

СОДЕРЖАНИЕ

Том 86, выпуск 5, 2021

Влияние диеты с высоким содержанием сахарозы на уровни мРНК элонгаз и десатураз и активность этих белков в жировой ткани крысы <i>Я. Драг, М. Кнапик-Чайка, А. Гаведзка, И. Гдула-Аргасинска, Е. Яцкевич</i>	619
Активности химически синтезированного пептида, который кодируется РНК-предшественником miR156A и консервативен в растениях семейства Brassicaceae <i>Т.Н. Ерохина, Д.Ю. Рязанцев, Л.В. Самохвалова, А.А. Можяев, А.Н. Орс, С.К. Завриев, С.Ю. Морозов</i>	629
Сигнальные каскады белкового фосфорилирования при аутизме (с акцентом на путь mTOR) (обзор) <i>И.С. Бокша, Т.А. Прохорова, Е.Б. Терешкина, О.К. Савушкина, Г.Ш. Бурбаева</i>	643
Отдаленные исходы сепсиса (мини-обзор) <i>О.А. Гребенчиков, А.Н. Кузовлев</i>	667
МикроРНК в онкологии: от механизмов регуляции экспрессии генов до перепрограммирования метастатической ниши (обзор) <i>Е.В. Семина, К.Д. Рысенкова, К.Э. Трояновский, А.А. Шмакова, К.А. Рубина</i>	672
Анализ репертуаров антигенных специфичностей циркулирующих аутоантител как инструмент поиска опухолеассоциированных антигенов: актуальные проблемы и пути их решения (обзор) <i>П.В. Белоусов</i>	689
Мелатонин улучшает сниженную активность мембранных АТФаз и сохраняет ультраструктуру серого и белого вещества в модели ишемии/реперфузии головного мозга крыс <i>М. Тунсер, Б. Пехливаноглу, С.Х. Суруджу, Т. Исбир</i>	711
Электростимуляция миотуб как модель сократительной активности мышц <i>in vitro</i> : текущее состояние и перспективы развития (обзор) <i>Т.Ф. Вепхадзе, А.В. Воротников, Д.В. Попов</i>	724
КРАТКОЕ СООБЩЕНИЕ	
Влияние динитрозильных комплексов железа на конформацию альбумина <i>Э. С. Аллахвердиев, Г.В. Максимов, О.В. Родненков, О.Г. Лунева, Г.В. Цораев, А.Д. Иванов, А.И. Юсипович, Т.В. Мартынюк</i>	740
Правила для авторов	749

CONTENTS

Vol. 86, Publ. 5, 2021

Impact of High-Sucrose Diet on the mRNA Levels for Elongases and Desaturases and Estimated Protein Activity in Rat Adipose Tissue <i>Jagoda Drag, Malgorzata Knapik-Czajka, Anna Gawedzka, Joanna Gdula-Argasinska, and Jerzy Jaskiewicz</i>	619
Activity of Chemically Synthesized Peptide Encoded by the miR156A Precursor and Conserved in the Brassicaceae Family Plants <i>T. N. Erokhina, D. Y. Ryazantsev, L. V. Samokhvalova, A. A. Mozhaev, A. N. Orsa, S. K. Zavriev, and S. Y. Morozov</i>	629
Protein Phosphorylation Signaling Cascades in Autism with Emphasis on the mTOR Pathway (Review) <i>I. S. Boksha, T. A. Prokhorova, E. B. Tereshkina, O. K. Savushkina, and G. Sh. Burbaeva</i>	643
Long-Term Outcomes after Sepsis (Mini-Review) <i>O. A. Grebenchikov and A. N. Kuzovlev</i>	667
MicroRNA in Oncology: From Mechanisms of Gene Expression Regulation to Reprogramming of the Metastatic Niche (Review) <i>E. V. Semina, K. D. Rysenkova, K. E. Troyanovskiy, A. A. Shmakova, and K. A. Rubina</i>	672
The Analysis of the Repertoires of the Circulating Autoantibodies' Antigenic Specificities as a Search Tool for the Identification of the Tumor-Associated Antigens: Current Problems and Solutions (Review) <i>P. V. Belousov</i>	689
Melatonin Improves Reduced Activities of Membrane ATPases and Preserves Ultrastructure of Gray and White Matter in the Rat Brain Ischemia/Reperfusion Model <i>Meltem Tuncer, Bilge Pehlivanoglu, Selçuk H. Sürücü, and Turgay Isbir</i>	711
Electrical Stimulation of Cultured Myotubes <i>in vitro</i> as a Model of Skeletal Muscle Activity: An Update and Perspectives (Review) <i>T. F. Vepkhvadze, A. V. Vorotnikov, and D. V. Popov</i>	724
SHORT COMMUNICATION	
Effect of Dinitrosyl Iron Complex on Albumin Conformation <i>E. S. Allakhverdiev, G. V. Maksimov, O. V. Rodnenkov, O. G. Luneva, G. V. Tsoraev, A. D. Ivanov, A. I. Yusipovich, and T. V. Martynyuk</i>	740
Instructions to Authors	749

УДК 577.152.311

ВЛИЯНИЕ ДИЕТЫ С ВЫСОКИМ СОДЕРЖАНИЕМ САХАРОЗЫ НА УРОВНИ мРНК ЭЛОНГАЗ И ДЕСАТУРАЗ И АКТИВНОСТЬ ЭТИХ БЕЛКОВ В ЖИРОВОЙ ТКАНИ КРЫСЫ

© 2021 Я. Драг^{1*}, М. Кнапик-Чайка¹, А. Гаведзка¹, И. Гдула-Аргасинска², Е. Яцкевич¹

¹ Department of Biochemical Analytics, Faculty of Pharmacy, Jagiellonian University Medical College, 30-688 Krakow, Poland; E-mail: jagoda.drag@uj.edu.pl

² Department of Radioligands, Faculty of Pharmacy, Jagiellonian University Medical College, 30-688 Krakow, Poland

Поступила в редакцию 07.10.2020

После доработки 09.02.2021

Принята к публикации 09.02.2021

В жировой ткани (АТ) структура жирных кислот (ФА) может подвергаться изменениям в результате действия элонгаз и десатураз. Регуляция активности этих ферментов обеспечивается различными факторами, в том числе питательными веществами. Целью исследования была оценка влияния диеты с высоким содержанием сахарозы (HSD; 68% сахара) на уровни мРНК элонгаз (*Elovl2*, *Elovl5*, *Elovl6*) и десатураз (*Fads1*, *Fads2*, *Scd*) и определение активности соответствующих белков в АТ крыс. Самцы крыс линии Wistar были случайным образом разбиты на две группы. В первой группе (HSD) их кормили пищей с высоким содержанием сахарозы, а в другой они получали стандартный пищевой рацион (ST). Уровни мРНК определяли с помощью метода полуколичественной ПЦР с обратной транскриптазой. Состав ФА анализировали с помощью газовой хроматографии, и соотношения ФА использовали для оценки активности ферментов. У крыс из группы HSD уровни мРНК для *Elovl5*, *Elovl6*, *Fads1* и *Scd* были выше, а уровень мРНК *Fads2* ниже, чем в группе ST. Повышенные уровни мРНК для *Elovl5* и *Elovl6* соответствовали относительно более высокой активности этих ферментов, в то время как снижение уровня мРНК *Fads2* ассоциировалось с пониженной активностью этой десатуразы. Напротив, повышение уровня мРНК *Scd* сопровождалось снижением активности соответствующего фермента. В АТ крыс группы HSD было обнаружено меньше мононенасыщенных ФА, чем в группе ST. Выявлены различия в составе индивидуальных ФА между группами. Это исследование поддерживает идею о том, что регуляция уровней мРНК и активности как элонгаз, так и десатураз играет важную роль в формировании липидного состава АТ в ответ на изменения в пищевом рационе.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: элонгазы, десатуразы, жирные кислоты, диета с высоким содержанием сахарозы, жировая ткань.

DOI: 10.31857/S0320972521050018

ВВЕДЕНИЕ

Белая жировая ткань (WAT) хранит большое количество жирных кислот (ФА) в форме внутриклеточных отложений триацилглицери-

Принятые сокращения: АТ – жировая ткань; ВАТ – бурая жировая ткань (brown adipose tissue); ChREBP – белок, связывающий элементы, реагирующие на углеводы (carbohydrate-responsive element-binding protein); ELOVL – элонгаза; ФА – жирная кислота; FADS1 и FADS2 – десатуразы жирных кислот 1 и 2; HSD – диета с высоким содержанием сахарозы; LXR – печёночный рецептор X (liver X receptor); MUFA – мононенасыщенная жирная кислота; PUFA – полиненасыщенная жирная кислота; SAT – насыщенная жирная кислота; SCD – стеароил-КоА-десатураза; SREBP-1c – белок, связывающий регуляторный элемент стерола 1c (sterol regulatory element-binding protein 1c); ST – стандартный пищевой рацион; TG – триацилглицерин; UNSAT – ненасыщенная жирная кислота; WAT – белая жировая ткань; eWAT – белая жировая ткань придатка яичка.

* Адресат для корреспонденции.

на (TG), которые составляют до 85% массы WAT. Преобладающими компонентами TG, хранящимися в WAT, являются ФА, такие как C14 : 0, C16 : 0, C16 : 1 n-7, C18 : 0, C18 : 1 n-9 и 18 : 2 n-6, которые в сумме составляют до 90% от общего количества ФА, входящих в состав TG [1].

Жирные кислоты присутствуют в адипоцитах в основном после приёма пищи и последующего гидролиза TG сывороточных липопротеинов (хиломикроны, липопротеины очень низкой плотности), катализируемого липопротеинлипазой (LPL). Также они образуются в результате синтеза *de novo* из ацетил-КоА (липогенез *de novo* или DNL). Основным субстратом липогенеза *de novo* является глюкоза, которая поступает через инсулинзависимый глюкозный транспортёр 4-го типа (GLUT 4) [2].

В жировой ткани (АТ) структура ФА может подвергаться изменениям под воздействием эндогенных ферментов, таких как элонгазы и де-

сатуразы, с образованием нескольких видов липидов. Элонгация и десатурация FA являются двумя ключевыми метаболическими путями биосинтеза насыщенных (SAT), мононенасыщенных (MUFA) и полиненасыщенных жирных кислот (PUFA) [2–4].

В клетках млекопитающих удлинение цепи FA на два атома углерода (элонгация) происходит в основном в эндоплазматическом ретикулуме. Для этого процесса необходим малонил-КоА в качестве донора двух атомов углерода и NADPH в качестве восстанавливающего агента. Начальная реакция конденсации, контролирующая скорость, катализируется элонгазами, называемыми ELOVL (для удлинения очень длинных FA). Связанные с мембраной элонгазы взаимодействуют с 3-кетацил-КоА-редуктазой, дегидратазой и транс-2,3-еноил-КоА-редуктазой для удлинения FA [5].

В семейство элонгаз входит семь членов (ELOVL1–ELOVL7). Гены *Elovl1*, *Elovl5* и *Elovl6* экспрессируются в различных тканях, в то время как *Elovl2*, *Elovl3*, *Elovl4* и *Elovl7* показывают чёткую тканеспецифичную картину экспрессии. ELOVL1 катализирует образование насыщенных жирных кислот (SAT), содержащих до 26 атомов углерода, и этот фермент преимущественно экспрессируется в мозге. ELOVL2 удлиняет молекулы PUFA, таких как C20 : 4 n-6, C20 : 5 n-3, C22 : 5 n-3 и демонстрирует ограниченный паттерн экспрессии генов с наивысшими уровнями мРНК в семенниках и печени и в меньшей степени в WAT, головном мозге и почках. ELOVL3 катализирует образование SAT и MUFA длиной до 24 атомов углерода и в основном экспрессируется в бурой жировой ткани (BAT). ELOVL4 участвует в биосинтезе насыщенных жирных кислот с очень длинной цепью (VLCFA), C28 и C30, а также в синтезе очень длинных полиненасыщенных жирных кислот (VLCPUFA) C28–C38. Этот фермент специфически экспрессируется в сетчатке и в меньшей степени в мозге, семенниках, тимусе и коже. ELOVL5 участвует в элонгации C18–C20 PUFA, и наивысшие уровни соответствующей мРНК были выявлены в печени, семенниках, надпочечниках и WAT. ELOVL6, который удлиняет C12–C16 SAT, экспрессируется в WAT, BAT, печени и мозге. ELOVL7 представляет собой элонгазу VLCFA, которая была идентифицирована совсем недавно. Этот фермент участвует в удлинении SAT, содержащих до 24 атомов углерода, и экспрессируется на высоком уровне в почках, поджелудочной железе, надпочечниках и простате [6–8].

Введение двойных связей в цепь FA (десатурация) происходит в эндоплазматическом рети-

кулуме. Этот процесс требует наличия молекулярного кислорода, NADPH, флавопротеина (цитохром-*b5* редуктаза) и акцептора электронов (цитохром-*b5*). Десатурация жирных кислот катализируется мембраносвязанными ацил-КоА-десатуразами, в состав которых в основном входят десатураза жирных кислот 1 (FADS1), десатураза жирных кислот 2 (FADS2) и стеароил-КоА-десатураза (SCD). FADS1 и FADS2 принимают участие в биосинтезе длинноцепочечных полиненасыщенных FA. Их основными субстратами являются полиненасыщенные жирные кислоты C16–C24 PUFA, преимущественно 18 : 2 n-6 и 18 : 3 n-3 [9]. Начальный этап Δ6-десатурации рассматривается как реакция, ограничивающая скорость биосинтеза PUFA, которая включает чередующееся действие десатураз (FADS1 и FADS2) и элонгаз (ELOVL2 и ELOVL5). SCD является ключевым ферментом биосинтеза MUFA, в основном олеата (18 : 1 n-9) и пальмитолеата (16 : 1 n-7) [10, 11].

Было установлено, что экспрессия генов элонгаз и десатураз регулируется преимущественно на уровне транскрипции различными факторами, включая питательные вещества и гормоны. Экспрессия генов элонгаз и десатураз регулируется непосредственно связыванием факторов транскрипции, таких как белок, связывающий элементы, реагирующие на углеводы (ChREBP) [12–14], печёночный рецептор X (LXR) [15, 16], белок, связывающийся с элементом регуляции стеролов (SREBP) и рецептор, активируемый пролифератором пероксисом (PPAR) со специфическими чувствительными элементами промоторов генов [4, 5 17]. Строгий контроль экспрессии генов элонгаз и десатураз достигается за счёт комбинированного действия различных факторов транскрипции.

Большинство исследований по изучению влияния различных пищевых рационов на активность элонгаз и десатураз проводилось на культурах клеток печени или гепатоцитов. На настоящий момент было показано, что в первичных гепатоцитах глюкоза способствует повышению уровня мРНК для *Elovl6* и *Scd*, а инсулин повышает уровни мРНК для *Elovl6*, *Fads1*, *Fads2* и *Scd* [4]. Экспрессию гена *Scd1* в печени мышей индуцировали кормлением голодных мышей обезжиренной высокоуглеводной пищей [18]. Также было показано, что экспрессия и активность печёночных элонгаз (ELOVL1, ELOVL2, ELOVL5, ELOVL6) и десатураз (FADS1, FADS2, SCD) изменялась у взрослых крыс-самцов после потребления ими пищи с высоким содержанием углеводов с добавкой оливкового масла (10%, w/w) и рыбьего жира (10%, w/w) [14]. Однако данные о влиянии

обогащённой сахарозой диеты (HSD) на элонгазы и десатуразы в АТ ограничены.

Целью настоящего исследования было оценить влияния HSD (68% сахарозы) на относительные уровни мРНК *Elovl2*, *Elovl5*, *Elovl6*, *Fads1*, *Fads2* и *Scd* в белой жировой ткани придатка яичка крысы (eWAT). Нами были отображены гены *Elovl2*, *Elovl5* и *Elovl6*, так как ранее экспрессия этих генов была продемонстрирована в WAT и является предметом регуляции питания. Кроме того, были определены относительные активности (выраженные в виде индексов — соотношения отдельных FA) ELOVL5, ELOVL6, FADS2 и SCD. Также был определен состав FA жировой ткани.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Животные. Крысы-самцы (6 недель) линии Wistar весом 151 ± 3 г были приобретены в питомнике фармацевтического факультета Ягеллонского университета. Животных содержали в отдельных клетках в стандартных условиях искусственного светового режима: 12 ч свет/темнота при постоянной комнатной температуре (21–23 °С). Крысам был предоставлен неограниченный доступ к пище и воде. Животные (12 крыс) были случайным образом разбиты на две группы: (1) экспериментальная группа ($n = 6$), получавшая HSD (68% сахароза, MP Biomedicals, 960236, США) и (2) контрольная (ST) группа ($n = 6$), питающаяся стандартной пищей (55% углеводов, Murigran, Concentrate and Mix Feed Factory AGROPOL, Мотыч, Польша). Животных кормили до достижения ими веса в 250 г (21 день в группе HSD и 25 дней в группе ST). Не было выявлено изменений в их внешнем виде или поведении. Затем крыс умерщвляли и вырезали белую жировую ткань придатков яичка (eWAT). Ткань замораживали с помощью

алюминиевых шипцов, предварительно охлажденных в жидком азоте. До проведения анализа все образцы хранили при -80 °С.

Определение уровня мРНК для элонгаз и десатураз. Относительные уровни мРНК для *Elovl2*, *Elovl5*, *Elovl6*, *Fads1*, *Fads2* и *Scd* в eWAT оценивали с помощью полуколичественной полимеразной цепной реакции с использованием обратной транскриптазы. Препарат общей РНК из жировой ткани получали с помощью реагента TRI («Sigma-Aldrich», Германия), а затем синтезировали кДНК с использованием 1 мкг общей РНК, обратной транскриптазы и олигодТ-праймеров, входящих в RevertAid™ H Minus First Strand cDNA Synthesis Kit («Fermentas», Литва). кДНК амплифицировали с помощью ДНК-полимеразы OptiQ («Euro», Польша) согласно инструкциям производителя. Для проведения ПЦР в реакционную смесь добавляли 1,2 мкл кДНК и 1,6 мкл специфических для каждого гена праймеров (табл. 1), которые были предсказаны с помощью программы Primer3 (v. 0.4.0; NCBI, США). В работе использовали Mastercycler gradient EP 5331 («Eppendorf», Германия). Продукты ПЦР подвергали электрофорезу в 1,5%-ном агарозном геле, окрашивали этидиумбромидом и проводили денситометрию с помощью программы Quantity One 4.2.1. («Bio-Rad», США). Полученные данные нормализовали относительно β -актина как внутреннего контроля (в таком же образце). После выделения общей РНК были проведены две независимых ПЦР с обратной транскриптазой. Количество циклов ПЦР для всех протестированных ферментов было равно 35.

Экстракция липидов и определение содержания жирных кислот (FA) в жировой ткани. Общий экстракт липидов из eWAT получали по методу Folch [19]. Синтез метиловых эфиров жирных кислот (FAME) проводили с использованием 14%-ного BF_3 в метаноле согласно методу

Таблица 1. Праймеры, использованные для проведения ПЦР

Название гена (символ)	Последовательность прямого праймера	Последовательность обратного праймера	Концентрация; прямой/обратный праймер (мкМ)	Длина продукта (п.н)
<i>Elovl2</i>	TCAACAATGGCAGCTCAAAG	GGGGGATTTACTTGGGAAAA	4/4	249
<i>Elovl5</i>	GAGGCATCCTGGTGGTGTAT	ACGTGCAGGACTGTGATCTG	4/4	247
<i>Elovl6</i>	GCTACAACGGAGCAGAGGAC	CCATTTTCAAGCCAACCAGT	4/4	247
<i>Fads1</i>	GAAGGAACAGCAGTCCAAGC	GTCTGGACTCGTGGAAGAGC	4/4	185
<i>Fads2</i>	ATCTGCCCTACAACCACCAG	TGTGACCCACACAAACCAGT	4/4	248
<i>Scd</i>	CTGTTAGCCCAGCCTCACTC	GTCTGCAGGAAAACCTCTGC	2/2	668
<i>β-actin</i>	AGCCATGTACGTAGCCATCC	CTCTCAGCTGTGGTGGTGAA	4/4	228

Таблица 2. Проанализированные жирные кислоты

Группа	FA
SAT	12 : 0, 14 : 0, 15 : 0, 16 : 0, 17 : 0, 18 : 0, 21 : 0
UNSAT	14 : 1, 16 : 1 n-7, 17 : 1, 18 : 1 n-9, 18 : 2 n-6, 18 : 3 n-6, 18 : 3 n-3, 20 : 3 n-6, 20 : 4 n-6, 20 : 5 n-3, 22 : 6 n-3
MUFA	14 : 1, 16 : 1 n-7, 17 : 1, 18 : 1 n-9
PUFA	18 : 2 n-6, 18 : 3 n-6, 18 : 3 n-3, 20 : 3 n-6, 20 : 4 n-6, 20 : 5 n-3, 22 : 6 n-3

Metcalfе и Schmitz [20]. Полученные FAME анализировали с помощью метода газовой хроматографии Agilent 6890N («Agilent», США) с использованием пламенно-ионизационного детектора (FID – flame ionization detector) и колонки DB-23 (60 м × 0,25 мм), как было описано ранее [21, 22], и идентифицировали с использованием Supelco® 37 Component FAME Mixstandards («Sigma-Aldrich»). Полученные данные были проанализированы с использованием программного обеспечения ChemStation («Agilent Technologies», Германия). Для каждого образца содержание отдельных жирных кислот выражали в виде процента от общего количества жирных кислот. Жирные кислоты были разбиты на группы, обозначаемые как SAT, UNSAT (ненасыщенные жирные кислоты), MUFA и PUFA (табл. 2).

Индексы элонгации, десатурации и липогенеза de novo. Для оценки относительной активности отдельных элонгаз и десатураз были использованы индексы, выраженные в виде соотношения концентраций конкретных жирных кислот [23, 24]. Индексы для SCD (C16) и SCD (C18) описывают активность SCD в процессе десатурации жирных кислот C16 и C18 соответственно. Оценка индекса FADS1, как соотношения 20 : 4 n-6 и 20 : 3 n-6, оказалась невозможной из-за отсутствия в хроматограммах пика, соответствующего 20 : 4 n-6.

Статистическая обработка данных. Статистическая обработка данных была проведена с помощью программ STATISTICA 13 и GraphPad Prism v. 5.02. Для оценки нормализации использовали критерий Шапиро–Вилк. Односторонний дисперсионный анализ ANOVA и критерий Тьюки использовались для оценки уровня мРНК для всех элонгаз и десатураз, индексов (такие как SAT, UNSAT, PUFA и MUFA), состава жирных кислот 16 : 0, 16 : 1, 18 : 0, 18 : 2 n-6, 18 : 3 n-6, 18 : 3n-3 и индексов для ELOVL5 и ELOVL6 и FADS2 (данные представлены в виде среднего значения ± SD). U-критерий Манна–Уитни был использован для анализа состава жирных кислот 12 : 0, 14 : 0, 14 : 1, 15 : 0, 17 : 0, 17 : 1, 18 : 1 n-9, 21 : 0, 20 : 3 n-6 и индексов для

SCD (C16) и SCD (C18) (данные представлены в виде среднего значения и разброса). Приемлемый уровень достоверности был установлен как $p < 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Оценка уровня мРНК для элонгаз и десатураз.

В группе HSD уровень мРНК *Elovl2* был понижен на 21% по сравнению с группой ST. Уровни мРНК *Elovl5* и *Elovl6* были на 43% и 16% выше по сравнению с контролем. Выявленные различия в случае *Elovl5* и *Elovl6* были статистически достоверны (рис. 1).

Уровень мРНК *Fads2* в группе HSD снизился на 23% по сравнению с группой ST. Напротив, уровни мРНК для *Fads1* и *Scd* были на 22% и 69% выше соответственно, чем в контрольной группе. Выявленные различия в уровне мРНК для *Fads1*, *Fads2* и *Scd* были статистически достоверны (рис. 1).

