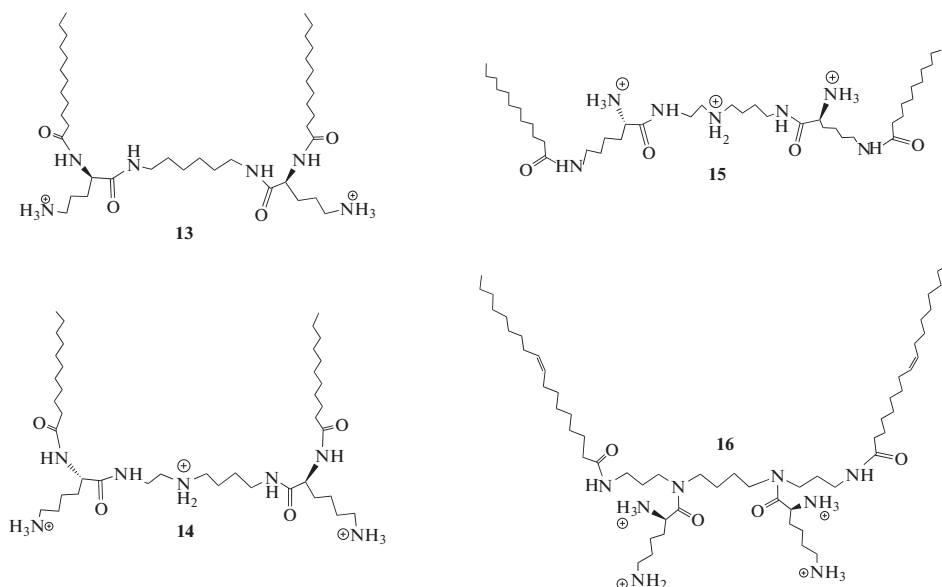


Схема 3

Кроме того, важно, чтобы заряженные “головки” находились на определенном расстоянии друг от друга для взаимодействия с соседними фосфатными группами молекул ДНК [51]. Согласно исследованию [52], наиболее эффективным расстоянием между аминогруппами в амфифилах является 4.9 Å, которое позволяет им прочно связываться с фосфатными группами молекулы ДНК.

Липиды с *L*-аргинином в качестве полярной головки имеют эффективность трансфекции выше, чем их аналоги с *L*-лизином, благодаря наличию гуанидиновой группировки, которая обеспечивает способность прочно связываться с ДНК [47]. Гуанидиновая группировка остается протонированной в широком диапазоне pH, образует водородные связи с пуриновыми и пиримидиновыми нуклеотидами, а также играет важную роль

в различных ДНК-связывающих белках, таких как гистоны и протамины. Кроме того, *L*-аргинин способен образовывать цвиттер-ионные водородные связи с фосфат-ионами [52–54]. Образование водородных связей между гуанидиновым фрагментом *L*-аргинина и фосфатами, сульфатами, карбоксильными группами компонентов клеточной мембраны может усиливать проявляемый эффект [55]. Наличие множества положительных зарядов в полярной головке липида обычно не влияет негативно на компактность и гидродинамический размер липоплексов, эффективность трансфекции и цитотоксичность катионных амфифилов, однако в некоторых случаях может вызывать трудности при проникновении через клеточную мембрану ввиду большой плотности поверхностного заряда гуанидиновой группировки [56].

Гистидин также позволяет повысить эффективность трансфекции. Среда, используемая при образовании липоплексов между катионными амфифилами, содержащими в структуре гистидин, и плазмидной ДНК, существенно влияет на эффективность трансфекции, а также на совместимость с сывороткой крови [57].

Катионные липиды с *L*-лизин, *L*-аргинином и гистидином могут формировать структуры в виде стержней, поскольку их полярные “головки” образуют однослойные везикулы [32]. Эффективность их трансфекции изменяется в ряду *L*-лизин > *L*-аргинин > гистидин. При этом катионные липиды с дипептидами в качестве полярной головки, например *L*-лизин-глицин, “работают” лучше, чем их аналоги с одной аминокислотой [23].

Наличие гидроксильных групп в составе полярного блока усиливает электростатическое взаимодействие плазмидной ДНК с липидами посредством водородных связей и, следовательно, улучшает средство полученных липоплексов к клеточным мембранам [28]. Амфифилы на основе производных *L*-серина могут снижать цитотоксические эффекты [58]. Присутствие трех активных центров может обеспечить наличие химических связей разного типа, в результате чего открываются новые возможности для создания биологически активных молекул.

Кроме стандартных мономерных липидных молекул существуют димерные амфифилы. Перспективным материалом для дизайна димерных амфифилов является цистин, который состоит из двух остатков *L*-цистеина, соединенных дисульфидной связью. Дисульфидная связь является потенциально реакционноспособной группой, способной вступать в реакции обмена тиол–дисульфид, образуя свободные сульфгидрильные группы. Таким образом, соединения на основе цистина и их восстановленные аналоги являются структурами с уникальными свойствами [59].

Первым синтезированным катионным липидом, содержащим дисульфидную связь, является КЛ 17 (схема 4). Исследования показали, что он эффективнее высвобождает плазмидную ДНК из комплекса по сравнению с его аналогом 18, не содержащим S–S-связь, из-за дестабилизации структуры липида при низких значениях pH внутри клетки [60].

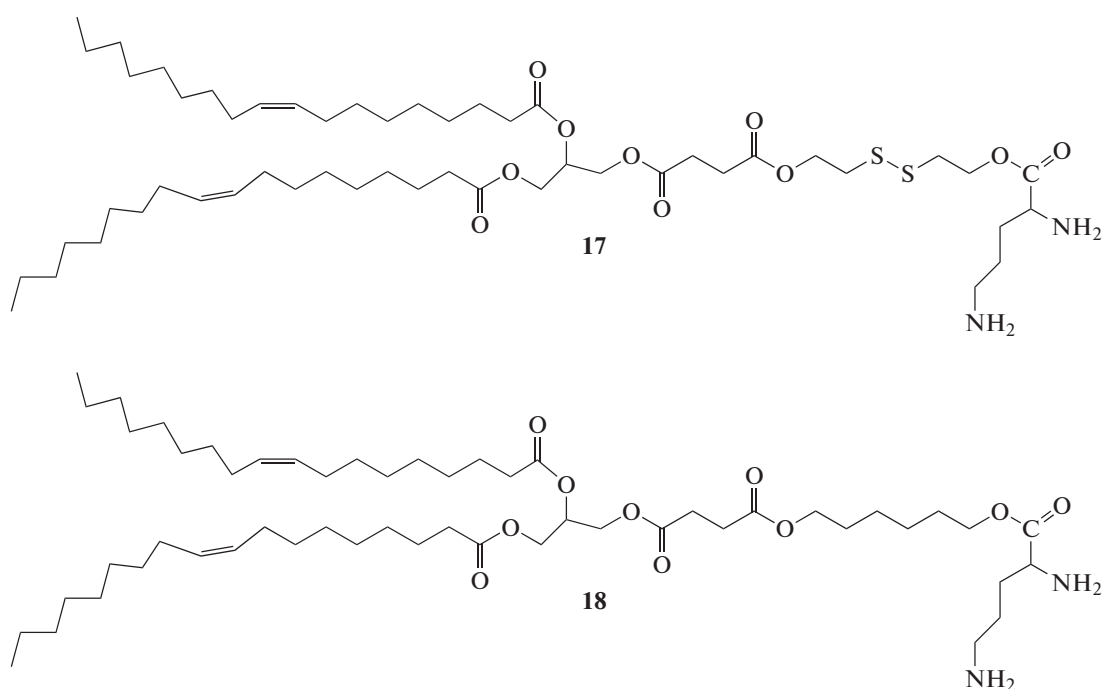


Схема 4

Структуры, содержащие цистин в качестве полярного домена, проявили себя как перспективные трансфицирующие агенты. Определена зависимость эффективности трансфекции от структуры гидрофобного блока липидов на основе цистина [61]. Исследование показало, что α -то-

коферол-содержащие липиды **19** и **20** более активные, чем амфифилы со стероидными фрагментами **21** и алифатическими цепями **22** (схема 5). При этом КЛ **19**, несущий два гидрофобных фрагмента, эффективнее, чем его мономерный аналог **20**.

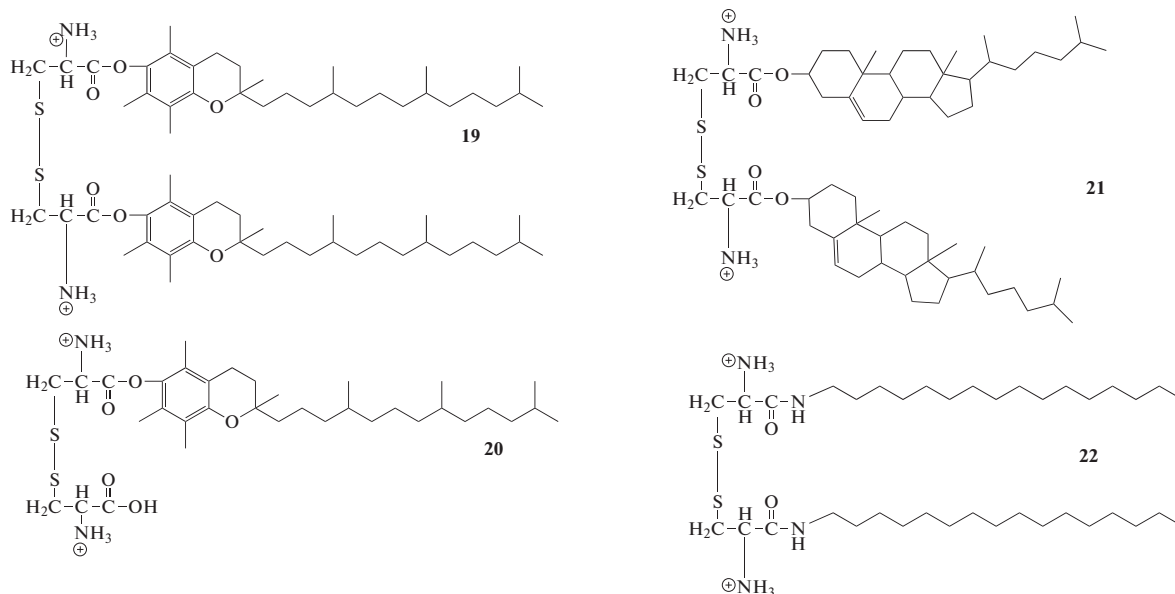


Схема 5

Кроме того, созданы структуры на основе природных *L*-аминокислот, которые проявили антибактериальную активность [62, 63]. Это расширяет возможные области применения катионных липидов.

КЕРАСОМЫ – УСОВЕРШЕНСТВОВАННАЯ ТРАНСПОРТНАЯ СИСТЕМА

Несмотря на известные достоинства, катионные липосомы могут быть весьма токсичными для клеток. Это может приводить к изменениям в экспрессии генов даже при отсутствии какого-либо визуального эффекта на клетки. Кроме того, многие структуры подвержены деградации или агрегации в физиологических условиях. Для решения подобной проблемы были сконструированы гибридные системы кремнийорганической природы.

Керасомы, впервые разработанные в 1999 году [64], в настоящее время интересны в качестве нового типа транспортной системы для трансфекции, а также в терапии социально значимых заболеваний. Это искусственные биоорганические гибридные липосомы, образованные с помощью золь-гель-процесса в условиях *in situ* путем самосборки керасомообразующих липидов (КОЛ), содержащих силоксановую сеть на поверхности

двухслойной мембраны везикул (рис. 4). Они морфологически стабильны и могут быть нагружены гидрофильными, гидрофобными или амфифильными молекулами для терапевтической доставки и биомедицинской визуализации. В общем виде структура КОЛ включает гидрофильную триэтоксисилильную головку (неорганический прекурсор), гидрофобный блок, содержащий углеводородные цепи, и соединительное звено (линкер) между ними [65–68]. При гидролизе триалкоксисилильных полярных групп образуется прочная сеть $-\text{Si}-\text{O}-\text{Si}-$ на поверхности везикулы, которая позволяет резко увеличить устойчивость агрегатов по сравнению с липосомами. Керасомообразующие липиды синтезируются по методу блочного синтеза. Это позволяет проводить стадию присоединения кремнийсодержащего фрагмента последней, что, несомненно, важно для предотвращения возможной реакции самопроизвольной полимеризации силановых групп под воздействием различных сред.

Одним из первых был получен КОЛ **23** путем простых реакций конденсации трех молекулярных блоков: дигексадециламина, янтарной кислоты и 3-амино-пропилтриэтоксисилана (схема 6) [68].

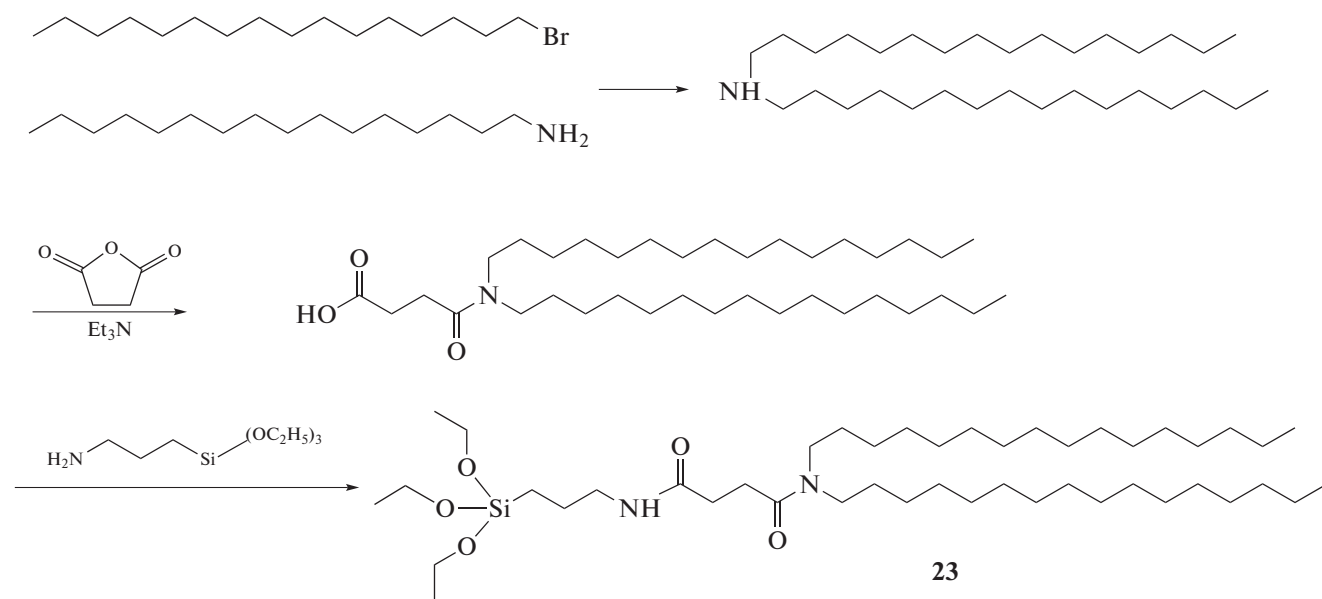


Схема 6

На сегодняшний день исследованы модификации поверхности керасом. Для получения уникальных везикул, которые можно применять в различных областях, кремнийсодержащую поверхность агрегатов модифицируют различным образом (рис. 5) [69]. Чаще всего такой процесс инициируется силанизацией молекулы 3-аминопропилтриэтоксисилана, после чего следует реакция образования основания Шиффа между его аминогруппой и альдегидной группой глутарового альдегида. Затем идет присоединение функциональной группировки [70]. Возможно нанесение металлических наночастиц на поверхность кера-

сом. Наноконпозиты с частицами золота могут служить объемными электрохимическими платформами для исследования передачи информации между клетками [71].

Кроме силоксановой сети проводят модификации структуры самих КОЛ. Так, для исследования влияния липидоподобной структуры на способность к загрузке лекарственного средства и механизм его высвобождения были разработаны схемы и синтезирована серия КОЛ **24** и **25**, различающиеся числом триэтоксисилильных головок (схемы 7, 8).

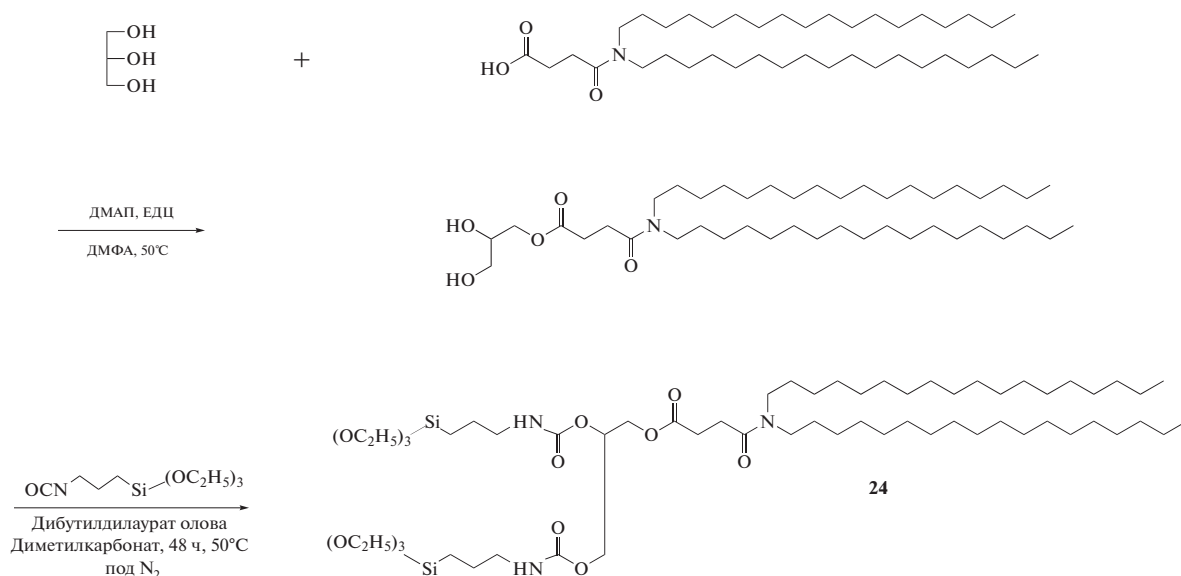


Схема 7

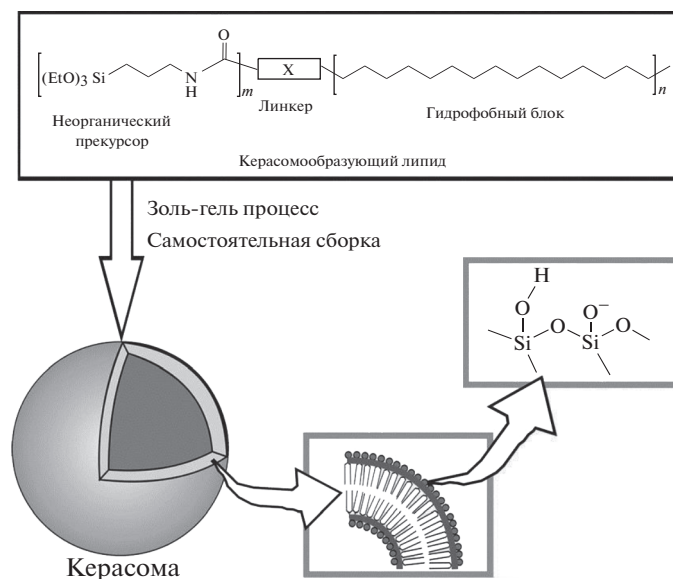


Рис. 4. Схематическое изображение структуры керасомы (по [14]). Неорганическим прекурсором является триэтоксисилильная головка.

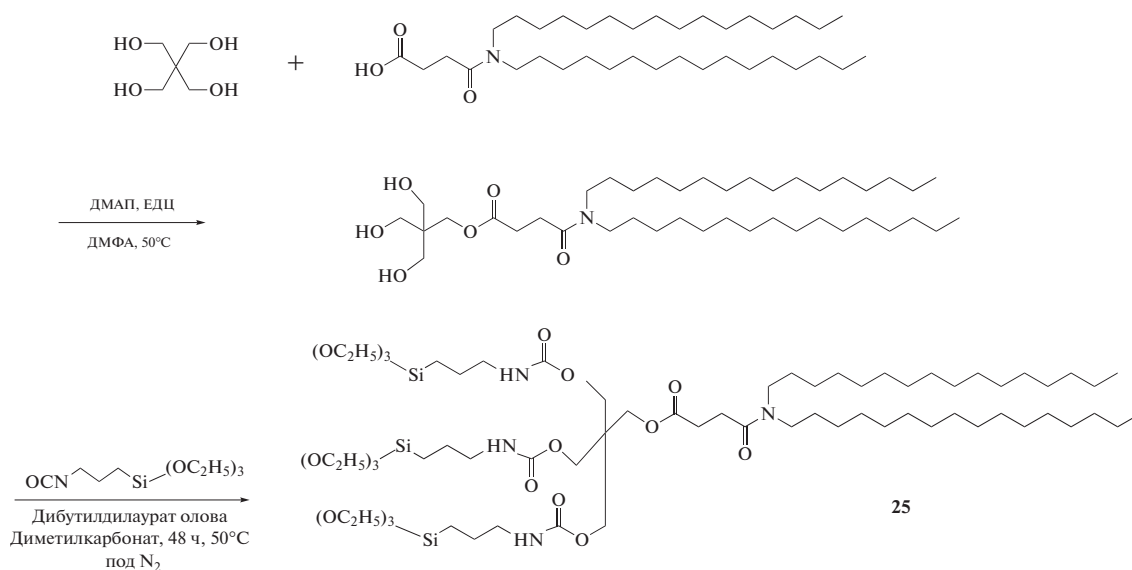


Схема 8

Результаты экспериментов показали, что количество силиконовых групп влияет на диаметр керасом: с увеличением их количества наблюдалось уменьшение диаметра. Это может быть связано с особенностями полимеризации силиконовой сети на поверхности, поскольку, чем больше число триэтоксисилановых групп, тем выше степень полимеризации силиконовых головок, что приводит к более компактным везикулам. Исследование эффективности захвата керасомами противоопухолевого препарата доксорубицина (DOX) показало увеличение количества инкапсулированного вещества с увеличением числа кремниевых фрагментов в ряду 1 фрагмент <

< 2 фрагмента < 3 фрагмента. Это объясняется электростатическим взаимодействием между положительно заряженным DOX и отрицательно заряженными керасомами, что приводит к увеличению эффективности инкапсуляции водорастворимого препарата DOX [72].

Разработаны гибридные КОЛ на основе фосфатидилхолина путем реакции конденсации алифатических производных триэтоксисилана, несущих азидную группировку, и алкин-лизолипида [73]. Образующие молекулы триэтоксисилан-триазол-фосфатидилхолина содержат полисилоксановую сеть внутри бислойной мембраны. Благодаря такой структуре подобные керасомы могут приме-

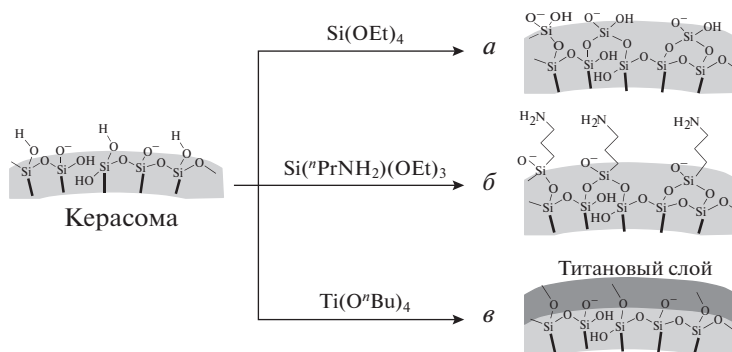


Рис. 5. Модификации поверхности керасом: *a* – расширение силоксановой сети; *б* – введение функциональной группы; *в* – покрытие титановым слоем (по [67, 69]).

няться для конструирования везикулярных материалов с функционализированными оболочками.

Создание положительного заряда в структуре керасообразующего липида позволяет применять керасомы не только как часть комбинированных с липосомами систем, но и в качестве

самостоятельных агентов трансфекции нуклеиновых кислот в клетки. Для этой цели был разработан КОЛ 26 (схема 9) [74]. Катионные керасомы успешно осуществляют трансфекцию первичных нейронов и не оказывают неблагоприятного воздействия на рост аксонов [75].

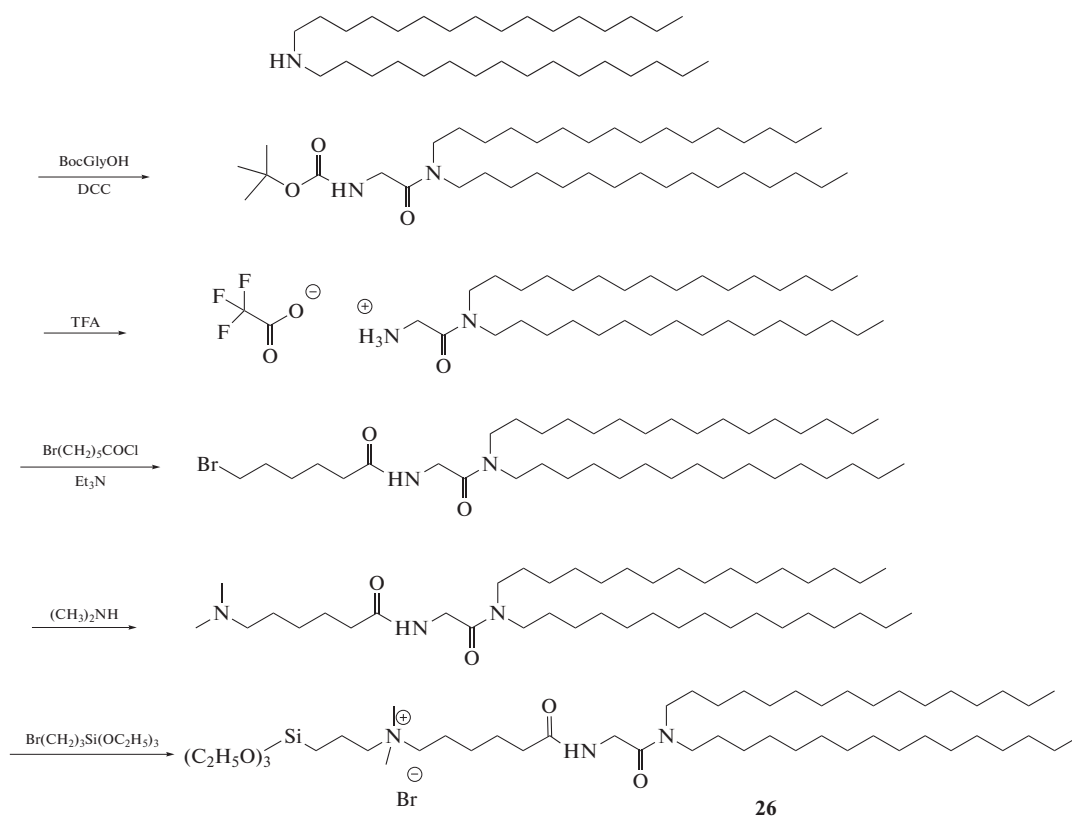


Схема 9

В последние годы были синтезированы новые керасообразующие липиды на основе природных аминокислот [76–78]. Это позволило изучить влияние структуры соединений на биологиче-

скую активность и свойства агрегатов. Полученные данные свидетельствуют о перспективности применения природных компонентов в составе амфифилов.

При терапии опухолевых заболеваний наночастицы в основном пассивно или активно накапливаются в клетках опухолей. До сих пор этот процесс не во всех случаях улучшал терапевтическую эффективность, однако важно, чтобы лекарственные молекулы аккумулировались в местах, близких к опухолям. Путем применения различных стимулов [79], например изменения рН, кванта света, магнитного поля, ультразвука [80, 81] можно обеспечить высвобождение переносимого препарата во внеклеточном пространстве или внутри опухоли.

Фотодинамическая терапия (ФДТ) является одним из неинвазивных методов лечения онкологических заболеваний, использующих активацию внешним светом определенной длины волны особых молекул – фотосенсибилизаторов, которые могут генерировать цитотоксические активные формы кислорода. Фотосенсибилизаторами являются производные порфиринов и родственные им гетероароматические структуры, чувствительные к свету. Активно исследуются производные природных хлоринов и бактериохлоринов [82]. Нетоксичная природа применяемых молекул придает им дополнительное преимущество по сравнению с химиотерапией. Однако плохая растворимость в воде и недостаточная селективность ограничивают их терапевтическое применение. Чтобы решить эту проблему, синтезированы керасомальные фотосенсибилизаторы путем конъюгации порфиринов и керасом [83]. Керасомы, обладающие легко модифицируемыми химическими свойствами, позволяют загружать фотоактивируемый блок для эффективной и безопасной ФДТ. Распределение порфиринов в липидном бислое может предотвращать их агрегацию, а химическое связывание предупреждает преждевременную утечку фотосенсибилизаторов во время циркуляции в русле крови, что значительно улучшает эффективность ФДТ. Исследования показали отличную способность порфирина продуцировать активные формы кислорода даже после конъюгирования с керасомами. Результаты *in vitro* отражают значительный эффект абляции опухоли при облучении светом 400–700 нм, демонстрируя возможность использовать керасомы в качестве терапевтической платформы для лечения рака [83]. Кроме того, они способны инкапсулировать молекулы лекарственного средства во внутреннюю часть, следовательно, совмещают химиотерапию и ФДТ [84].

В последние годы отмечается значительный исследовательский интерес к разработке и внедрению многофункциональных наноматериалов для одновременной визуализации и терапии [85]. Эта область развилась настолько быстро, что был введен специальный термин “тераностика” для описания двойной функциональности таких наноматериалов [86]. Магнитно-резонансная томография (МРТ) является одним из мощнейших ме-

тодов диагностики социально значимых заболеваний. Высокое пространственное разрешение, неинвазивность и яркий контраст мягких тканей являются основными преимуществами МРТ по сравнению с другими методами визуализации. Использование магнитных наночастиц в качестве контрастного средства дополнительно позволяет обнаруживать опухоли на ранней стадии. Особое место в ряду магнитных наноматериалов занимают наночастицы магнетита ($\text{FeO} \cdot \text{Fe}_2\text{O}_3$) благодаря их уникальным свойствам, например, высокой чувствительности и низкой токсичности для живых организмов. При этом привлекательна их доступность и высокая технологичность процессов получения [87]. Однако для применения магнитных частиц в медицине важную роль играет возможность создания устойчивых коллоидных растворов частиц, биосовместимость, а также возможность модифицировать их путем присоединения к частицам векторов нацеливания на клетки-мишени. Для этой цели было предложено включать наночастицы магнетита в керасомы и, таким образом, получать новую систему, обладающую комбинированными свойствами. Она является как системой доставки терапевтических препаратов в клетки, так и методом диагностики МРТ. Такие системы получили название магнитные керасомочастицы [88].

Магнитные керасомочастицы показали высокую стабильность при хранении в водной среде, пролонгированное высвобождение лекарственного препарата паклитаксела в организме, более высокую чувствительность при диагностике МРТ, а также положительные результаты при лечении лейкемии [89]. Такие показатели делают их многообещающей платформой для одновременной химио- и магнитотерапии.

Керасомальным системам доставки лекарственных веществ в процессе их конструирования можно придать специфические свойства. Например, керасомы могут быть чувствительными к рН среды. При нормальных (физиологических) условиях рН-чувствительные керасомы имеют достаточно жесткую мембрану, однако при понижении рН среды до 6.5 и ниже, что свойственно опухолевым тканям, проницаемость мембраны керасом резко увеличивается [90, 91]. Принципиальным механизмом действия таких керасом является дестабилизация структуры в кислых условиях, что, в свою очередь, приводит к высвобождению их содержимого [92]. Однако существуют некоторые ограничения для терапии. Во-первых, участки опухолей с кислым рН удалены от микроциркулирующей части сосудистого русла, так как именно там наиболее выражена гипоксия. Такая отдаленность затрудняет эффективное накопление керасом в требуемом участке опухоли. Во-вторых, поскольку значения рН в опухолевых клетках не превышают 6.5, технически сложно изготовить керасомы, которые способны эффек-

тивно реагировать на низкие уровни pH [93]. Решением данных ограничений является включение производных фосфатидилэтаноламина в состав керасом. Полярная группа фосфолипида подвергается дестабилизации в кислой среде, в результате чего слияние керасом с клеточной мембраной в опухоли протекает легче и, в конечном итоге, высвобождается содержимое транспортной системы. Кроме включения фосфолипидов в состав керасом, возможна модификация их поверхности с помощью pH-лабильных полимеров на основе производных декстрана [94]. Подобное преобразование керасом позволяет создать платформу, способную к дестабилизации в слабокислых условиях.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Липосомальные транспортные системы в качестве невирусных систем доставки генетического материала и терапевтических молекул являются интересным объектом для фундаментальных исследований. Они позволяют легко транспортировать в клетки нуклеиновые кислоты в составе липоплексов за счет электростатических взаимодействий между положительными полярными группами катионных липидов и отрицательно заряженной поверхностью клеточных мембран. Однако известны недостатки катионных липосом, такие как низкая стабильность, токсичность, а также способность провоцировать сильный иммунный ответ. Тем не менее, современные исследования позволяют преодолевать подобные трудности путем введения в систему дополнительных компонентов — керасомообразующих липидов. Они дают возможность улучшить стабильность везикул в системном кровотоке и способствуют пролонгированному высвобождению полезной нагрузки из липосом в клетках. Это расширяет области применения липосомальных систем.

Таким образом, применение различных липидов позволяет создавать множество липосом для нескольких областей медицины. Невирусные системы доставки на основе гибридных липосом при правильном подборе их структурных компонентов могут стать перспективным решением ряда проблем медицины, а их дальнейшее изучение является актуальной задачей.

Работа выполнена в рамках гранта Российского фонда фундаментальных исследований (№ 19-04-00775).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Dickler H.B., Collier E. 1994. Gene therapy in the treatment of disease. *J. Allergy and Clinical Immunology*. **94** (6), 942–951.
- Patra J.K., Das G., Fraceto L.F., Campos E.V.R., Rodriguez-Torres M.P., Acosta-Torres L.S., Diaz-Torres L.A., Grillo R., Swamy M.K., Sharma S., Habtemariam S., Shin H.-S. 2018. Nano based drug delivery systems: recent developments and future prospects. *J. Nanobiotechnol.* **16** (1), 71–104.
- Yin H., Kanasty R., Eltoukhy A., Vegas A.J., Dorkin J.R., Anderson D.G. 2014. Non-viral vectors for gene-based therapy. *Nat Rev Genet.* **15**, 541–555.
- Akinc A., Maier M.A., Manoharan M., Fitzgerald K., Jayaraman M., Barros S., Ansell S., Du X., Hope M.J., Madden T.D., Mui B.L., Semple S.C., Tam Y.K., Ciufofini M., Witzigmann D., Kulkarni J.A., Meel R., Cullis P.R. 2019. The Onpattro story and the clinical translation of nanomedicines containing nucleic acid-based drugs. *Nature Nanotech.* **14**, 1084–1087.
- Carter M. 2015. Chapter 11. Gene delivery strategies. In: *Guide to Research Techniques in Neuroscience*. New York: Acad. Press, p. 239–252.
- Alavi M., Karimi N., Safaei M. 2017. Application of various types of liposomes in drug delivery systems. *Adv. Pharm. Bull.* **7**(1), 3–9.
- Тазина Е.В., Игнатъева Е.В., Полозкова А.П., Орлова О.Л., Оборотова Н.А. 2008. Технология получения и анализ термозависимой липосомальной лекарственной формы доксорубина. *Хим.-фарм. журн.* **42** (12), 30–35.
- Patil Y.P., Jadhav S. 2014. Novel methods for liposome preparation. *Chem. Phys. Lipids.* **177**, 8–18.
- Dan N. 2015. Lipid-nucleic acid supramolecular complexes: Lipoplex structure and the kinetics of formation. *AIMS Biophysics.* **2** (2), 163–183.
- Kim T.K., Eberwine J.H. 2010. Mammalian cell transfection: The present and the future. *Analytical and Bioanalytical Chemistry.* **397** (8), 3173–3178.
- Knudsen K.B., Northeved H., Kumar P.E., Permin A., Gjetting T., Andresen T.L., Larsen S., Wegener K.M., Lykkesfeldt J., Jantzen K., Loft S., Møller P., Roursgaard M. 2015. In vivo toxicity of cationic micelles and liposomes. *Nanomedicine.* **11** (2), 467–477.
- Akbarzadeh A., Rezaei-Sadabady R., Davaran S., Joo S. W., Zarghami N., Hanifehpour Y., Samiei M., Kouhi M., Nejati-Koshki K. 2013. Liposome: Classification, preparation, and applications. *Nanoscale Research Letters.* **8** (1), 102.
- Shim G., Kim M.-G., Park J.Y., Oh Y.-K. 2013. Application of cationic liposomes for delivery of nucleic acids. *Asian J. Pharm. Sci.* **8**, 72–80.
- Liang X., Li X., Jing L., Xue P., Jiang L., Ren Q., Dai Z. 2013. Design and synthesis of lipidic organoalkoxysilanes for self-assembly of liposomal nanohybrid cerasomes with controlled drug release properties. *Chem. Eur. J.* **19** (47), 16113–16121.
- Sabin J., Prieto G., Ruso J.M., Hidalgo-Álvarez R., Sarmiento F. 2006. Size and stability of liposomes: A possible role of hydration and osmotic forces. *The European Phys. J.* **20**, 401–408.
- Sandeep K., Sunilkumar K.T., Sudheer B., Mohanvarma M. 2013. Liposomal drug delivery system – A comprehensive review. *Int. J. Drug Dev. Res.* **5** (4), 62–75.
- Ghosh Y.K., Visweswariah S.S., Bhattacharya S. 2002. Advantage of the ether linkage between the positive charge and the cholesteryl skeleton in cholesterol-based