FA-состав белой жировой ткани придатков яичка. В жировой ткани крыс группы HSD со-

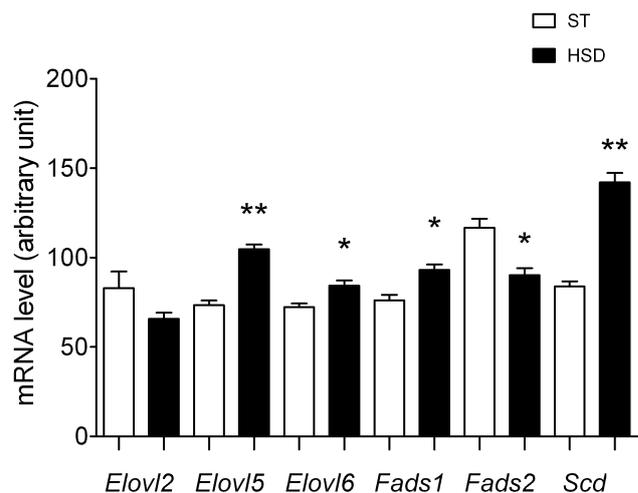


Рис. 1. Относительные уровни мРНК для генов *Elovl2*, *Elovl5*, *Elovl6*, *Fads1*, *Fads2* и *Scd* в eWAT у крыс из группы HSD ($n = 6$) и контрольной (ST) группы ($n = 6$); * $p < 0,01$, ** $p < 0,001$

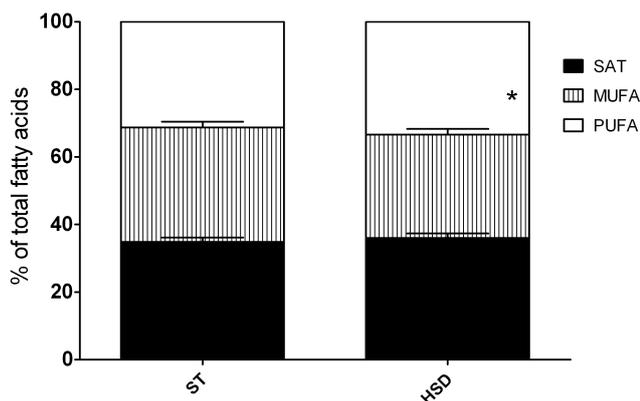


Рис. 2. Средние значения индексов SAT, PUFA и MUFA в eWAT крыс группы HSD ($n = 6$) и контрольной группы (ST) ($n = 6$); * $p < 0,01$

держание SAT увеличилось на 3%, а содержание ненасыщенных жирных кислот (UNSATs) уменьшилось на 2% по сравнению с группой ST. Средний уровень PUFA был на 7% выше в группе HSD, чем в контрольной группе. Средний уровень MUFA был на 10% ниже, чем в группе ST, и выявленные различия были статистически достоверны (рис. 2).

Процентное содержание отдельных жирных кислот у крыс групп HSD и ST различается. Содержание 16 : 0, 18 : 0 и 18 : 2 n-6 выше в группе

HSD по сравнению с группой ST. Процентное содержание других FA в группе HSD было ниже, чем у контрольных крыс. Выявленные различия были статистически достоверными для всех FA, за исключением 21 : 0 (табл. 3).

В отличие от крыс группы ST, в жировой ткани крыс группы HSD арахидоновая (20 : 4 n-6), эйкозапентаеновая (20 : 5 n-3) и докозагексаеновая (22 : 6 n-3) кислоты обнаружены не были (табл. 3). Типичные хроматограммы представлены на рис. 3.

Активность элонгаз и десатураз. Мы также обнаружили различия в активности (выраженные в виде индексов) элонгаз и десатураз в белой eWAT крыс. В группе HSD индексы FADS2, SCD (C16) и SCD (C18) были понижены на 93, 51 и 16% соответственно по сравнению с группой ST. Индексы ELOVL5 и ELOVL6 были на 828 и 12% выше по сравнению с контролем. Все наблюдаемые различия были статистически достоверными (табл. 4). В группе HSD активность FADS1 не определялась из-за отсутствия FA, необходимой для определения индекса.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Результаты этого исследования показывают, что HSD снижает общее содержание MUFA

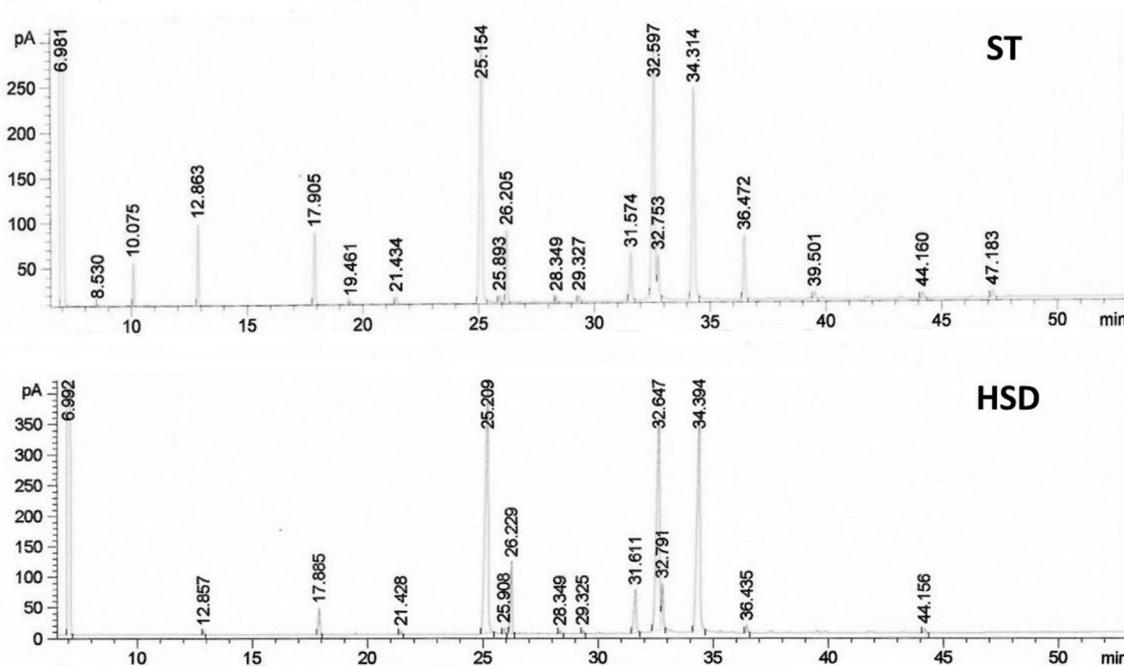


Рис. 3. Типичные хроматограммы для групп ST и HSD

Таблица 3. Содержание FA в процентах и изменения их содержания в группе HSD в сравнении с группой ST

FA	% FA в группе ST	% FA в группе HSD	% FA в группе HSD относительно группы ST
12 : 0	1,1	0,3	↓ 74*
14 : 0	2,9	1,8	↓ 40**
14 : 1	0,2	0,1	↓ 58**
15 : 0	0,5	0,2	↓ 51**
16 : 0	26,6	29,4	↑ 11**
16 : 1 n-7	5,9	4,1	↓ 31*
17 : 0	0,3	0,2	↓ 43**
17 : 1	0,4	0,2	↓ 59**
18 : 0	3,3	4,0	↑ 21***
18 : 1 n-9	27,4	26,3	↓ 4*
18 : 2 n-6	21,7	32,2	↑ 51***
18 : 3 n-6	5,5	0,6	↓ 88***
18 : 3 n-3	0,6	0,2	↓ 68***
21 : 0	0,2	0,2	↓ 26
20 : 3 n-6	0,5	0,4	↓ 28*
20 : 4 n-6	0,7	0,0	–
20 : 5 n-3	0,9	0,0	–
22 : 6 n-3	1,5	0,0	–

Примечание. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$.

Таблица 4. Средние значения индексов элонгаз и десатураз

Фермент	Индекс	ST	HSD
FADS2	18 : 3 n-6/18 : 2 n-6	0,25 ± 0,01	0,01 ± 0,007**
SCD (C16)	16 : 1 n-7/16 : 0	0,23 (0,14-0,27)	0,11 (0,11-0,14)*
SCD (C18)	18 : 1 n-9/18 : 0	8,07 (7,96-9,32)	6,76 (6,04-7,03)*
ELOVL5	20 : 3 n-6/18 : 3 n-6	0,09 ± 0,008	0,91 ± 0,41**
ELOVL6	18 : 0/16 : 0	0,12 ± 0,009	0,14 ± 0,006*

Примечание. Данные представлены в виде среднего значения ± стандартное отклонение или в виде медианы (диапазон). * $p < 0,01$, ** $p < 0,001$.

(сумма мононасыщенных жирных кислот 14 : 1, 16 : 1 n-7, 17 : 1 и 18 : 1 n-9) в eWAT крысы. Уменьшение содержания MUFA можно объяснить более низкой активностью SCD у крыс, получавших рацион, обогащённый сахарозой. Путь биосинтеза MUFA включает стадии, которые катализируются ELOVL6 и SCD. ELOVL6 в основном ответственен за элонгацию 16 : 0 (пальмитиновая кислота) до 18 : 0 (стеариновая кислота), в то время как SCD, фермент, ограничивающий скорость в синтезе MUFA, катализирует десатурацию насыщенных FA C16–C18.

В нашем исследовании относительные уровни мРНК для *Elovl6* и *Scd* в группе HSD были выше, чем в контрольной группе. Известно, что углеводы пищи индуцируют секрецию инсулина β -клетками поджелудочной железы и повышают поглощение глюкозы адипоцитами [25, 26]. Было показано, что в адипоцитах глюкоза и инсулин стимулируют факторы транскрипции LXR α , ChREBP и SREBP-1c (белки, связывающие регуляторный элемент стерола 1c). Глюкоза активирует преимущественно ChREBP, в то время как инсулин активирует LXR α либо прямо, либо через SREBP-1c [27–31]. Эти факторы транскрипции, в особенности ChREBP, регулируют экспрессию элонгаз и десатураз, включая гены *Elovl6* и *Scd* [4]. Мы не измеряли уровни мРНК и белка для LXR α , ChREBP и SREBP-1c, но предполагаем, что HSD стимулирует экспрессию генов *Elovl6* и *Scd*, активируя эти транскрипционные факторы.

В настоящем исследовании было показано, что повышенный уровень мРНК *Elovl6* соответствует более высокой активности ELOVL6. Напротив, повышение содержания мРНК *Scd* сопровождалось снижением активности соответствующего фермента. Нельзя исключить, что активность SCD регулируется на пост-транскрипционном уровне. Tan et al. [32] показали, что miR-199a-3p подавляет активность SCD и изменяет состав FA в адипоцитах 3T3-L1, целенаправленно воздействуя на 3'-UTR гена *Scd*. Было показано, что глюкоза регулирует экспрессию микроРНК из семейства 199a в β -клетках поджелудочной железы [33]. В исследовании Li et al. [34] было показано, что в плазме больных диабетом экспрессия miR-199a-3p повышена по сравнению со здоровыми волонтерами. Мы предполагаем, что HSD может быть ответственным за ингибирование трансляции мРНК *Scd* и снижение активности SCD за счёт повышения уровня miR-199a-3p.

Нами было показано, что в eWAT крыс из группы HSD уровни 16 : 0 и 18 : 0 были значительно выше, а уровни 16 : 1 n-7 и 18 : 1 n-9 были понижены по сравнению с контролем. Эти результаты соответствуют результатам, полученным на моделях нокаутированных животных. Так, мыши со специфическим удалением из жировой ткани SCD1 (AKO), мыши с одновременным удалением SCD1 из печени и АТ (LAKO) и *Scd1*-дефицитные мыши характеризуются выраженным снижением содержания 16 : 1 n-7 и 18 : 1 n-9 и повышением уровня 16 : 0 и 18 : 0 в составе жирных кислот TG жировой ткани [35, 36]. Кроме того, недавно было показано, что пальмитолеиновая кислота контролирует важные метаболические процессы в АТ, та-

кие как повышенный липолиз и поглощение глюкозы, и увеличивает расход энергии за счёт стимуляции цикла TG/FA [37, 38]. Мы предполагаем, что низкое содержание MUFA, особенно пальмитолеиновой кислоты, оказывает отрицательное влияние на метаболизм АТ, включая повышенное накопления TG у крыс из группы HSD.

Мыши с мутациями гена *Scd1* и *Scd1*-дефицитные мыши демонстрируют замечательный гиперметаболический фенотип, который защищает их от ожирения, инсулиновой резистентности и стеатоза печени. Ntambi et al. [39] показали, что мыши с целевым разрушением изоформы SCD1 в меньшей степени страдали от ожирения, они обладали повышенной чувствительностью к инсулину и были устойчивы к увеличению веса, вызванному диетой. Снижение ожирения, вызванного высокоуглеводной диетой, у мышей с печёночно-специфической делецией *Scd1* (LKO) и у *Scd1*-дефицитных мышей было связано с ингибированием экспрессии генов, участвующих в биосинтезе FA. В то же время было обнаружено, что делеция или ингибирование *Scd1* в WAT и BAT оказывают минимальное воздействие на энергетический метаболизм всего организма [35]. Таким образом, мы предполагаем, что снижение активности SCD в eWAT оказывает лишь некоторый локальный эффект, как было описано выше, но не оказывает значительного влияния на метаболизм липидов в организме.

В этом исследовании не было обнаружено различий между группами в содержании PUFA в eWAT. Однако содержание отдельных FA значительно изменялось. Так, у крыс группы HSD было обнаружено повышенное содержание 18 : 2 n-6 и пониженное содержание 18 : 3 n-3 и 18 : 3 n-6 по сравнению с группой ST.

Изменения содержания PUFA можно объяснить снижением уровня мРНК и активности FADS2, который является первым и скоростью-лимитирующим ферментом биосинтеза PUFA [9]. Напротив, уровень мРНК и активность ELOVL5, второго фермента, принимающего участие в синтезе PUFA, были повышены в группе HSD. Недавно было обнаружено, что ELOVL5 катализирует не только элонгацию C18 PUFA (18 : 3 n-6 и 18 : 4 n-3), но также и элонгацию MUFA от 16 : 1 n-7 до 18 : 1 n-7 (вакценовая кислота) [40]. В исследовании наблюдалось значительное снижение количества 18 : 3 n-6 и отсутствие 18 : 4 n-3. Мы предположили, что у крыс, получавших HSD, синтез вакценовой кислоты (18 : 1 n-7), катализируемый ELOVL5, доминирует над реакцией, приводящей к синтезу PUFA. Мы не измеряли содержание вакцено-

вой кислоты; однако мы полагаем, что более высокая активность ELOVL5 приводит к увеличению содержания этого соединения.

Более высокий уровень мРНК *Elovl5* соответствовал повышенной активности ELOVL5. Относительный уровень мРНК *Fads1* в группе HSD был выше по сравнению с контрольной группой, однако в группе HSD не удалось определить активность FADS1 из-за отсутствия конкретной FA, необходимой для расчёта индекса, отражающего активность FADS1.

В печени экспрессия генов *Elovl5*, *Fads1* и *Fads2* регулируется на уровне транскрипции, а именно белками SREBP-1c и LXR [4]. Было показано, что как глюкоза, так и инсулин индуцируют экспрессию LXR α , который является ключевым фактором транскрипции, стимулирующим экспрессию ферментов липогенеза. LXR высоко экспрессируется в АТ [41]. Hua et al. [29] предположили, что LXR α может играть центральную роль в контроле транскрипции с помощью глюкозы и инсулина в адипоцитах. Кроме того, в промоторе гена, кодирующего SREBP-1, имеется сайт связывания LXR α , и, следовательно, SREBP-1c может являться мишенью для LXR α . В целом вполне возможно, что более высокие уровни мРНК *Elovl5* и *Fads1* в АТ крыс группы HSD могут быть ассоциированы с индукцией LXR α и SREBP-1c глюкозой и инсулином. Более низкий уровень мРНК *Fads2* коррелировал с пониженной активностью белка FADS2 в группе крыс HSD, и эти изменения нуждаются в дальнейших исследованиях.

Уровень мРНК *Elovl2* в АТ крыс группы HSD не отличался от её уровня в контрольной группе. Wang et al. [4] показали, что обработка гепатоцитов глюкозой или инсулином не оказывает влияния на уровень экспрессии *Elovl2*. Кроме того, на экспрессию *Elovl2* в печени не влияют голодание и повторное кормление, а также диетические добавки с рыбным или оливковым маслом. Можно предположить, что уровень мРНК *Elovl2* в АТ, как и в печени, не изменяется в ответ на различные диеты.

Как описано в нашем предыдущем исследовании, в группе HSD уровень TG в сыворотке повышается по сравнению с контрольной группой [42], что могло быть результатом как стимулирования синтеза TG в печени, так и снижения деградации TG липазой липопротеинов [43–46].

Результаты этого исследования поддерживают идею о том, что регуляция уровня мРНК и активности элонгаз и десатураз играет важную роль в контроле липидного состава АТ в ответ на изменения в пищевом рационе. Нами было показано, что повышенное потребление углеводов вызывает изменения состава FA в АТ путём сни-

жения содержания MUFA. Кроме того, было показано, что HSD может регулировать гены элонгаз (*Elovl5* и *Elovl6*) и десатураз (*Fads1*, *Fads2* и *Scd*) FA. Чтобы изучить молекулярную основу регуляции экспрессии элонгаз и десатураз в АТ в ответ на изменения в питании, необходимы дальнейшие исследования.

Благодарности. Авторы выражают благодарность Катаржине Вадовской и Анне Цихон за прекрасную техническую поддержку.

Вклад авторов. Я. Драг и Е. Яцкевич задумали и спланировали эксперименты. Я. Драг, И. Гдула-Аргасинска и М. Кнапик-Чайка прове-

ли эксперименты. Я. Драг провела эксперименты на животных. Я. Драг, М. Кнапик-Чайка и А. Гаведзка проанализировали полученные данные. Я. Драг и М. Кнапик-Чайка написали статью. Все авторы прочли и одобрили окончательный вариант статьи.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Соблюдение этических норм. Все процедуры с лабораторными животными были выполнены в соответствии с этическими стандартами института, где было выполнено настоящее исследование (комитет по работе с животными, комитет по этике Ягеллонского университета, 19.11.2009, № 116/2009).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Jurešić, G. Č., Percan, K., and Broznić, D. (2016) Effect of dietary fatty acid variation on mice adipose tissue lipid content and phospholipid composition, *Croat. J. Food Technol. Biotechnol. Nutr.*, **11**, 128-137.
- Beylot, M. (2007) Metabolism of white adipose tissue, in *Adipose Tissue And Adipokines In Health And Disease* (Fantuzzi, G., and Mazzone, T., ed.) Totowa, pp. 21-35, doi: 10.1007/978-1-59745-370-7_2.
- Kunešová, M., Hlavatý, P., Tvrzická, E., Staňková, B., Kalousková, P., et al. (2012) Fatty acid composition of adipose tissue triglycerides after weight loss and weight maintenance: the DIOGENES study, *Physiol. Res.*, **61**, 597-607, doi: 10.33549/physiolres.932414.
- Wang, Y., Botolin, D., Xu, J., Christian, B., Mitchell, E., et al. (2006) Regulation of hepatic fatty acid elongase and desaturase expression in diabetes and obesity, *J. Lipid Res.*, **47**, 2028-2041, doi: 10.1194/jlr.M600177-JLR200.
- Guillou, H., Zadavec, D., Martin, P. G. P., and Jacobsson, A. (2010) The key roles of elongases and desaturases in mammalian fatty acid metabolism: Insights from transgenic mice, *Prog. Lipid Res.*, **49**, 186-199, doi: 10.1016/j.plipres.2009.12.002.
- Kihara, A. (2012) Very long-chain fatty acids: elongation, physiology and related disorders, *J. Biochem.*, **152**, 387-395, doi: 10.1093/jb/mvs105.
- Moon, Y.-A., Hammer, R. E., and Horton, J. D. (2009) Deletion of ELOVL5 leads to fatty liver through activation of SREBP-1c in mice, *J. Lipid Res.*, **50**, 412-423, doi: 10.1194/jlr.M800383-JLR200.
- Tripathy, S., Lytle, K. A., Stevens, R. D., Bain, J. R., Newgard, C. B., et al. (2014) Fatty acid elongase-5 (*Elovl5*) regulates hepatic triglyceride catabolism in obese C57BL/6J mice, *J. Lipid Res.*, **55**, 1448-1464, doi: 10.1194/jlr.M050062.
- Zhang, J. Y., Kothapalli, K. S. D., and Brenna, J. T. (2016) Desaturase and elongase-limiting endogenous long-chain polyunsaturated fatty acid biosynthesis, *Curr. Opin. Clin. Nutr. Metab. Care*, **19**, 103-110, doi: 10.1097/MCO.0000000000000254.
- ALJohani, A. M., Syed, D. M., and Ntambi, J. M. (2017) Insights into stearoyl-CoA desaturase-1 regulation of systemic metabolism, *Trends Endocrinol. Metab.*, **28**, 831-842, doi: 10.1016/j.tem.2017.10.003.
- Paton, C. M., and Ntambi, J. M. (2009) Biochemical and physiological function of stearoyl-CoA desaturase, *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.*, **297**, 28-37, doi: 10.1152/ajpendo.90897.2008.
- Dentin, R., Denechaud, P. D., Benhamed, F., Girard, J., and Postic, C. (2006) Hepatic gene regulation by glucose and polyunsaturated fatty acids: a role for ChREBP, *J. Nutr.*, **136**, 1145-1149, doi: 10.1093/jn/136.5.1145.
- Ma, L., Robinson, L. N., and Towle, H. C. (2006) ChREBP-Mlx is the principal mediator of glucose-induced gene expression in the liver, *J. Biol. Chem.*, **281**, 28721-28730, doi: 10.1074/jbc.M601576200.
- Wang, Y., Botolin, D., Christian, B., Busik, J., Xu, J., and Jump, D. B. (2005) Tissue-specific, nutritional, and developmental regulation of rat fatty acid elongases, *J. Lipid Res.*, **46**, 706-715, doi: 10.1194/jlr.M400335-JLR200.
- Mitro, N., Mak, P. A., Vargas, L., Godio, C., Hampton, E., et al. (2007) The nuclear receptor LXR is a glucose sensor, *Nature*, **445**, 219-223, doi: 10.1038/nature05449.
- Qin, Y., Dalen, K. T., Gustafsson, J. Å., and Nebb, H. I. (2009) Regulation of hepatic fatty acid elongase 5 by LXR α -SREBP-1c, *Biochim. Biophys. Acta Mol. Cell Biol. Lipids*, **1791**, 140-147, doi: 10.1016/j.bbalip.2008.12.003.
- Jazurek, M., Dobrzyń, P., and Dobrzyń, A. (2008) Regulation of gene expression by long-chain fatty acids, *Postepy Biochem.*, **54**, 242-250.
- Ntambi, J. M. (1992) Dietary regulation of stearoyl-CoA desaturase 1 gene expression in mouse liver, *J. Biol. Chem.*, **267**, 10925-10930, doi: 10.1016/S0021-9258(19)50107-7.
- Folch, J., Lees, M., and Sloane Stanley, G. H. (1957) A simple method for the isolation and purification of total lipides from animal tissues, *J. Biol. Chem.*, **226**, 497-509.
- Metcalfe, L. D., and Schmitz, A. A. (1961) The rapid preparation of fatty acid esters for gas chromatographic analysis, *Anal. Chem.*, **33**, 363-364, doi: 10.1021/ac60171a016.
- Chaves Das Neves, H. J., and Vasconcelos, A. M. (1987) Capillary gas chromatography of amino acids, including

- asparagine and glutamine: sensitive gas chromatographic-mass spectrometric and selected ion monitoring gas chromatographic-mass spectrometric detection of the N,O(S)-tert.-butyldimethylsilyl derivativ, *J. Chromatogr.*, **392**, 249-258.
22. Li, Y., and Watkins, B. A. (1998) Conjugated linoleic acids alter bone fatty acid composition and reduce *ex vivo* prostaglandin E 2 biosynthesis in rats fed n-6 or n-3 fatty acids, *Lipids*, **33**, 417-425, doi: 10.1007/s11745-998-0223-9.
 23. Cedernaes, J., Alsjö, J., Västermark, Å., Risérus, U., and Schiöth, H. B. (2013) Adipose tissue stearoyl-CoA desaturase 1 index is increased and linoleic acid is decreased in obesity-prone rats fed a high-fat diet, *Lipids Health Dis.*, **12**, 2, doi: 10.1186/1476-511X-12-2.
 24. Harding, S. V., Bateman, K. P., Kennedy, B. P., Rideout, T. C., and Jones, P. J. H. (2015) Desaturation index versus isotopically measured de novo lipogenesis as an indicator of acute systemic lipogenesis, *BMC Res. Notes*, **8**, 49, doi: 10.1186/s13104-015-1016-0.
 25. Gastaldelli, A., Gaggini, M., and DeFronzo, R. A. (2017) Role of adipose tissue insulin resistance in the natural history of type 2 diabetes: results from the San Antonio metabolism study, *Diabetes*, **66**, 815-822, doi: 10.2337/db16-1167.
 26. Govers, R. (2014) Molecular mechanisms of GLUT4 regulation in adipocytes, *Diabetes Metab.*, **40**, 400-410, doi: 10.1016/J.DIABET.2014.01.005.
 27. Beaven, S. W. W., Matveyenko, A., Wroblewski, K., Chao, L., Wilpitz, D., et al. (2013) Reciprocal regulation of hepatic and adipose lipogenesis by liver X receptors in obesity and insulin resistance, *Cell Metab.*, **18**, 106-117, doi: 10.1016/j.cmet.2013.04.021.
 28. Herman, M. A., Peroni, O. D., Villoria, J., Schön, M. R., Abumrad, N. A., et al. (2012) A novel ChREBP isoform in adipose tissue regulates systemic glucose metabolism, *Nature*, **484**, 333-338, doi: 10.1038/nature10986.
 29. Hua, Z. G., Xiong, L. J., Yan, C., Wei, D. H., Ying Pai, Z., et al. (2016) Glucose and insulin stimulate lipogenesis in porcine adipocytes: dissimilar and identical regulation pathway for key transcription factors, *Mol. Cells*, **39**, 797-806, doi: 10.14348/molcells.2016.0144.
 30. Nuotio-Antar, A. M., Pongvarin, N., Li, M., Schupp, M., Mohammad, M., et al. (2015) FABP4-Cre mediated expression of constitutively active ChREBP protects against obesity, fatty liver, and insulin resistance, *Endocrinology*, **156**, 4020-4032, doi: 10.1210/en.2015-1210.
 31. Song, Z., Xiaoli, A. M., and Yang, F. (2018) Regulation and metabolic significance of *de novo* lipogenesis in adipose tissues, *Nutrients*, **10**, 1383, doi: 10.3390/nu10101383.
 32. Tan, Z., Du, J., Shen, L., Liu, C., Ma, J., et al. (2017) MiR-199a-3p affects adipocytes differentiation and fatty acid composition through targeting SCD, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **492**, 82-88, doi: 10.1016/j.bbrc.2017.08.030.
 33. De Castro, J.P.W., Blandino-Rosano, M., and Bernal-Mizrachi, E. (2018) The microRNA 199a family is regulated by glucose levels in pancreatic beta cells, *Diabetes*, **67**, 2170, doi: 10.2337/db18-2170-P.
 34. Li, Y. B., Wu, Q., Liu, J., Fan, Y. Z., Yu, K. F., and Cai, Y. (2017) miR-199a-3p is involved in the pathogenesis and progression of diabetic neuropathy through downregulation of SerpinE2, *Mol. Med. Rep.*, **16**, 2417-2424, doi: 10.3892/mmr.2017.6874.
 35. Flowers, M. T., Ade, L., Strable, M. S., and Ntambi, J. M. (2012) Combined deletion of SCD1 from adipose tissue and liver does not protect mice from obesity, *J. Lipid Res.*, **53**, 1646-1653, doi: 10.1194/jlr.M027508.
 36. Dragos, S. M., Bergeron, K. F., Desmarais, F., Suito, K., Wright, D. C., et al. (2017) Reduced SCD1 activity alters markers of fatty acid reesterification, glyceroneogenesis, and lipolysis in murine white adipose tissue and 3T3-L1 adipocytes, *Am. J. Physiol. Cell Physiol.*, **313**, 295-304, doi: 10.1152/ajpcell.00097.2017.
 37. Soriguer, F., Moreno, F., Rojo-Martínez, G., García-Fuentes, E., Tinahones, F., et al. (2003) Monounsaturated n-9 fatty acids and adipocyte lipolysis in rats, *Br. J. Nutr.*, **90**, 1015-1022, doi: 10.1079/BJN2003993.
 38. Cruz, M. M., Lopes, A. B., Crisma, A. R., De Sá, R. C. C., Kuwabara, W. M. T., et al. (2018) Palmitoleic acid (16 : 1 n7) increases oxygen consumption, fatty acid oxidation and ATP content in white adipocytes, *Lipids Heal. Dis.*, **17**, 55, doi: 10.1186/s12944-018-0710-z.
 39. Ntambi, J. M., Miyazaki, M., Stoehr, J. P., Lan, H., Kendziorski, C. M., et al. (2002) Loss of stearoyl-CoA desaturase-1 function protects mice against adiposity, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **99**, 11482-11486, doi: 10.1073/pnas.132384699.
 40. Tripathy, S., Torres-Gonzalez, M., and Jump, D. B. (2010) Elevated hepatic fatty acid elongase-5 activity corrects dietary fat-induced hyperglycemia in obese BL/6J mice, *J. Lipid Res.*, **51**, 2642-2654, doi: 10.1194/jlr.M006080.
 41. Steffensen, K. R., and Gustafsson, J. A. (2004) Putative metabolic effects of the liver X receptor (LXR), *Diabetes*, **53**, Suppl. 1, 36-42, doi: 10.2337/diabetes.53.2007.s36.
 42. Drag, J., Goździalska, A., Knapik-Czajka, M., Gawędzka, A., Gawlik, K., and Jaśkiewicz, J. (2017) Effect of high carbohydrate diet on elongase and desaturase activity and accompanying gene expression in rat's liver, *Genes Nutr.*, **12**, 2, doi: 10.1186/s12263-017-0551-9.
 43. Kanazawa, M., Xue, C. Y., Kageyama, H., Suzuki, E., Ito, R., et al. (2003) Effects of a high-sucrose diet on body weight, plasma triglycerides, and stress tolerance, *Nutr. Rev.*, **61**, 27-33, doi: 10.1301/nr.2003.may.s27-s33.
 44. Xue, C. Y., Kageyama, H., Kashiba, M., Kobayashi, A., Osaka, T., et al. (2001) Different origin of hypertriglyceridemia induced by a high-fat and a high-sucrose diet in ventromedial hypothalamic-lesioned obese and normal rats, *Int. J. Obes.*, **25**, 434-438, doi: 10.1038/sj.ijo.0801548.
 45. Huang, W., Dedousis, N., and O'Doherty, R. M. (2007) Hepatic steatosis and plasma dyslipidemia induced by a high-sucrose diet are corrected by an acute leptin infusion, *J. Appl. Physiol.*, **102**, 2260-2265, doi: 10.1152/jappphysiol.01449.2006.
 46. Feng, R., Du, S., Chen, Y., Zheng, S., Zhang, W., et al. (2015) High carbohydrate intake from starchy foods is positively associated with metabolic disorders: a Cohort Study from a Chinese population, *Sci. Rep.*, **5**, 16919, doi: 10.1038/srep16919.

IMPACT OF HIGH-SUCROSE DIET ON THE mRNA LEVELS FOR ELONGASES AND DESATURASES AND ESTIMATED PROTEIN ACTIVITY IN RAT ADIPOSE TISSUE

Jagoda Drag^{1*}, Malgorzata Knapik-Czajka¹, Anna Gawedzka¹,
Joanna Gdula-Argasinska², and Jerzy Jaskiewicz¹

¹ Department of Biochemical Analytics, Faculty of Pharmacy, Jagiellonian University Medical College, 30-688 Krakow, Poland; E-mail: jagoda.drag@uj.edu.pl

² Department of Radioligands, Faculty of Pharmacy, Jagiellonian University Medical College, 30-688 Krakow, Poland

Fatty acids (FAs) present in the adipose tissue (AT) can be modified by elongases and desaturases. These enzymes are regulated by different factors including nutrients. The aim of the study was to evaluate the impact of high-sucrose diet (HSD; 68% sucrose) on the levels of mRNAs for elongases (*Elovl2*, *Elovl5*, *Elovl6*) and desaturases (*Fads1*, *Fads2*, *Scd*) and on the activity of the corresponding proteins in the rat AT. Male Wistar rats were randomized into two study groups: fed with an HSD and with a standard diet (ST). The mRNA levels were determined by a semi-quantitative reverse transcription-PCR. FA composition was analyzed by gas chromatography, and FA ratios were used to estimate the activity of the enzymes. In the HSD rats, the levels of *Elovl5*, *Elovl6*, *Fads1*, and *Scd* mRNAs were higher, while the level of *Fads2* mRNA was lower than in the ST group. Higher levels of *Elovl5* and *Elovl6* mRNAs corresponded to higher relative activities of these enzymes, while downregulation of the *Fads2* mRNA was associated with the lower activity of this desaturase. In contrast, an increase in the level of *Scd* mRNA was accompanied by a decrease in the enzyme activity. Less monounsaturated FAs was detected in the AT of HSD rats than in the ST group. The composition of individual FAs differed between the groups. This study supports the notion that the regulation of mRNA levels and activity of both elongases and desaturases play an important role in managing the AT lipid composition in response to changes in the dietary status.

Keywords: elongases, desaturases, fatty acids, high-sucrose diet, adipose tissue

УДК 577.2

АКТИВНОСТИ ХИМИЧЕСКИ СИНТЕЗИРОВАННОГО ПЕПТИДА, КОТОРЫЙ КОДИРУЕТСЯ РНК-ПРЕДШЕСТВЕННИКОМ miR156A И КОНСЕРВАТИВЕН В РАСТЕНИЯХ СЕМЕЙСТВА Brassicaceae

© 2021 Т.Н. Ерохина¹, Д.Ю. Рязанцев¹, Л.В. Самохвалова¹, А.А. Можжев¹, А.Н. Орс¹, С.К. Завриев¹, С.Ю. Морозов^{2*}

¹ Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, 117997 Москва, Россия

² НИИ физико-химической биологии им. А.Н. Белозерского, Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, 119992 Москва, Россия; электронная почта: morozov@belozersky.msu.ru

Поступила в редакцию 25.01.2021

После доработки 03.03.2021

Принята к публикации 03.03.2021

Недавние исследования показали, что в растениях первичные транскрипты некоторых генов miRNA (pri-miRNA) способны экспрессировать короткие белки (пептиды) размером от 12–15 до 30–40 а.о. Эти пептиды, названные miPEP, могут участвовать в регуляции транскрипции собственных rgi-miRNA и сохраняют биологическую активность при экзогенном введении в растения через корневую систему. Используя биоинформатический сравнительный анализ последовательностей РНК-транскриптов и геномов растений, нами ранее была обнаружена новая группа miPEP (miPEP-156a), которая кодируется первичными транскриптами rgi-miR156a у нескольких десятков видов из семейства Brassicaceae. Экзогенные химически синтезированные пептиды miPEP-156a способны эффективно проникать в проростки растений через корневую систему и распространяться по растению локально и системно в листьях молодых проростков. При этом наблюдается морфологический эффект, заключающийся в ускоренном росте основного корня проростка. Параллельно наблюдается позитивный эффект на уровне экспрессии rgi-miR156a. Важно, что с эффектами на морфологическом и молекулярном уровнях коррелирует способность пептида быстро проникать в ядра клеток и связываться *in vitro* как с хроматином, так и с ДНК. В настоящей работе была экспериментально установлена вторичная структура пептида и показано изменение этой структуры в комплексе с ДНК.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: микроРНК, первичные транскрипты микроРНК, трансляция РНК-транскриптов микроРНК, короткие рамки трансляции, регуляция транскрипции, импорт белков в ядро, ДНК-связывающие пептиды.

DOI: 10.31857/S032097252105002X

ВВЕДЕНИЕ

МикроРНК (miRNA) – это короткие некодирующие одноцепочечные эндогенные РНК, которые регулируют экспрессию генов, используя специфическое расщепление и/или трансляционную репрессию целевой мРНК при комплементарном спаривании оснований [1–4]. Типичные miRNA выступают в качестве ключевых регуляторов различных процессов развития

растений и животных [5, 6]. Биогенез miRNA требует ряда хорошо скоординированных процессов, где ген miRNA сначала транскрибируется РНК-полимеразой II с образованием первичной miRNA (pri-miRNA), которая обычно имеет длину в несколько сотен или даже тысяч нуклеотидов и содержит, как и мРНК, 5'-концевую «кэп»-структуру и 3'-концевую поли(А)-последовательность [1–4, 7]. У растений pri-miRNA процессируются с образованием шпилькообразного несовершенного дуплекса (называемого предшественником miRNA (pre-miRNA)) Dicer-подобным ферментом 1 (DCL1) с участием белка HYL1 [8]. При следующем шаге процессинга с участием DCL1 у pre-miRNA отщепляется шпилечная область, что после 3'-концевого метилирования приводит к формированию зрелых miRNA, которые играют особую роль как жизненно важные регуляторы процессов развития растений, поглощения пи-

Принятые сокращения: miRNA – микроРНК; pri-miRNA – первичные транскрипты генов микроРНК; pre-miRNA – предшественник miRNA; miPEP – пептид, кодируемый первичным транскриптом генов микроРНК; ОПТ – открытая рамка трансляции; кПЦР – количественная полимеразная цепная реакция; КД – круговой дихроизм; TRAP – метод для трансляционной иммунологической очистки связанных с рибосомами РНК (translating ribosome affinity immunoprecipitation).

* Адресат для корреспонденции.

тательных веществ, а также ответа на стрессы [1–8].

В цитоплазме зрелая miRNA взаимодействует с белковым комплексом RISC, содержащим фермент Argonaute (AGO1), который связывает одну из цепей двуспиральной miRNA, и комплементарное спаривание последней с мРНК либо обеспечивает прецизионное расщепление целевой мРНК, либо ингибирует её трансляцию [1–4, 9]. Очевидно, основная роль pre-miRNA заключается в продукции регуляторных miRNA, и поэтому долгое время считалось, что это некодирующие РНК.

Таким образом, существовало общее мнение, что последовательности к 5'- и 3'-концам от шпилькообразной области pre-miRNA функционально маловажны и быстро деградируют после отщепления области pre-miRNA [10].

Однако более поздние новые методы исследований транслята растений явно указывают на трансляционную активность первичных транскриптов генов микроРНК (pri-miRNA). Чтобы облегчить захват рибосом-ассоциированной мРНК или ее фрагментов, был разработан метод для трансляционной иммунологической очистки связанных с рибосомами РНК (метод TRAP – translating ribosome affinity immunoprecipitation) [11]. При этом используется эпитоп-меченый рибосомный белок L18 (RPL18), встроенный в функциональные рибосомы в трансгенном растении *Arabidopsis thaliana*. Главное преимущество этого метода заключается в том, что уменьшается загрязнение препаратов полисом мРНК-белковыми комплексами сходной плотности, и эти препараты могут быть использованы для получения фрагментов мРНК, непосредственно связанных с рибосомами [11, 12]. TRAP-анализ показал, что в составе препаратов полисом могут быть выявлены фраг-

менты pri-miRNA, ассоциированные с рибосомами и содержащие открытые рамки трансляции (OPT) [12, 13].

Сейчас все большее число сообщений указывает на то, что действительно существуют пептиды, транслируемые на коротких OPT в 5'-проксимальных последовательностях pri-miRNA. Такие пептиды, кодируемые pri-miRNA у растений и животных, называются miPEP [10, 13–17]. В частности, ряд miPEP, синтез которых направляют короткие OPT в 5'-проксимальных последовательностях pri-miRNA, предсказан и найден у арабидопсиса (*A. thaliana*) [18], сои (*Glycine max*) [19] и арахиса (*Arachis hypogaea*) [20]. Экзогенное введение в растения синтетических пептидов через корневую систему показало, что пептиды miPEP-165a из *Arabidopsis* и miPEP-171b из *Medicago truncatula* способны активировать транскрипцию собственных pri-miRNA и ускорять развитие корней. Таким образом, формируется петля положительной обратной связи, что приводит к повышению уровня биогенеза соответствующей miRNA и изменениям в органогенезе [18, 21]. Обработка растений *M. truncatula* синтетическим пептидом miPEP-171b также повышает эндогенную экспрессию miR171b, но приводит к снижению плотности боковых корней. Этот эффект miPEP-171b был специфичным, поскольку пептид не влиял на экспрессию других miRNA. Обработка проростков *A. thaliana* и рассады винограда химически синтезированными препаратами miPEP-171c и miPEP-171d также приводила к специфическому ускорению развития корней [16]. Кроме того, недавно было показано участие miPEP-172c в контроле процесса нодуляции в корнях растений сои [19].

Ранее нами было предсказано существование коротких OPT в 5'-проксимальных последовательностях РНК-транскриптов pri-miR156a у растений рода *Brassica* (*B. napus*, *B. rapa* и *B. oleracea*) (рис. 1). Похожие короткие консервативные пептиды длиной 32–33 остатка закодированы также в геномах растений рода *Arabidopsis*, включая *A. thaliana* [22]. Используя множественные выравнивания кодирующих последовательностей микрорепептидов miPEP-156a, были идентифицированы консервативные а.о., характерные для кодируемых пептидов у многих представителей из 11 родов семейства Brassicaceae [22].

Вторичная структура и трехмерная модель miPEP-156a были предсказаны *in silico* с использованием метода I-TASSER (Iterative Threading ASSEMBly Refinement). В настоящей работе, используя синтетический пептид miPEP-156a *Brassica rapa*, были изучены биологические и ряд

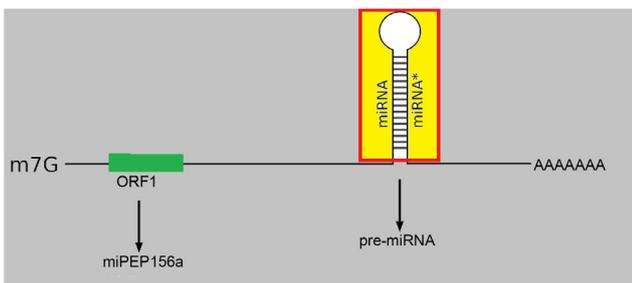


Рис. 1. Схема организации РНК-транскрипта pri-miR156a. Открытая рамка трансляции (ORF1), кодирующая пептид miPEP-156a, отмечена как зеленый прямоугольник. Шпильчатый район РНК, соответствующий pre-miR156a, отмечен жёлтым цветом. (С цветными вариантами рисунков можно ознакомиться в электронной версии статьи на сайте: <http://sciencejournals.ru/journal/biokhsm/>)

пептида miPEP-156a в концентрации 10 мкг/мл. Для анализа корней 4–5-дневные проростки переносили на стеклянные пластины для наблюдения, измерения и фотографирования.

Получение флуоресцентно-меченных пептидов. Синтетические пептиды (табл. 1) были любезно предоставлены Игорем Ивановым (ИБХ РАН). Нами был также получен флуоресцентно-меченный пептид miPEP-156a (исходный пептид предоставлен И. Ивановым).

Для мечения был использован флуорофор TAMRA (5-carboxytetramethylrhodamine). В результате был получен пептид TAMRA-miPEP-156a. Мечение miPEP-156a проводили двумя разными способами: по N-концу и по аминокетильным группам. Для мечения пептида по аминокетильным группам 2 мг пептида растворяли в 0,1 М гидрокарбонате натрия (pH 8,2) и добавляли 1,5-кратный молярный избыток N-гидроксисукцинимидного эфира TAMRA («Lumiprobe», Россия) в ДМСО. Реакцию проводили 2 ч при комнатной температуре. После реакции пептид осаждали трихлоруксусной кислотой, осадок промывали ацетоном и растворяли в воде. Для очистки от непрореагировавшего красителя проводили обращенно-фазовую хроматографию на колонке Vydac C18 peptide («Hichrom», Великобритания) в градиенте ацетонитрила с добавлением 0,1%-ной трифторуксусной кислоты. Для получения отрицательного контроля смешивали 10 мМ раствор глицина в 0,1 М гидрокарбонатном буфере (pH 8,2) с 10 мМ раствором N-гидроксисукцинимидного эфира TAMRA. После инкубации 2 ч при комнатной температуре продукт реакции использовали без дополнительной очистки.

Мечение пептида по N-концу проводили в соответствии с работой Witus и Francis [25]. К 2 мг пептида, растворенного в 200 мкл фосфатного буфера (pH 6,0), добавляли пиридоксальфосфат («Sigma», США) до концентрации 10 мМ, и инкубировали ночь при комнатной температуре. После инкубации смесь центрифугировали 5 мин при 13 000 об./мин на центрифуге Eppendorf 5810 R («Eppendorf», Германия), и супернатант переносили в новую пробирку. Пептид осаждали 15%-ной трихлоруксусной кислотой, осадок промывали ацетоном и растворяли в воде. К раствору пептида добавляли гидразид TAMRA («Lumiprobe») до концентрации 5 мМ, и инкубировали ночь при комнатной температуре. После реакции пептид осаждали 15%-ной трихлоруксусной кислотой, осадок промывали ацетоном и растворяли в воде. Для очистки от непрореагировавшего красителя проводили обращенно-фазовую хроматографию на колонке Vydac C18 peptide («Hichrom») в

градиенте ацетонитрила (5–80%) с добавлением 0,1%-ной трифторуксусной кислоты.

Выделение ядерной фракции и получение хроматин-содержащего лизата из тканей *Brassica rapa* subsp. *pekinensis*. Для выделения ядерной фракции 1 г листьев растирали в ступке с 3 мл буфера А: 50 мМ Tris-HCl, pH 7,4; 15 мМ MgCl₂; 10 мМ KCl; 0,1% меркаптоэтанола; 20% (w/v) глицерина и 12,6 мкл Protease Inhibitor Cocktail («Sigma») и центрифугировали 10 мин при 1260 g («Eppendorf»). Осадок ресуспендировали в 0,5 мл буфера А с добавлением 3% (w/v) Triton X100. На дно пробирки наслаивали 0,8 мл 2,3 М сахарозы, сверху наносили ресуспендированный осадок и центрифугировали 10 мин при 12 000 g («Eppendorf»). Затем супернатант удаляли, а осадок промывали два раза буфером А и центрифугировали 5 мин при 12 000 g.

Для получения хроматин-содержащего лизата осадок ядер ресуспендировали в 1,5 мл буфера Б: 20 мМ HEPES, pH 7,9; 1,5 мМ MgCl₂; 0,42 М NaCl; 0,2 мМ EDTA; 25% (w/v) глицерина, содержащего 1,5 мкл 0,1 М DTT и 15 мкл Protease Inhibitor Cocktail, инкубировали при слабом покачивании 30 мин, затем центрифугировали 5 мин при 20 000 g («Eppendorf»). Супернатант переносили в чистую пробирку и диализовали против 0,1 М HEPES, pH 6,0. Отдельную фракцию супернатанта инкубировали 10 мин при 74 °С для удаления из нуклеосом гистонов H2A–H2B. После инкубации смесь снова центрифугировали 5 мин при 20 000 g, после чего осадок растворяли в 0,1 М HEPES, pH 6,0. Потерю хроматина гистонов H2A–H2B проверяли с помощью электрофореза в ПААГ [27] при сравнении с фракцией, не обработанной при 74 °С.

In silico предсказания ассоциации пептида miPEP-156a с ядром клетки и ДНК. Несмотря на интенсивные исследования взаимодействий между белками и ДНК в течение последних десятилетий, механизмы связывания и распознавания белок–ДНК остаются недостаточно изученными. Идентификация ядерных белков и потенциальных ДНК-связывающих областей таких белков является важным шагом к раскрытию функций транскрипционных факторов. На сегодняшний день в этой области широко применяются различные вычислительные методы, помогающие идентифицировать ядерные белки и предсказать возможные сайты связывания белка. В данной работе мы использовали достаточно новые гибридные алгоритмы для предсказания ядерной локализации miPEP-156a (<http://mleg.cse.sc.edu/seqNLS/index.html>) и идентификации потенциальных ДНК-связывающих остатков в этом пептиде (<https://dnabind.szilab.org/> и <http://mleg.cse.sc.edu/DNABind/>) [26].

Анализ связывания пептида с ядерной ДНК и хроматином. Для анализа связывания флуоресцентно-меченных пептидов с тотальной ядерной ДНК и хроматином из клеток китайской капусты использовали метод сдвига в агарозном геле [27].

Неспецифический ДНК-фрагмент длиной 280 п.н. представлял собой ПЦР-продукт плазмиды pUC18 из области, содержащей полилинкер. Растворы пептида и ДНК смешивали в буфере, содержащем 10 мМ HEPES pH 8,0; 50 мМ KCl; 0,1 мМ ЭДТА и 5% (w/v) глицерин, таким образом, чтобы получить молярное соотношение ДНК/пептид от 1/25 до 1/200. Эксперименты проводили также с добавлением хлорида магния до концентрации 10 мМ и с добавлением 10 мМ хлорида магния и 0,5% меркаптоэтанола. Образцы инкубировали 30 мин в холодильнике (при температуре 6 °С), смешивали с буфером для нанесения на гель и проводили электрофорез в 1,2%-ном агарозном геле. Присутствие или отсутствие 10 мМ MgCl₂ и меркаптоэтанола (0,05% и 0,5%) не оказывало влияния на образование комплекса пептид–нуклеиновая кислота. Кроме того, чтобы определить стабильность комплексов пептид–ДНК и пептид–хроматин, фрагменты тотальной ДНК из хроматин-содержащего лизата (~15 000–20 000 п.н.) или хроматина были растворены вместе с флуоресцентно-меченным пептидом (1 мкг пептида/10 нг ДНК растений) в буфере, содержащем 10 мМ HEPES pH 8,0; 50 мМ KCl; 0,1 мМ ЭДТА и 5% (w/v) глицерин. Эти смеси инкубировали 10 мин при комнатной температуре и анализировали в 0,8%-ном агарозном геле.

Изучение вторичной структуры пептида miPEP-156a и его комплексов с ДНК с помощью метода кругового дихроизма (КД). Для исследования был использован пептид miPEP-156a (концентрация 1 мг/мл или 0,259 нмоль/мл). Был приготовлен раствор пептида в воде и в растворе тотальной ДНК капусты (5 мкг/мл).