- amphiphiles as vectors for gene delivery. *Bioconjugate Chem.* **13**, 378–384.
18. Ghosh Y.K., Visweswariah S.S., Bhattacharya S. 2000. Nature of linkage between the cationic headgroup and cholesteryl skeleton controls gene transfection efficiency *FEBS letters.* **473**, 341–344.
 19. Banerjee R., Mahidhar Y.V., Chaudhuri A., Gopal V., Rao N.M. 2001. Design, synthesis, and transfection biology of novel cationic glycolipids for use in liposomal gene delivery *J. Med. Chem.* **44**, 4176–4185.
 20. Sarker S.R., Arai S., Murate M., Takahashi H., Takata M., Kobayashi T., Takeoka S. 2012. Evaluation of the influence of ionization states and spacers in the thermotropic phase behaviour of amino acid-based cationic lipids and the transfection efficiency of their assemblies. *Int. J. Pharmaceutics.* **422**, 364–373.
 21. Obata Y., Saito S., Takeda N., Takeoka S. 2009. Plasmid DNA-encapsulating liposomes: Effect of a spacer between the cationic head group and hydrophobic moieties of the lipids on gene expression efficiency. *Biochim. Biophys. Acta.* **1788**, 1148–1158.
 22. Loew S., Fahr A., May S. 2011. Modeling the release kinetics of poorly water-soluble drug molecules from liposomal nanocarriers. *J. Drug Deliv.* 376548.
 23. Yi W.J., Zheng L.T., Su R.C., Liu Q., Zhao Z.-G. 2015. Amino acid-based cationic lipids with alpha-tocopherol hydrophobic tail for efficient gene delivery. *Chem. Biol. Drug Design.* **86**, 1192–1202.
 24. Zhi D., Zhang S., Wang B., Zhao Y., Yang B., Yu S. 2010. Transfection efficiency of cationic lipids with different hydrophobic domains in gene delivery. *Bioconjugate Chem.* **21**, 563–577.
 25. Pinnaduwege P., Schmitt L., Huang L. 1989. Use of a quaternary ammonium detergent in liposome mediated DNA transfection of mouse L-cells. *Biochim. Biophys. Acta.* **985**, 33–37.
 26. Cameron F.H., Moghaddam M.J., Bender V.J., Whitaker R.G., Mott M., Lockett T.J. 1999. A transfection compound series based on a versatile Tris linkage. *Biochim. Biophys. Acta.* **1417**, 37–50.
 27. Obika S., Yu W., Shimoyama A., Uneda T., Miyashita K., Doi T., Imanishi T. 2001. Symmetrical cationic triglycerides: An efficient synthesis and application to gene transfer. *Bioorgan. Med. Chem.* **9**, 245–254.
 28. Felgner J.H., Kumar R., Sridhar C.N., Wheeler C.J., Tsai Y.J., Border R., Ramsey P., Martin M., Felgner P.L. 1994. Enhanced gene delivery and mechanism studies with a novel series of cationic lipid formulations. *J. Biol. Chem.* **269**, 2550–2561.
 29. Lichtenberg D., Freire E., Schmidt C.F., Barenholz Y., Felgner P.L., Thompson T.E. 1981. Effect of surface curvature on stability, thermodynamic behavior, and osmotic activity of dipalmitoylphosphatidylcholine single lamellar vesicles. *Biochemistry.* **20**, 3462–3467.
 30. Lichtenberg D., Felgner P., Thompson T. 1982. Transition of a liquid crystalline phosphatidylcholine bilayer to the gel phase in a vesicle reduces the internal aqueous volume. *Biochim. Biophys. Acta. Biomembranes.* **684**, 277–281.
 31. Fletcher S., Ahmad A., Perouzel E., Heron A., Miller A.D., Jorgensen M.R. 2006. In vivo studies of dialkynoyl analogues of DOTAP demonstrate improved gene transfer efficiency of cationic liposomes in mouse lung. *J. Med. Chem.* **49**, 349–357.
 32. Obata Y., Suzuki D., Takeoka S. 2008. Evaluation of cationic assemblies constructed with amino acid-based lipids for plasmid DNA delivery. *Bioconjugate Chem.* **19**, 1055–1063.
 33. Floch V., Bolc'h G. Le, Audrezet M.P., Yaoouanc J.J., Clément J.C., Abbayes H., Mercier B., Abgrall J.F., Férec C. 1997. Cationic phosphonolipids as non-viral vectors for DNA transfection in hematopoietic cell lines and CD34+ cells. *Blood Cell. Mol. Dis.* **23**, 69–87.
 34. Nantz M.H., Dicus C.W., Hilliard B., Yellayi S., Zou S., Hecker J.G. 2010. The benefit of hydrophobic domain asymmetry on the efficacy of transfection as measured by in vivo imaging. *Mol. Pharm.* **7**, 786–794.
 35. Dharmalingam P., Rachamalla H.K.R., Lohchania B., Bandlamudi B., Thangavel S., Murugesan M.K., Banerjee R., Chaudhuri A., Chandrashekhara Voshavar, Marepally S. 2017. Green transfection: Cationic lipid nanocarrier system derivatized from vegetable fat, palmstearin enhances nucleic acid transfections. *ACS Omega.* **2**, 7892–7903.
 36. Bhattacharya S., Bajaj A. 2009. Advances in gene delivery through molecular design of cationic lipids. *Chem. Commun.* **31**, 4632–4656.
 37. Shi N., Pardridge W.M. 2000. Noninvasive gene targeting to the brain. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **97**, 7567–7572.
 38. Sarker S.R., Takeoka S. 2018. Amino acid-based liposomal assemblies: Intracellular plasmid DNA delivery nanoparticles. *J. Nanomed.* **2**, 1008–1021.
 39. Ghosh Y.K., Visweswariah S.S., Bhattacharya S. 2002. Advantage of the ether linkage between the positive charge and the cholesteryl skeleton in cholesterol-based amphiphiles as vectors for gene delivery. *Bioconjugate Chem.* **13**, 378–384.
 40. Ghosh Y.K., Visweswariah S.S., Bhattacharya S. 2000. Nature of linkage between the cationic headgroup and cholesteryl skeleton controls gene transfection efficiency. *FEBS letters.* **473**, 341–344.
 41. Kim H.S., Song I.H., Kim J.C., Jang D.O., Park Y.S. 2006. In vitro and in vivo gene-transferring characteristics of novel cationic lipids, DMKD (O,O'-dimyristyl-N-lysyl aspartate) and DMKE (O,O'-dimyristyl-N-lysyl glutamate). *J. Contr. Release.* **115**, 234–241.
 42. Rajesh M., Sen J., Srujan M., Mukherjee K., Sreedhar B., Chaudhuri A. 2007. Dramatic influence of the orientation of linker between hydrophilic and hydrophobic lipid moiety in liposomal gene delivery. *J. Amer. Chem. Society.* **129**, 11408–11420.
 43. Zhi D., Bai Y., Yang J., Cui S., Zhao Y., Chen H., Zhang S. 2018. A review on cationic lipids with different linkers for gene delivery. *Adv. Colloid Interface Sci.* **253**, 117–140.
 44. Bajaj A., Kondaiah P., Bhattacharya S. 2008. Effect of the nature of the spacer on gene transfer efficacies of novel thiocholesterol derived gemini lipids in different cell lines: A structure–activity investigation. *J. Med. Chem.* **51**, 2533–2540.
 45. Bhattacharya S. 1999. Vesicle formation from dimeric ion-paired amphiphiles. control over vesicular thermotropic and ion-transport properties as a function of in-

- tra-amphiphilic headgroup separation. *Langmuir*. **15**, 3400–3410.
46. Bhattacharya S., Bajaj A. 2007. Membrane-forming properties of gemini lipids possessing aromatic backbone between the hydrocarbon chains and the cationic headgroup. *J. Phys. Chem. B*. **111**, 13511–13519.
 47. Sarker S.R., Aoshima Y., Hokama R., Inoue T., Sou K., Takeoka S. 2013. Arginine-based cationic liposomes for efficient in vitro plasmid DNA delivery with low cytotoxicity. *Int. J. Nanomed.* **8**, 1361–1375.
 48. Colomer A., Pinazo A., García M.T., Mitjans M., Vinardell M.P., Infante M.R., Martínez V., Pérez L. 2012. pH-Sensitive surfactants from lysine: Assessment of their cytotoxicity and environmental behavior. *Langmuir*. **28**, 5900–5912.
 49. Mezei A., Pérez L., Pinazo A., Comelles F., Infante M.R., Pons R. 2012. Self assembly of pH-sensitive cationic lysine based surfactants. *Langmuir*. **28**, 16761–16771.
 50. Castro M., Griffiths D., Patel A., Patrick N., Kitson C., Ladlow M. 2004. Effect of chain length on transfection properties of spermine-based gemini surfactants. *Org. Biomol. Chem.* **2**, 2814–2820.
 51. Karlsson L., van Eijk M.C.P., Söderman O. 2002. Compaction of DNA by gemini surfactants: Effects of surfactant architecture. *J. Colloid Interface Sci.* **252**, 290–296.
 52. Wettig S.D., Badea I., Donkuru M., Verrall R.E., Foldvari M. 2007. Structural and transfection properties of amine-substituted gemini surfactant-based nanoparticles. *J. Gene Med.* **9**, 649–658.
 53. Vigneron J.P., Oudrhiri N., Fauquet M., Vergely L., Bradley J.C., Basseville M., Lehn P., Lehn J.M. 1996. Guanidinium-cholesterol cationic lipids: efficient vectors for the transfection of eukaryotic cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **93**, 9682–9686.
 54. Sen J., Chaudhuri A. 2005. Design, syntheses, and transfection biology of novel non-cholesterol-based guanidinylated cationic lipids. *J. Med. Chem.* **48**, 812–820.
 55. Nakase I., Takeuchi T., Tanaka G., Futaki S. 2008. Methodological and cellular aspects that govern the internalization mechanisms of arginine-rich cell-penetrating peptides. *Adv. Drug Delivery Rev.* **60**, 598–607.
 56. Лосева А.А., Буданова У.А., Себякин Ю.Л. 2019. Синтез новых гуанидинированных амфифилов и их аналога, содержащего пирен, для создания липосомальных транспортных систем и визуализации в клетке-мишени. *Журн. орг. химии*. **55** (12), 1827–1833.
 57. Kumar V.V., Pichon C., Refregiers M., Guerin B., Midoux P., Chaudhuri A. 2003. Single histidine residue in head-group region is sufficient to impart remarkable gene transfection properties to cationic lipids: evidence for histidine-mediated membrane fusion at acidic pH. *Gene Ther.* **10**, 1206–1215.
 58. Cardoso A.M., Morais C.M., Cruz A.R., Silva S.G., Vale M.L., Marques E.F., Pedroso de Lima M.C., Jurado A.S. 2015. New serine-derived gemini surfactants as gene delivery systems. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* **89**, 347–356.
 59. Gujrati M., Malamas A., Shin T., Jin E., Sun L., Lu Z.-R. 2014. Multifunctional cationic lipid-based nanoparticles facilitate endosomal escape and reduction-triggered cytosolic siRNA release. *Mol. Pharm.* **11**, 2734–2744.
 60. Tang F., Hughes J.A. 1998. Introduction of a disulfide bond into a cationic lipid enhances transgene expression of plasmid DNA. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **242**, 141–145.
 61. Kedika B., Patri S.V. 2012. synthesis and gene transfer activities of novel serum compatible reducible tocopherol-based cationic lipids. *Mol. Pharm.* **9**, 1146–1162.
 62. Denieva Z.G., Romanova N.A., Bodrova T.G., Budanova U.A., Sebyakin Yu.L. 2019. Synthesis of amphiphilic peptidomimetics based on the aliphatic derivatives of natural amino acids. *Moscow University Chem. Bull.* **74** (6), 300–305.
 63. Marusova (Soloveva) V.V., Zagitova R.I., Budanova U.A., Sebyakin Yu.L. 2018. Multifunctional lipoamino acid derivatives with potential biological activity. *Moscow University Chem. Bull.* **73** (2), 74–79.
 64. Katagiri K., Ariga K., Kikuchi J.-I. 1999. Preparation of organic-inorganic hybrid vesicle “cerasome” derived from artificial lipid with alkoxyethyl head. *Chem. Lett.* **28**, 661–662.
 65. Liang X., Gao J., Jiang L., Luo J., Jing L., Li X., Jin Y., Dai Z. 2015. Nanohybrid liposomal cerasomes with good physiological stability and rapid temperature responsiveness for high intensity focused ultrasound triggered local chemotherapy of cancer. *ACS Nano*. **9**, 1280–1293.
 66. Zhang C.Y., Cao Z., Zhu W.J., Liu J. 2014. Highly uniform and stable cerasomal microcapsule with good biocompatibility for drug delivery. *Colloids Surface B*. **116**, 327–333.
 67. Kikuchi J. 2011. Cerasomes: A new family of artificial cell membranes with ceramic surface. In: *Advances in Biomimetics*. Ed. George A. Rijeka: InTech, p. 231–250.
 68. Wang Y., Wang B., Song X., Wu H., Wang H., Shen H., Ma X., Tan M. 2015. Liposomal nanohybrid cerasomes for mitochondria-targeted drug delivery. *J. Mat. Chem. B*. **3**, 7291–7299.
 69. Katagiri K., Hamasaki R., Ariga K., Kikuchi J.-I. 2003. Preparation and surface modification of novel vesicular nano-particle “cerasome” with liposomal bilayer and silicate surface. *J. Sol.-Gel. Sci. Technol.* **26**, 393–396.
 70. Cheung L.S., Zheng X., Stopa A., Baygents J.C., Guzman R., Schroeder J.A., Heimark R.L., Zohar Y. 2009. Detachment of captured cancer cells under flow acceleration in a bio-functionalized microchannel. *Lab. Chip*. **9**, 1721–1731.
 71. Liu D., Wu Q., Zou S., Bao F., Kikuchi J.-I., Song X.-M. 2020. Surface modification of cerasomes with AuNPs@poly(ionic liquid)s for an enhanced stereo biomimetic membrane electrochemical platform. *Bioelectrochem.* **132**, 107411.
 72. Hashizume M., Inoue H., Katagiri K., Ikeda A., Kikuchi J.-I. 2004. Cerasome as an organic-inorganic nanohybrid: Characterization of cerasome-forming lipids having a single or a dual trialkoxysilyl head. *J. Sol.-Gel. Sci. Technol.* **31**, 99–102.
 73. Zhang D., Culver H.R., Bowman C.N. 2019. Hybrid cerasomes composed of phosphatidylcholines and silica

- networks for the construction of vesicular materials with functionalized shells. *ACS Applied Nano Mater.* **2** (12), 7549–7558.
74. Katagiri K., Hashizume M., Ariga K., Terashima T., Kikuchi J.-I. 2007. Preparation and characterization of a novel organic-inorganic nanohybrid “cerasome” formed with a liposomal membrane and silicate surface. *Chem. Eur. J.* **13**, 5272–5281.
 75. Tahara K., Moriuchi T., Tsukui M., Hirota A., Maeno T., Toriyama M., Inagaki N., Kikuchi J.-I. 2013. Ceramic coating of liposomal gene carrier for minimizing toxicity to primary hippocampal neurons. *Chem. Lett.* **42**, 1265–1267.
 76. Denieva Z.G., Budanova U.A., Sebyakin Yu.L. 2019. Synthesis asymmetric lipid-like organosilanes for liposomal nanohybrid cerasomes toward potential medical applications. *Mendeleev Commun.* **29**, 32–34.
 77. Sarychev G.A., Mironova M.S., Budanova U.A., Sebyakin Yu.L. 2017. Design, synthesis and morphology of the organosiloxane hybrid particles based on L-aspartic acid derivatives. *Mendeleev Commun.* **27**, 155–156.
 78. Denieva Z.G., Budanova U.A., Sebyakin Y.L. 2019. Липосомальные гибридные кремний-органические средства доставки лекарственных препаратов. *Изв. вузов. Химия и хим. технология.* **62** (5), 14–23.
 79. Karimi M., Ghasemi A., Zangabad P.S., Rahighi R., S. Basri M.M., Mirshekari H., Amiri M., Pishabad Z.S., Aslani A., Bozorgomid M., Ghosh D., Beyzavi A., Vaseghi A., Aref A.R., Haghani L., Bahrami S., Hamblin M.R. 2016. Smart micro/nanoparticles in stimulus responsive drug/gene delivery systems. *Chem. Soc. Rev.* **45**, 1457–1501.
 80. Xiao W., Zeng X., Lin H., Han K., Jia H.-Z., Zhang X.-Z. 2015. Dual stimuli-responsive multi-drug delivery system for the individually controlled release of anti-cancer drugs. *Chem. Commun.* **51**, 1475–1478.
 81. Manigandan A., Handi V., Sundaramoorthy N.S., Dhandapani R., Radhakrishnan J., Sethuraman S., Subramanian A. 2017. Responsive nanomicellar therapeutic cages for metastatic breast cancer. *Bioconjugate Chem.* **29**, 275–286.
 82. Panchenko P.A., Grin M.A., Fedorova O.A., Zakharko M.A., Pritmov D.A., Mironov A.F., Arkhipova A.N., Fedorov Y.V., Jonusauskas G., Yakubovskaya R.I., Morozova N.B., Ignatova A.A., Feofanov A.V. 2017. A novel bacteriochlorin–styrylnaphthalimide conjugate for simultaneous photodynamic therapy and fluorescence imaging. *Phys. Chem. Chem. Phys.* **19**, 30195–30206.
 83. Liang X., Li X., Yue X., Dai Z. 2011. Conjugation of porphyrin to nanohybrid cerasomes for photodynamic diagnosis and therapy of cancer. *Angew. Chem. Int. Ed Engl.* **50**, 11622–11627.
 84. Li S., Jiang J., Zhu S., Yan Y., Huang G., He D. 2017. Progress of liposomal nanohybrid cerasomes as novel drug nanocarriers. *Gen. Chem.* **3** (4), 194–201.
 85. Bhattarai P., Liang X., Xu Y., Dai Z. 2017. A novel cyanine and porphyrin based theranostic nanoagent for near-infrared fluorescence imaging guided synergistic phototherapy. *J. Biomed. Nanotechnol.* **13**, 1468–1479.
 86. Elzoghby A.O., Hemasa A.L., Freag M.S. 2016. Hybrid protein-inorganic nanoparticles: From tumor-targeted drug delivery to cancer imaging. *J. Control. Release.* **243**, 303–322.
 87. Шарапаев А.И., Мурадова А.Г., Юртов Е.В. 2012. Получение магнитных частиц на основе магнетита и фармацевтически приемлемых полимеров для МРТ-диагностики. *Успехи химии и хим. технологии.* **26** (7), 97–100.
 88. Cao Z., Zhu W., Wang W., Zhang C., Xu M., Liu J., Feng S.-T., Jiang Q., Xie X. 2014. Stable cerasomes for simultaneous drug delivery and magnetic resonance imaging. *Int. J. Nanomed.* **9**, 5103–5116.
 89. Mo R., Sun Q., Li N., Zhang C. 2013. Intracellular delivery and antitumor effects of pH-sensitive liposomes based on zwitterionic oligopeptide lipids. *Biomaterials.* **34** (11), 2773–2786.
 90. Xia G., An Z.Y., Wang Y., Zhao C., Li M., Li Z.; Ma J. 2013. Synthesis of a novel polymeric material folate-poly(2-ethyl-2-oxazoline)-distearoyl phosphatidyl ethanolamine tri-block polymer for dual receptor and pH-sensitive targeting liposome. *Chem. Pharm. Bull.* **61** (4), 390–398.
 91. Drummond D. C., Zignani M., Leroux J. 2000. Current status of pH-sensitive liposomes in drug delivery. *Prog. Lipid Res.* **39** (5), 409–460.
 92. Karanth H., Murthy R. 2007. pH-sensitive liposomes-principle and application in cancer therapy. *J. Pharm. Pharmacol.* **59** (4), 469–483.
 93. Ferreira D.S., Lopes S.C., Franco M.S., Oliveira M.C. 2013. pH-sensitive liposomes for drug delivery in cancer treatment. *Ther. Deliv.* **4** (9), 1099–1123.
 94. Seki K., Tirrell D.A. 1984. pH-dependent complexation of poly(acrylic acid) derivatives with phospholipid vesicle membranes. *Macromolecules.* **17** (9), 1692–1698.

Vesicle Delivery Systems of Biologically Active Compounds: From Liposomes to Cerasomes

Z. G. Denieva¹*, U. A. Budanova¹, Yu. L. Sebyakin¹

¹Russian Technological University (Lomonosov Institute of Fine Chemical Technologies), Moscow, 119571 Russia

*e-mail: zare03@mail.ru

Modern pharmaceuticals aims at creating new drugs with high bioavailability, biocompatibility, and efficiency, as well as with minimal toxic effects. One of the ways to reach this goal is the creation of nanosize particles that carry a small but sufficient dose of a medicinal drug. The diversity of the nanoscale delivery systems al-

lows the design of therapeutic complexes with necessary characteristics. Liposomes are lipid vesicles with a bilayer membrane that possess the required properties for transportation of various drugs and genes. They consist of natural components, which can minimize the toxicity to the cells. In addition, the creation of cationic lipids makes it possible to adjust the properties of the delivery system to certain purposes. Cerasomes were developed to overcome the low stability of liposomes. These are nanoscale spherical aggregates consisting, like liposomes, of a lipid bilayer, but their surface is modified by a silicon polymer network. Cerasomes have all the advantages of liposomes. This review presents basic methods for the synthesis of liposome components and cerasome-forming lipids to create stable delivery systems. Variants of the cationic lipid structures and modifications of cerasome-forming lipids are presented. Potential areas of cerasome application are described, including gene transfection, photodynamic therapy, visualization and diagnosis of diseases using magnetic resonance, and tumor treatment.