Растворы инкубировали при комнатной температуре 30 мин, а затем выполняли измерения спектров КД на спектрополяриметре J-810 («JASCO», Япония) в диапазоне 250–190 нм в кварцевой кювете толщиной 0,05 или 0,1 см при комнатной температуре. Записи спектров КД проводились с шагом 0,2 нм (скорость сканирования 20 нм/мин) и шириной оптической щели 1 нм, затем выполняли усреднение по 4-м спектрам. Для расчета вторичной структуры использовали программу CONTINLL (пакет CDPго) и набор референсных спектров SMP56.

Изучение локализации флуоресцентно-меченого пептида miPEP-156a в клетках животных. Учитывая средство miPEP-156a к нуклеиновым

кислотам, мы провели предварительные эксперименты по изучению внутриклеточной локализации TAMRA-miPEP-156a в клетках мышечной миеломной линии Sp2/0 («Creative Biolabs», Германия). Для этого клетки рассевали в среде DMEM, дополненной 10% (v/v) фетальной бычьей сыворотки («Gibco», США), в 24-луночные планшеты, на дно которых были заранее положены круглые стерильные стекла. Клетки рассевали в такой концентрации, чтобы на следующий день они составляли 40–60% от монослоя. На следующий день в среду добавляли TAMRA-miPEP-156a (5 мкг/мл) и инкубировали в течение 2 ч в CO₂-инкубаторе («Heraeus», Германия). Через 1 ч после начала инкубации добавляли 10 мкл ядерного маркера Hoechst 33342 (0,625 мг/мл) («Thermo Fisher Scientific») и инкубировали еще час. В случае мечения клеточных мембран через 50 мин после добавления маркера Hoechst добавляли 0,2 мкл 1 мМ маркера ER-Tracker™ Green (glibenclamide BODIPY® FL) («Thermo Fisher Scientific»). Затем стекла с клетками 3 раза отмывали бессывороточной средой DMEM («Gibco»). После этого стекла извлекали из планшета и с помощью специального клея прикрепляли к предметным стеклам. Внутриклеточную локализацию меченого пептида TAMRA-miPEP-156a, маркера ER-Tracker™ Green и ядерного маркера Hoechst 33342 изучали с помощью конфокальной лазерной сканирующей микроскопии (CLSM).

Изучение локализации пептида miPEP-156a в клетках растений. Пептид miPEP-156a (10 мкг/мл), меченный с N-конца флуорофором TAMRA, инкубировали в МГ-буфере (10 мМ MgCl₂, 10 мМ Tris-HCl, pH 5,8) с 4-дневными проростками *B. rapa* при погружении корней в раствор пептида (23 °С в течение 18 ч). После обработки проростки трижды промывали при мягком встряхивании в течение 5 мин в МГ-буфере, обрабатывали 20 мин раствором ядерного маркера Hoechst 33342 (10 мкл на 1,5 мл буфера, концентрация маркера 0,625 мг/мл), и их корни и листья анализировали с помощью конфокального микроскопа «Nikon Eclipse TE 2000-E» («Nikon», Япония). Флуоресценция визуализировалась следующим образом: возбуждение 495 нм/эмиссия 545 нм.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Сравнительный анализ накопления РНК-транскриптов pri-miR156a в растениях капусты и арабидопсиса. Ранее было показано, что наиболее интенсивный синтез pri-miR156a в листьях и корнях проростков арабидопсиса происходит в

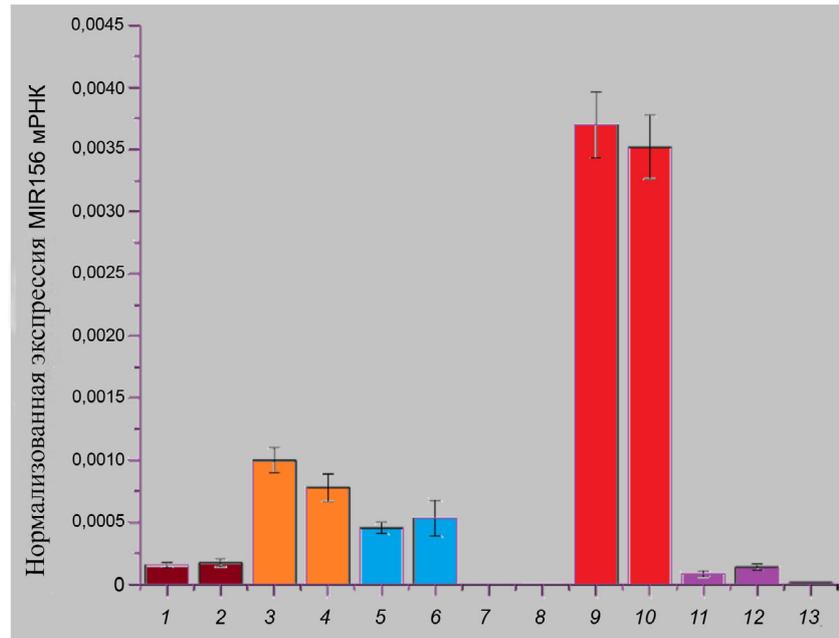


Рис. 2. Результаты кПЦР по измерению уровня экспрессии pri-miRNA156a в растениях семейства Brassicaceae. 1 – Брокколи (20-дневное растение, листья); 2 – брокколи (20-дневное растение, корень); 3 – проростки брокколи (4 дня) с добавлением пептида miPEP-156a (10 мкг/мл, выращивание при 20 °С); 4 – проростки брокколи (4 дня) с добавлением пептида (10 мкг/мл, выращивание при 24 °С); 5 – проростки брокколи (4 дня) на чашке Петри, контроль (вода, выращивание при 20 °С); 6 – проростки брокколи (4 дня) на чашке Петри, контроль (вода, выращивание при 24 °С); 7 – взрослые цветущие растения арабидопсиса (корни); 8 – взрослые цветущие растения арабидопсиса (листья); 9 – арабидопсис, проростки (4 дня при 20 °С) целиком (с корнями); 10 – арабидопсис, проростки (4 дня при 24 °С) целиком (с корнями); 11 – пекинская капуста (20-дневное растение, стебель); 12 – пекинская капуста (20-дневное растение, лист); 13 – пекинская капуста (20-дневное растение, корень). Для каждого из трех независимых повторов РНК выделяли из смеси пяти растительных проб. На рисунке указаны средние статистические значения в виде столбчатой диаграммы и стандартные отклонения. Статистическая значимость различий сумм значений в экспериментах 3 и 4 относительно экспериментов 5 и 6 составляла для этих двух выборок $p < 0,05$, согласно критерию Стьюдента (расчёт на основе программы GraphPad Prism 7.0 – <https://graphpad-prism.software.informer.com/7.0/>)

ходе прорастания между 2-м и 10-м днём при 23 °С [28, 29]. После 10-го дня экспрессия многократно падает. Мы решили сравнить динамику накопления pri-miR156a в растениях капусты брокколи и китайской капусты (*B. oleracea* var. *italica* и *B. rapa* subsp. *pekinensis*) по сравнению с растениями арабидопсиса. Для этого была выделена суммарная РНК из листьев и корней 3–4-дневных проростков, а также цветущих растений, и проведен кПЦР-анализ с использованием препарата кДНК, полученного с помощью олиго(дТ)-затравки (рис. 2). Ранее такого рода сравнительные исследования для растений капусты не проводили.

Оказалось, что онтогенетическая корреляция возраста растений и накопления pri-miR156a сходна в листьях и корнях разных растений семейства Brassicaceae. Накопление pri-miR156a в проростках многократно выше, чем у цветущих растений (рис. 2). Следовательно, можно предположить, что наиболее эффективный синтез miPEP-156a в растениях происходит на ранних стадиях онтогенеза.

Биоинформатический анализ транслятома арабидопсиса. Ранее исследователями был поднят вопрос о том, с помощью каких подходов можно апробировать реальную экспрессию потенциальных miPEP в растениях [30]. Например, miPEP-165a арабидопсиса и ряд других пептидов не были обнаружены с помощью масс-спектрометрии [18, 31], хотя TRAP-анализ показал, что в составе препаратов полисом могут быть выявлены фрагменты pri-miRNA, кодирующие эти пептиды [12]. В наших предварительных экспериментах попытки выявить miPEP-156a в проростках арабидопсиса методами масс-спектрометрии и иммунопреципитации с помощью поликлональных антител также не дали положительного результата (данные не приведены). Таким образом, чтобы получить хотя бы косвенные доказательства трансляционной активности ОПТ для miPEP-156a в 5'-концевой области pri-miR156a в растениях вплоть до получения эффективных моноклональных антител, мы провели биоинформатический BLASTn-анализ последовательностей РНК в транслятоме

арабидопсиса на базе архива NCBI SRA (SRA, short read assembly).

Ген арабидопсиса pri-miR156a (AT2G25095) расположен на хромосоме 2 и состоит из 3108 п.н. Этот ген содержит 4 экзона и 3 интрона. Последовательность pre-miR156a расположена в экзоне 2, а ОПТ miPEP-156a — в экзоне 1 (рис. 1). В качестве якорных последовательностей в BLASTn-анализе была взята область ОПТ miPEP-156a и аналогичная по размеру область экзона 4. В ходе анализа данных ряда TRAP-экспериментов мы выявили наличие ОПТ miPEP-156a в рибосом-связанных фрагментах РНК из флоэмы корней проростков (NCBI accessions SRX3204187, SRX3204194, SRX3204195, SRX3204199 [32]), хотя последовательности 3'-концевого экзона 4 среди рибосом-связанных сегментов не обнаружены. Аналогичные результаты получены для экзона 2 и 3. Таким образом, мы получили косвенные доказательства того, что 5'-концевая ОПТ на РНК pri-miR156 подвергается трансляции, по крайней мере, в корнях проростков *A. thaliana*. Кроме того, эти данные указывают, что в цитоплазме клетки, видимо, транслируется не полноразмерная РНК pri-miR156a, а лишь её 5'-концевая область после процессинга.

Влияние пептида miPEP-156a на развитие корней у проростков растений. Поскольку известно, что экзогенное введение miPEP-156a через корни арабидопсиса влияет на накопление зрелой miRNA165a путём усиления транскрипции её РНК-предшественника, и это, в свою очередь, увеличивает скорость развития корней проростков [18], мы предположили, что экзогенное применение miPEP-156a также может влиять на раз-

витие корневой системы молодых растений капусты. Чтобы проверить, является ли miPEP-156a китайской капусты (*B. rapa* subsp. *pekinensis*) физиологически активным, её семена проращивали на питательной среде для растений, дополненной синтетическим пептидом в концентрации 10 мкг/мл. Оказалось, что длина основного (первичного) корня 5-дневных проростков, выращенных на среде, дополненной экзогенным miPEP-156a, увеличивалась по сравнению с контролем (водный раствор солей) (рис. 3).

Полученное увеличение в длине корней сопоставимо с эффектом, который описан в литературе для проростков арабидопсиса, сверхэкспрессирующих miR165a [29]. При этом проростки с повышенной экспрессией miR165a имели более длинные первичные корни, чем дикий тип (увеличение длины составляло ~20%). Наоборот, в условиях подавления синтеза miR165a развивались более короткие первичные корни, чем у дикого типа [29].

Таким образом, литературные данные позволили нам выдвинуть гипотезу, что miPEP-156a играет какую-то роль в усилении накопления miR156 и, опосредованно, в росте первичных корней у капусты. Это аналогично эффекту miPEP-156a арабидопсиса на рост первичных корней и усилению накопления соответствующей miRNA [18]. Действительно, прямое измерение количества pri-miRNA156a в проростках брокколи, прорастающих в присутствии пептида, выявило явное (хотя и достаточно умеренное) увеличение концентрации этой РНК в растениях (рис. 2).

Изучение локализации пептида miPEP-156a в проростках растений. Наличие физиологическо-



Рис. 3. Типичный фенотип при проращивании семян капусты (длина корня) в присутствии и при отсутствии miPEP-156a. Верхний ряд — проращивание без miPEP-156a, среднее квадратичное отклонение для 50 растений — $1,2 \pm 0,19$ см; нижний ряд — проращивание с добавлением miPEP-156a (10 мкг/мл), среднее квадратичное отклонение для 50 растений — $4,3 \pm 0,79$ см. Так как выборки не имели нормального распределения, статистический анализ проводили с использованием непараметрического U-критерия Манна–Уитни. При выявленном уровне значимости $p < 0,05$ средние значения для контроля и эксперимента считаются достоверно различными (расчёт по программе OriginPro 6.0)

го эффекта экзогенного *miPEP*-156a на рост растений указывает на его способность проникать в ткани проростков. Ранее такой эффект был детально изучен на примере *miPEP*-165a арабидопсиса [33]. В опубликованном исследовании использовался пептид, меченный флуоресцентным красителем на базе флуоресцеина. Было показано, что в 7-дневных проростках арабидопсиса меченый пептид в течение 2 ч инкубации активно проникает в корневую чехлик и корневую меристему. При этом для проникновения в другие части корня требуется больше времени. Установлено, что при этом задействованы два механизма – первичная пассивная диффузия пептида с последующим процессом эндоцитоза [33]. Важно, что в ходе этих процессов *miPEP*-165a не может проникнуть в центральный цилиндр корня, не попадает во флоэму и, следовательно, не мигрирует от корней в верхнюю часть растения. Эти данные могут указывать, что экзогенные *miPEP* не могут оказывать системного эффекта на растение в целом [33].

Однако наши эксперименты с проникновением *miPEP*-156a в проростки капусты выявили

заметно отличающуюся картину. После 18-часовой инкубации с TAMRA-*miPEP*-156a (табл. 1) было показано, что весьма малые количества пептида локализуются в корне проростков. При этом наблюдается лишь мечение ядер сильно удлинённых клеток в центральном цилиндре корня (предположительно, клетки флоэмной паренхимы и клетки-спутницы) (рис. 4, а). Микроскопический анализ листьев проростков показал, что в отличие от *miPEP*-165a, наиболее интенсивное накопление TAMRA-*miPEP*-156a наблюдается в листьях проростков. Причем накопление пептида явно выше в областях листа вблизи жилок, что указывает на его транспорт по флоэме из корней в верхнюю часть проростка. В клетках, где накапливается достаточно большое количество пептида, наблюдается его концентрация вблизи и внутри ядра (рис. 4, б). Сравнение наших данных с теми, что представлены в литературе ранее [33] (см. выше), явно указывает на различия в проникновении в растения пептидов с разной первичной структурой, что, возможно, обусловлено особенностями их функционирования при эндогенной экспрессии.

Изучение локализации пептида *miPEP*-156a в клетках животных. Наблюдаемая нами локализация TAMRA-*miPEP*-156a в ядрах клеток растений капусты, что не было выявлено в случае *miPEP*-165a в арабидопсисе [33], указывает на способность пептида *miPEP*-156a к ядерно-цитоплазматическому транспорту. Механизмы такого транспорта весьма консервативны у растений и животных [34, 35]. Поэтому в качестве объекта для контроля эффективности ядерного импорта пептида *miPEP*-156a мы выбрали клетки мышей миеломной линии Sp2/0. Клетки инкубировали с TAMRA-*miPEP*-156a в течение 2 ч, отмывали и анализировали с помощью конфокального микроскопа. Предварительная окраска клеток ядерным маркером Hoechst 33342 и маркерным флуорофором, окрашивающим эндоплазматический ретикулум, показала, что ядро клетки занимает большую часть её объема и имеется лишь достаточно тонкий слой цитоплазмы, примыкающий к плазматической мембране (рис. 5, а и б).

При визуализации проникновения в клетки флуоресцирующего пептида и Hoechst 33342 стало очевидно, что пептид полностью импортируется в ядро и вообще не наблюдается в цитоплазме клетки при разных уровнях увеличения (рис. 6, а и б). Такой результат, очевидно, свидетельствует в пользу активного транспорта пептида в ядро и не может быть объяснен лишь за счет его пассивной диффузии через ядерные поры.

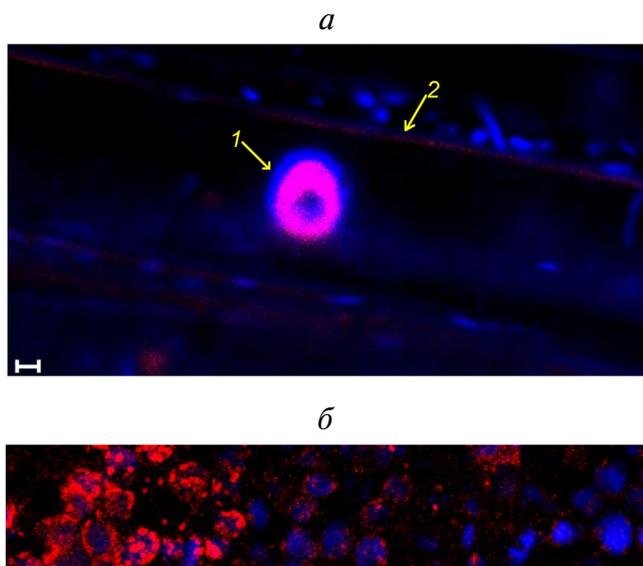


Рис. 4. Внутриклеточная локализация специфических маркеров в клетках капусты. а – Конфокальная микроскопия клетки-спутницы из корня проростка капусты, инкубированного в присутствии флуоресцирующего пептида TAMRA-*miPEP*-156a (красный). Окраска ядер с помощью Hoechst 33342 (синий). Левая часть рисунка соответствует клеткам мезофилла в части листа вблизи центральной жилки, 1 – ядро, 2 – стенка клетки-спутницы. Масштабная линейка – 1 мкм. б – Конфокальная микроскопия участка корня проростка капусты, инкубированного в присутствии флуоресцирующего пептида TAMRA-*miPEP*-156a (красный). Окраска ядер с помощью Hoechst 33342 (синий). Левая часть рисунка соответствует клеткам части листа вблизи центральной жилки. Масштабная линейка – 1 мкм

Действительно, результаты анализа *in silico* первичной структуры miPEP-156a позволили выдвинуть гипотезу о том, что последовательность пептида несет положительно-заряженный

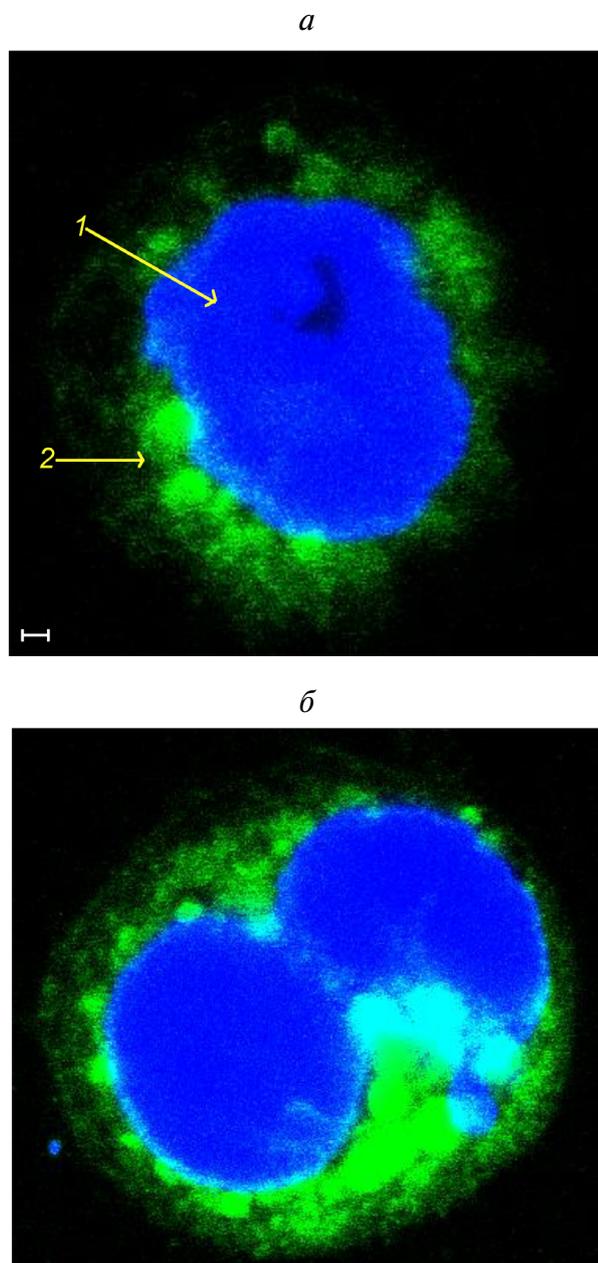


Рис. 5. Внутриклеточная локализация специфических маркеров в клетках мышиной миеломной линии Sp2/0. *а* – Конфокальная микроскопия клетки мышиной миеломной линии Sp2/0. Окраска Hoechst 33342 (синий) – ядро и маркером ER-Tracker™ Green – эндоплазматический ретикулум. 1 – Ядро, 2 – цитоплазма. Масштабная линейка – 1 мкм. *б* – Конфокальная микроскопия делящейся клетки мышиной миеломной линии Sp2/0. Окраска Hoechst 33342 (синий) – ядро и маркером ER-Tracker™ Green – эндоплазматический ретикулум. Масштабная линейка – 1 мкм

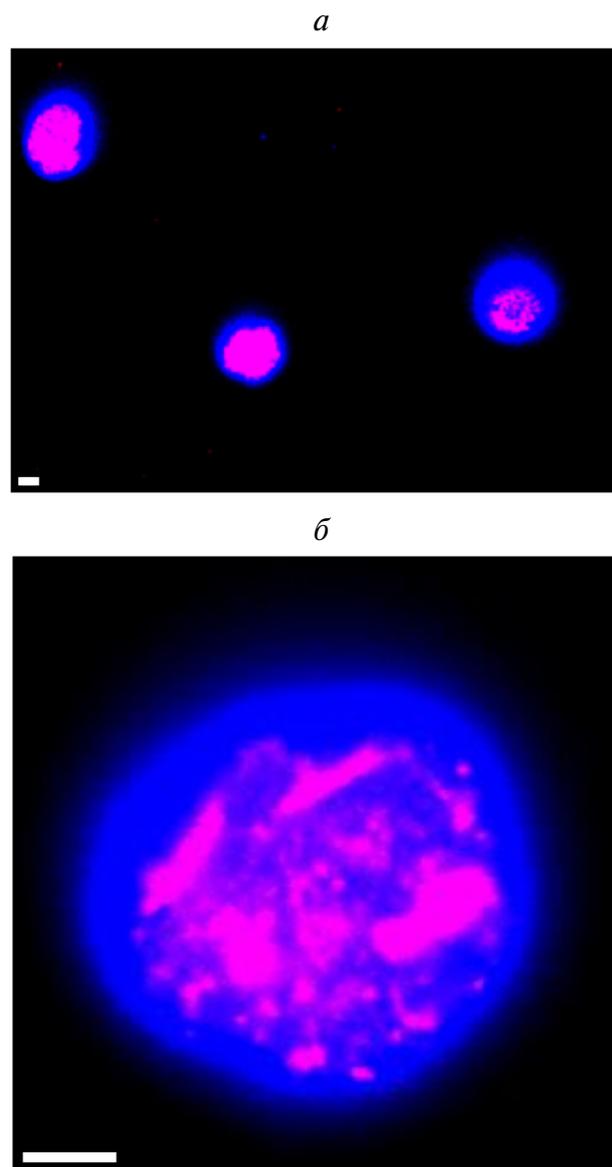


Рис. 6. Проникновение в клетки мышиной миеломной линии Sp2/0 флуоресцирующего пептида и Hoechst 33342. *а* – Конфокальная микроскопия клеток мышиной миеломной линии Sp2/0, инкубированных в присутствии флуоресцирующего пептида TAMRA-miPEP-156a (красный). Окраска Hoechst 33342 (синий) – ядро. Масштабная линейка – 250 нм. *б* – Конфокальная микроскопия клетки мышиной миеломной линии Sp2/0 после инкубации с флуоресцирующим пептидом TAMRA-miPEP-156a (красный). Окраска Hoechst 33342 (синий) – ядро. Масштабная линейка – 1 мкм

сегмент ККАТКАИККДК, который включает сигнал ядерной локализации (NLS) (<http://mleg.cse.sc.edu/seqNLS/index.html>) [34, 35] (табл. 1). В частности, этот сегмент содержит участок 28–31 (KKDK), близкий по структуре последовательности KKKGK, которая отвечает за ядерную локализацию фермента фруктозо-

1,6-бисфосфатаза в клетках животных, где показано, что целостность мотива имеет решающее значение для ядерной локализации фермента [36].

Связывания пептида miPEP-156a с ядерной ДНК и хроматином растений. Эффективная концентрация miPEP-156a в ядрах клеток животных и растений может свидетельствовать в пользу его активного связывания с хроматином за счет белок-белковых и/или ДНК-белковых взаимодействий. Действительно, использование компьютерных предсказаний на базе алгоритмов (<https://dnabind.szilab.org/>) и (<http://mleg.cse.sc.edu/DNABind/>) [26] показало, что пептид потенциально взаимодействует с ДНК с вероятностью ~99%, и в этот процесс потенциально могут быть вовлечены 10 а.о. (табл. 1).

Для экспериментальной проверки предсказаний мы использовали связывание флуоресцентно-меченного пептида *in vitro* с хроматином и тотальной ДНК капусты (рис. 7, а). «Мономерный строительный блок» хроматина, нуклеосома, содержит ~150 п.н. ДНК, обёрнутых вокруг гистонового октамера, состоящего из 4-х основных гистонов – H2A, H2B, H3 и H4 [37]. Довольно давно установлено, что для изменений в структуре хроматина, необходимых для эффективного связывания многих транскрипционных факторов и активации транскрипции генов, часто требуется удаление димеров H2A–H2B из нуклеосомы. Причём, как правило, при ремоделировании нуклеосомного октамера гистонов димер H2A–H2B более легко вытесняется, чем H3 и H4 [38]. При этом *in vivo* вытеснение димера H2A–H2B из области промоторов обычно осуществляют специальные ядерные факторы транскрипции (факторы «первопроходчики» – pioneer transcription factors), которые часто структурно принимают трехмерную укладку аналогично основным гистонам H2A и H2B [39]. Можно предположить, что если miPEP-156a функционально сходен с miPEP-165a, о чем свидетельствуют наши косвенные данные, то он должен взаимодействовать с хроматином наподобие транскрипционных факторов. Учитывая, что данные *in vitro* указывают на прямую конкуренцию за связывание с промоторами между транскрипционными факторами и димером H2A–H2B [40], мы использовали *in vitro* 2 типа препаратов хроматина капусты – исходный («нативный хроматин») и хроматин, подвергшийся температурной обработке при 74 °С. Известно, что такая обработка приводит к вытеснению димера H2A–H2B, но сохраняет в нуклеосомах H3 и H4 [41]. Оказалось, что эффективность связывания miPEP-156a с хроматином многократно возросла после температурной

обработки (рис. 7, а). Таким образом, данные результаты косвенно подтверждают предположение, что miPEP-156a, подобно miPEP-165a арабидопсиса, может модулировать транскрипционную активность генов, взаимодействуя с модифицированным хроматином.

Кроме того, мы проверили способность miPEP-156a взаимодействовать с изолированной ДНК растений. Использование метода сдвига подвижности в агарозном геле подтвердило предсказание, что пептид обладает способностью связывать не только ДНП-комплекс хроматина, но и ДНК растений, и неспецифический фрагмент ДНК. При этом в высоких концентрациях пептид покрывает, видимо, значительную часть длины молекул ДНК, т.к. подвижность комплекса значительно снижается (рис. 7, б и в).

Изучение вторичной структуры пептида miPEP-156a и его комплексов с ДНК. Среди белков, участвующих в регуляции транскрипции, значительная доля взаимодействует с хроматином путем распознавания специфических последовательностей ДНК как с помощью различных высокоупорядоченных ДНК-связывающих доменов, так и через внутренне неупорядоченные области (IDR – intrinsically disordered regions). IDR являются белковыми доменами, которые не имеют стабильной трехмерной структуры в физиологических условиях [42]. Многие IDR принимают четко определенную конформацию при взаимодействии с молекулами-мишенями. Значительное количество таких белков взаимодействуют с хроматином [43, 44]. При этом связывание и модификация хроматина может происходить независимым от специфической нуклеотидной последовательности образом [45].

Недавно специфическое взаимодействие ДНК-связывающего пептида с модельными ДНК было изучено на примере транскрипционного фактора GCN4 [46]. Мы обратили внимание, что мономерный пептид на базе GCN4, включающий 34 а.о., сам по себе не был способен связываться со специфической дсДНК. Лишь его димер, образованный через цистеиновые остатки, сохраняет способность к специфическому распознаванию консенсусных ДНК последовательностей, что, очевидно, указывает на димеризацию, как на существенную предпосылку образования комплекса пептид–ДНК. Для пептида GCN4 было показано, что при связывании с ДНК неупорядоченные элементы могут претерпевать структурные переходы, приводящие к формированию четко определенной конформации, стабильной в связанном состоянии [47]. Это процесс называется сопряженным складыванием, когда в белке происходит пере-

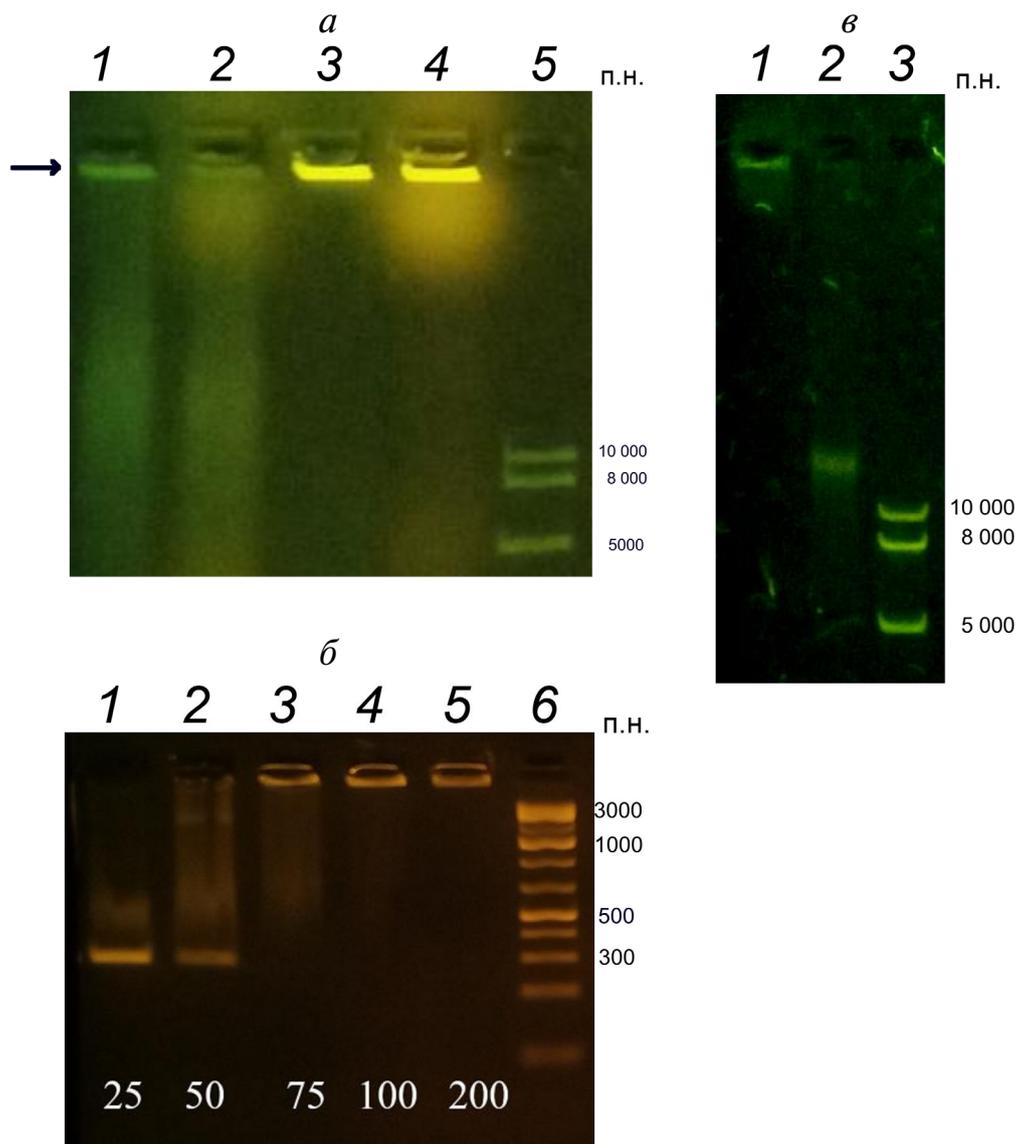


Рис. 7. Выявление комплексов пептид–ДНК после связывания флуоресцентно-меченного пептида *in vitro*. *a* – Выявление комплексов пептид–хроматин в 0,8%-ном агарозном геле после связывания флуоресцентного пептида TAMRA-miPEP-156a и хроматина капусты. 1 – Нативный хроматин с TAMRA-miPEP-156a; 2 – нативный хроматин с miPEP-156a (TAMRA); 3 – хроматин, подвергшийся температурной обработке (74 °С), с TAMRA-miPEP-156a; 4 – хроматин, подвергшийся температурной обработке (74 °С), с miPEP-156a (TAMRA); 5 – маркерная ДНК (10 000, 8000, 5000 п.н.). Стрелка указывает положение хроматина при отсутствии пептида. *б* – Выявление комплексов пептид–ДНК в 1,5%-ном агарозном геле после связывания пептида miPEP-156a и неспецифического фрагмента ДНК. Молярное соотношение пептид/ДНК – 25/1 (1), 50/1 (2), 75/1 (3), 100/1 (4), 200/1 (5), маркерная ДНК (6) включает и короткие ДНК-фрагменты – снизу вверх 100, 200, 300, 400, 500 п.н.). *в* – Выявление комплексов пептид–ДНК в 0,8%-ном агарозном геле после связывания флуоресцентного пептида TAMRA-miPEP-156a и ДНК капусты. 1 – ДНК капусты с TAMRA-miPEP-156a; 2 – ДНК капусты (контроль); 3 – маркерная ДНК (10 000, 8000, 5000 п.н.)

ход от неупорядоченной конформации к частично упорядоченной при взаимодействии аминокислот с гидрофобными связывающими карманами ДНК [48].

Интересно, что miPEP-156a, имеющий длину 33 остатка, содержит 2 цистеина и потенциально способен к образованию димеров и тетрамеров [22]. Учитывая формальное сходство пеп-

тида GCN4 и miPEP-156a, мы экспериментально изучили вторичную структуру растительного пептида в свободном состоянии и в комплексе с ДНК капусты. Всего было проведено по 6 независимых измерений в двух повторах (см. «Материалы и методы», табл. 2).

Существует обратно пропорциональная зависимость между количеством бета-структур и

Таблица 2. Данные кругового дихроизма модельного пептида и комплекса с ДНК

Образец	Альфа-спираль, %	Бета-структура, %	Поворот, %	Неупорядоченная конформация, %	NRMSD*
1	6,9 + 0,5	28,5 + 0,9	22,4 + 0,5	41,2 + 0,8	0,043
2	5,5 + 0,9	37,4 + 2,2	23,0 + 0,7	33,9 + 1,9	0,06

Примечание. 1 – свободный пептид, 2 – комплекс с ДНК.

* Оптимальное значение NRMSD (normalized root-mean-square deviation) в расчётах должно быть < 0,1.

интенсивностью отрицательного сигнала при 200 нм в спектре КД *miPER-156a*, отличающая его от пептида *GCN4* (рис. 8). В случае *GCN4*, который сильно неупорядочен при отсутствии дсДНК, резко увеличивается его сворачивание в альфа-спираль в комплексе с ДНК [46]. Однако у *miPER-156a* происходит возрастание количества бета-структур, когда он взаимодействует с ДНК (табл. 2). Важно, что у обоих пептидов после образования комплекса с ДНК заметно снижается процент неупорядоченных участков.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

К настоящему времени, кроме найденного нами *miPER-156a* в семействе *Brassicaceae*, есть данные о нескольких других пептидах *miPER* у растений. Это *miPER-165a* и *miPER-858* из *A. Thaliana* [18, 49], *miPER-171b* из *M. truncatula* и *miPER-172c* из *G. Max* [19, 21], а также *vvi-miPER-171d1* из *Vitis vinifera* [16]. В нашей работе выявлены некоторые общие с перечисленными выше пептидами особенности функционирования *miPER-156a*: во-первых, все пептиды способны при экзогенном воздействии на проростки растений изменять их фенотип, что выражается в общем позитивном эффекте на рост первичных корней; во-вторых, обработка син-

тетическими пептидами показывает, что микропротеины способны активировать транскрипцию собственных *pri-miRNA*, направляющих их трансляцию. Однако мы наблюдали и новые эффекты, не описанные в опубликованных исследованиях. В частности, доставка пептида через корневую систему проростков в случае *miPER-156a* приводит к эффективному транспорту его в листья, тогда как в случае *miPER-165a* арабидопсиса выявлена полная задержка пептида в корнях, а именно в эпидермисе и перicycle, но не во флоэме. Пептид *miPER-156a*, наоборот, наблюдался нами только в отдельных клетках флоэмы корня, что, по-видимому, согласуется с его быстрым транспортом в листья проростков. Полностью за рамками исследования в опубликованных работах осталась способность пептидов *miPER* взаимодействовать с ДНК и транспортироваться в ядро. Таким образом, следует отметить, что наши исследования выявили новый спектр активности пептидов *miPER* при их экзогенном применении, что согласуется с их предполагаемыми функциями в транскрипционной регуляции. Полученные нами данные для экзогенных пептидов, несомненно, помогут следующему этапу работы, связанному с изучением тканевой локализации и активности эндогенного *miPER-156a* в растениях капусты и арабидопсиса.

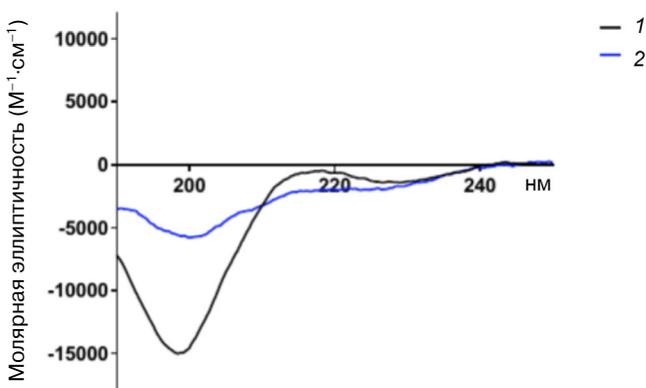


Рис. 8. Типичные спектры КД пептида *miPER-156a* (1) и его комплекса с ДНК (2)

Финансирование. Исследования выполнены при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (проект № 19-04-00174-а).

Благодарности. Авторы благодарят Игнатову Анастасию Александровну (ИБХ РАН) за помощь в экспериментах по измерению вторичной структуры пептида с помощью метода кругового дихроизма.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

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

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Wang, J., Mei, J., and Ren, G. (2019) Plant microRNAs: biogenesis, homeostasis, and degradation, *Front. Plant Sci.*, **10**, 1-12, doi: 10.3389/fpls.2019.00360.
- Bartel, D. P. (2004) MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function, *Cell*, **116**, 281-297, doi: 10.1016/s0092-8674(04)00045-5.
- Rogers, K., and Chen, X. (2013) Biogenesis, turnover, and mode of action of plant microRNAs, *Plant Cell*, **25**, 2383-2399, doi: 10.1105/tpc.113.113159.
- Yu, Y., Jia, T., and Chen, X. (2017) The 'how' and 'where' of plant microRNAs, *New Phytol.*, **216**, 1002-1017, doi: 10.1111/nph.14834.
- Song, X., Li, Y., Cao, X., and Qi, Y. (2019) MicroRNAs and their regulatory roles in plant-environment interactions, *Annu. Rev. Plant Biol.*, **70**, 489-525, doi: 10.1146/annurev-arplant-050718-100334.
- Liu, H., Yu, H., Tang, G., and Huang, T. (2018) Small but powerful: function of microRNAs in plant development, *Plant Cell Rep.*, **37**, 515-528, doi: 10.1007/s00299-017-2246-5.
- Budak, H., and Akpinar, B. A. (2015) Plant miRNAs: biogenesis, organization and origins, *Funct. Integr. Genomics*, **15**, 523-531, doi: 10.1007/s10142-015-0451-2.
- Fukudome, A., and Fukuhara, T. (2017) Plant dicer-like proteins: double-stranded RNA-cleaving enzymes for small RNA biogenesis, *J. Plant Res.*, **130**, 33-44, doi: 10.1007/s10265-016-0877-1.
- Zhang, H., Xia, R., Meyers, B. C., and Walbot, V. (2015) Evolution, functions, and mysteries of plant ARGONAUTE proteins, *Curr. Opin. Plant Biol.*, **27**, 84-90, doi: 10.1016/j.pbi.2015.06.011.
- Tavormina, P., De Coninck, B., Nikonorova, N., De Smet, I., and Cammue, B. P. (2015) The plant peptidome: an expanding repertoire of structural features and biological functions, *Plant Cell*, **27**, 2095-2118, doi: 10.1105/tpc.15.00440.
- Zanetti, M. E., Chang, I. F., Gong, F., Galbraith, D. W., and Bailey-Serres, J. (2005) Immunopurification of polyribosomal complexes of Arabidopsis for global analysis of gene expression, *Plant Physiol.*, **138**, 624-635, doi: 10.1104/pp.105.059477.
- Juntawong, P., Girke, T., Bazin, J., and Bailey-Serres, J. (2014) Translational dynamics revealed by genome-wide profiling of ribosome footprints in Arabidopsis, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **111**, E203-212, doi: 10.1073/pnas.1317811111.
- Zhu, S., Wang, J., He, Y., Meng, N., and Yan, G.-R. (2018) Peptides/proteins encoded by non-coding RNA: a novel resource bank for drug targets and biomarkers, *Front. Pharmacol.*, **9**, 1295, doi: 10.3389/fphar.2018.01295.
- Hellens, R. P., Brown, C. M., Chisnall, M. A. W., Waterhouse, P. M., and Macknight, R. C. (2016) The emerging world of small ORFs, *Trends Plant Sci.*, **21**, 317-328, doi: 10.1016/j.tplants.2015.11.005.
- Li, L. J., Leng, R. X., Fan, Y. G., Pan, H. F., and Ye, D. Q. (2017) Translation of noncoding RNAs: focus on lncRNAs, pri-miRNAs, and circRNAs, *Exp. Cell Res.*, **361**, 1-8, doi: 10.1016/j.yexcr.2017.10.010.
- Chen, Q. J., Deng, B. H., Gao, J., Zhao, Z. Y., Chen, Z. L., et al. (2020) A miRNA-encoded small peptide, vvi-miPEP171d1, regulates adventitious root formation, *Plant Physiol.*, **183**, 656-670, doi: 10.1104/pp.20.00197.
- Yeasmin, F., Yada, T., and Akimitsu, N. (2018) Micropeptides encoded in transcripts previously identified as long noncoding RNAs: a new chapter in transcriptomics and proteomics, *Front. Genet.*, **9**, 144, doi: 10.3389/fgene.2018.00144.
- Lauressergues, D., Couzigou, J. M., Clemente, H. S., Martinez, Y., Dunand, C., et al. (2015) Primary transcripts of microRNAs encode regulatory peptides, *Nature*, **520**, 90-93, doi: 10.1038/nature14346.
- Couzigou, J. M., André, O., Guillotin, B., Alexandre, M., Combiere, J. P. (2016) Use of microRNA-encoded peptide miPEP172c to stimulate nodulation in soybean, *New Phytol.*, **211**, 379-381, doi: 10.1111/nph.13991.
- Ram, M. K., Mukherjee, K., and Pandey, D. M. (2019) Identification of miRNA, their targets and miPEPs in peanut (*Arachis hypogaea* L.), *Comput. Biol. Chem.*, **83**, 107100, doi: 10.1016/j.compbiolchem.2019.107100.
- Couzigou, J. M., Lauressergues, D., Bécard, G., and Combiere, J. P. (2015) miRNA-encoded peptides (miPEPs): a new tool to analyze the roles of miRNAs in plant biology, *RNA Biol.*, **12**, 1178-1180, doi: 10.1080/15476286.2015.1094601.
- Morozov, S. Y., Ryazantsev, D. Y., and Erokhina, T. N. (2019) Bioinformatics analysis of the novel conserved micropeptides encoded by the plants of family Brassicaceae, *J. Bioinform. Syst. Biol.*, **2**, 066-077, doi: 10.26502/jbsb.5107009.
- Czechowski, T., Stitt, M., Altmann, T., Udvardi, M. K., and Scheible, W. R. (2005) Genome-wide identification and testing of superior reference genes for transcript normalization in Arabidopsis, *Plant Physiol.*, **139**, 5-17, doi: 10.1104/pp.105.063743.
- Simon, P. (2003) Q-Gene: processing quantitative real-time RT-PCR data, *Bioinformatics*, **19**, 1439-1440, doi: 10.1093/bioinformatics/btg157.
- Witus, L. S., and Francis, M. (2010) Site-specific protein bioconjugation via a pyridoxal 5'-phosphate-mediated N-terminal transamination reaction, *Curr. Protoc. Chem. Biol.*, **2**, 125-134, doi: 10.1002/9780470559277.ch100018.
- Liu, R., and Hu, J. (2013) DNABind: a hybrid algorithm for DNA-binding residue prediction by combining machine learning and template-based approaches, *Proteins Struct. Funct. Bioinform.*, **81**, 1888-1899, doi: 10.1002/prot.24330.
- Rakitina, D. V., Taliatsky, M., Brown, J. W. S., and Kalinina, N. O. (2011) Two RNA-binding sites in plant fibrillar protein provide interactions with various RNA substrates, *Nucleic Acids Res.*, **39**, 8869-8880, doi: 10.1093/nar/gkr594.
- Kim, W., Kim, H. E., Jun, A. R., Jung, M. G., Jin, S., et al. (2016) Structural determinants of miR156a precursor processing in temperature-responsive flowering in Arabidopsis, *J. Exp. Bot.*, **67**, 4659-4670, doi: 10.1093/jxb/erw248.
- Yu, N., Niu, Q. W., Ng, K. H., and Chua, N. H. (2015) The role of miR156/SPLs modules in Arabidopsis lateral root development, *Plant J.*, **83**, 673-685, doi: 10.1111/tpl.12919.
- Lv, S., Pan, L., and Wang, G. (2016) Commentary: primary transcripts of microRNAs encode regulatory peptides, *Front Plant Sci.*, **22**, 1436, doi: 10.3389/fpls.2016.01436.
- Shahin-Kaleybar, B., Niazi, A., Afsharifar, A., Nematzadeh, G., Yousefi, R., et al. (2020) Isolation of cysteine-rich peptides from *Citrullus colocynthis*, *Biomolecules*, **10**, E1326, doi: 10.3390/biom10091326.
- Brosnan, C. A., Sarazin, A., Lim, P., Bologna, N. G., Hirsch-Hoffmann, M., and Voinnet, O. (2019) Genome-scale, single-cell-type resolution of microRNA activities within a whole plant organ, *EMBO J.*, **38**, e100754, doi: 10.15252/embj.2018100754.
- Ormancey, M., Le Ru, A., Duboé, C., Jin, H., Thuleau, P., et al. (2020) Internalization of miPEP165a into Arabidopsis roots depends on both passive diffusion and endocytosis-associated processes, *Int. J. Mol. Sci.*, **21**, 2266, doi: 10.3390/ijms21072266.