Keywords: liposome, cationic liposome, cerasome, drug delivery systems

УДК 57.085.23,616.155.392.8

ПОЯВЛЕНИЕ ПРИЗНАКОВ ДИФФЕРЕНЦИРОВКИ И ПРОВОСПАЛИТЕЛЬНОГО ФЕНОТИПА У КЛЕТОК ОСТРОГО МИЕЛОИДНОГО ЛЕЙКОЗА TNF-1 ПРИ ПОВЫШЕНИИ ИХ TRAIL-РЕЗИСТЕНТНОСТИ В АГРЕГАТАХ *IN VITRO*

© 2021 г. М. И. Кобякова^а, Я. В. Евстратова^а, А. С. Сенотов^а, А. И. Ломовский^а,
В. В. Минайчев^а, А. И. Звягина^а, М. Е. Соловьева^а,
И. С. Фадеева^а, В. С. Акатов^а, Р. С. Фадеев^а, *

^аИнститут теоретической и экспериментальной биофизики РАН,
Пушино, 142290 Россия

*e-mail: fadeevrs@gmail.com

Поступила в редакцию 03.08.2020 г.

После доработки 09.09.2020 г.

Принята к публикации 10.09.2020 г.

Ранее нами было обнаружено значительное повышение TRAIL (TNF α Related Apoptosis Inducing Ligand) резистентности клеток острого миелоидного лейкоза (ОМЛ) в многоклеточных агрегатах *in vitro*, моделирующих расположение лейкозных клеток в костном мозге. В представленной работе мы попытались оценить, может ли быть связано повышение резистентности клеток ОМЛ к цитотоксическому действию TRAIL в многоклеточных агрегатах *in vitro* с запуском механизмов, опосредованных дифференцировкой клеток или приобретением ими провоспалительного фенотипа. Было выполнено исследование фенотипа клеток TNF-1 в агрегированной и дезагрегированной культурах в сравнении с фенотипом дезагрегированной культуры клеток TNF-1, подвергнутой действию факторов, индуцирующих моноцитоподобную дифференцировку или провоспалительный фенотип. Установлено, что повышение TRAIL-резистентности клеток TNF-1 в агрегированной культуре сопровождается появлением у них признаков, характерных для моноцитоподобной дифференцировки и провоспалительного фенотипа. Результаты представляют интерес для разработки подходов подавления TRAIL-резистентности клеток ОМЛ в костном мозге человека.

Ключевые слова: острый миелоидный лейкоз, TRAIL-резистентность опухолевых клеток, многоклеточные агрегаты *in vitro*, дифференцировка, провоспалительный фенотип

DOI: 10.31857/S0233475521010059

ВВЕДЕНИЕ

Выяснение механизмов резистентности опухолевых клеток к противоопухолевой терапии и к иммунному надзору, в частности, к известному индуктору апоптотической рецептор-опосредованной гибели опухолевых клеток, цитокину TRAIL (TNF α Related Apoptosis Inducing Ligand), является одной из центральных задач онкологии. Ранее нами было обнаружено значительное повышение TRAIL-резистентности клеток острого миелоидного лейкоза (ОМЛ) *in vitro* в многоклеточных агрегатах, которые моделируют расположение лейкозных клеток в костном мозге [1, 2].

Список сокращений: TRAIL – TNF α Related Apoptosis Inducing Ligand; ОМЛ – острый миелоидный лейкоз; izTRAIL – рекомбинантная форма тримерного белка TRAIL, включающего внеклеточный домен белка TRAIL и изолейциновый zipper; LPS – липополисахарид бактериальный; ATRA – транс-ретиноевая кислота (All Trans Retinoic Acid).

Повышение TRAIL-резистентности было обнаружено также у клеток различных линий, полученных из солидных опухолей (сарком, карцином, глиом, нейробластом и т.д.), при формировании ими конфлюэнтного монослоя или клеточных сфероидов *in vitro* [3–7]. В связи с этим изучение механизмов повышения резистентности опухолевых клеток, в частности клеток ОМЛ, в многоклеточных агрегатах к цитотоксическому действию лиганда TRAIL представляет интерес для онкологии.

Известно, что в процессе дифференцировки клеток моноцитарного ряда наблюдается активация внутриклеточных сигнальных путей выживания [8]. Так, созревание в моноцитарном направлении у нормальных клеток может сопровождаться повышенной экспрессией антиапоптотических белков, таких как Bcl-XL, XIAP (через активацию транскрипционного фактора STAT3) [9] и/или

Bcl-2 (через активацию сигнального каскада Akt/P13K) [10]. Кроме того, в механизмах защиты моноцитов от индукции клеточной гибели могут участвовать белки теплового шока (Hsp), в частности Hsp27, Hsp70 и Hsp90 [10]. Также в наших публикациях было показано, что снижение экспрессии проапоптотических TRAIL-рецепторов и, соответственно, повышение TRAIL-устойчивости происходит на фоне дифференцировки миелоидных клеток в моноцитарно-макрофагальном направлении как при направленной дифференцировке лейкозных бластов, так и при созревании нормальных моноцитов периферической крови в макрофаги [11]. В то же время известно, что активация клеток моноцитарного ряда липополисахаридом, цитокинами TNF α , IL-1 β , в ходе которой они приобретают провоспалительный фенотип, может также защищать их от гибели. Показано, что активация клеток моноцитарного ряда может сопровождаться активацией транскрипционного фактора NF- κ B и, как следствие, повышенной экспрессией антиапоптотических белков семейств Bcl-2 и IAP [12, 13], а также индукцией секреции провоспалительных цитокинов, таких как TNF α , IL-1 β , -6, -8, -10, -12, -15 [14], способной повысить выживаемость клеток [10]. В связи с этим возникает вопрос, может ли быть связано повышение TRAIL-резистентности клеток ОМЛ в многоклеточных агрегатах *in vitro* с дифференцировкой клеток или с приобретением ими провоспалительного фенотипа. В представленной работе мы попытались ответить на этот вопрос.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Клеточные культуры. В работе использовали клетки остроуго миелоидного лейкоза человека, линии ТНР-1, полученные из Всероссийской коллекции клеточных культур (Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург), а также первичную культуру моноцитов периферической крови человека, полученную от здоровых доноров из ГБУЗ МО МОНИКИ им. М.Ф. Владимирского. Первичная культура моноцитов была получена из мононуклеарной фракции периферической крови с использованием набора MojoSort Human Pan Monocyte Isolation Kit (BioLegend, США) в соответствии с рекомендациями производителя. Моноциты культивировали в среде DMEM/F12 с добавлением 10% эмбриональной телячьей сыворотки (Gibco, США) 80 мкг/мл гентамицина, 24 мкг/мл флуконазола при 37°C и 5% CO₂ в газовой фазе в CO₂-инкубаторе в течение 24 ч. Для прикрепления моноцитов от поверхности культуральной посуды использовали фермент Accutase (Sigma, США). Клетки ТНР-1 культивировали в среде RPMI 1640/F12 с добавлением 20% эмбриональной телячьей сыворотки, 80 мкг/мл гентами-

цина, 24 мкг/мл флуконазола при 37°C и 5% CO₂ в газовой фазе в CO₂-инкубаторе. Клетки линии ТНР-1 спонтанно формировали агрегаты, состоящие из 10–50 клеток через 24 ч после посева 15×10^3 клеток/см².

Получение белка izTRAIL. Для получения тримерной формы белка izTRAIL синтезировали мотив изолейциновой застеежки и ген *izTRAIL*, которые в дальнейшем клонировали в плазмидном векторе pET101 (Novagen, США). Полученным геном трансформировали штамм *E. coli* BL21(DE3) и методом микробного синтеза с последующей очисткой металл-аффинной хроматографии получали тримерную форму izTRAIL с молекулярной массой 80 кДа [15, 16]. Показано, что полученный рекомбинантный белок TRAIL вызывает апоптотическую гибель опухолевых клеток в культуре [16].

Активация провоспалительного фенотипа и моноцитоподобной дифференцировки у клеток ТНР-1. Для активации провоспалительного фенотипа клетки ТНР-1 культивировали в среде DMEM/F12 с добавлением 10% эмбриональной телячьей сыворотки в присутствии 10 мкг/мл липополисахарида (LPS) из *E. coli* O111:B4 (Sigma, США) в течение 24 ч. [17, 18]. Для получения моноцитоподобной дифференцировки клетки ТНР-1 культивировали в среде DMEM/F12 с добавлением 10% эмбриональной телячьей сыворотки в присутствии 1 мкМ АТРА (Sigma, США) в течение 96 ч [19]. Затем клетки трижды отмывали средой DMEM/F12 и использовали для экспериментов.

Формирование многоклеточных агрегатов. Для формирования многоклеточных агрегатов клетки высевали по 5×10^3 клеток в лунку в 100 мкл ростовой среды в 96-луночные планшеты, покрытые 1.5% гелем агарозы толщиной 1 мм (Panreac, Испания) и культивировали в течение 5 дней (120 ч). Формированию агрегатов способствовала U-образная форма агарозного геля на дне лунки. Через 120 ч после посева в каждой лунке наблюдали крупные одиночные агрегаты клеток. Клетки в агрегатах были слабо связаны, и стандартное пипетирование культуры позволяет получить из агрегатов суспензию живых одиночных клеток.

Анализ цитотоксического действия белка izTRAIL. Для анализа цитотоксического действия белка izTRAIL клетки из растущих культур высевали в 96-луночные плоскодонные культуральные планшеты по 5×10^3 клеток в 100 мкл ростовой среды в лунки, дно которых было покрыто слоем 1.5% агарозного геля (Panreac, Испания) толщиной 1 мм, способствующего формированию агрегатов, или без покрытия агарозным гелем. Цитотоксическое действие izTRAIL оценивали по отношению количества живых клеток в опытных и контрольных (без добавления izTRAIL) культурах через 24 ч после добавления izTRAIL. Белок

izTRAIL добавляли через 24 ч после посева клеток в лунки, не покрытые агарозным гелем, или через 120 ч после посева клеток в лунки, покрытые агарозным гелем. Количество живых клеток после инкубации с izTRAIL оценивали по интенсивности восстановления резазурина (Sigma, США). Для этого к клеткам добавляли резазурин в концентрации 30 мкг/мл. Далее клетки инкубировали с красителем в течение 4 ч при 37°C и 5% CO₂ в инкубаторе и измеряли интенсивность флуоресценции при длине волны возбуждения 532 нм и длине волны испускания 590 нм с использованием планшетного спектрофлуориметра Infinite F200 (Tecan, Австрия) [20].

Анализ пролиферативной активности. Для определения пролиферативной активности оценивали распределение клеточной популяции по фазам клеточного цикла, митотическую активность клеток, экспрессию ядерного антигена Ki-67. Для изучения распределения по фазам клеточного цикла, клетки отмывали в фосфатно-солевом буфере (300 g, 5 мин), фиксировали 70% этанолом (24 ч, -20°C), окрашивали йодидом пропидия. Для анализа экспрессии Ki-67 клетки окрашивали моноклональными антителами против Ki-67 человека, конъюгированными с PE (Biolegend, США). Для определения неспецифического связывания клетки окрашивали антителами контроля изотипа PE Mouse IgG1, k isotype Ctrl (Biolegend, США). Для анализа флуоресценции клеток и построения ДНК-цитогрaмм использовали проточный цитометр BD Accuri C6 (BD Bioscience, США). Полученные результаты обрабатывали с использованием программы ModFit LT 4.1. Митотический индекс и жизнеспособность оценивали, окрашивая суспензию клеток в культуральной среде флуоресцентными ядерными красителями Hoechst 33342 и йодидом пропидия в концентрации 1 мкг/мл и подсчитывая число живых, погибших, а также митотических клеток с помощью флуоресцентного микроскопа DM 6000 (Leica, Германия), используя камеры Горяева [16, 21].

Имунофенотипирование клеток. Клетки для иммунофенотипирования отмывали в буферном растворе для окрашивания клеток (Biolegend, США) при 300 g в течение 5 мин, окрашивали их, используя панель конъюгированных с FITC человеческих моноклональных антител против CD11b (Biolegend США), CD11c, CD14 и CD45 (Sigma, США), CD163 и CD68 (BD Bioscience, США), а также конъюгированных с PE моноклональных человеческих антител CD284 и HLA-DR (Biolegend США). Для определения неспецифического связывания клетки окрашивали антителами-контролями изотипов: FITC Mouse IgG1, k isotype Ctrl, PE Mouse IgG1 k isotype и PE Mouse IgG2a k isotype (Biolegend, США). Окрашивание проводили при комнатной температуре в темноте в течение 30 мин. После окрашивания клетки фикси-

ровали 2% раствором параформальдегида (Panreac, Испания). Измерение флуоресценции выполняли с помощью проточного цитометра BD Accuri C6.

Определение гранулярности цитоплазмы. Определение гранулярности цитоплазмы клеток проводили по боковому рассеянию света (SSC) на проточном цитометре Accuri C6.

Анализ фагоцитарной активности клеток. Фагоцитарную активность клеток оценивали после 2 ч инкубации их в CO₂-инкубаторе в ростовой среде с добавлением в нее 1 мг/мл pHrodo Green *E. coli* (Thermo Fisher Scientific, Германия). Для контроля неспецифического окрашивания клетки инкубировали с 10 мкг/мл цитохалазина D (Sigma, США) в течение 30 мин в CO₂-инкубаторе, затем добавляли 1 мг/мл pHrodo Green *E. coli* и далее инкубировали в течение 2 ч. Измерение флуоресценции осуществляли с помощью проточного цитометра BD Accuri C6. Оценку фагоцитарной активности проводили с использованием показателей фагоцитарного числа и индекса. Фагоцитарный индекс отражает процент клеток в популяции, способных к поглощению бактерий (оценивали по числу флуоресцентных клеток в процентах относительно общего числа клеток). Фагоцитарное число – среднее число бактерий, поглощенное одним фагоцитом (оценивали по средней интенсивности флуоресценции клеток, способных к фагоцитозу) [22].

Оценка внутриклеточного содержания оксида азота (NO). Для оценки внутриклеточной продукции NO клетки инкубировали в ростовой среде в течение 40 мин после добавления в нее 5 мкМ флуоресцентного NO-зонда DAF-FM DA (Thermo Fisher Scientific, Германия). Далее клетки отмывали в ростовой среде (300 g, 5 мин) и инкубировали в ней в течение 30 мин. Все процедуры инкубации выполняли при 37°C и 5% CO₂. Интенсивность флуоресценции клеток измеряли, используя проточный цитофлуориметр BD Accuri C6 [22].

Статистический анализ. Результаты представляли в виде среднего \pm стандартное отклонение ($M \pm SD$). Опыты проводили не менее чем в трех повторах ($n \geq 3$). Статистическую значимость отличия определяли с помощью одностороннего ANOVA с последующим множественным сравнением Холма–Сидака, $p < 0.05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Клетки ТНР-1 приобретают в агрегатах in vitro такую же TRAIL-резистентность, как после воздействия дифференцирующего фактора АТРА или провоспалительного стимула LPS

Мы сравнили TRAIL-резистентность клеток ОМЛ линии ТНР-1 в многоклеточных агрегатах (1), после индукции у этих клеток моноцитоподоб-

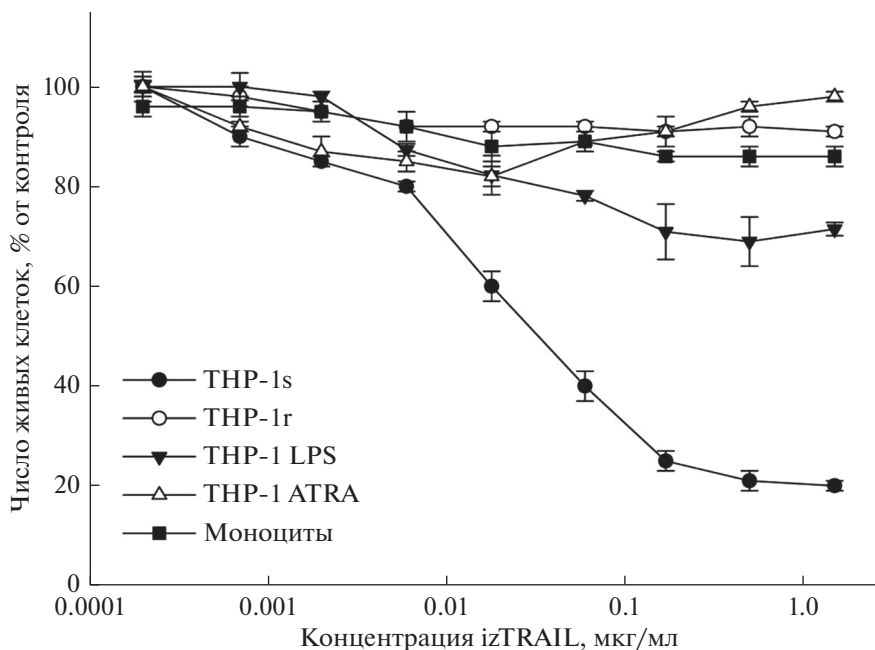


Рис. 1. Цитотоксическое действие рекомбинантного белка izTRAIL на клетки THP-1, культивируемые 24 ч в планшете (нет агрегата, THP-1s), либо 120 ч в агрегате на агарозном геле (THP-1r), либо предварительно обработанные ATRA (1 мкМ, 96 ч) и затем культивируемые 24 ч (нет агрегата) (THP-1 ATRA), либо предварительно обработанные LPS (10 мкг/мл, 24 ч) и затем культивируемые 24 ч (нет агрегата) (THP-1 LPS) и моноциты крови человека (нет агрегата).

ной дифференцировки трансретиновой кислотой ATRA (2), после активации в этих клетках провоспалительного фенотипа посредством LPS (3) и TRAIL-резистентность моноцитов периферической крови человека (4) (рис. 1).

Было установлено, что как после LPS-индуцированной активации провоспалительного фенотипа у клеток THP-1 (THP-1 LPS), так и после индукции в них моноцитоподобной дифференцировки транс-ретиновой кислотой (THP-1 ATRA) происходило формирование их TRAIL-резистентности. Эти клетки в основном (около 100% после ATRA и около 80% после LPS) были резистентными к цитотоксическому действию izTRAIL даже при его концентрации 1.5 мкг/мл, так же как клетки THP-1 в агрегатах (около 100 тысяч) на агарозном геле (далее THP-1r) и моноциты периферической крови человека. Однако эти же клетки THP-1 были высокочувствительными к действию izTRAIL через 24 ч после посева 5 тысяч клеток в лунку 96-луночного планшета, когда не было образования больших агрегатов (THP-1s). Величина IC₅₀ белка izTRAIL (концентрация агента, при количестве клеток в опыте в 2 раза меньше, чем в контроле) для клеток THP-1s равна 2.1 ± 0.5 нг/мл, а доля TRAIL-резистентной субпопуляции в этом случае составляла 20% (“полочка” при концентрациях izTRAIL около 1 мкг/мл, рис. 1).