34. Sorokin, A. V., Kim, E. R., Ovchinnikov, L. P. (2007) Nucleocytoplasmic transport of proteins, *Biochemistry (Moscow)*, **72**, 1439-1457, doi: 10.1134/s0006297907130032.
35. Merkle, T. (2011) Nucleo-cytoplasmic transport of proteins and RNA in plants, *Plant Cell Rep.*, **30**, 153-176, doi: 10.1007/s00299-010-0928-3.
36. Gizak, A., Maciaszyk-Dziubinska, E., Jurowicz, M., and Rakus, D. (2009) Muscle FBPase is targeted to nucleus by its 203-KKKGK-207 sequence, *Proteins*, **77**, 262-267, doi: 10.1002/prot.22506.
37. Lanctot, C., Cheutin, T., Cremer, M., Cavalli, G., and Cremer, T. (2007) Dynamic genome architecture in the nuclear space: regulation of gene expression in three dimensions, *Nat. Rev. Genet.*, **8**, 104-115, doi: 10.1038/nrg2041.
38. Bennetzen, M. V., Larsen, D. H., Bunkenborg, J., Bartek, J., Lukas, J., and Andersen, J. S. (2010) Site-specific phosphorylation dynamics of the nuclear proteome during the DNA damage response, *Mol. Cell. Proteomics*, **9**, 1314-1323, doi: 10.1074/mcp.M900616-MCP200.
39. Lai, X., Verhage, L., Hugouvioux, V., and Zubieta, C. (2018) Pioneer factors in animals and plants-colonizing chromatin for gene regulation, *Molecules*, **23**, 1914-1936, doi: 10.3390/molecules23081914.
40. Lone, I. N., Shukla, M. S., Charles Richard, J. L., Peshev, Z. Y., Dimitrov, S., et al. (2013) Binding of NF- κ B to nucleosomes: effect of translational positioning, nucleosome remodeling and linker histone H1, *PLoS Genet.*, **9**, e1003830, doi: 10.1371/journal.pgen.1003830.
41. Horikoshi, N., Kujirai, T., Sato, K., Kimura, H., and Kurumizaka, H. (2019) Structure-based design of an H2A.Z.1 mutant stabilizing a nucleosome *in vitro* and *in vivo*, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **515**, 719-724, doi: 10.1016/j.bbrc.2019.06.012.
42. Van der Lee, R., Buljan, M., Lang, B., Weatheritt, R. J., Daughdrill, G. W., et al. (2014) Classification of intrinsically disordered regions and proteins, *Chem. Rev.*, **114**, 6589-6631, doi: 10.1021/cr400525m.
43. Peng, Z., and Kurgan, L. (2015) High-throughput prediction of RNA, DNA and protein binding regions mediated by intrinsic disorder, *Nucleic Acids Res.*, **43**, e121, doi: 10.1093/nar/gkv585.
44. Wang, C., Uversky, V. N., and Kurgan, L. (2016) Disordered nucleome: Abundance of intrinsic disorder in the DNA- and RNA-binding proteins in 1121 species from Eukaryota, Bacteria and Archaea, *Proteomics*, **16**, 1486-1498, doi: 10.1002/pmic.201500177.
45. Sabari, B. R., Dall'Agnesse, A., Boija, A., Klein, I. A., Coffey, E. L., et al. (2018) Coactivator condensation at super-enhancers links phase separation and gene control, *Science*, **361**, earr3958, doi: 10.1126/science.aar3958.
46. Quirolo, Z. B., Sequeira, M. A., Martins, J. C., and Doderio, V. I. (2019) Sequence-specific DNA binding by noncovalent peptide – azocyclodextrin dimer complex as a suitable model for conformational fuzziness, *Molecules*, **24**, 2508-2528, doi: 10.3390/molecules24132508.
47. Miskei, M., Gregus, A., Sharma, R., Duro, N., Zsolyomi, F., and Fuxreiter, M. (2017) Fuzziness enables context dependence protein interactions, *FEBS Lett.*, **591**, 2682-2695, doi: 10.1002/1873-3468.12762.
48. Wright, P. E., and Dyson, H. J. (2009) Linking folding and binding, *Curr. Opin. Struct. Biol.*, **19**, 31-38, doi: 10.1016/j.sbi.2008.12.003.
49. Sharma, A., Badola, P. K., Bhatia, C., Sharma, D., and Trivedi, P. K. (2020) Primary transcript of miR858 encodes regulatory peptide and controls flavonoid biosynthesis and development in *Arabidopsis*, *Nat. Plants*, **6**, 1262-1274, doi: 10.1038/s41477-020-00769-x.

ACTIVITIES OF CHEMICALLY SYNTHESIZED PEPTIDE ENCODED BY THE miR156A PRECURSOR AND CONSERVED IN THE Brassicaceae FAMILY PLANTS

T. N. Erokhina¹, D. Y. Ryazantsev¹, L. V. Samokhvalova¹, A. A. Mozhaev¹,
A. N. Orsa¹, S. K. Zavriev¹, and S. Y. Morozov^{2*}

¹ Shemyakin–Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry, Russian Academy of Sciences, 117997 Moscow, Russia

² Belozersky Institute of Physico-Chemical Biology, Lomonosov Moscow State University, 119992 Moscow, Russia; E-mail: morozov@belozersky.msu.ru

It was recently found that the primary transcripts of some microRNA genes (pri-miRNAs) are able to express peptides with 12 to 40 residues in length. These peptides, called miPEPs, participate in the transcriptional regulation of their own pri-miRNAs. In our previous studies, we used bioinformatic approach for comparative analysis of pri-miRNA sequences in plant genomes to identify a new group of miPEPs (miPEP-156a peptides) encoded by pri-miR156a in several dozen species of the Brassicaceae family. Exogenous miPEP-156a peptides could efficiently penetrate into the plant seedlings through the root system and spread systemically to the leaves. The peptides produced moderate morphological effect accelerating primary root growth. In parallel, the miPEP-156a peptides upregulated expression of their own pri-miR156a. Importantly, the observed effects at both morphological and molecular levels correlated with the peptide ability to quickly translocate into the cell nucleus and to bind chromatin. In this work, we established secondary structure of the miPEP-156a and demonstrated its changes induced by formation of the peptide complex with DNA.

Keywords: microRNA, primary transcripts of microRNA, translation of the microRNA primary transcripts, short open reading frames, transcription regulation, protein import into nucleus, DNA-binding peptides

УДК 577.25;577.151;616.89-008.48

СИГНАЛЬНЫЕ КАСКАДЫ БЕЛКОВОГО ФОСФОРИЛИРОВАНИЯ ПРИ АУТИЗМЕ (С АКЦЕНТОМ НА ПУТЬ mTOR)

Обзор

© 2021 И.С. Бокша^{1,2*}, Т.А. Прохорова¹, Е.Б. Терешкина¹,
О.К. Савушкина¹, Г.Ш. Бурбаева¹

¹ ФГБНУ «Научный центр психического здоровья», 115522 Москва, Россия; электронная почта: boksha_irina@mail.ru

² Национальный исследовательский центр эпидемиологии и микробиологии имени Н. Ф. Гамалеи
Минздрава России, 123098 Москва, Россия; электронная почта: boksha_irina@gamaleya.org

Поступила в редакцию 18.12.2020

После доработки 18.03.2021

Принята к публикации 22.03.2021

Сигнальный каскад протеинкиназы mTOR является центральным регулятором клеточного метаболизма, роста и выживания клеток в ответ на гормоны, факторы роста, питательные вещества и сигналы, вызванные стрессом. Цель обзора: на основе анализа современной литературы продемонстрировать, как часто встречаются молекулярные аномалии сигнального пути mTOR и сопряжённых с ним сигнальных путей при расстройствах аутистического спектра (РАС), а также наметить возможные перспективы патогенетически-ориентированного фармакотерапевтического воздействия, особенно при синдромных РАС. На основе анализа экспериментальных и клинических данных предполагается, что наиболее раннему выявлению молекулярных аномалий в группе риска РАС могут способствовать исследования тромбоцитов периферической крови. Поиск в этой группе временного «окна», в котором происходят критические нарушения регуляции активности описанных путей, может привести к более эффективной превентивной фармакотерапии аутизма.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: mTOR, сигнальные каскады, фосфорилирование белков, расстройства аутистического спектра.

DOI: 10.31857/S0320972521050031

ВВЕДЕНИЕ

Аутизм, или расстройство аутистического спектра (РАС) – это нейроонтогенетическое

расстройство, в общем случае характеризующееся такими ключевыми симптомами, как качественное нарушение социального взаимодействия, коммуникации и ограниченное стерео-

Принятые сокращения: AMPK – AMP-активируемая протеинкиназа; APP – белок-предшественник бета-амиоида; KTC – комплекс туберозного склероза; MAPK – митоген-активируемая протеинкиназа (синоним ERK); MeCP2 – метил-СrG-связывающий белок 2; MEK – киназа митоген-активируемых протеинкиназ (МАРК/ЕРК); НФ1 – нейрофиброматоз первого типа; ППСК – плюрипотентные перепрограммированные стволовые клетки; РАС – расстройство аутистического спектра; И-РАС – идиопатические РАС; НС-РАС – несиндромные РАС; С-РАС – синдромные формы РАС; СА – синдром Ангельмана; СР – синдром Ретта; ФМС – синдром Фелан–МакДермид; Х-ФРА – синдром ломкой («фрагильной») X-хромосомы; Akt – RAS-alpha серин-треониновая протеинкиназа; Arg – ассоциированный с цитоскелетом белок; BDNF – нейротрофический фактор мозга; CDKL5 – киназа, подобная циклинзависимой киназе 5; eIF4 – эукариотический фактор инициации трансляции 4; E/I – соотношение возбуждения/торможения; ERK – активируемая внеклеточными сигналами киназа (синоним MAPK); 4E-BP1 – eIF4E-связывающий белок 1; FMRP – белок, ассоциируемый с синдромом ломкой X-хромосомы; IGF-1 и IGF-2 – инсулиноподобные факторы роста; LTP – долговременная (длительная) потенциация; mGluR, mGluR1 и mGluR5 – метаботропный глутаматный рецептор и его подтипы 1 и 5; mLST8 – ассоциированный с mTOR белковый гомолог LST8 (mammalian lethal with Sec13 protein 8); MNK – взаимодействующая с MAPK киназа; mTOR – протеинкиназа, механистическая мишень рапамицина у млекопитающих; NF1 – белок нейрофибромин; NGF – фактор роста нервов; NMDA – N-метил-D-аспартат; PI3K – фосфатидилинозитол-3-киназа; PIP3 – фосфатидилинозитол-3,4,5-трифосфат; PTEN-PAС – синдром, связанный с мутацией гомолога фосфатазы и тензина; pAkt^{Ser473} – Akt, фосфорилированная по Ser473; p70S6K1 – киназа 1 рибосомного белка S6; Ras – семейство малых ГТФаз, участвующих в передаче сигнала в животных клетках (от Rat sarcoma); Rheb – гомолог Ras в мозге; SGK1 – индуцируемая сывороткой и глюкокортикоидами киназа 1; SHANK3 – содержащий SH3-домен и множественные анкириновые повторы белок 3; TSC1 и TSC2 – белки комплекса туберозного склероза (гамартин и туберин); UBE3A – убиквитин-протеиновая лигаза E3A; Wnt – группа путей передачи сигналов, начинающихся от белков, передающих сигналы в клетку от рецепторов на её поверхности.

* Адресат для корреспонденции.

типное поведение. РАС чрезвычайно гетерогенны с точки зрения их генетической основы и, соответственно, этиологии и патогенеза. Во всём мире диагностика и классификация РАС в настоящее время основана на клинических наблюдениях (оценке тяжести симптомов психиатрами), в случае синдромных форм РАС выявить и идентифицировать их причину помогают медико-генетические анализы. Недавно в Российской Федерации благодаря иммунологическим и электрофизиологическим исследованиям особенностей пациентов с разными формами РАС появились возможности практического применения выявленных «биомаркёров» в поддержку клиническим диагностическим критериям РАС [1, 2]. Достижения в области генетики аутизма только вступают в фазу перехода к практическому клиническому применению [3, 4].

За исключением синдромных форм РАС (С-РАС), когда аутистическое поведение связано с определенным медицинским синдромом, обусловленным известной генетической (хромосомной) аномалией, в большинстве случаев генетические и иные причины, обуславливающие фенотипическое проявление аутистических симптомов, остаются неясными и требуют дорогостоящего анализа генома, а для разработки «биомаркёров» требуются дополнительные биохимические исследования.

Ввиду отсутствия как ясного понимания этиологии, патогенеза, так и классификации РАС (особенно расстройств, не относящихся к С-РАС) с биохимической точки зрения, фармакологическое воздействие сводится в большинстве случаев к поддержке ноотропами, а в случае психотических форм — к симптоматическому лечению антипсихотиками [1, 2], хотя, безусловно, необходима разработка препаратов, воздействующих на уже намеченные, открытые патогенетические пути.

Написание данного обзора вызвано необходимостью обобщения современных результатов исследования регуляторных сигнальных каскадов белкового фосфорилирования при РАС, поскольку в этом направлении достигнут определенный прогресс в изучении вклада этих путей в развитие аутистических симптомов при С-РАС и ведется поиск фармакологических препаратов.

Обзор сфокусирован на каскаде mTOR, поскольку из всех систем белкового фосфорилирования этот путь наиболее исследован при РАС, его можно считать центральным, и к нему «сходятся» данные, полученные при изучении С-РАС и свидетельствующие о том, что при РАС изменена как активность его регуляторов, т.е.

компонентов «выше по течению», так и его мишеней («ниже по течению» — факторы белковой трансляции) [5]. В обзоре оценены результаты исследований сигнального каскада mTOR и сопряженных с ним биохимических путей — как с точки зрения понимания патогенеза РАС, так и с точки зрения поиска препаратов, действующих на компоненты этого каскада и сопряженные с ним пути (его мишени), а также намечены пути исследований, которые авторы считают перспективными.

СИГНАЛЬНЫЙ ПУТЬ mTOR — КОНВЕРГЕНЦИЯ СИНДРОМНЫХ РАС И НЕ АССОЦИИРОВАННЫХ С СИНДРОМАМИ ФОРМ РАС

Известно, что сигнальный каскад mTOR функционирует как интегратор молекулярных систем по поддержанию взаимодействия организма и клеток с окружающей средой. Путь mTOR регулирует гомеостаз, влияя на синтез белка, транскрипцию, метаболизм, процессы аутофагии, биогенеза органелл, участвует в процессах, поддерживающих иерархическую целостность функционирования мозга, включая дифференцировку и пролиферацию клеток нервной системы, организацию и поддержание проводящих путей, обеспечивающих пластичность, связанную с обучением, и регуляцию сложного поведения [6]. Поэтому дисфункцию mTOR можно рассматривать как основополагающую причину ряда моногенных расстройств и как важный патогенетический фактор различных неврологических, нейродегенеративных и психических расстройств [7]. Далее будет оценено состояние исследований mTOR при РАС.

СИНДРОМНЫЕ, НЕСИНДРОМНЫЕ И ИДИОПАТИЧЕСКИЕ РАССТРОЙСТВА АУТИСТИЧЕСКОГО СПЕКТРА

Фенотипические (клинические) проявления патологии нервной системы, выражающиеся как аутизм, или аутистические симптомы, сильно варьируют по выраженности и степени тяжести. Такая варибельность определяется различным вкладом в развитие патологии как генетических нарушений, так и факторов воздействия внешней среды [8].

В настоящее время принято деление по этиологии РАС на синдромные РАС (С-РАС), которые связаны с описанными клиническими синдромами и обусловлены открытыми генетическими аномалиями (так называемые генети-

ческие заболевания), несиндромные РАС (НС-РАС), не связанные с этими синдромами, но обусловленные также выявленными генетическими причинами, и идиопатические РАС (И-РАС), генетические и другие причины которых не установлены [9]. В качестве возможных причин развития И-РАС рассматриваются пренатальные воздействия (например, влияние на развитие плода токсинов, некоторых лекарственных препаратов, инфекции) и постнатальные факторы риска нарушения развития нервной системы (например, социальная и/или сенсорная депривация), а также пока не выявленные генетические и/или эпигенетические факторы [8].

С генетической и биохимической точек зрения С-РАС изучены лучше, чем НС-РАС, и значительно лучше, чем И-РАС [4].

К С-РАС относят заболевания с генетически установленными причинами (генетические болезни), при которых наблюдаются симптомы аутизма: редкое моногенное заболевание — комплекс туберозного склероза (КТС) и КТС-ассоциированная мегалэнцефалия и симптоматический эпилептический синдром, синдром ломкой («фрагильной») X-хромосомы (X-ФРА), синдром Ретта (СР), синдром Ангельмана (СА), синдром, связанный с аномалией гомолога фосфатазы и тензина (PTEN-РАС), нейрофиброматоз первого типа (НФ1), синдром Тимоти, Ульриха—Нунан, синдром делеции 22q13.3 и ряд других относительно редких расстройств нейронотогенеза, покрываемых спектром РАС.

Хотя С-РАС охватывают лишь 5–10% всех случаев РАС, их изучение внесло большой вклад в понимание молекулярных основ возникновения аутистических симптомов. С другой стороны, в случаях РАС, не связанных с перечисленными С-РАС, разнообразные (в частности, биохимические) причины развития аутизма остаются неясными, и за прошедшие 15 лет с момента публикации обзора на эту тему прогресс наметился лишь в недавнее время [10, 11].

Оценки вклада генетического компонента в развитие НС-РАС и И-РАС варьируют от 40 до 90%, в зависимости от принимаемых во внимание параметров [3, 12–14].

Геномные технологии вкупе с обследованием больших когорт пациентов позволили выявить обилие редких вариантов, имеющих отношение к развитию РАС, причём связанными с НС-РАС оказались и несколько относительно редких мутаций *de novo*. На интернет-ресурсах рабочей группы по аутизму Психиатрического Геномного Консорциума (<https://www.med.unc.edu/pgc/pgc-workgroups/autism-spectrum-disorder/>) и Инициативы по исследованию ау-

тизма фонда Simons (Simons Foundation Autism Research Initiative — <https://gene.sfari.org>) обобщён и опубликован список генов, ассоциированных с риском РАС, ранжированный по четырём категориям — S (С-РАС) и 1–3: в категории S — гены, ассоциированные с С-РАС, в категории 1 — гены с подтверждённой ассоциацией с РАС, в категории 2 — «сильные кандидаты», в категории 3 — «предположительно гены-кандидаты». Список составлен на основе частоты встречаемости сообщений об исследованиях в литературе и воспроизводимости/подтвержденности данных. Но ни одна мутация в этих генах не обуславливает более чем 1–2% случаев НС-РАС, а все вместе формы НС-РАС, обусловленные мутациями в высоко пенетрантных генах, представляют около 10–20% всех случаев, что свидетельствует о крайне высокой степени генетической гетерогенности НС-РАС.

Несмотря на высокую степень клинической и генетической гетерогенности, описаны некоторые механизмы, общие для С-РАС и НС-РАС, и наблюдается конвергенция в нескольких генетических мутациях, сходящихся к ключевым биохимическим путям. Так, по данным широкомасштабных геномных и транскриптомных исследований, с риском РАС связаны сигнальные каскады белкового фосфорилирования с участием фосфатидилинозитол-3-киназы (PI3K), RAC-alpha серин-треониновой протеинкиназы (Akt) и протеинкиназы mTOR, т.е. пути PI3K/Akt/mTOR, а также сигнальный каскад фактора роста нервов (NGF), нейротрофического фактора мозга (BDNF), MAPK/ERK, сигнальный путь Wnt (группа путей передачи сигналов, начинающихся от белков, передающих сигналы в клетку от рецепторов на ее поверхности), а также Ca²⁺-кальмодулина [15].

Сигнальный путь Wnt вносит вклад в клеточную дифференцировку, полярность, пролиферацию клеток, и нарушение его регуляции ведёт к развитию определенных типов РАС. Сигнальные каскады MAPK/ERK связаны более чем с 20 функциональными путями и 22 генами, ассоциированными с РАС [16]. Активация NGF-индуцируемого сигнального пути ведёт к существенному снижению концентрации белка 4E-BP1 и фактора инициации трансляции eIF4E и связана с развитием окислительного стресса у пациентов с РАС. Со степенью окислительного стресса при РАС также связана активность сигнального каскада белкового фосфорилирования mTOR, которому в данном обзоре уделено особое внимание.

Сигнальный каскад mTOR — один из центральных биохимических путей конвергенции при разных РАС, он служит критическим регу-

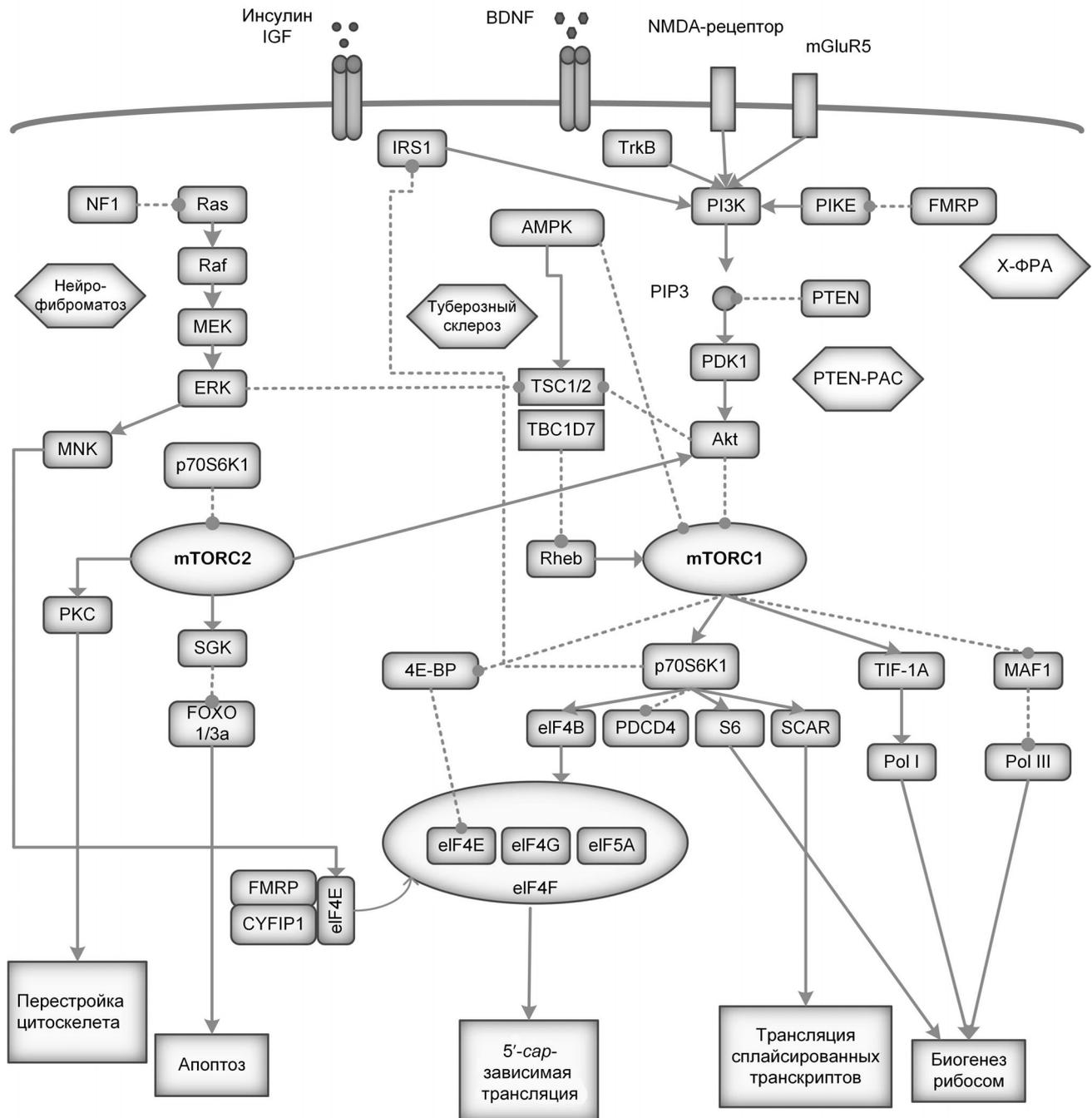


Схема сигнального каскада mTOR и сопряженных с ним путей. Схема составлена на основании вышедших недавно публикаций [17–20]

лятором белковой трансляции и влияет на множество функций в развивающемся и зрелом организме [12]. Сигнальные каскады митоген-активируемых протеинкиназ (МАРК) и Wnt также конвергируют на сигнальном каскаде mTOR [17] (рисунок). Приведенная на рисунке схема составлена на основании вышедших недавно публикаций [17–20].

Ключевой фермент в каскаде mTOR – киназа mTOR. Это белок, гомологичный дрожжевому белку TOR, серин-треониновая (Ser/Thr) протеинкиназа (~ 289 кДа), член семейства PI3K млекопитающих. mTOR входит в состав двух функционально различающихся комплексов: mTORC1 и mTORC2, подробно освещённых в обзорах ранее [17, 19, 20].

Активность комплекса mTORC1 подавляется рапамицином (фунгицидом микробиологического происхождения), поэтому белок mTOR получил название «мишень рапамицина у млекопитающих» [17]. Механизм действия рапамицина подробно рассмотрен в обзоре Pupyshv et al. [21] и других цитированных публикациях.

СИГНАЛЬНЫЙ ПУТЬ mTOR И СОПРЯЖЁННЫЕ С НИМ КАСКАДЫ

Комплекс mTORC1 содержит, кроме фермента mTOR, регуляторные белки Raptor (связывающий рапамицин), mLST8 (ассоциированный с mTOR белковый гомолог LST8 (mammalian lethal with Sec13 protein 8)), PRAS40 (40 кДа, обогащённый пролином субстрат Akt), Deptor (содержащий DEP-домен белок, взаимодействующий с mTOR) и ещё несколько белков [19]. Raptor необходим для внутриклеточной локализации mTORC1, он также рекрутирует субстраты mTORC1, связываясь с сигнальной последовательностью mTOR, которая представлена на канонических субстратах mTOR, таких как белки, регулирующие трансляцию (например, pS70S6K и 4EBP-1) и аутофагию (Ulk1). Рапамицин в присутствии FKBP12 (FK506-связывающего белка 12) подавляет связывание Raptor с mTOR и подавляет катализируемое mTOR фосфорилирование Raptor-зависимых субстратов, но не влияет на каталитическую активность mTOR. mLST8 предположительно стабилизирует киназный домен mTOR, а PRAS40 и Deptor являются ингибиторами активности mTORC1 [19].