Клетки THP-1r, как и клетки THP-1s, пролиферировали. Процент клеток THP-1r в сравнении

с THP-1s достоверно увеличивался в G₁/G₀-фазе ($p \leq 0.01$), уменьшался в S-фазе ($p \leq 0.02$) и не отличался достоверно в G₂/M- и M-фазах (рис. 2). Процент клеток THP-1s в M-фазе составлял $2.0 \pm 0.3\%$. Видно, что отличия были хоть и достоверными, но небольшими, клетки THP-1r, как и THP-1s, оставались в клеточном цикле и пролиферировали. Пролиферация клеток THP-1r подтверждается экспрессией в них Ki-67 у $99 \pm 1\%$ клеток, как и у клеток THP-1s. В культуре THP-1r $96 \pm 4\%$ клеток оставались живыми, как и клетки THP-1s. Процент живых клеток в культурах THP-1 ATRA, THP-1 LPS и моноцитов был таким же, как у THP-1s. Процент клеток THP-1 LPS в сравнении с THP-1s достоверно уменьшался в G₁/G₀-фазе, S-фазе ($p < 0.05$), но не в M-фазе и достоверно увеличился в G₂/M-фазе ($p \leq 0.02$), т.е. клетки оставались в клеточном цикле и пролиферировали. Процент клеток THP-1 ATRA в сравнении с THP-1s достоверно и значительно увеличивался в G₁/G₀-фазе ($p \leq 0.01$), уменьшался в S-фазе ($p \leq 0.01$) и не отличался достоверно в M- и G₂/M-фазах ($p > 0.05$) клеточного цикла, т.е. клетки оставались в клеточном цикле, пролиферировали, но дифференцировочный эффект ATRA частично подавлял пролиферацию.

Таким образом, в многоклеточных агрегатах *in vitro* значительно повышается резистентность клеток THP-1 к токсическому действию TRAIL на фоне сохранения их пролиферативной актив-

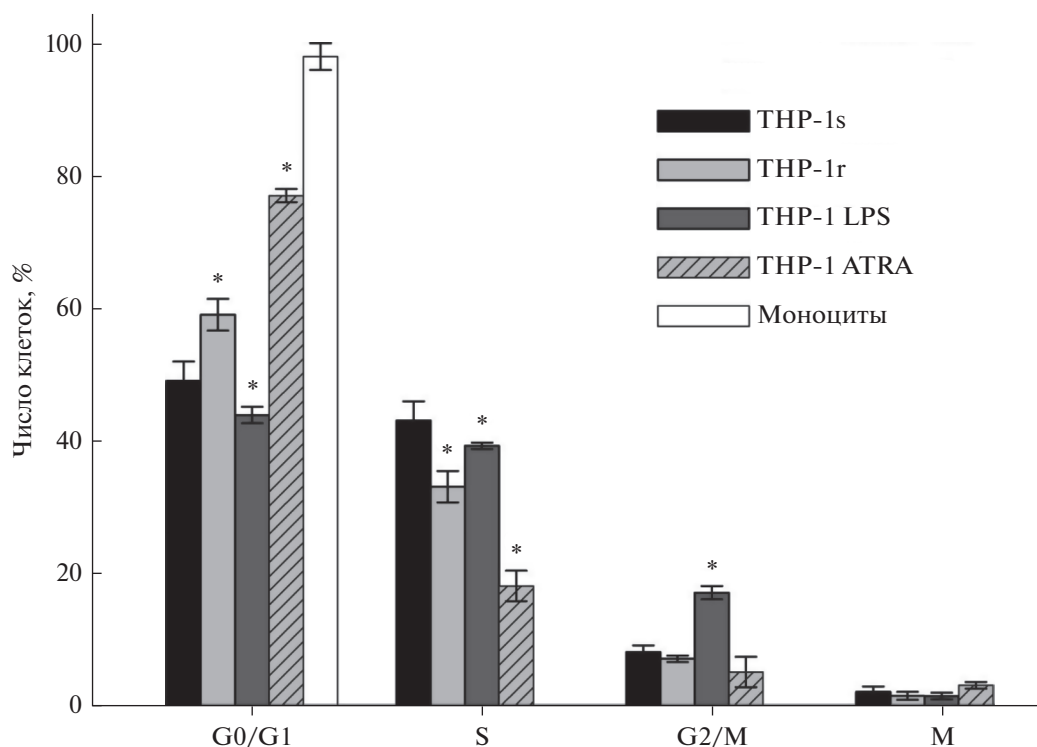


Рис. 2. Распределение по фазам клеточного цикла клеток THP-1s, THP-1r, THP-1 ATRA, THP-1 LPS и моноцитов. По оси ординат – процент клеток, находящихся в отмеченной фазе. * $p < 0.05$ в сравнении с THP-1s.

ности, что также выявляется при воздействии на эти клетки факторов, способных вызывать провоспалительный фенотип (LPS) или монобластоподобную дифференцировку (ATRA). Полученные результаты дают основание предположить, что формирование TRAIL-резистентности клеток THP-1 в многоклеточных агрегатах сопряжено с приобретением ими провоспалительного фенотипа и признаков моноцитоподобной дифференцировки.

Исследование фенотипа клеток THP-1 в многоклеточных агрегатах *in vitro*

Для изучения изменений фенотипа клеток ОМЛ THP-1 в многоклеточных агрегатах THP-1r в сравнении с THP-1s выполняли анализ экспрессии кластеров дифференцировки (CD) этих клеток (иммунофенотипирование), оценивали их фагоцитарную активность, гранулярность цитоплазмы, а также продукцию внутриклеточного оксида азота (NO).

Имунофенотипирование TRAIL-чувствительных и TRAIL-резистентных клеток ОМЛ

Имунофенотипирование клеток проводили по 9 основным маркерам, характерным для моноцитарной дифференцировки и провоспалитель-

ного клеточного фенотипа [23, 24], таким как: интегрин αM (CD11b); интегрин αX (CD11c); ко-рецептора для липополисахарида (CD14); PTPRC (CD45); Fc- γ рецептор 1 (CD64); макросиалин (CD68); рецептор для гаптоглобина (CD163); толл-подобный рецептор 4 (CD284); МНС-II (HLA-DR). Созревание монобластов в моноциты характеризуется появлением и увеличением экспрессии таких рецепторов, как CD11b, HLA-DR, CD163, а также рецепторов CD14, CD284, CD64, CD68, необходимых для распознавания патогенных молекул и для фагоцитоза. В свою очередь, активация клеток моноцитарного ряда характеризуется появлением и увеличением экспрессии таких рецепторов, как CD11b, CD11c, ответственных за адгезию, HLA-DR и CD68 [25–27]. В табл. 1 представлены результаты иммунофенотипирования клеток THP-1s, THP-1r, THP-1 LPS, THP-1 ATRA и моноцитов.

Из табл. 1 видно, что у TRAIL-резистентных клеток THP-1r увеличен процент субпопуляций, несущих на поверхности CD68 и HLA-DR ($p \leq 0.01$), а также появились субпопуляции, несущие интегрин αM (CD11b) и интегрин αX (CD11c) ($24 \pm 1\%$ и $35 \pm 1\%$ соответственно) в сравнении с TRAIL-чувствительными клетками THP-1s через 24 ч после посева. У клеток THP-1 LPS, THP-1 ATRA и моноцитов были также выявлены популяции клеток, несущие интегрин αM

Таблица 1. Иммунофенотипирование TRAIL-чувствительных (THP-1s) и TRAIL-резистентных (THP-1r, THP-1 LPS и THP-1 ATRA) клеток THP-1 и моноцитов периферической крови человека

Маркер	Процент клеток популяции, экспрессирующих CD-маркеры				
	THP-1s	THP-1r	THP-1 LPS	THP-1 ATRA	моноциты
Интегрин α M, (CD11b)	0	24 \pm 1	74 \pm 3	88 \pm 1	93 \pm 1
Интегрин α X, (CD11c)	0	35 \pm 1	28 \pm 2	48 \pm 3	90 \pm 2
Ко-рецептор для LPS (CD14)	0	0	11 \pm 1	26 \pm 2	81 \pm 2
PTPRC (CD45)	96 \pm 1	97 \pm 2	99 \pm 1	99 \pm 1	99 \pm 1
Fc- γ рецептор 1 (CD64)	95 \pm 2	96 \pm 1	57 \pm 2	99 \pm 1	85 \pm 1
Макросиалин (CD68)	71 \pm 1	97 \pm 1	97 \pm 1	94 \pm 4	99 \pm 1
Рецептор для гаптоглобина (CD163)	0	0	0	0	75 \pm 1
TLR4 (CD284)	0	0	14 \pm 4	72 \pm 9	49 \pm 6
MHC II (HLA-DR)	21 \pm 1	58 \pm 2	69 \pm 3	53 \pm 5	73 \pm 1

Примечание. Данные представлены в виде среднего \pm стандартное отклонение для трех независимых экспериментов.

(CD11b) и интегрин α X (CD11c), а также показан высокий процент клеток в популяции, экспрессирующих макросиалин (CD68) и MHC II (HLA-DR). В свою очередь, в популяции клеток THP-1r не было выявлено CD14 и CD284-положительных клеток, наличие которых было показано для популяции клеток THP-1 ATRA, моноцитов и THP-1 LPS, а также CD163-положительных клеток, наличие которых выявляется в популяции моноцитов (табл. 1).

В целом полученные результаты указывают, что клетки THP-1r приобретают некоторые иммунофенотипические признаки схожие с иммунофенотипом клеток THP-1 LPS, и клеток THP-1 дифференцированных посредством ATRA в моноцитоподобный фенотип.

Сравнительный анализ гранулярности в TRAIL-резистентных клетках THP-1r и в TRAIL-чувствительных клетках THP-1s

Известно, что дифференцировка монобластов в промоноциты и моноциты сопровождается изменением гранулярности их цитоплазмы [28, 29]. Для оценки гранулярности цитоплазмы клеток использовали показатель бокового светорассеяния (рассеяние света под прямым углом, SSC).

На рис. 3 видно, что значение интенсивности SSC у клеток THP-1r было ниже, чем у клеток THP-1s, как и у клеток THP-1 ATRA ($p < 0.01$), и достоверно не отличалась от таковой для моноцитов. Гранулярность клеток THP-1 LPS достоверно увеличилась в сравнении с THP-1s.

Таким образом, установлено, что гранулярность цитоплазмы клеток THP-1r уменьшалась относительно клеток THP-1s, как и у дифференцированных клеток THP-1 ATRA. В то же время гранулярность цитоплазмы клеток THP-1 LPS,

активированных провоспалительным агентом, возрастала в сравнении с THP-1s.

Сравнительный анализ фагоцитарной активности TRAIL-резистентных клеток THP-1r и TRAIL-чувствительных клеток THP-1s

Основная функция зрелых клеток моноцитарного ряда заключается в способности к фагоцитозу. Так, при созревании промоноцитов в моноциты, промоноциты начинают экспрессировать рецепторы, важные для распознавания патогенов и реализации фагоцитоза [30].

Обнаружили, что фагоцитарное число клеток THP-1r, культивируемых на агарозе 120 ч в составе многоклеточных агрегатов, не отличалось от фагоцитарного числа клеток THP-1s, культивируемых на пластике 24 ч, но было выше, чем у клеток THP-1 ATRA и THP-1 LPS (рис. 4a). Моноциты периферической крови обладали самым высоким показателем фагоцитарного числа. В свою очередь, относительный фагоцитарный индекс клеток THP-1r не отличался от фагоцитарного индекса клеток THP-1s и был достоверно ниже, чем у клеток THP-1 ATRA, моноцитов и клеток THP-1 LPS (рис. 4б).

Таким образом, показано, что фагоцитарная активность (фагоцитарный индекс и фагоцитарное число) клеток THP-1r в составе многоклеточных агрегатов, обладающих TRAIL-резистентным фенотипом, не изменялась относительно клеток THP-1s, чувствительных к действию *iz*TRAIL, и данные характеристики отличались от таковых для THP-1 ATRA, THP-1 LPS и моноцитов, которые также обладали TRAIL-резистентным фенотипом. Следовательно, повышение TRAIL-резистентности клеток THP-1 в агрегатах происходит независимо от изменения фагоцитарной активности.

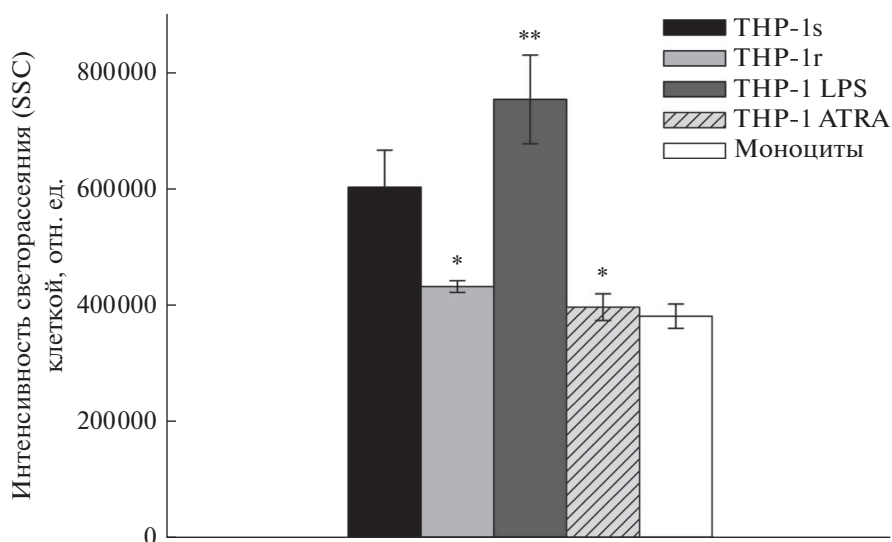


Рис. 3. Сравнительный анализ гранулярности клеток THP-1s, THP-1r, THP-1 ATRA, THP-1 LPS и моноцитов. По оси ординат – среднее значение интенсивности бокового светорассеяния клеткой в отн. ед. (SSC). * $p < 0.01$; ** $p < 0.05$ в сравнении с THP-1s.

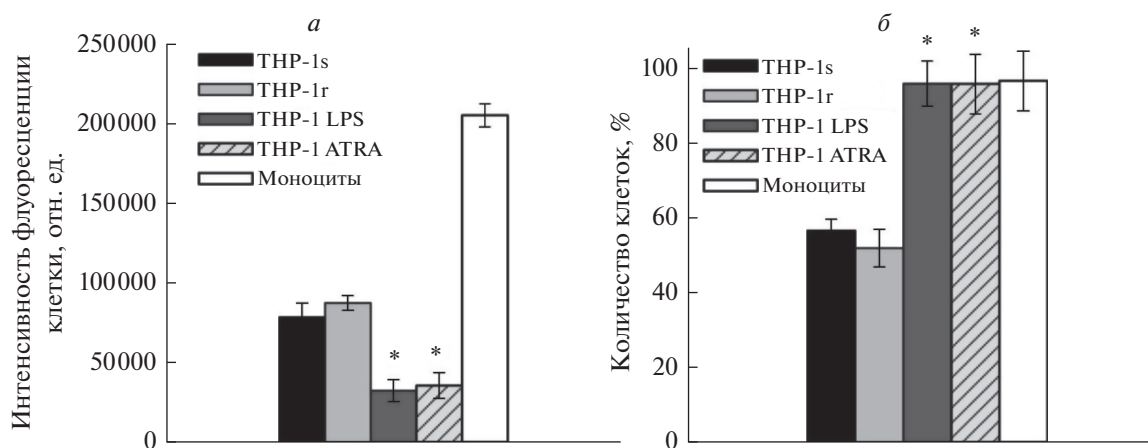


Рис. 4. Сравнительный анализ фагоцитарной активности клеток THP-1s, THP-1r, THP-1 ATRA, THP-1 LPS и моноцитов. По оси ординат – средняя интенсивность флуоресценции клетки (фагоцитарное число, *a*) и процент фагоцитирующих клеток (фагоцитарный индекс, *б*). Клетки фагоцитировали pHrodo Green *E. coli*. * $p < 0.01$ в сравнении с THP-1s.

Сравнительный анализ внутриклеточной продукции оксида азота у TRAIL-чувствительных и TRAIL-резистентных клеток ОМЛ in vitro

Известно, что оксид азота (NO) может способствовать индукции апоптоза в злокачественно трансформированных клетках или же сенсibilизировать их к действию противоопухолевых препаратов [31–33], а снижение продукции NO в опухолевых клетках может способствовать их лекарственной устойчивости [34].

Обнаружили, что, у клеток THP-1r происходило достоверное ($p < 0.01$) уменьшение уровня внутриклеточного NO в сравнении с клетками THP-1s, так же как у клеток THP-1 ATRA ($p < 0.01$)

и THP-1 LPS ($p < 0.05$). Для сравнения, уровень NO в моноцитах был близок к тому, что в клетках THP-1r и THP-1 ATRA (рис. 5).

Таким образом, приобретение TRAIL-резистентности клетками THP-1 (THP-1r, THP-1 ATRA, THP-1 LPS) осуществлялось на фоне уменьшения внутриклеточного уровня NO в сравнении с клетками THP-1s, чувствительными к действию izTRAIL.

ОБСУЖДЕНИЕ

Полученные в работе результаты показали, что клетки ОМЛ THP-1 приобретают резистентность

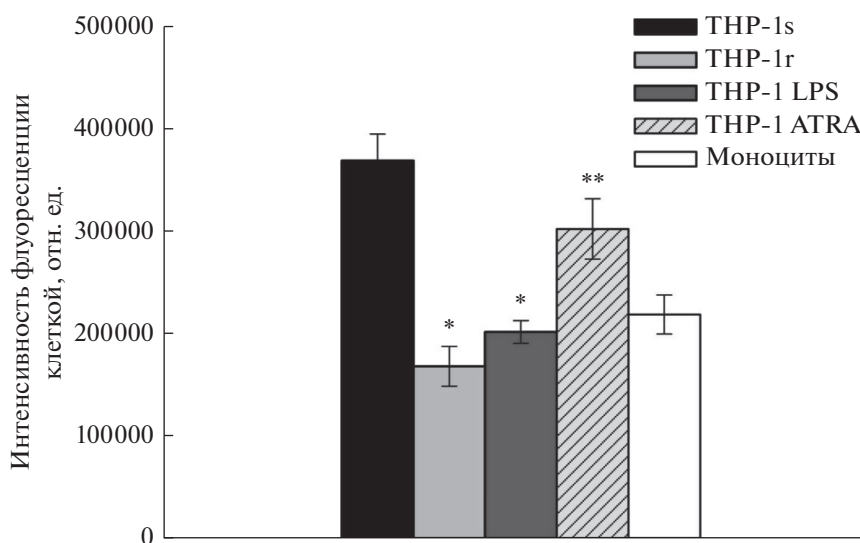


Рис. 5. Сравнительный анализ продукции оксида азота в клетках THP-1s, THP-1r, THP-1 ATRA, THP-1 LPS и в моноцитах. Клетки нагружали NO-зондом DAF-FM DA. По оси ординат – средняя интенсивность флуоресценции клеток. * $p < 0.01$ и ** $p < 0.05$ в сравнении с THP-1s.

к TRAIL-опосредованной гибели в многоклеточных агрегатах *in vitro*, так же как после воздействия факторов, способных вызывать моноцитоподобную дифференцировку (ATRA) или провоспалительный фенотип (LPS), сохраняя при этом пролиферативную активность. Основываясь на этих данных, можно предположить, что формирование TRAIL-резистентности клеток THP-1 в многоклеточных агрегатах осуществляется по механизмам, сопряженным с моноцитоподобной дифференцировкой, с провоспалительной активацией. Возникает вопрос, каким образом культивирование клеток в составе агрегатов может приводить их к таким изменениям? Можно предположить, что изменение состояния клеток THP-1 в агрегатах связано с адгезивными и паракринными взаимодействиями, способными активировать внутриклеточные сигнальные пути. Существенная роль адгезивных взаимодействий в повышении TRAIL-резистентности клеток THP-1 в агрегатах вызывает сомнение, поскольку их адгезия слабая и агрегаты легко распадаются на отдельные клетки при слабом перемешивании среды. С другой стороны, не вызывает сомнения, что в агрегатах усиливается паракринное взаимодействие клеток, межклеточная сигнализация секретруемыми ими молекулами. Тот факт, что клетки в исследуемых агрегатах продолжали пролиферировать, говорит о достаточном для их роста поступлении в агрегаты низкомолекулярных компонентов питания, кислорода, об эффективном выходе из них низкомолекулярных метаболитов (лактат, аммоний и др.). Однако все это не исключает усиления в агрегатах межклеточной сигнализации секретруемыми цитокинами и

низкомолекулярными сигнальными молекулами, действующими на клеточные рецепторы, что могло вызвать у клеток THP-1 повышение TRAIL-резистентности и формирование некоторых признаков, характерных для моноцитоподобной дифференцировки и провоспалительной активации. Безусловно, можно говорить лишь о частичном совпадении изменений у клеток THP-1 в агрегатах с признаками дифференцировки или провоспалительной активации, и это хорошо видно по данным иммунофенотипирования клеток, по морфологическому признаку (гранулярность цитоплазмы), по функциональному признаку (фагоцитарная активность). Однако наличие некоторых совпадений, в том числе по уровню оксида азота может указывать на общие процессы в сравниваемых изменениях клеток THP-1, в частности, на необходимость повышения выживаемости клеток. Необходимость повышения выживаемости клеток в агрегатах *in vitro* связана с ограничениями диффузионного переноса компонентов питания и метаболитов в них, что ярко проявляется в сфероиде [35]. Такая же необходимость может возникать *in vivo* в связи с нарушениями кровообращения, что, по всей видимости, и сформировало у клеток такой адаптационный механизм.