Комплекс mTORC2 содержит, кроме mTOR, белки mLST8, Deptor (те же, что и mTORC1), а также mSIN1 (индуцируемый стрессом взаимодействующий с протеинкиназой белок млекопитающих), Rictor (нечувствительный к рапамицину компонент) и Protor-1/2 (белок, наблюдаемый в ассоциации с Rictor-1/2). В отличие от mTORC1, активность mTORC2 не ингибируется рапамицином, но при хроническом воздействии рапамицина активность mTORC2 подавляется, что вызвано, как предполагают, истощением пула mTOR [22]. О комплексе mTORC2 известно значительно меньше, чем о mTORC1, но он (посредством мишеней Akt, SGK1, PKC) регулирует анаболические процессы, процессы организации и поддержания целостности цитоскелета, апоптоза и ионного транспорта (рисунок) [17, 23]. Стимуляция mTORC2 ведёт к перестройке организации цитоскелета (при посредстве активации PKC), а механизмы выживания

клеток реализуются посредством индуцируемой сывороткой и глюкокортикоидами киназы 1 (SGK1) (рисунок) [23]. Кроме того, mTORC2 фосфорилирует Akt, активируя её и контролируя тем самым активность mTORC1 (рисунок).

Большинство известных неврологических и психических расстройств, в которых задействован mTOR, связывают с нарушением регуляции активности mTORC1 [24].

Рассмотрим ключевые моменты каскада, лежащие «выше» mTORC1. Активация mTORC1 инициируется различными факторами (в т.ч. NGF, PDGF, NF1 при посредстве ГТФазы Ras, BDNF и глутаматом при посредстве NMDA- и метаботропных глутаматных mGluR5-рецепторов), активирующими PI3K и образование ею фосфатидилинозитол-3,4,5-трифосфата (PIP3) (рисунок). Накопление PIP3 в цитоплазматической мембране стимулирует рекрутинг Akt, её фосфорилирование и активацию 3-фосфоинозитид-зависимой протеинкиназой 1 (PDK1), а также фосфорилирование и активацию mTORC2. Будучи активированной, Akt фосфорилирует и ингибирует TSC2, который вместе с TSC1 и TBC1D7 (член 7 семейства белков, содержащих TBC-домен) образует белковый комплекс туберозного склероза (TSC). Комплекс TSC функционирует как ГТФаза (GAP) по отношению к белку Rheb (гомологу Ras в мозге), стимулируя превращение Rheb-GTP в Rheb-GDP и инактивируя этот белок. Следовательно, если ингибируется комплекс TSC1/2 под действием Akt, то активируется Rheb, который далее активирует mTORC1 [25]. Активность комплекса TSC1/2 может регулироваться несколькими сигнальными путями. Кроме пути PI3K/PDK1/Akt, TSC2 фосфорилируется и ингибируется киназами ERK и AMP-активируемой протеинкиназой (AMPK) (рисунок); Wnt также подавляет фосфорилирование TSC2 киназой гликогенсинтазы 3 альфа (GSK3 α), что ведёт к стимуляции пути mTOR [26].

Один из главных сигнальных компонентов, находящихся непосредственно выше mTORC1 и активирующих его, — это Rheb. В норме белки TSC1/2 ингибируют Rheb и его мишень — mTORC1. Когда этот процесс, происходящий «выше по течению», подавлен (см. раздел Комплекс туберозного склероза), происходит гиперактивация mTORC1.

Ряд регуляторов действуют на активность mTORC1 при посредстве сигнального пути Akt. Так, активацию Akt, происходящую при посредстве PI3K, может подавлять NF1 при посредстве Ras (рисунок). Ещё один механизм активации mTORC1 — инактивация PRAS40 либо вслед-

ствии фосфорилирования протеинкиназой А, либо вследствие прямого фосфорилирования Akt по Thr246 и mTOR – по Ser183 [6].

Другая регуляторная молекула – PTEN – участвует в управлении активностью Akt и липидном сигналинге посредством регуляции уровня PIP3, синтезируемого PI3K. PTEN катализирует реакцию дефосфорилирования PIP3 до PIP2 (фосфатидилинозитол-4,5-дифосфата), отщепляя фосфатные группы от PIP3, образованного PI3K. Дефосфорилирование PIP3 ингибирует сигнальный путь, опосредуемый Akt, и способствует апоптозу. Активация и фосфорилирование киназой PDK1 протеинкиназы Akt играет основную роль в инициации пути mTOR, т.к. Akt имеет мишенью белки комплекса TSC1/2 и тем самым регулирует активность mTORC1 [27].

Кроме киназ, есть и другие модуляторы активности mTORC1 и mTORC2, которые рассмотреть в данном обзоре не представляется возможным. Отметим лишь, что активность mTOR, как и всех протеинкиназ, конечно, зависит от уровня энергетического субстрата – АТФ (точнее, комплекса АТФ с ионами Mg^{2+} или Mn^{2+}). То, что активность каскада mTORC1 контролируется MAPK/ERK и AMPK, еще раз подтверждает справедливость признания mTOR в качестве «сенсора» внутренних и внешних стимулов, который поддерживает клеточный гомеостаз, модулируя анаболические и катаболические процессы [19].

Что касается мишеней mTORC1, то в числе прочих процессов, mTORC1 стимулирует белковую трансляцию, активируя киназу 1 рибосомного белка S6 (p70S6K1) и ингибируя активность белков 4E-BP. В дефосфорилированном состоянии 4E-BP1 подавляет трансляцию, связывая эукариотический фактор инициации трансляции 4E (eIF4E). При фосфорилировании киназой mTORC1 белки 4E-BP1 диссоциируют от фактора eIF4E, позволяя тому взаимодействовать и связываться с eIF4G и eIF4A с образованием комплекса инициации трансляции eIF4F, что является критическим этапом в *cap*-зависимой трансляции. Фосфорилирование p70S6K1 стимулирует киназную активность и усиливает фосфорилирование ею субстрата – рибосомного белка S6. Предполагают, что фосфорилирование S6 может стимулировать транскрипцию генов, вовлечённых в биогенез рибосом [5].

В нейронах сигнальный каскад PI3K/Akt/mTORC1 регулирует множество процессов (рост, выживание клеток, синтез белка, синаптическую пластичность, зависимость от глутаматных рецепторов NMDA-типа, рост и ветвление

дендритов) благодаря активации этого каскада факторами роста, включая BDNF, а также его стимуляции глутаматными рецепторами NMDA-типа и mGluR5 [28] (рисунок). Этот каскад и системы, с которыми он взаимодействует, особенно пути Wnt, MAPK/ERK, играют центральную роль в нейроонтогенезе и нейрональных функциях.

В литературе имеется много данных, указывающих на нарушение регуляции активности пути PI3K/Akt/mTOR при PAC. Наиболее убедительные прямые данные получены при исследовании моногенных C-PAC, обусловленных потерей или снижением функции генов *FMRP*, *PTEN*, *NF1*, *TSC1*, *TSC2* и *EIF4E*, продукты которых являются либо регуляторами самого каскада mTOR, либо его мишенями, либо компонентами путей, на которые он влияет. Hoeffler и Klann [29] отмечали, что вызванные одиночными генами нарушения ответственны за 8–15% всех случаев PAC, причём более половины этих генов участвует либо в регуляции сигнального каскада mTOR, либо в контроле трансляции.

Изменения в активности PI3K/Akt/mTOR по сравнению с контролем отмечены не только при C-PAC, но и при некоторых HC-PAC [30]. Повышение активности каскада кажется логичным для объяснения таких фенотипических признаков аутизма, как увеличенный размер мозга [31, 32], эпилепсия и преобладание процессов возбуждения над процессами торможения (E/I) [33], усиленный рост дендритов и их аномальное ветвление [34]. Но не всё так однозначно в вопросе активности каскада mTOR при различных формах даже C-PAC, не говоря уже о И-PAC: как будет отмечено далее, имеются также данные и о нарушении равновесия активностей комплексов mTORC1 и mTORC2, или снижении активности каскада mTOR, например, при CA [35], синдроме Фелан–МакДермид (ФМС) и CP. В целом отклонения (повышение или понижение) активности сигналинга mTORC1 описаны при нескольких моногенных C-PAC: KTC, PTEN-ассоциированном PAC, NF1, X-ФРА, CP и CA, рассмотренных далее.

Кроме C-PAC, нарушение регуляции активности mTORC1-зависимого сигнального каскада (как лежащих выше путей, регулирующих этот каскад, так и фосфорилируемых им мишеней) наблюдалось у пациентов с HC-PAC и у животных, моделирующих HC-PAC [36–39].

Тем не менее до полного понимания механизмов, посредством которых дисбаланс пути mTORC1 приводит к развитию аутистических симптомов, ещё далеко, и остается ряд нерешенных вопросов: насколько закономерности, выясненные при изучении C-PAC, можно рас-

пространить на HC-PAC; достаточно ли свидетельств того, что сигнальный путь mTORC1 вносит вклад в патогенез HC-PAC для разработки фармакологических препаратов; насколько велика доля случаев с измененной активностью сигнального пути mTORC1 среди всех HC-PAC и И-PAC; будет ли терапия, направленная на mTORC1 и эффективная в лечении проявлений некоторых С-PAC, также эффективна хотя бы для некоторых подгрупп пациентов с HC-PAC и И-PAC; в каких случаях при PAC активность сигнального пути mTOR повышена, в каких – понижена и каковы пределы и временные рамки этих отклонений в онтогенетическом развитии.

Далее в настоящем обзоре обсуждаются механизмы и терапевтические подходы, разработанные при изучении С-PAC с доказанным вкладом в патогенез аномалий регуляции пути mTORC1, а также обсуждаются недавние находки, потенциально свидетельствующие о вкладе дисфункции сигналинга mTORC1 в HC-PAC и И-PAC.

СИГНАЛЬНЫЕ КАСКАДЫ (ВКЛЮЧАЯ mTORC1) ПРИ С-PAC

Комплекс туберозного склероза (КТС). При КТС наблюдается снижение интеллекта, аутизм, тревожные расстройства и расстройства настроения, эпилепсия, множественные опухоли и многочисленные другие расстройства. PAC при КТС встречаются в 20–60% случаев, причём эпилепсия, PAC и снижение интеллекта тесно сцеплены [20]. Структурные аномалии мозга при КТС [40] приведены в таблице. Примечательно, что когнитивные нарушения и отклонения от нормы в поведении детей с КТС и с И-PAC очень сходны, что может свидетельствовать о сходных молекулярных и структурных аномалиях при аутистических симптомах, сопровождающих КТС, и при И-PAC. Предполагается, что КТС может служить моделью PAC, и когда молекулярные механизмы, лежащие в его основе, будут полностью расшифрованы, эти находки, вероятно, помогут также при изучении механизмов, лежащих в основе И-PAC.

КТС – это классическая форма «mTOR-патии», он вызывается мутациями генов, кодирующих белки TSC1 или TSC2, с потерей функций. TSC1 и TSC2 вместе с TBC1D7 образуют комплекс, осуществляющий негативную регуляцию mTORC1 при посредстве Rheb (рисунок). Основная функция комплекса TSC1/2 – это интеграция множественных сигналов от лежащих «выше» сигнальных путей и ингибирование активности Rheb и mTORC1, таким образом, при

отсутствии ингибирования конститутивная активация mTORC1 представляет молекулярную основу КТС [63]. Однако, не слишком упрощая ситуацию, отметим, что TSC1 и TSC2 имеют и другие молекулярные функции: взаимодействие с актин-связывающими белками и независимая от Rheb модуляция активности mTORC2, механизм которой может включать прямое связывание комплекса TSC1/2 с компонентами mTORC2. Активированный mTORC2 фосфорилирует и активирует Akt (рисунок), что приводит к фосфорилированию ее субстратов, включая TSC2. Взаимодействие между mTORC1 и mTORC2 происходит ещё и при посредстве p70S6K1, фосфорилирующей и ингибирующей Rictor. Утрата либо TSC1, либо TSC2 приводит к тому, что mTORC1 активируется, а mTORC2 подавляется. Поскольку такие наблюдения были сделаны не на нейрональных клетках, предстоит важная задача: изучить, как происходит взаимная регуляция mTORC1 и mTORC2 в нервной ткани. Второе важное следствие из таких наблюдений – это то, что при поиске лекарственных препаратов, воздействующих на mTOR, следует учитывать активность обоих комплексов – mTORC1 и mTORC2 – и их взаимодействие [26]. Отметим также, что сам Rheb имеет и не зависящие от mTORC1 функции – регулирует сигналинг B-Raf (серин-треониновой киназы) и MAPK/ERK, опосредует апоптоз и митофагию, а также выполняет другие функции [64]. Следовательно, в фенотип КТС могут вносить дополнительный вклад и нарушения регуляции других сигнальных путей, хотя большая часть исследований указывает на то, что в основном фенотип обусловлен гиперактивацией mTORC1.

На животных, лабораторных моделях КТС, показано, что мутации с инактивацией TSC1 и TSC2 и обусловленная этим гиперактивность сигнального пути mTOR могут приводить к аномалиям мозга, отмеченным у пациентов с PAC при КТС.

Сведения о молекулярной природе нейрокогнитивных аномалий почерпнуты также из исследований моделей – нокаутных мышей с инактивированными генами TSC [65]. В экспериментах на мышях *Tsc2^{+/-}*, моделирующих поведенческие аномалии при КТС, показано, что нарушения обратимы под действием рапамицина – ингибитора mTORC1 [41]. Производное рапамицина, эверолимус (Everolimus) или афинитор, был одобрен Food and Drug Administration в 1999 г. для лечения субэпендимальных гигантоклеточных астроцитом, развивающихся при КТС (при невозможности выполнения хирургической резекции опухоли). Рапамицин и эверолимус также проявляли противоэпилептические

Известные генетические основы, активность mTORC1 и белков сопряженных с ним сигнальных путей, морфологические и функциональные аномалии мозга и моделирование на животных расстройств аутистического спектра*

Формы РАС	Генетические основы	Активность mTORC1 и белков сопряженных с ним сигнальных путей	Морфологические и функциональные аномалии мозга	Животные модели
КТС	мутация <i>TSC1</i> или <i>TSC2</i>	отсутствуют функционально активные белки TSC1 или TSC2; конститутивная активация mTORC1	мегалэнцефалия; нарушение синаптического прунинга; гипомиелинизация; сверхвозбудимость синапсов астроглиоз; дисплазии нейронов; множественные аномально длинные аксоны; аномальные межнейронные связи	мыши с условным нокаутом гена <i>Tsc1</i> (<i>Tsc1^{+/-}</i> -мыши); мыши с условным нокаутом гена <i>Tsc2</i> (<i>Tsc2^{+/-}</i> -мыши)
X-ФРА	экспансия повтора CGG 5'-UTR гена <i>FMR1</i>	повышение активности mTORC1 при посредстве PI3K; снижение концентрации белка FMRP	обилие незрелых форм шипиков; высокая плотность дендритных шипиков; избыток синапсов; повышенная частота патологии нейронов; увеличение объема гиппокампа	<i>Fmr1</i> KO
PTEN	мутация с потерей функции гена протеинфосфатазы PTEN	конститутивно высокая активность mTORC1 при посредстве PI3K	макроцефалия; мегалэнцефалия; аномалии миелинизации; гипертрофия тела нейронов; высокая плотность дендритных шипиков; увеличение длины дендритов; повышенная плотность нейронных связей	мыши <i>Pten</i> KO или нокдаун
НФ1	мутации гена <i>NF1</i>	повышенная активность RAS/MAPK (ERK); повышенная активность PI3K; повышенная активность mTORC1; ингибирование TSC2; снижение содержания нейрофибромина	макроцефалия; увеличение объемов белого и серого вещества; нарушение целостности белого вещества; аномалии миграции нейронов; астроглиоз	мыши <i>NF1</i> KO
СА	делеция в 15q11–13 или мутация с потерей функции гена <i>UBE3A</i> , локализованного на 15q11–13	повышенная активность mTORC1; пониженная активность mTORC2; нарушение экспрессии убиквитин-протеинлигазы E3A; изменение количества Arg	микроцефалия; увеличение объема мозжечка и гиппокампа; нарушение миелинизации; аномалии морфологии дендритных шипиков; снижение плотности шипиков; снижение ветвления и длины дендритов	мыши с делецией <i>UBE3A</i>
CP	мутация с потерей функции гена <i>MECP2</i> ; мутация <i>CDKL5</i>	пониженная активность mTORC1; снижение содержания BDNF; снижение содержания MECP2	уменьшение размеров нейронов; повышенная плотность нейронов; астроглиоз; снижение ветвления дендритов; пониженная плотность шипиков; аномалии созревания в коре и гиппокампе; сниженное число глутаматергических синапсов	мыши <i>Mecp2^{+/-}</i> , <i>Mecp2^{-/-}</i>
Фелан–МакДермид 22q13	микрделеция 22q13, затрагивающая локус гена <i>SHANK3</i>	пониженная активность mTORC1	аномалии нейронов и синаптической проводимости в кортикальных слоях и в полусатом теле; снижение плотности шипиков; снижение плотности нейронных связей	нокдаун <i>SHANK3</i> ; дупликация <i>SHANK3</i>
Dup15q11–13	дупликация 15q11–13; увеличение дозы гена <i>CYFIP1</i> ; увеличение дозы гена <i>UBE3A</i>	повышенная активность mTORC1	аномалии морфологии нейронов и нейромедиаторных систем	дупликация BP2–BP3 (<i>patDp/+</i>); сверхэкспрессия гена <i>CYFIP1</i>
eIF4E HC-РАС	мутации в области промотора гена <i>EIF4E</i>	повышение активности промотора гена <i>EIF4E</i>	увеличение плотности дендритных шипиков; нарушение синаптической пластичности; снижение возбудимости; нарушение LTP в префронтальной коре и гиппокампе	мыши со сверхсинтезом белка eIF4E
И-РАС	неизвестны	повышенная или пониженная активность mTORC1; снижение синтеза PI3K, Akt, mTOR, p-mTOR, p70S6K и eIF4B	макроцефалия; повышение плотности нейронов в некоторых областях мозга; снижение численности клеток Пуркинье; астроглиоз и активация микроглии; аномалии миелинизации; изменение плотности дендритных шипиков	мыши с индуцированными вальпроатом аномалиями развития; мыши BTBR <i>T⁺Itr3^{fl}/J</i>

* Таблица составлена на основании публикаций: [11, 37, 40–62].

кую активность у животных, лабораторных моделей КТС с делецией *TSC1* в нейронах или астроцитах, и в экспериментах на таких животных, демонстрирующих аномальное поведение и когнитивные нарушения, рапамицин уменьшал степень выраженности этих аномалий [66].

В фазе III клинических испытаний эверолимус достоверно позволял контролировать эпилептические припадки у больных с КТС с рефрактерным эпилептическим статусом [67]. В настоящее время ингибиторы mTOR используются для лечения связанных с КТС неврологических проявлений у детей и взрослых, но применение рапамицина и его производных ограничено из-за осложнений и побочного действия. В отдельных клинических исследованиях рапамицина и его производных сообщалось о положительной динамике аутистических симптомов и улучшении когнитивного функционирования при КТС, однако в других исследованиях говорилось либо об отсутствии положительного влияния этих препаратов на когнитивные способности детей с КТС, либо эти способности не оценивались [68]. Можно предположить, что препараты, одобренные для применения у детей с 3-летнего возраста и опробованные в клинике, применялись слишком поздно и не были способны «обратить» патологию развития ЦНС, тогда как, возможно, при более раннем применении они могли бы её предотвратить. Тем более ценными кажутся единичные обследования детей в возрасте до 2 лет [69]. Этот вопрос будет затронут далее в разделе PTEN-RAC (экспериментальные данные по моделированию патологии на мышах).

Ограниченность применения рапамицина и его производных в терапии (в т.ч. неврологических проявлений) объясняется также существованием обратной связи — опосредуемой p70S6K1 петли регуляции сигналинга PI3K. p70S6K1 — субстрат mTORC1 — фосфорилирует субстрат рецептора инсулина (IRS-1), блокируя инсулин-опосредованную активацию сигнального пути PI3K/Akt (рисунок). Кроме того, рапамицин подавляет не все функции mTORC1: он блокирует фосфорилирование mTORC1 киназы p70S6K1, но практически не ингибирует фосфорилирование белка 4E-BP1, что может приводить к стимуляции других частей каскада mTOR (например, 4E-BP1) [21].

Сигнальный путь mTOR играет критическую роль для нормального клеточного роста и выживания, и все последствия, которые может оказать его ингибирование и/или активация на развивающийся мозг, ещё до конца не изучены.

Проводятся исследования с использованием плюрипотентных перепрограммированных ство-

ловых клеток (ППСК), полученных от больных КТС, и клеток-онтогенетических предшественников нейронов, в которых изучается роль ранних событий, происходящих в сигнальных каскадах, в онтогенезе и развитии PAC [70]. Так, например, ППСК от пациента с КТС, несущие мутацию гена *TSC1*, были подвергнуты дифференцировке в клетки-предшественники нейронов. В гетерозиготном и нулевом вариантах клеток наблюдались активация mTORC1 и MEK/ERK и усиление пролиферации и роста нейритов. Активация mTORC1 приводила к фосфорилированию и высвобождению ингибиторного 4E-BP1 из комплекса с eIF4E, что позволяло сформироваться активному комплексу eIF4F. Рапамицин подавлял активацию mTORC1, но не оказывал влияния на повышенную пролиферацию и образование отростков у клеток-предшественников. Кроме того, оказалось, что под действием рапамицина усиливалась повышенная базовая активность MEK/ERK и активировался альтернативный механизм опосредованного MNK (киназой, взаимодействующей с MAPK) фосфорилирования и активации eIF4F (рисунок) [71]. Полностью заблокировать эффекты, вызванные отсутствием *TSC1*, удавалось лишь совместной обработкой рапамицином и eFT508 — ингибитором MNK.

Полученные данные указывают на то, что ранние события, вызванные отсутствием *TSC1*, зависят не только от активации mTORC1. Регуляция трансляции в нейронах, опосредованная MEK/ERK и MNK-eIF4E, тоже может играть роль в аспектах КТС, связанных с нарушениями в центральной нервной системе. И, возможно, что при разработке фармакологических подходов совместное применение ингибиторов mTOR и MNK будет более эффективно, чем применение одного рапамицина и его производных. Для этого необходимы дальнейшие исследования протеома и транскриптома (мРНК) как до, так и после обработки ингибиторами mTOR и MNK клеток-предшественников нейронов, выделенных от пациентов с КТС [70].

Синдром ломкой X-хромосомы (X-ФРА, синдром Мартина—Белл). X-ФРА — это наиболее известный синдром, ассоциированный с задержкой психического развития и PAC, причём диагноз PAC имеют 30–50% больных с X-ФРА [72].

Чаще всего синдром обусловлен экспансией повтора CGG в 5'-UTR гена *FMR1* (*fragile X mental retardation 1*), что приводит к гиперметилованию и снижению экспрессии гена. При полностью мутантном гене (>200 повторов) отсутствует продукт гена — белок, ассоциированный с синдромом ломкой X-хромосомы (FMRP). FMRP — это РНК-связывающий белок, участву-

ющий в регуляции трансляции, зависимой от BDNF и метаболитных глутаматных рецепторов 1 (mGluR1) – процесса, лежащего в основе синаптической пластичности. Поэтому изменение интенсивности синтеза белка играет важную роль в неврологических проявлениях Х-ФРА [73] (рисунок). FMRP служит репрессором трансляции, специфически (селективно) связываясь с последовательностями ряда мРНК и полирибосомами. Многие мРНК, являющиеся его мишенями, кодируют важнейшие белки, необходимые для созревания, стабилизации и элиминации при перестройке синапсов, причем известно, что гены, которые кодируют эти белки, ассоциированы с риском PAC: *SHANK3*, *PTEN*, *TSC2*, *NF1*, *CYFIP1*, *NLGN3* и *NRXN1* [73, 74]. При Х-ФРА часто развивается эпилепсия, наблюдаются множественные аномалии структур мозга (таблица), что влияет на его функции и синаптическую пластичность, а *in vitro* в клеточных линиях нейронов, полученных из ППСК больных с Х-ФРА, наблюдаются структурные аномалии (уменьшение размеров тела и длины отростков) [42].

У нокаутных мышей *Fmr1* KO развиваются аномалии нервной системы, сходные с проявлениями патологии у пациентов с Х-ФРА [43].

В постмортальном мозге больных с Х-ФРА обнаружены аномалии каскадов белкового фосфорилирования, включая сигнальный путь mTOR [44]. Роль каскада mTOR в Х-ФРА остается до конца не выясненной, но исследования позволили идентифицировать механизмы, посредством которых FMRP может регулировать mTOR, и наоборот. Так, FMRP может подавлять трансляцию многих мРНК, например, глутаматного рецептора mGluR5 и белков пути PI3K/Akt/mTOR [73]. Участие этих каскадов в регуляции социального поведения, обучения, памяти обусловлено тем, что они необходимы для регуляции белкового синтеза, индуцируемого mGluR группы 1 (Gp1), обеспечения синаптической проводимости и формирования шипиков [44, 45].