Возникает вопрос, какое отношение феномен повышения TRAIL-резистентности клеток ОМЛ в агрегатах *in vitro* может иметь к состоянию лейкозных клеток в костном мозге? В костном мозге клетки ОМЛ расположены близко друг к другу, т.е. в агрегированном состоянии. Воздействие химиотерапевтическими препаратами вызывает гибель клеток ОМЛ в периферической крови, а в

костном мозге значительная часть их остается живыми и определяет формирование рецидива. Поэтому изучение механизмов повышения резистентности клеток ОМЛ к повреждающим воздействиям, в частности TRAIL-резистентности в агрегатах *in vitro*, представляет интерес для разработки таргетных средств лечения лейкозов, подавления резистентности опухолевых клеток в костном мозге.

Наши результаты, в целом, указывают на то, что повышение TRAIL-резистентности клеток ОМЛ в агрегатах может быть сопряжено не только с путями активации, дифференцировки, способствующими повышению выживаемости клеток, но и с активацией иных путей выживаемости, на что указывает снижение продукции NO в клетке, которое, согласно литературным данным, может способствовать повышению резистентности опухолевых клеток.

Исследование выполнено при финансовой поддержке РФФИ в рамках научных проектов (20-34-90062, 20-34-90061, 20-315-90014, 20-315-90101) и при финансовой поддержке стипендии Президента РФ (СП-606.2019.4, СП-608.2019.4, СП-1275.2019.4).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Захаров С.Г., Голенков А.К., Митина Т.А., Луцкая Т.Д., Белоусов К.А., Фадеев Р.С., Соловьева М.Е., Сенотов А.С., Акатов В.С. 2014. Повышение лекарственной устойчивости клеток острого миелобластного лейкоза в многоклеточных агрегатах *in vitro*. *Альманах клин. мед.* **31**, 11–16.
- Фадеев Р.С., Соловьева М.Е., Слядовский Д.А., Захаров С.Г., Фадеева И.С., Сенотов А.С., Долгих Н.В., Голенков А.К., Акатов В.С. 2015. Клеточная агрегация повышает лекарственную устойчивость клеток острого миелоидного лейкоза. *Биол. мембраны.* **32** (2), 125–134.
- Ishiguro T., Ohata H., Sato A., Yamawaki K., Enomoto T., Okamoto K. 2017. Tumor-derived spheroids: Relevance to cancer stem cells and clinical applications. *Cancer Sci.* **108** (3), 283–289.
- Rodrigues T., Kundu B., Silva-Correia J., Kundu S.C., Oliveira J.M., Reis R.L., Corrello V.M. 2018. Emerging tumor spheroids technologies for 3D *in vitro* cancer modeling. *Pharmacol Ther.* **184**, 201–211.
- Riffle S., Pandey R.N., Albert M., Hegde R.S. 2017. Linking hypoxia, DNA damage and proliferation in multicellular tumor spheroids. *BMC Cancer.* **17** (1), E338.
- Hamilton G., Rath B. 2019. Applicability of tumor spheroids for *in vitro* chemosensitivity assays. *Expert Opin. Drug Metab. Toxicol.* **15** (1), 15–23.
- Abe M., Havre P.A., Urasaki Y., Ohnuma K., Morimoto C., Dang L. H., Dang N. H. 2011. Mechanisms of confluence-dependent expression of CD26 in colon cancer cell lines. *BMC Cancer.* **11**, 1–10.
- Gonzalez-Mejia M.E., Doseff A.I. 2009. Regulation of monocytes and macrophages cell fate. *Front. Biosci. (Landmark Ed).* **14**, 2413–2431.
- Miranda M., Dyer K., Grandis J. Johnson D.E. 2003. Differential activation of apoptosis regulatory pathways during monocytic vs granulocytic differentiation: A requirement for Bcl-XL and XIAP in the prolonged survival of monocytic cells. *Leukemia.* **17**, 390–400.
- Geissmann F., S. Jung, D. R. 2003. Littman: Blood monocytes consist of two principal subsets with distinct migratory properties. *Immunity.* **19**, 71–82.
- Евстратова Я.В., Кобякова М.И., Новикова В.В., Сенотов А.С., Акатов В.С., Фадеев Р.С. 2019. Моноцитарно-макрофагальная дифференцировка подавляет экспрессию проапоптотических рецепторов к Apo2L/TRAIL и повышает резистентность к TRAIL-индуцированному апоптозу. *Биофизика.* **64** (5), 729–731.
- Konopleva M., Tabe Y., Zeng Z., Andreeff M. 2009. Therapeutic targeting of microenvironmental interactions in leukemia: Mechanisms and approaches. *Drug Resist. Updat.* **12** (4–5), 103–113.
- Wilson K., Case M., Minto L., Bailey S., Bown N., Jesson J., Lawson S., Vormoor J., Irving J. 2010. Flow minimal residual disease monitoring of candidate leukemic stem cells defined by the immunophenotype, CD34+CD38lowCD19+ in B-lineage childhood acute lymphoblastic leukemia. *Haematologica.* **95** (4), 679–683.
- Konopleva M.Y., Jordan C.T. 2011. Leukemia stem cells and microenvironment: Biology and therapeutic targeting. *J. Clin. Oncol.* **29** (5), 591–599.
- Фадеев Р.С., Чеканов А.В., Долгих Н.В., Акатов В.С. 2012. Резистентность опухолевых клеток к TRAIL-индуцированному апоптозу в конфлюентных культурах. *Биол. мембраны.* **29** (6), 433–441.
- Fadeev R., Chekanov A., Solovieva M., Bezborodova O., Nemtsova E., Dolgikh N., Fadeeva I., Senotov A., Kobyakova M., Evstratova Y., Yakubovskaya R., Akatov V. 2019. Improved anticancer effect of recombinant protein iZTRAIL combined with sorafenib and peptide iRGD. *Int. J. Mol. Sci.* **20** (3), E525.
- Tucureanu M.M., Rebleanu D., Constantinescu C.A., Deleanu M., Voicu G., Butoi E., Calin M., Manduteanu I. 2017. Lipopolysaccharide-induced inflammation in monocytes/macrophages is blocked by liposomal delivery of Gi-protein inhibitor. *Int. J. Nanomedicine.* **13**, 63–76.
- Chanput W., Mes J., Vreeburg R.A.M., Savelkoul H.F.J., Wichers H.J. 2010. Transcription profiles of LPS-stimulated THP-1 monocytes and macrophages: a tool to study inflammation-modulating effects of food-derived compounds. *Food Funct.* **1**, 254–261.
- Drach J., Lopez-Berestein G., Queen T., Andreeff M., Mehta K. 1993. Induction of differentiation in myeloid leukemia cell lines and acute promyelocytic leukemia cells by liposomal all-trans-retinoic acid. *Cancer Res.* **53** (9), 2100–2104.
- Фадеев Р.С., Соловьева М.Е., Слядовский Д.А., Захаров С.Г., Фадеева И.С., Сенотов А.С., Голенков А.К., Акатов В.С. 2015. Ингибирование активации NF- κ B снижает устойчивость клеток острого

- миелоидного лейкоза к TRAIL-индуцированному апоптозу в многоклеточных агрегатах. *Биофизика*. **60** (6), 1146–1150.
21. Solovieva M.E., Soloviev V.V., Faskhutdinova A.A., Kudryavtsev A.A., Akatov V.S. 2007. Prooxidant and cytotoxic effect of N-acetylcysteine and glutathione in combination with vitamin B12b. *Cell and Tissue*. **1**, 40–49.
 22. Кобякова М.И., Евстратова Я.В., Сенотов А.С., Ломовский А.И., Новикова В.В., Краснов К.С., Фадеева И.С., Акатов В.С., Фадеев Р.С. 2020. Исследование макрофагальной дифференцировки клеток острого миелоидного лейкоза в многоклеточных агрегатах. *Биофизика*. **65** (2), 320–325.
 23. Gordon S., Taylor P.R. 2005. Monocyte and macrophage heterogeneity. *Nat. Rev. Immunol.* **5** (12), 953–964.
 24. Kapellos T. S., Bonaguro L., Gemünd I., Reusch N., Saglam A., Hinkley E.R., Schultze J. L. 2019. Human monocyte subsets and phenotypes in major chronic inflammatory diseases. *Front. Immunol.* **10**, E2035.
 25. Ziegler-Heitbrock L., Ancuta P., Crowe S., Dalod M., Grau V., Hart D.N., Leenen P.J.M., Liu Y.J., MacPherson G., Randolph G.J., Scherberich J., Schmitz J., K. Shortman, Sozzani S., Strobl H., Zembala M., Austyn J. M., Lutz M. B. 2010. Nomenclature of monocytes and dendritic cells in blood. *Blood*. **116**, 74–80.
 26. Cifarelli V., Libman I.M., Deluca A., Becker D., Trucco M., Luppi P. 2007. Increased expression of monocyte CD11b (mac-1) in overweight recent-onset type 1 diabetic children. *Rev. Diabet. Stud.* **4** (2), 112–117.
 27. Chistiakov D.A., Killingsworth M.C., Myasoedova V.A., Orekhov A.N., Bobryshev Y.V. 2017. CD68/macrosialin: Not just a histochemical marker. *Lab. Investigation*. **97**, 4–13.
 28. Goldspink G. 1974. *Differentiation and Growth of Cells in Vertebrate Tissues*. 1st ed. London: Chapman and Hall Inc. 323 p.
 29. Paulette. 2009. Wintrobe's Clinical Hematology. *J. Am. Med. Assoc.* **302** (22), 2488–2493.
 30. Mukherjee R., Barman P.K., Thatoi P.K., Tripathy R., Das B.K., Ravindran B. 2015. Non-Classical monocytes display inflammatory features: Validation in sepsis and systemic lupus erythematosus. *Sci. Rep.* **5**, E13886.
 31. Xie K., Huang S., Dong Z., Juang S.H., Gutman M., Xie Q.W., Nathan C., Fidler I.J. 1995. Transfection with the inducible nitric oxide synthase gene suppresses tumorigenicity and abrogates metastasis by K-1735 murine melanoma cells. *J. Exp. Med.* **181**, 1333–1343.
 32. Xu L., Xie K., Fidler I.J. 1998. Therapy of human ovarian cancer by transfection with the murine interferon β gene: Role of macrophage-inducible nitric oxide synthase. *Hum. Gene Ther.* **9**, 2699–2708.
 33. Qiu M., Chen L., Tan G., Ke L., Zhang S., Chen H., Liu J. 2015. A reactive oxygen species activation mechanism contributes to JS-K-induced apoptosis in human bladder cancer cells. *Sci. Rep.* **5**, E15104.
 34. Rapozzi V., Della P. E., Bonavida B. 2015. Dual roles of nitric oxide in the regulation of tumor cell response and resistance to photodynamic therapy. *Redox Biol.* **6**, 311–317.
 35. Lin R.Z., Chang H.Y. 2008. Recent advances in three-dimensional multicellular spheroid culture for biomedical research. *Biotechnol.* **3**, 1172–1184.

Appearance of Signs of Differentiation and Pro-inflammatory Phenotype in Acute Myeloid Leukemia Cells THP-1 with Cell Aggregation-Induced Increase of TRAIL Resistance *In Vitro*

M. I. Kobyakova¹, Ya. V. Evstratova¹, A. S. Senotov¹, A. I. Lomovsky¹, V. V. Minaichev¹,
A. I. Zvyagina¹, M. E. Solovieva¹, I. S. Fadeeva¹, V. S. Akatov¹, R. S. Fadeev¹, *

¹*Institute of Theoretical and Experimental Biophysics, Russian Academy of Sciences, Pushchino, Moscow oblast, 142290 Russia*

*e-mail: fadeevrs@gmail.com

Earlier we found that in multicellular aggregates of cultured acute myelogenous leukemia (AML) cells, mimicking *in vitro* the location of leukemic cells in the bone marrow, the resistance of cells to the TNF α -related apoptosis-inducing ligand (TRAIL) increases significantly. In this work, we tried to assess whether an increase in the TRAIL resistance of AML THP-1 cells in multicellular aggregates *in vitro* is associated with triggering mechanisms mediated by cell differentiation or acquisition of the pro-inflammatory phenotype. The phenotype of THP-1 cells in aggregated and disaggregated cultures was compared with the phenotype of the disaggregated culture of THP-1 cells exposed to factors inducing monocyte-like differentiation or a pro-inflammatory phenotype. It was found that the increase in TRAIL resistance of aggregated THP-1 cells is accompanied by the appearance of signs characteristic of monocyte-like differentiation and a pro-inflammatory phenotype. The results are of interest for the development of the approaches to suppressing TRAIL resistance of AML cells in the human bone marrow.

Keywords: acute myelogenous leukemia, TRAIL resistance of tumor cells, multicellular aggregates *in vitro*, differentiation, pro-inflammatory phenotype

УДК 577.112.7

ПРИМЕНЕНИЕ SPR-БИОСЕНСОРА ДЛЯ АНАЛИЗА БЕЛОК-БЕЛКОВЫХ ВЗАИМОДЕЙСТВИЙ В ВОДНОЙ СРЕДЕ И БИСЛОЙНОЙ ЛИПИДНОЙ МЕМБРАНЕ НА ПРИМЕРЕ P450_{scc} (CYP11A1)

© 2021 г. П. В. Ершов^a, Л. А. Калужский^a, Е. О. Яблоков^{a,*}, О. В. Гнеденко^a, А. А. Ковалевский^b, А. М. Тумилович^b, А. А. Гилеп^b, Н. В. Струшкевич^c, А. С. Иванов^a

^a Научно-исследовательский институт биомедицинской химии им. В.Н. Ореховича, Москва, 119121 Россия

^b Институт биоорганической химии Национальной академии наук Беларуси, Минск, 220141 Республика Беларусь

^c Сколковский институт науки и технологий, Москва, 121205 Россия

*e-mail: evgeyablokov1988@mail.ru

Поступила в редакцию 14.07.2020 г.

После доработки 20.08.2020 г.

Принята к публикации 25.08.2020 г.

Белок-белковые взаимодействия (ББВ) лежат в основе функционирования множества метаболических и сигнальных путей. Особый интерес представляют ББВ с участием мембранных белков, образующих стабильные или временные комплексы для передачи сигнала в клетку, транспорта ионов и молекул, переноса электронов в различных электрон-транспортных цепях. Метод SPR позволяет оценить термодинамику, кинетические (k_{on} и k_{off}) и равновесные (K_d) константы ББВ, а также определить модулирующие действия низкомолекулярных соединений. Цель данной работы состояла в адаптации протоколов SPR-анализа для исследования ББВ с участием митохондриального цитохрома P450 CYP11A1, митохондриального цитохрома b5 (CYP5B) и адриноксина (Adx). Было показано, что взаимодействия Adx – CYP11A1 и CYP5B–CYP11A1 зависят от способа иммобилизации белков и микроокружения. Ранее нами было показано, что в водном микроокружении при сходном значении k_{off} ($1.5 \pm 0.2 \times 10^{-3} \text{ с}^{-1}$), значения k_{on} комплексов Adx–CYP11A1 и CYP5B–CYP11A1 различались на порядок ($(6.5 \pm 0.5) \times 10^4$ и $(0.30 \pm 0.03) \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ с}^{-1}$ соответственно), что согласуется с высоким сродством CYP11A1 к физиологическому редокс-партнеру Adx. В липидном микроокружении скорость распада комплекса CYP11A1–Adx значительно выше, чем в водном, k_{off} составляет $(9.1 \pm 0.3) \times 10^{-3} \text{ с}^{-1}$. Для сравнения параметры комплекса CYP11A1–CYP5B определить не удалось вследствие неспецифического связывания мембранных белков, используемых в качестве аналитов, с фосфолипидным бислоем на L1-чипе. Мы впервые доказали применимость SPR-метода для детекции и количественной оценки комплексообразования митохондриальных цитохромов P450 с их редокс-партнерами как в водном, так и липидном микроокружении. Экспериментальные протоколы SPR-анализа, которые были разработаны и проверены в этой и предыдущих работах, представляют собой неотъемлемую часть современных подходов для изучения ферментов семейства цитохромов P450 (CYP-optics), а также могут быть применимы для исследования мембранных белков.

Ключевые слова: поверхностный плазмонный резонанс (SPR), SPR-биосенсор, протоколы SPR, митохондриальный цитохром P450 11A1 (CYP11A1), митохондриальный цитохром b5 (CYP5B), редокс-партнеры, белок-белковые взаимодействия, кинетика, аффинность, стероиды

DOI: 10.31857/S0233475521010047

ВВЕДЕНИЕ

Оптико-биосенсорный анализ, основанный на эффекте поверхностного плазмонного резонанса (SPR), позволяет регистрировать любые белок-белковые и белок-лигандные взаимодействия в режиме реального времени без использования вспомогательных детектирующих молекул, при этом один из партнеров по взаимодействию

иммобилизуется на оптическом чипе (лиганд), а другой подается в измерительную ячейку с потоком рабочего буфера (аналит). Разные комбинации химических групп на поверхности оптического чипа позволяют иммобилизовать белковые молекулы ковалентно или нековалентно, ориентированным или случайным образом. Важным фактором выбора способа иммобилизации по-

прежнему остаются физико-химические характеристики взаимодействующих биомолекул: наличие аффинной метки на N- или C-конце белка, мембранного “якоря”, профиль распределения сульфгидрильных и аминокрупп по поверхности белковой глобулы.

Цитохромы P450 (CYP) представляют собой класс гемсодержащих монооксигеназ, осуществляющих биохимические превращения огромного множества ксенобиотиков, лекарств, эндогенных метаболитов, а также участвующих в биосинтезе стероидных гормонов. Ферментативная активность P450 осуществляется с участием электронов, которые передаются от NADPH на железо гема с участием белков редокс-партнеров. В зависимости от клеточной локализации P450, разные редокс-белки осуществляют перенос электронов: NADPH-зависимая цитохром-P450-оксидоредуктаза (CPR) – в эндоплазматическом ретикулуме и короткая редокс-цепь, состоящая из аденодоксинредуктазы (AdR) и аденодоксина (Adx) – в митохондриях.

У митохондриальных цитохромов P450 имеется несколько участков связывания с мембраной, а редокс-партнер взаимодействует с дистальной стороной молекулы, удаленной от сайта связывания с мембраной. Эта особенность и чувствительность гемового кофактора к химическим воздействиям накладывают ограничения при проведении SPR-анализа белок-белковых взаимодействий с участием цитохромов P450. Ранее мы показали, что CYP11A1 в водном микроокружении образует высокоаффинные комплексы с Adx [1, 2] и с митохондриальным цитохромом b5 (CYB5B) [3], а также способен к комплексообразованию с другими цитохромами P450 [4]. Взаимодействия характеризовались высокой аффинностью, со значениями K_d в субмикромольном диапазоне.

В настоящей работе представлены методические подходы оптико-биосенсорного анализа для оценки межмолекулярных взаимодействий с участием цитохромов P450. В качестве объекта исследования был использован митохондриальный цитохром P450 11A1 (P450_{scs}, CYP11A1), катализирующий отщепление боковой цепи стероидных субстратов (холестерина, 7-дегидрохолестерола, эргостерола, люмистерола), а также гидроксирование витаминов D3 и D2 [5, 6]. С помощью SPR-биосенсора были исследованы параметры взаимодействия Adx и CYP11A1, иммобилизованного в фосфолипидной бислоидной мембране.

Для демонстрации возможного применения SPR-анализа для детекции белок-белковых взаимодействий (ББВ) с участием мембранных белков, находящихся в липидном микроокружении, нами был выбран митохондриальный цитохром P450 CYP11A1, так как его взаимодействия с белками-партнерами в водном микроокружении уже

были подробно изучены [1]. Детекцию можно проводить как в водной среде, так и в липидном микроокружении, в зависимости от типа оптического чипа. Следует отметить, что параметры взаимодействия CYP11A1 с белками-партнерами в водном и липидном микроокружении различаются. Перспективным представляется изучение взаимодействия митохондриальных CYP с Adx в липидном микроокружении различного состава, поскольку доступ гидрофобных субстратов в активный центр происходит из мембраны. Однако оценку влияния липофильных молекул на взаимодействие, определение термодинамических параметров белок-белковых комплексов, а также исследования мембранотропных анализов предпочтительнее проводить в водном микроокружении.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Оборудование, расходные материалы и белковые препараты. В работе был использован 4-канальный SPR-биосенсор Biacore T-200 (GE Healthcare, США), оптические чипы CM5 серии S (с полимерной поверхностью, покрытой карбоксилированным декстраном) и чипы L1 серии S (GE Healthcare) с липофильными группами на поверхности. В качестве рабочих буферов был использован HBS-N (10 mM HEPES (pH 7.4), 150 mM NaCl) и HBS-EP+ (10 mM HEPES (pH 7.4), 150 mM NaCl, 1 mM EDTA, 0.05% Tween-20), 10 mM ацетат натрия (pH 5.0), водный раствор 0.1 M NHS (N-гидрокси-сукцинимид) и 0.4 M EDC (1-этил-3-(3-диметил-аминопропил)карбодиймид гидрохлорид) и стоковые растворы HBS-N и HBS-EP+ получали от GE Healthcare.

Высокоочищенные (>95% по данным SDS-PAGE) препараты рекомбинантных белков (CYP11A1, CYB5B, Adx) были получены как описано ранее [1, 7]. Бычий сывороточный альбумин (БСА) был получен от фирмы Sigma Aldrich (США).

Протокол ковалентной неориентированной иммобилизации на оптическом чипе CM5. Данный протокол был использован для иммобилизации Adx, CYB5B, БСА, а также CYP11A1 на оптическом чипе. После уравнивания поверхности чипа CM5 рабочим буфером HBS-EP+ в течение 30 мин и скорости потока 10 мкл/мин выполняли промывку раствором 50 mM NaOH в течение 30 с и скорости потока 30 мкл/мин. Иммобилизацию белков в разных каналах биосенсора осуществляли ковалентно путем формирования амидных связей между аминокруппами белка и карбоксильными группами на поверхности оптического чипа CM5. Для этого карбоксильные группы чипа активировали пропусканием через канал биосенсора смеси равных объемов 0.2 M EDC/0.05 M NHS в течение 7 мин при скорости потока

5 мкл/мин. Далее осуществляли введение раствора белка (25 мкг/мл) в 10 мМ ацетатном буфере (рН 5.0) в течение 10 мин со скоростью 5 мкл/мин. Целевой уровень иммобилизации белков был в диапазоне 4000–5000 рез. ед. (резонансных единиц, от англ. resonance units, RU) или в среднем 4.5 нг белка на 1 мм² поверхности чипа.

Протокол “прямой” и “инвертированной” регистрации ББВ на CM5-чипе. Протокол “прямой” регистрации был использован для детекции комплексообразования иммобилизованного на чипе белка СУР11А1 (лиганд); редокс-партнеры вводили в измерительную ячейку биосенсора в виде раствора (аналит). При “инвертированной” регистрации ББВ в качестве лиганда использовали редокс-партнеры, а в качестве аналита – СУР11А1.

Регистрация взаимодействия аналита в разных концентрациях с иммобилизованными на чипе лигандами осуществлялась путем их пропускания через контрольный (без белка) и затем через рабочий каналы оптического биосенсора в течение 5 мин при скорости потока 10 мкл/мин. По окончании инъекции аналита, в течение 10 мин регистрировали диссоциацию белкового комплекса, после чего связавшийся аналит удаляли путем двукратной инъекции раствора 2 М NaCl и 0.4% CHAPS в течение 30 с при скорости потока 30 мкл/мин. Результирующие сенсограммы (запись сигнала биосенсора во времени) представляли собой разницу между рабочим и контрольным каналом. Для определения значений кинетических констант комплексообразования (k_{on} , k_{off}) измерения выполняли при 25°C. Значения K_d , которые представляют собой отношение величин k_{off}/k_{on} , рассчитывали с помощью программы VIAevaluation software (GE Healthcare). Для вычисления термодинамических параметров (ΔG , ΔH , $-T\Delta S$), измеряли значения кинетических констант комплексообразования цитохромов P450 с редокс-партнерами в интервале температур от 10 до 40°C с шагом 5°C, как описано ранее [1, 3].

Протокол получения липосом на основе 1,2-диолеил-глицеро-3-фосфатидилхолина (DOPC) и 1,2-диолеил-глицеро-3-фосфоглицерина (DOPG). В текущей работе критическим моментом является захват липосом гидрофобными углеводородными цепями (“гидрофобными якорями”) на поверхности оптического чипа с последующим их превращением в планарный липидный бислой. Для этих процессов важно, чтобы бислойная мембрана липосом была жидкой. Именно поэтому для создания экспериментальной модели бислойной мембраны были использованы препараты липидов на основе олеиновой мононенасыщенной жирной кислоты. Образцы фосфолипидов DOPC и DOPG растворяли в хлороформе до концентрации 10 и 2 мг/мл соответственно. Далее го-

товили смесь в молярном соотношении DOPC (80%) и DOPG (20%). После многократного пипетирования смесь переносили в круглодонную колбу и высушивали на вакуумном роторном испарителе Rotacool (Heidolph, Германия) до образования на дне колбы тонкой пленки фосфолипидов, которую диспергировали при помощи стеклянных шариков в HBS-N-буфере до конечной концентрации 2 мг/мл. Затем суспензию переносили в пробирку и дополнительно диспергировали на льду в течение 2 мин на ультразвуковом гомогенизаторе Sonoplus hd 3110 (Bandelin, Германия), мощность излучателя составляла 20% от максимальной. Полученную суспензию однослойных липосом стандартизовали по размеру путем многократной экструзии через поликарбонатный фильтр с диаметром пор 100 нм с использованием набора LipoFast-Basic (Avestin, Канада).

Протокол контроля качества суспензии липосом методом динамического светорассеяния (DLC). Полученные суспензии липосом анализировали с использованием дзета-сайзера (Malvern, Англия) при следующих условиях: температура 25°C, частота измерений 333.6 тыс/с, длительность измерения 60 с, количество повторов 18. Исходную суспензию липосом разводили калий-фосфатным буфером (рН 7.4) до конечной концентрации 100 мкг/мл. Измерения проводили в специализированной кварцевой кювете zmv 1002 (Malvern). Пик максимальной интенсивности светорассеяния соответствовал диаметру частиц 100 нм. Контроль качества суспензии липосом выполняли по графику корреляционной функции; удовлетворительным результатом измерений считался коэффициент корреляции выше 0.75. В качестве стандарта использовали 5% раствор сахарозы в воде с основным и второстепенным пиками интенсивности светорассеяния частиц с диаметром 1 и 200 нм соответственно [8].

Протокол создания липидной бислойной мембраны на поверхности чипа L1 и нековалентная иммобилизация СУР11А1 в липидной бислойной мембране. После уравнивания поверхности чипа L1 рабочим буфером HBS-N в течение 30 мин и скорости потока 10 мкл/мин через рабочий и контрольный каналы биосенсора пропускали растворы 50 мМ NaOH и 2 М NaCl в течение 30 с со скоростью потока 30 мкл/мин. Через рабочий канал биосенсора последовательно пропускали: (1) суспензию липосом, содержащую 2 мг/мл смеси DOPC : DOPG = 80 : 20%, в течение 18 мин при скорости потока 5 мкл/мин и (2) 10 мМ NaOH в течение 30 с при скорости 30 мкл/мин. Затем для контроля гомогенности сформированного плоского липидного бислоя на поверхности оптического чипа вводили раствор бычьего сывороточного альбумина (BCA) (0.2 мг/мл в HBS-N-буфере) в течение 5 мин при скорости потока 10 мкл/мин. Далее образец, содержащий 5 мкМ

Таблица 1. Влияние температурного фактора на кинетические параметры комплексообразования СУР11А1–Аdx и СУР11А1–СУВ5В в водном микроокружении

$T, ^\circ\text{C}$	$k_{\text{on}}, \text{M}^{-1} \text{c}^{-1}$	$k_{\text{off}}, \text{c}^{-1}$	$K_{\text{d}}, \text{нМ}$	$k_{\text{on}}, \text{M}^{-1} \text{c}^{-1}$	$k_{\text{off}}, \text{c}^{-1}$	$K_{\text{d}}, \text{нМ}$
СУР11А1–Аdx			СУР11А1/СУВ5В			
10	$(1.5 \pm 0.2) \times 10^5$	$(1.1 \pm 0.1) \times 10^{-3}$	8	н/о	н/о	н/о
15	$(1.2 \pm 0.2) \times 10^5$	$(1.4 \pm 0.1) \times 10^{-3}$	12	н/о	н/о	н/о
20	$(8.3 \pm 0.7) \times 10^4$	$(1.5 \pm 0.1) \times 10^{-3}$	18	$(4.4 \pm 0.3) \times 10^3$	$(2.8 \pm 0.2) \times 10^{-3}$	638
25	$(6.5 \pm 0.3) \times 10^4$	$(1.6 \pm 0.1) \times 10^{-3}$	23	$(3.1 \pm 0.2) \times 10^3$	$(1.5 \pm 0.1) \times 10^{-3}$	500
30	$(7.3 \pm 0.3) \times 10^4$	$(2.2 \pm 0.2) \times 10^{-3}$	30	$(6.1 \pm 0.3) \times 10^3$	$(1.0 \pm 0.1) \times 10^{-3}$	163
35	$(6.9 \pm 0.3) \times 10^4$	$(2.7 \pm 0.2) \times 10^{-3}$	39	$(1.1 \pm 0.1) \times 10^4$	$(8.0 \pm 0.5) \times 10^{-4}$	69
40	$(7.3 \pm 0.3) \times 10^4$	$(3.6 \pm 0.2) \times 10^{-3}$	49	$(2.3 \pm 0.1) \times 10^4$	$(6.8 \pm 0.3) \times 10^{-4}$	30

Примечание. Значения K_{d} рассчитывали по отношению $k_{\text{off}}/k_{\text{on}}$. В таблице представлены средние значения параметров \pm стандартное отклонение ($n = 3$). н/о – не определяли.

СУР11А1 в HBS-N-буфере, пропускали через рабочий канал биосенсора в течение 5 мин при скорости потока 10 мкл/мин. Для контроля уровня иммобилизации белка-лиганда пропускали растворы 10 мМ HEPES (pH 7.4), содержащие возрастающие концентрации NaCl (от 0 до 2 М). Отсутствие падения сигнала биосенсора после пропуска растворов NaCl и систематического снижения дрейфа базовой линии указывали на достаточно прочное связывание молекул СУР11А1 с бислоистой липидной мембраной.

Протокол регистрации ББВ в бислоистой липидной мембране на поверхности L1-чипа. Образцы, содержащие Adx в концентрациях 0.5–3 мкМ в HBS-N-буфере, последовательно пропускали через контрольный (без белка-лиганда) и рабочий (с иммобилизованным в бислоистой липидной мембране СУР11А1) каналы биосенсора. Продолжительность введения образцов Adx составляла 5 мин при скорости потока 10 мкл/мин. Сенсограммы взаимодействия СУР11А1–Аdx представляли собой разницу сигналов рабочего канала (с СУР11А1) и контрольного (без белка). После окончания введения раствора аналита и регистрации диссоциации комплексов СУР–Аdx, липиды и белки удаляли с поверхности L1 чипа трехкратной промывкой раствором, содержащим 2 М NaCl и 0.5% CHAPS, в течение 30 с при скорости потока 30 мкл/мин, и однократной промывкой 50 мМ NaOH (30 с, 30 мкл/мин).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Дизайн схемы биосенсорных экспериментов выбирается в зависимости от задач по определению параметров комплексообразования цито-

хромов Р450 с редокс-партнерами. Можно отметить три наиболее часто встречающиеся задачи.

1) Определение кинетических констант и равновесной константы диссоциации белкового комплекса при стандартных условиях (температура 25°C). В данном случае предпочтительно фосфолипидное микроокружение, созданное на поверхности оптического чипа L1, с учетом структурных особенностей рекомбинантных белков. Пример данного применения будет описан ниже.

2) Определение термодинамических параметров комплексообразования в широком температурном диапазоне 10–40°C на чипах CM-типа с покрытием из карбоксилированного декстрана без создания липидного микроокружения. В данном варианте исключается систематическая ошибка эффекта температурного фактора на физико-химические и реологические свойства фосфолипидов, и как следствие, влияние на ББВ. Такой подход использовался в работах [1, 3], где были охарактеризованы ББВ с участием СУР11А1 и его редокс-партнеров (СУВ5А, СУВ5В, СРР, Аdx). Недостатком неориентированной иммобилизации белков на оптических чипах типа CM является снижение чувствительности детекции молекулярных взаимодействий [9]. В данной работе мы исследовали влияние температурного фактора на кинетические параметры комплексообразования СУР11А1 с редокс-партнерами (табл. 1). Интересно отметить, что для комплексов СУР11А1–Аdx и СУР11А1–СУВ5В наблюдались разнонаправленные изменения кинетических параметров взаимодействия под влиянием температурного фактора. Значения K_{d} комплекса СУР11А1–Аdx монотонно возрастают с повыше-

нием температуры, тогда как для комплекса CYP11A1–CYB5B наблюдалась обратная зависимость.

3) Оценка влияния низкомолекулярных соединений на кинетические и термодинамические параметры взаимодействия цитохромов P450 с редокс-партнерами.

Малые молекулы (низкомолекулярные соединения, пептиды, фрагменты антител) способны влиять на кинетику белок-белковых взаимодействий, а следовательно, изменять аффинность комплекса. Среди низкомолекулярных соединений, с молекулярной массой ≤ 1 кДа, интерес представляют субстраты, продукты и ингибиторы цитохромов P450. Их модулирующее действие на образование комплексов цитохромов P450 с редокс-партнерами можно оценить методом SPR, учитывая следующие факторы:

а) растворимость в водных растворах и органических растворителях (спирты, диметилсульфоксид (ДМСО), диметилформамид (ДМФ));

б) стабильность белкового комплекса в присутствии органических растворителей;

в) выбор нескольких тестовых концентраций соединения (диапазон молярного соотношения белок-аналит/соединение). Максимальная концентрация соединения должна быть равной или превышать значение константы Михаэлиса (при наличии данных), но в то же время не вызывать преципитацию соединения в анализируемом образце;

г) способность соединений связываться с иммобилизованным на чипе белком- лигандом и его белком-партнером (аналитом);

д) оптимальная ионная сила и состав рабочего буфера: наличие детергентов, восстанавливающих агентов (дитиотреитол), а также хелатирующих агентов (например, EDTA);

е) время инкубации белка-аналита с соединением.

Ранее нами было показано [10], что в присутствии стероидных субстратов скорость образования комплекса стероидогенного микросомального цитохрома P450 17A1 (CYP17A1) с цитохромом b5 (CYB5A) увеличивается, чего не наблюдалось в случае CPR и Adx. В данных экспериментах CYB5A был ковалентно иммобилизован за аминогруппы на CM5-чипе, а раствор CYP17A1 вводили в качестве аналита в отсутствие (контроль) или в присутствии стероидных субстратов. В данной системе добавление фосфолипидного окружения неизбежно приводило бы к артефактам измерений из-за совокупного вклада факторов, таких как сродство стероидных субстратов к бислойной липидной мембране, влияние липидного состава бислоя на связывание субстрата с

цитохромом P450, а также подвижность мембранотропных субстратов в бислое [11, 12].

Для определения кинетических констант и равновесной константы диссоциации белкового комплекса с помощью SPR-биосенсора нами были разработаны методы оценки комплексообразования CYP11A1–Adx и CYP11A1–CYB5B в системе водного и фосфолипидного микроокружения. Схема иммобилизации препаратов рекомбинантных белков на оптическом чипе CM5 и на чипе L1 приведена на рис. 1. Четырехканальный биосенсор Biacore позволяет регистрировать максимум три целевых взаимодействий, так как один канал используется в качестве контроля (коррекция на неспецифическую сорбцию веществ на поверхности чипа). В качестве контрольного белка для оценки специфичности связывания изучаемых белков, а также для “закрытия” возможных оставшихся гидрофобных участков на L1-чипе, не занятых липидным бислоем, использовали БСА. Сигналы связывания БСА с подложкой чипа составляли не более 5% от уровня равновесных сигналов после формирования липидного бислоя, что свидетельствует о достаточно однородном распределении последнего на чипе L1. Также было отмечено отсутствие взаимодействия Adx, CYB5B и CYP11A1 с иммобилизованным БСА на чипе CM5. Сравнительный анализ кинетических и равновесных параметров комплексообразования с участием CYP11A1 приведен в табл. 2. Так, взаимодействие между ковалентно иммобилизованным CYP11A1 на чипе CM5 и Adx (аналит) не регистрировалось даже при высоких концентрациях Adx. Использование инвертированной пары лиганд-аналит позволило зарегистрировать высокоаффинное комплексообразование CYP11A1–Adx с K_d порядка 10^{-9} – 10^{-8} М [1], что согласуется с ранее опубликованными данными других авторов [13]. В первом случае имеет место либо нарушение пространственной структуры контактной области белка-лиганда, либо химическая модификация аминокислотных остатков CYP11A1, принимающих участие во взаимодействии с Adx. Следует отметить, что дизайн схемы иммобилизации целевых и контрольных белков обусловлен структурными особенностями различных изоформ цитохромов P450 и их редокс-партнеров. Слабокислая среда (pH 5.0) буфера для иммобилизации практически не влияет на спектральные свойства CYP8A1, который был иммобилизован на чипе без потери гемового кофактора [4] в виде мономерной формы, что следовало из отсутствия ступенчатого падения сигнала биосенсора при пропускании растворов ионных детергентов. Демонстрация возможности комплексообразования CYP11A1 с иммобилизованным за аминогруппы цитохромом b5 (CYB5B) показана на рис. 2, при этом CYB5B, так же как и

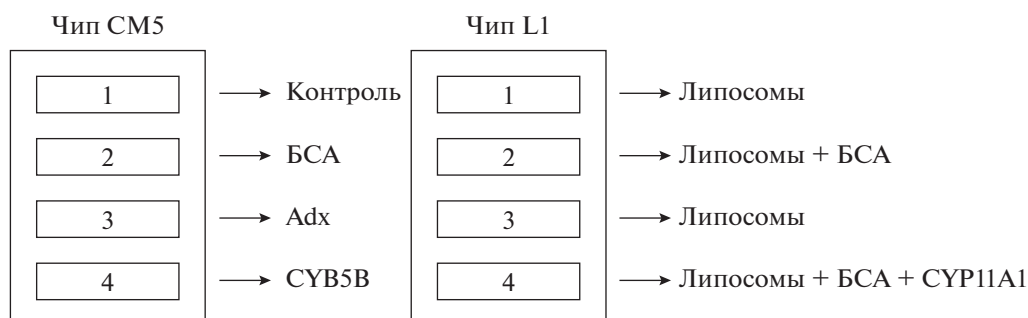


Рис. 1. Схема иммобилизации белков в разных каналах биосенсора на чипах CM5 и L1. На чипе CM5 канал 1 был использован в качестве контрольного канала (без иммобилизации белка) для коррекции неспецифического связывания CYP11A1 с поверхностью чипа. В каналах 2, 3, 4 были ковалентно иммобилизованы бычий сывороточный альбумин (BSA) (дополнительный контроль), Adx и CYP5B соответственно. На чипе L1 каналы 1 и 3 были контрольными (липидной бислой, без белка), канал 2 – контроль связывания с BSA, канал 4 – иммобилизованный в липидном бислое CYP11A1.

CYP8A1, не переходил в апоформу при воздействии pH.

С другой стороны, Adx – водорастворимый белок, в отличие от других редокс-партнеров, таких как CYP5B (CYP5A) или CPR. Это дает возмож-

ность использовать Adx в качестве аналита для регистрации взаимодействия с CYP11A1, находящимся в фосфолипидном микроокружении, так как не наблюдается неспецифического связывания Adx с липидным бислоем, (рис. 3). Напротив,

Таблица 2. Сравнительный анализ параметров комплексообразования CYP11A1 с его редокс-партнерами в зависимости от вариантов SPR-анализа

Белковые партнеры по взаимодействию		Кинетические параметры		Равновесные параметры
лиганд	аналит	k_{on} , $M^{-1}c^{-1}$	k_{off} , c^{-1}	K_d , нМ
Водное микроокружение (ковалентная иммобилизация лиганда за аминогруппы на оптическом чипе CM5 с поверхностью, покрытой карбоксилированным декстраном)				
Прямое взаимодействие				
CYP11A1	Adx	Нет	Нет	Нет
CYP11A1	CYP5B	Нет	Нет	Нет
Инвертированное взаимодействие				
Adx	CYP11A1	$(6.5 \pm 0.5) \times 10^4$	$(1.5 \pm 0.2) \times 10^{-3}$	23 [1]
CYP5B	CYP11A1	$(0.30 \pm 0.03) \times 10^4$	$(1.5 \pm 0.2) \times 10^{-3}$	500 [3]
Фосфолипидное микроокружение (нековалентная иммобилизация лиганда в липидном бислое на оптическом чипе L1)				
Прямое взаимодействие				
CYP11A1	Adx	$(1.6 \pm 0.1) \times 10^4$	$(9.1 \pm 0.3) \times 10^{-3}$	570
CYP11A1	CYP5B	Ограничение детекции*		
Инвертированное взаимодействие				
Adx	CYP11A1	Невозможность иммобилизации лиганда**		
CYP5B	CYP11A1	Ограничение детекции*		

Примечание. Кинетические параметры представляют собой средние значения \pm стандартное отклонение (SD) ($n = 3$).

* Ограничение детекции ББВ из-за вклада неспецифического связывания CYP5B и CYP11A1, используемых в качестве аналитов, с фосфолипидным бислоем на чипе L1.

** Невозможность иммобилизации Adx в фосфолипидном бислое на чипе L1.

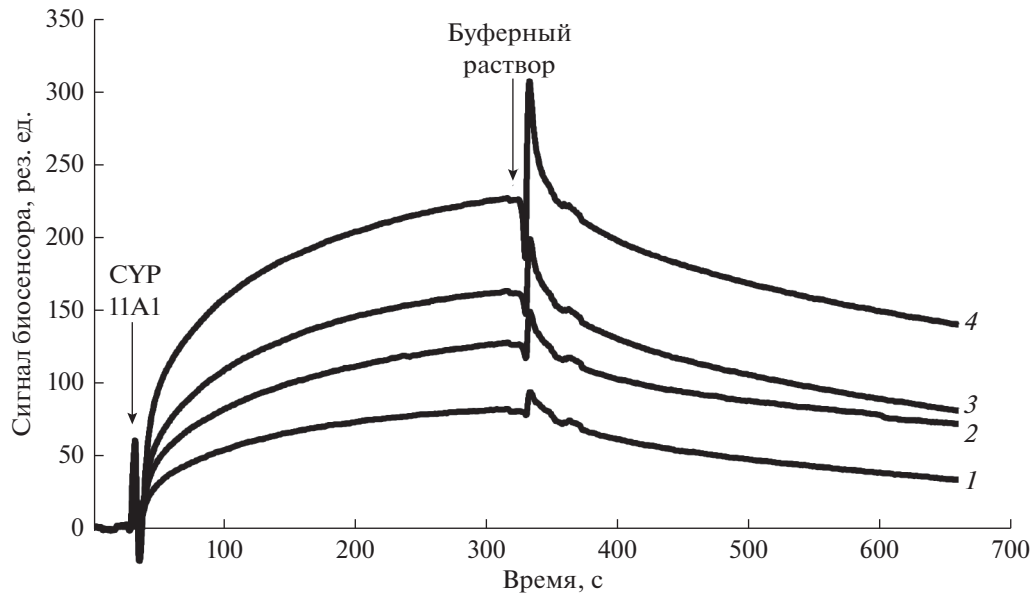


Рис. 2. SPR-анализ взаимодействия цитохрома *b5* (CYB5B), ковалентно иммобилизованного за аминокгруппы на оптическом чипе CM5, и CYP11A1. В качестве аналита использовали растворы CYP11A1 в следующих концентрациях, нМ: 250 (1), 500 (2), 1000 (3) и 2000 (4). Все измерения выполнялись при 25°C. Результирующий сигнал биосенсора представлял собой разницу между рабочим (с иммобилизованным CYB5B) и контрольным (без белка) каналами биосенсора; сигналы биосенсора представлены в резонансных единицах, 1 рез. ед. соответствует связыванию 1 пг белка на 1 мм² поверхности чипа.

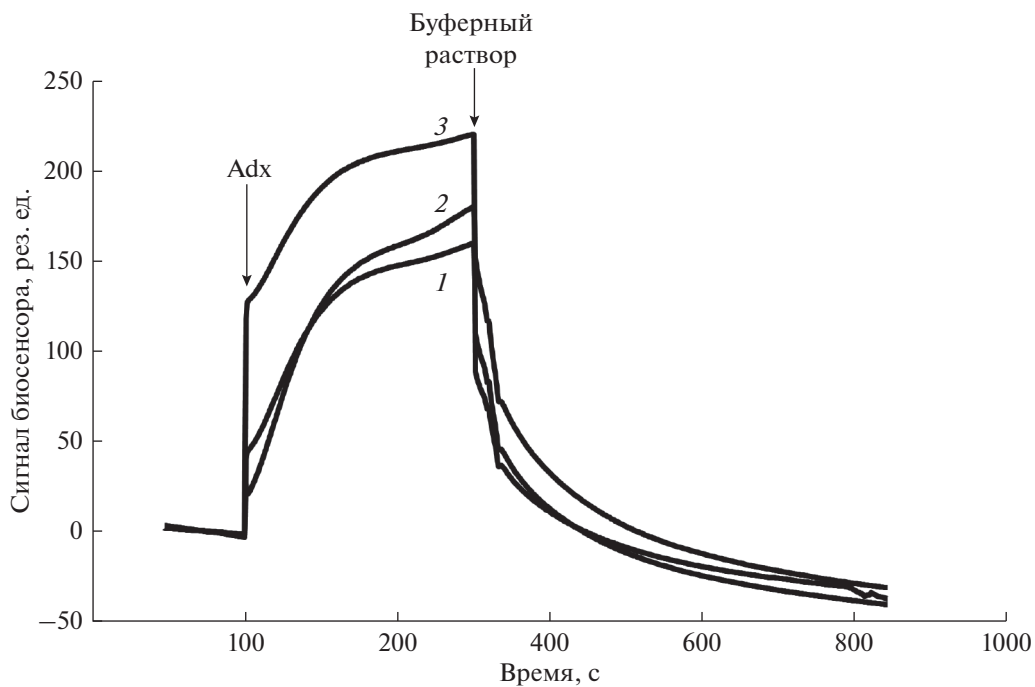


Рис. 3. SPR-анализ взаимодействия CYP11A1, иммобилизованного в фосфолипидном микроокружении на чипе L1, и адренодоксина (Adx). В качестве аналита использовали растворы Adx в следующих концентрациях, мкМ: 0.5 (1), 1 (2) и 3 (3). Все измерения выполнялись при 25°C. Результирующий сигнал биосенсора представлял собой разницу между рабочим (с иммобилизованным CYP11A1) и контрольным (с липидным бислоем, но без белка) каналами биосенсора; сигналы биосенсора представлены в резонансных единицах, 1 рез. ед. соответствует связыванию 1 пг белка на 1 мм² поверхности чипа.

регистрация взаимодействия между CYP11A1, иммобилизованным на чипе L1 в фосфолипидном микроокружении, и его альтернативным редокс-партнером CYP5B (аналит) имела некоторые ограничения – CYP5B связывался с липидной бислоемной мембраной на чипе как в контрольном канале биосенсора, так и в канале с иммобилизованным в бислое CYP11A1. Исключить фоновое связывание CYP5B с липидным бислоем можно путем использования водорастворимой транкированной по мембранному домену формы белка (с удаленным мембранным якорем), однако такие ББВ не будут отражать реальной картины.

С учетом вышеизложенного SPR-анализ термодинамических параметров и влияние низкомолекулярных соединений стероидной природы (субстраты, продукты, ингибиторы) на белок-белковые взаимодействия Adx–CYP11A1 и CYP5B–CYP11A1 предпочтительно проводить в водном микроокружении, т.е. в таких условиях, когда редокс-партнер ковалентно иммобилизован на чипе SM-типа, а цитохром P450 используется в качестве аналита (в растворе).

Таким образом, с помощью оптико-биосенсорного анализа было обнаружено, что взаимодействие CYP11A1 с Adx зависит от способа иммобилизации белков (при иммобилизации на чип CYP11A1 взаимодействия с Adx не было) и микроокружения (водная среда или липидный бислое). С помощью разработанного метода было зарегистрировано взаимодействие CYP5B с CYP11A1. Несмотря на различную локализацию данных белков в клетке (CYP5B расположен на внешней мембране митохондрии, CYP11A1 – на внутренней), результат представляет интерес с точки зрения потенциальной регуляции активности стероидогенного цитохрома CYP11A1 на уровне ББВ. На основании полученных данных можно сделать вывод, что при работе на оптическом SPR-биосенсоре с цитохромами P450 предпочтительна ковалентная иммобилизация редокс-партнера (Adx, CYP5) на чипе SM-типа. Такой способ иммобилизации подходит для первичной оценки параметров ББВ (кинетические и равновесные константы, термодинамические параметры взаимодействия), а также для оценки влияния низкомолекулярных соединений на взаимодействие CYP с редокс-партнерами. Для анализа ББВ мембранных белков в липидном микроокружении в качестве аналита предпочтительнее использовать белок-партнер, не имеющий тропности к мембране. Параметры ББВ с участием CYP, установленные в липидном и в водном микроокружении, могут отличаться, предположительно, в зависимости от способа иммобилизации белка-лиганда на оптическом чипе. Так, неодинаковая плот-

ность доступных сайтов для связывания белка-партнера вследствие экранирования декстрановой поверхностью или липидным бислоем функциональных химических групп контактной поверхности, а также ограничение конформационных степеней свободы фиксированной белковой молекулы могут вносить вклад в наблюдаемую разницу значений кинетических констант.

Применение SPR-биосенсора было расширено для детекции разных комбинаций белок-белковых взаимодействий с участием мембранных гем-содержащих ферментов цитохромов P450 и их редокс-партнеров в водном и фосфолипидном микроокружении. Разработанные нами экспериментальные протоколы могут использоваться для дифференциальной оценки кинетики, аффинности и термодинамики комплексообразования, а также для оценки эффекта субстратов и/или продуктов на параметры комплексообразования. SPR-анализ ББВ представляет собой ценный инструмент в арсенале современных подходов в исследовании данного класса ферментов (CYP-omics).

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

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Исследование взаимодействия CYP11A1–Adx в бислоемной липидной мембране было выполнено при поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (грант № 19-04-00485). Оптимизация SPR-протоколов для работы с мембранными белками P450-зависимых систем была выполнена в рамках Программы фундаментальных научных исследований государственных академий наук на 2013–2020 годы. Работа проводилась с использованием оборудования Центра коллективного пользования “Протеом человека” при ИБМХ, поддержанного субсидией Минобрнауки (№ 075-15-2019-1502 от 5 сентября 2019 года).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Yablokov E.O., Sushko T.A., Ershov P.V., Florinskaya A.V., Gnedenko O.V., Shkel T.V., Grabovec I.P., Strushkevich N.V., Kaluzhskiy L.A., Usanov S.A., Gillep A.A., Ivanov A.S. 2019. A large-scale comparative analysis of affinity, thermodynamics and functional characteristics of interactions of twelve cytochrome P450 isoforms and their redox partners. *Biochimie*. **162**, 156–166.
2. Strushkevich N., MacKenzie F., Cherkesova T., Grabovec I., Usanov S., Park H.-W. 2011. Structural basis for pregnenolone biosynthesis by the mitochondrial monooxygenase system. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **108** (25), 10139–10143.

3. Yablokov E., Florinskaya A., Medvedev A., Sergeev G., Strushkevich N., Luschnik A., Shkel T., Haidukevich I., Gilep A., Usanov S., Ivanov A. 2017. Thermodynamics of interactions between mammalian cytochromes P450 and b5. *Arch. Biochem. Biophys.* **619**, 10–15.
4. Гнеденко О.В., Яблоков Е.О., Ершов П.В., Свирид А.В., Шкель Т.В., Гайдукевич И.В., Струшкевич Н.В., Гилеп А.А., Усанов С.А., Иванов А.С. 2019. Взаимодействие протакцилинсинтазы с цитохромами P450. *Биомед. химия.* **65** (1), 63–66.
5. Guryev O., Carvalho R.A., Usanov S., Gilep A., Estabrook R.W. 2003. A pathway for the metabolism of vitamin D3: Unique hydroxylated metabolites formed during catalysis with cytochrome P450scc (CYP11A1). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **100** (25), 14754–14759.
6. Slominski A.T., Li W., Kim T.-K., Semak I., Wang J., Zjawiony J.K., Tuckey R.C. 2015. Novel activities of CYP11A1 and their potential physiological significance. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* **151**, 25–37.
7. Сергеев Г.В., Гилеп А.А., Усанов С.А. 2014. Роль структурных доменов цитохрома b_5 во взаимодействии с цитохромами. *Биохимия.* **79** (5), 520–531.
8. Kaszuba M., McKnight D., Connah M.T., McNeil-Watson F.K., Nobbmann U. 2008. Measuring subnanometre sizes using dynamic light scattering. *J. Nanopart. Res.* **10** (5), 823–829.
9. Калужский Л.А., Ершов П.В., Курпединов К.С., Сони́на Д.С., Яблоков Е.О., Шкель Т.В., Гайдукевич И.В., Сергеев Г.В., Усанов С.А., Иванов А.С. 2019. SPR анализ белок-белковых взаимодействий с участием цитохромов P450 и цитохрома b_5 , встроенных в бислойную липидную мембрану. *Биомед. химия.* **65** (5), 374–379.
10. Ershov P.V., Yablokov E.O., Florinskaya A.V., Mezentsev Y.V., Kaluzhskiy L.A., Tumilovich A.M., Gilep A.A., Usanov S.A., Ivanov A.S. 2019. SPR-based study of affinity of cytochrome P450s / redox partners interactions modulated by steroidal substrates. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* **187**, 124–129.
11. Šrejber M., Navrátilová V., Paloncýová M., Bazgier V., Berka K., Anzenbacher P., Otyepka M. 2018. Membrane-attached mammalian cytochromes P450: An overview of the membrane's effects on structure, drug binding, and interactions with redox partners. *J. Inorgan. Biochem.* **183**, 117–136.
12. Yamada A., Shimizu N., Hikima T., Takata M., Kobayashi T., Takahashi H. 2016. Effect of Cholesterol on the Interaction of Cytochrome P450 Substrate Drug Chlorzoxazone with the Phosphatidylcholine Bilayer. *Biochemistry.* **55** (28), 3888–3898.
13. Neunzig J., Bernhardt R. 2014. Dehydroepiandrosterone sulfate (DHEAS) stimulates the first step in the biosynthesis of steroid hormones. *PLOS ONE.* **9** (2), e89727.

Application of the SPR Biosensor for the Analysis of Protein–Protein Interactions in Aqueous Environment and Bilayer Lipid Membrane As Exemplified by P450scc (CYP11A1)

P. V. Ershov¹, L. A. Kaluzhskiy¹, E. O. Yablokov^{1, *}, O. V. Gnedenko¹, A. A. Kavaleuski²,
A. M. Tumilovich², A. A. Gilep², N. V. Strushkevich³, A. S. Ivanov¹

¹Institute of Biomedical Chemistry, Moscow, 119121 Russia

²Institute of Bioorganic Chemistry, National Academy of Sciences of Belarus, Minsk, 220141 Republic of Belarus

³Skolkovo Institute of Science and Technology, Moscow, 121205 Russia

*e-mail: evgeyablokov1988@mail.ru

Protein–protein interactions (PPIs) are crucial for the successful realization of many metabolic and signaling pathways. Of particular interest are PPIs of membrane proteins, which form stable and/or transient complexes for the signal transduction, ion transport, and electron transfer within electron transfer chains. The Surface Plasmon Resonance (SPR) allows analyzing the thermodynamic and kinetic parameters (k_{on} and k_{off}) and equilibrium constants (K_d) of PPI, as well as the assessment of the effects of low molecular weight compounds. The aim of the present study was the adaptation of the SPR protocols for PPIs involving mitochondrial cytochrome P450 CYP11A1, mitochondrial cytochrome b_5 (CYB5B), and adrenodoxin (Adx). We found that the Adx–CYP11A1 and CYB5B–CYP11A interactions depend on the method of protein immobilization and on the microenvironment. For example, the k_{off} values for complexes Adx–CYP11A1 and CYB5B–CYP11A1 in the water phase were similar $(1.5 \pm 0.2) \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$, while the values of k_{on} for these complexes differed from each other by almost one order of magnitude $((6.5 \pm 0.5) \times 10^4$ and $(0.30 \pm 0.03) \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$, respectively). This is in good agreement with the known high affinity of CYP11A1 to its cognate redox partner Adx. In the lipid environment, the rate of complex dissociation was higher than that in the water phase with k_{off} value equal to $(9.1 \pm 0.3) \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$. For the CYP11A1–CYB5B complex, the parameters of interaction in the lipid phase were not determined due to unspecific binding of the proteins used as analytes to the lipids immobilized on the L1 chip. We show for the first time that SPR method could be used for the detection and quantitative analysis of PPI of mitochondrial cytochromes (CYP) with their redox partners

both in water and in lipid phase. Experimental protocols developed and validated in this and in our previous work may serve as valuable tools for studies of CYP proteins, CYPomics, and could also be applied for other membrane proteins. **Funding.** The study of the CYP11A1–Adx interactions in the bilipid membrane environment was performed with support of the Russian Foundation for Basic Research (project no. 19-04-00485). Optimization of SPR protocols for analysis of membrane protein of P450-dependent systems was performed in the framework of the Program for Basic Research of State Academies of Sciences for 2013–2020. The work was performed using the equipment of the “Human Proteome” Core Facilities of the Institute of Biomedical Chemistry, which is supported by the Ministry of Education and Science (agreement no. 075-15-2019-1502 of September 5, 2019).

Keywords: surface plasmon resonance (SPR), SPR biosensor, SPR protocols, mitochondrial cytochrome P450 11A1 (CYP11A1), mitochondrial cytochrome *b5* (CYB5B), redox-partners, protein–protein interaction, kinetics, affinity, steroids