При биохимических исследованиях нокаутных мышей *Fmr1* KO были получены несколько различающиеся результаты, что, возможно, объясняется различными экспериментальными условиями. Но есть свидетельства того, что у этих мышей усилена активность сигнального каскада mTORC1 и повышено образование комплекса инициации трансляции в мозге. Это обусловлено, как минимум частично, усиленной трансляцией мРНК, кодирующих субъединицу p110 δ киназы PI3K и (PIKE)-S – энхансера-активатора PI3K, позитивно регулирующих активность mTORC1 и активность всего связанного с ним

каскада [75]. Все эти находки свидетельствуют о том, что помимо мРНК-связывающей активности, FMRP также играет роль регулятора инициации трансляции, опосредуемой PI3K/mTORC1, так как FMRP участвует в регуляции PI3K (рисунок) [75].

Поскольку у мышей *Fmr1* KO, лабораторных моделей Х-ФРА, при стимуляции активности каскада PI3K/Akt/mTOR симптомы, связанные с PAC, вероятно, обусловлены усиленной трансляцией белка в синапсах и спровоцированным высоким отношением Е/І в ключевых нервных путях, на этих мышках было опробовано фармакологическое ингибирование пути PI3K [76]. При этом наблюдалось ослабление дефицита, связываемого с симптомами PAC. Важно, что ингибирование PI3K или mTORC1 нормализовало избыточный синтез синаптических белков в нейронах мышей [76]. Кроме того, у мышей *Fmr1* KO делеция в гене, кодирующем p70S6K1, и фармакологическое или генетическое подавление фосфорилирования eIF4E (т.е. мишеней обоих путей – ERK и mTORC1) (рисунок) предотвращали формирование дефектов дендритных шипиков, изменение синаптической пластичности, усиленный синтез белка и развитие связанного с PAC поведенческого фенотипа [77]. Это указывает на то, что усиление сигналинга mTORC1 и *cap*-зависимой трансляции играет роль в патофизиологии Х-ФРА.

Вместе с тем известно исследование, показавшее, что гиперактивация mTOR вследствие утраты функции TSC2 парадоксальным образом привела к снижению синтеза белка в гиппокампе, и этим проявлениям (а также поведенческим и электрофизиологическим аномалиям) противодействовали как фармакологическая активация mGluR5, так и делеция *Fmr1* [78]. Следовательно, сигнальные взаимодействия FMRP и mTOR сложные и разветвленные, и их нарушение потенциально может привести к PAC.

Так, открыт ещё и такой механизм связи FMRP с mTOR, как регуляция трансляции на стадии инициации посредством связывания комплекса CYFIP1/FMRP с eIF4E (рисунок). Сигнальные каскады фосфорилирования, иницируемые BDNF и mGluR, активируют путь MNK, что, в свою очередь, приводит к усилению фосфорилирования eIF4E, ослаблению связей в комплексе CYFIP1/FMRP/eIF4E и усилению высвобождения eIF4E из комплекса с CYFIP1/FMRP, что позволяет взаимодействовать eIF4E с eIF4G, и при этом осуществляется трансляция связанной мРНК (рисунок) [71].

На сложность взаимодействий различных систем белкового фосфорилирования указывает возможное вовлечение казеинкиназы 2: стало

известно, что она конститутивно фосфорилирует FMRP по остатку S499, и это стимулирует дальнейшее фосфорилирование FMRP по другим сайтам [79]. Более того, FMRP является мишенью киназы p70S6K1 – члена семейства сигнального каскада mTOR, таким образом, трансляция, регулируемая репрессором FMRP, зависит от активности пути mTOR (рисунок).

Синдромная форма PTEN-PAC, ассоциированная с мутацией гена PTEN. PTEN-ассоциированная «моногенная» форма PAC связана с гетерозиготным вариантом мутации с потерей функции *PTEN*. Морфологические аномалии головного мозга при PTEN-PAC приведены в таблице. Хотя умственная отсталость наблюдается примерно у 20% пациентов с мутацией *PTEN*, распространенность PAC среди этих пациентов не оценивалась. Наоборот, частота встречаемости мутации *PTEN* среди пациентов с PAC с макроцефалией оценена: она варьирует в пределах 7–27% [46].

Ген *PTEN* кодирует липид- и протеинфосфатазу PTEN (гомолог фосфатазы и тензина), ключевой фермент в росте клеток, пролиферации, выживании. PTEN противодействует функции киназы PI3K (путём дефосфорилирования PIP3) [80] и, подобно TSC1/2, осуществляет негативный контроль активности каскада mTORC1 [81] (рисунок). Отсутствие контроля со стороны PTEN способствует неконтролируемому образованию PIP3 под действием PI3K, что приводит к усилению активности Akt и гиперактивации mTORC1 [81]. Таким образом, дефицит активности PTEN влечет за собой конститутивную активацию управляемых ею каскадов Akt/mTORC1.

Опубликованных результатов обследований пациентов с PTEN-PAC немного, тем не менее в них отмечались патология структур мозга и наличие эпилептических приступов [47].

В более многочисленных исследованиях на мышинных моделях (генетический нокаут или нокадаун), моделирующих дефицит PTEN, были получены ключевые данные о роли PTEN в центральной нервной системе и связи между повышенной активностью каскада mTORC1 и неврологическими и поведенческими аномалиями мутантных мышей. Патологические изменения в центральной нервной системе животных включали эпилептиформные припадки, макроцефалию, гипертрофию нейронов и астроцитов во всех структурах мозга и другие аномалии [48].

Применение рапамицина или ингибиторов киназы p70S6K1 в раннем периоде развития мышей, моделирующих PTEN-PAC, предотвращало развитие нарушений нервной системы и

PAC-подобных поведенческих аномалий [48], благодаря чему, во-первых, было достигнуто понимание связи между усиленной активностью сигнального каскада mTORC1 и неврологическими и поведенческими аномалиями мутантных мышей. Во-вторых, оказалось, что эффект от применения ингибиторов наблюдается лишь при наиболее раннем применении, т.е. достигается при предотвращении развития аномалий мозга, но не обращает их вспять. Однако оказалось, что рапамицин лишь частично компенсирует фенотип, обусловленный потерей функции *PTEN*, тогда как полный эффект достигается лишь при действии ингибитора Akt [82], следовательно, в развитие неврологических фенотипов, связанных с утратой функции *PTEN*, вносят вклад Akt-зависимые пути.

Хотя изменения роста, пролиферации, миграции глиальных клеток и образования миелина, наблюдаемые у животных моделей, могут иметь отношение к патогенезу PAC, необходимы дальнейшие исследования для того, чтобы понять, в какой мере эти аномалии связаны именно с избыточной активацией mTORC1, и как они влияют на поведение при PAC.

Несмотря на то, что в мозге мышей, моделирующих PTEN-PAC, наблюдаются невропатологические особенности, сходные с теми, что описаны у пациентов с PTEN-PAC [48], и они могут быть связаны отчасти с усилением сигнальной активности mTORC1, окончательного понимания связи не достигнуто, и вопрос требует углубленного изучения.

Также интересна связь пути mTOR с еще одним регуляторным фактором, влияющим на манифестацию аутизма – белком-предшественником бета-амилоида (APP) [83]. В синапсах при аутизме обнаружена повышенная концентрация APP, что ведёт к ещё большим нарушениям сигнальных путей PI3K/Akt/mTOR, которые обусловлены мутацией *PTEN* [84].

Нейрофиброматоз типа 1 (НФ1). НФ1 относят к «RAS-патиям», т.е. генетическим заболеваниям, обусловленным мутациями в генах, кодирующих белки каскадов Ras/MAPK [20, 85]. У большой доли пациентов с мутациями, относящимися к пути Ras/MAPK, включая довольно редкие синдром Ульриха–Нунан, кардио-фацио-кутанеальный синдром (КФКС) и синдром Костелло, проявляются симптомы PAC. Это подтверждает предположение о том, что в этих случаях PAC – общий результат усиленной активности Ras/MAPK [86]. Действительно, MAPK/ERK фосфорилирует и ингибирует TSC2, что приводит к сверхактивации mTORC1 (рисунок).

При НФ1 приблизительно в 15–18% случаев наблюдаются когнитивные нарушения и может

выставляться диагноз РАС, а в целом аутистические симптомы наблюдаются значительно чаще. НФ1 также характеризуется предрасположенностью к развитию опухолей (нейрофибром) [86]. НФ1 обусловлен мутациями с потерей функции гена *NF1*, кодирующего нейрофибромин. Ген *NF1* экспрессируется в нейронах и глиальных клетках. Нейрофибромин – негативный регулятор Ras, активирующий Ras ГТФазу (рисунок), поэтому дефект *NF1* запускает активацию сигнального каскада Ras. Первые свидетельства участия mTORC1 в патологии НФ1 были получены, когда было обнаружено, что Ras может индуцировать активацию PI3K и последующее ингибирование TSC2 киназой Akt, с усилением активности mTORC1 в эмбриональных фибробластах и астроцитах *NF1*-нокаутных мышей и в клетках, выделенных из опухолей от больных с НФ1. Однако позже было показано, что *NF1* регулирует пролиферацию глиальных клеток и рост глиом посредством Akt/mTORC1-зависимого, но TSC/Rheb-независимого механизма [87] (рисунок). У пациентов с НФ1 наблюдаются общие невропатологические признаки [49], и у ~10% больных с НФ1 развиваются эпилептиформные приступы. Эти аномалии воспроизводятся при моделировании НФ1 на мышах [50].

Как в экспериментальных, так и в клинических работах показано, что применение ингибиторов mTORC1 благоприятно сказывается, соответственно, как на состоянии животных, моделирующих НФ1, так и на состоянии больных НФ1: снижается рост нейрофибром и опухолей глиом. Это указывает на регуляцию функций различных типов клеток нервной системы посредством пути mTOR [88]. Однако действие ингибиторов mTORC1 на нейрокогнитивные или поведенческие функции при РАС, ассоциированных с НФ1, не изучалось.

Заметим, что утрата функции *NF1* не только в астроцитах, но и в нейронах приводит к астроглиозу, что свидетельствует о включении в мозг автономного внеклеточного механизма [87]. Однако необходимы дальнейшие исследования связи глиальных и нейрональных нарушений и пролиферации именно с РАС-ассоциированным поведением. Особенно важным было бы проведение исследований, в которых оценивалось бы влияние ингибиторов mTORC1 на проявление аутистических симптомов при НФ1.

Другие невропатологические особенности НФ1 пока не связывают с нарушением активности mTORC1, так, нарушение миграции нейронов и долговременной потенциации (LTP) зависят от сигнального каскада регулируемой внеклеточными сигналами киназы ERK [51].

Синдром Ангельмана (СА). Пациенты с СА характеризуются существенным недоразвитием речи, нарушением моторных функций, и большая доля пациентов с СА соответствует диагностическим критериям РАС, распространённость которых при СА оценивается в ~34–50% [89]. Большинство случаев СА обусловлены мутацией аллеля на материнской хромосоме с потерей функции гена *UBE3A* в нейронах. Ген *UBE3A* кодирует белок убиквитин-протеинлигазу E3A, которая убиквитинилирует другие белки, помечая и определяя их в качестве мишеней деградации. Ген *UBE3A* локализован в кластере генов на хромосомном локусе 15q11–13 [52].

Аномалии мозга при СА приведены в таблице [35, 53]. Нарушения развития нервной системы при СА воспроизводятся на мышинных моделях с материнской мутацией в *Ube3a* [35]. В основе патологии и неврологических аспектов СА лежит дефицит развития синапсов. Более того, в целом происходит более выраженное снижение активности ингибиторных, чем возбуждающих путей, что, возможно, объясняет подверженность эпилептическим припадкам больных СА. У мышей, моделирующих СА посредством делеции гена *UBE3A*, наблюдается гиперактивация сигнального пути mTORC1 и снижение активности mTORC2 [35]. Интересно, что активация mTORC2 восстанавливает до нормальных уровней LTP на переживающих срезах мозга, что, вероятно, указывает на важную роль, которую играет взаимное регулирование комплексов mTORC2 и mTORC1 (рисунок) [35].

Аномалии в центральной нервной системе при СА возникают в результате повышенного уровня белков-мишеней UBE3A в постсинаптическом пространстве, одним из которых является ассоциированный с цитоскелетом белок Arc. Функции белка Arc связаны с интернализацией α -amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazole propionic acid (AMPA), рецепторов глутамата в возбуждающих синапсах. У мышей, моделирующих СА и мутантных по *UBE3A*, нарушение LTP обусловлено главным образом повышением уровня Arc вследствие снижения его убиквитинилирования UBE3A и, как следствие, сниженной деградацией. Поскольку трансляция Arc регулируется FMRP – белком, ответственным за формирование синдрома Х-ФРА, предполагалось, что гиперэкспрессия Arc является точкой пересечения патофизиологии СА и Х-ФРА, а ингибирование mGluR5 сможет скорректировать аномалии фенотипа СА так же, как и при синдроме Х-ФРА [90]. Возможно, повышенные уровни Arc являются результатом усиленной активности mTORC1 и активации его мишени p70S6K1 в

мозге моделирующих СА мышей, запущенных усиленным ингибированием фосфорилирования TSC2 и снижением убиквитинилирования в отсутствие UBE3A [35, 91], хотя данные недостаточны, и точный механизм ещё неизвестен. Воздействие рапамицином или ингибитором киназы p70S6K1 снижало уровень Arg и нормализовало плотность дендритных шипиков, морфологию клеток Пуркиньи и пирамидальных клеток, а также LTP и, как следствие, устраняло моторную дисфункцию и дефицит обучения у мышей, моделей СА [35, 91]. Это свидетельствует о возможности влияния на синаптическую пластичность у больных с СА и общее функционирование нервной системы таких пациентов посредством нормализации активности mTOR. Однако, учитывая факт, что связь между mTORC1, mTORC2 и дефицитом UBE3A изучена недостаточно, необходимы дальнейшие исследования, направленные на выяснение вопроса о том, как связаны аномалии мозга пациентов с СА с нарушением равновесия активностей mTORC1 и mTORC2, и можно ли возлагать надежды на mTORC1/mTORC2-направленную терапию СА.

Синдром Ретта (СР). Хотя при СР и ФМС каскад mTOR затрагивается лишь косвенно (молекулярные «отклонения от нормы» лежат «вне» каскада mTOR), эти синдромы можно считать «вторичными» проявлениями нарушения активности каскада mTOR, которые могут вносить вклад в развивающиеся при этих синдромах аутистические симптомы.

СР носит характер прогрессирующего нейроонтогенетического расстройства, наступающего после начального периода нормального перинатального развития. Хотя этот синдром исключен из списка РАС в пятой редакции Диагностического и Статистического Руководства по Психическим Расстройствам (DSM-5), у детей с СР часто наблюдается аутистическое поведение, и встречаемость симптомов РАС при СР у девочек оценивается в ~61% [89].

СР обусловлен мутацией в гене *MECP2* на X-хромосоме с утратой его функции, ген кодирует метил-СpG-связывающий белок 2, контролирующий экспрессию генов и ремоделирование хроматина. Структурно-функциональные аномалии мозга при СР представлены в таблице. Аномалии структуры нейронов воспроизводятся в моделях СР на грызунах [54] и моделях *in vitro* с использованием *MECP2*-дефицитных нейронов, полученных из ППСК [92].

Хотя механизм, лежащий в основе наблюдаемых явлений, пока не совсем ясен, в моделях с мутацией *MECP2*, вызывающей фенотипические проявления СР, обнаружено снижение белкового синтеза и активности mTORC1 [20].

Кроме мутации гена *MECP2* у детей с СР, выявлены мутации других генов, в частности гена *CDKL5*, кодирующего киназу, подобную циклинзависимой киназе 5. Интересно, что активность mTORC1 также снижена и у мышей, несущих мутацию *CDKL5*, что свидетельствует об общей причине «типичного» и «атипичного» СР [93].

В отличие от большинства РАС-ассоциированных mTOR-патий, нейроны мышей-моделей *Mecp2^{+/-}* и *Mecp2^{-/-}* [55], а также нейроны, производные от *MeCP2*-дефицитных человеческих ППСК [94], демонстрируют пониженные сигнальную активность mTORC1, транскрипционную активность и скорость синтеза белка.

Хотя механизм, посредством которого *MeCP2* регулирует сигналинг mTORC1, еще до конца не выяснен, обнаружено, что у мышей, моделирующих СР, снижены уровни BDNF, что, возможно, и приводит к снижению активности путей PI3K/mTORC1 (рисунок) [55].

Воздействие на нейроны, производные из *MeCP2*-дефицитных ППСК, экзогенными факторами роста (IGF-1 или BDNF) или генетическое «выбивание» PTEN интенсифицирует синтез белка посредством усиления сигнальной активности PI3K/mTORC1 и нормализует размер сомы и образование и ветвление отростков [94]. Хотя необходимы дальнейшие исследования для того, чтобы понять, как дисфункция белка *MeCP2* приводит к развитию СР, уже сейчас можно сказать, что все находки свидетельствуют о связи дефектов глобального контроля транскрипции и опосредованной PI3K/mTORC1 трансляции с патогенетическими механизмами СР и, возможно, аутистическими симптомами.

Синдром Фелан–МакДермид (ФМС). ФМС – нейроонтогенетическое расстройство, обусловленное микроделецией 22q13, затрагивающей локус гена *SHANK3*. Ген *SHANK3* кодирует содержащий SH3-домен и множественные анкириновые повторы белок 3 (SHANK3). SHANK3 – структурный белок постсинаптической плотности, ответственный за ассоциацию и поддержание структуры комплексов глутаматных рецепторов в синапсах, который, как полагают, отвечает за развитие клинической картины заболевания [95]. Около 80% пациентов с ФМС получают диагноз РАС. У мышей, моделирующих генетическую аномалию – делецию *SHANK3* (как глобально, так и только в глутаматергических нейронах), обнаружены аномалии нейронов и синаптической проводимости [56].

Фосфопротеомные исследования нейронов грызунов, лабораторных моделей ФМС с нокдауном гена *SHANK3*, выявили снижение фосфо-

рилирования Akt и mTORC1, и закономерности воспроизводились на полученных из ППСК нейронах от пациентов с ФМС [57]. Это снижение было обусловлено накоплением CDC-подобной киназы 2 (CLK2) – негативного регулятора Akt, вследствие отсутствия SHANK3, а ингибитор CLK2 улучшал социальные взаимодействия животных с делецией SHANK3 [57]. Важно отметить, что у мышей с дупликацией SHANK3 обнаруживалось сниженное фосфорилирование mTOR в мозге при нормальном уровне фосфорилирования Akt, что является отличительной чертой молекулярного механизма этой модели [58]. В опытах *in vitro* введение гена SHANK3 дикого типа в нейроны, выращенные из индуцированных ППСК пациентов с ФМС, восстанавливало нормальный фенотип [96]. SHANK3, вероятно, вовлечён в путь, модулирующий активность mTOR, но подробности взаимодействий предстоит изучить в будущем.

Поскольку, в отличие от остальных С-РАС, рассмотренных выше, при СР и ФМС сигнальная активность mTORC1 не повышена, а, наоборот, снижена, непонятно, связана ли aberrанная работа каскада mTOR с поведенческим фенотипом или же это не прямой результат нейрональной дисфункции, обусловленной мутацией. Воздействие на животных, моделирующих СР, IGF-1 приводило к увеличению продолжительности жизни, изменениям в морфологии и физиологии нейронов, восстанавливало работу возбуждающих нейромедиаторных систем [96]. IGF-1 в настоящее время проходит клинические испытания при СР и ФМС, и известно, что сигналинг IGF-1 реализуется посредством пути PI3K и повышает активность mTORC1 [97], хотя функция mTORC1 в этих исследованиях напрямую не изучалась.

Синдром Аспергера. Ещё одно расстройство, отнесённое к спектру РАС по современной международной классификации болезней МКБ-10, – это синдром Аспергера. Известны две публикации [98, 99] с описанием двух отдельных случаев, когда постановку такого диагноза удалось связать с генетическими аномалиями, причём в одном случае – с мутацией гена, кодирующего SHANK3, а в другом – с дупликацией 22q13. В большинстве же случаев это расстройство, по-видимому, следует отнести к И-РАС, поскольку причины его неизвестны, и, к сожалению, неизвестны работы, в которых бы изучались каскады белкового фосфорилирования при данной патологии.

Все перечисленные сведения позволяют высказать предположение о том, что может существовать некий диапазон активности сигнального каскада mTOR, сохранение внутри ко-

торого необходимо для правильного функционирования мозга, а выход за диапазон приводит к поведенческим аномалиям. Детально данная ситуация была смоделирована математически [100].

СИГНАЛЬНЫЕ КАСКАДЫ, ВКЛЮЧАЯ mTORC1, ПРИ НЕСИНДРОМНЫХ (НС-РАС) НЕ МОНОГЕННЫХ ФОРМАХ РАС

Дупликация 15q11–13 (Dup15q). Унаследованные по материнской линии дупликации 15q11–13 – один из наиболее часто встречающихся вариантов НС-РАС, он обнаруживается у ~1–2% пациентов с РАС и свидетельствует о том, что гены, находящиеся в этой области, будучи представленными в нескольких копиях, могут приводить к развитию РАС. Делеции в этой же области приводят к синдрому Прадера–Вилли или СА в зависимости от того, унаследована ли делеция по отцовской или материнской линии соответственно, а, как обсуждалось выше, аутистические симптомы обычны для пациентов с СА. Нестабильность генома в этой области опосредована наличием пяти tandemных повторов с низким числом копий, обозначаемых BP1–BP5 (Breakpoints). Заметим, что хотя дупликации по отцовской линии не характеризуются высокой пенетрантностью, на мышинной модели с унаследованной по отцовской линии дупликацией района BP2–BP3 (мыши *patDp/+*) обнаружено расстройство поведения, напоминающее симптомы, наблюдаемые при РАС, а также нарушения развития мозга [59].

Кроме того, есть указания на то, что область между BP1 и BP2 (15q11.2) также является «горячей точкой», критичной для проявления РАС, и что гены, локализованные в этой области, важны для нормального функционирования нервной системы и поведенческих функций [101]. Из четырёх генов-кандидатов, локализованных между BP1 и BP2, ген *CYFIP1* является наиболее важным кандидатом на роль, обуславливающую РАС [37]: его продукт напрямую взаимодействует с FMRP и eIF4E и служит посредником в репрессии трансляции посредством FMRP в мозге (рисунок), а также регулирует полимеризацию актина при ремоделировании цитоскелета посредством взаимодействия с ГТФазой Rac1 (из семейства малых G-белков). Показано, что уровни белка CYFIP1 повышены в клетках лимфобластомы и постмортальной ткани мозга пациентов с РАС, имеющих дупликацию Dup15q [37], и сверхэкспрессия кодирующего его гена в культивируемых нейронах человека и мыши приводит к аномалиям структу-

ры нейронов. Сходные аномалии проявляются и у мышиных моделей с избыточным синтезом белка CYFIP1 [37].

Заметим, что сверхактивация mTORC1 связана с увеличением размеров нейронов и усиленным ветвлением нейритов в культуре нейронных клеток со сверхэкспрессией *CYFIP1* в локусе 15q11.2, ассоциированном с риском РАС [37]. С другой стороны, в моделях СР сниженная активность mTORC1 связана со снижением размеров нейронов и аномалиями ветвления нейритов [94]. Это свидетельствует о том, что для поддержания должного размера нейронов и мозга и нормального паттерна ветвления нейритов нужен оптимальный уровень активности сигналинга mTORC1, а вызываемые нарушением регуляции активности mTORC1 аномалии развития нервной системы могут вносить вклад в развитие симптомов РАС.

Однако необходимы дальнейшие исследования, чтобы ответить на вопрос о том, проявляют ли трансгенные *CYFIP1*-мыши аутистические черты, характерные для поведения при РАС.

Важно, что при изучении постмортального мозга носителей дупликации Dup15q больных РАС, а также эмбрионов трансгенных мышей *CYFIP1* и культивируемых нейронов с повышенным содержанием белка CYFIP1 были получены свидетельства аномального усиления сигналинга mTORC1. Воздействие рапамицином на культивируемые нейроны приводило к исчезновению наблюдаемых аномалий в размерах клеток, ветвлении и длине отростков [37]. Свидетельство гиперфункции сигналинга mTORC1 также наблюдалось в культивируемых индуцированных ППСК пациентов с НС-РАС с дупликацией Dup15q [102]. Все вместе эти факты свидетельствуют о том, что опосредованная CYFIP1 сверхактивация пути mTORC1 может вносить вклад в патогенез РАС при дупликации Dup15q. Учитывая данные о том, что у пациентов с Dup15q обнаружена aberrантная активность mTORC1 [102], представляют интерес клинические испытания, в которых была бы оценена способность лекарств, действующих на каскад mTORC1, облегчать поведенческие аномалии при Dup15q.

НС-РАС, ассоциированные с eIF4E (eIF4E-НС-РАС). mTOR в составе комплекса mTORC1 фосфорилирует связывающие eIF4E белки (4E-BP), что приводит к высвобождению их из комплекса с eIF4E, в результате чего eIF4E приобретает способность взаимодействовать с eIF4G и eIF4A с образованием комплекса eIF4F – критический этап в *cap*-зависимой трансляции (рисунок). У некоторых пациентов с НС-РАС обнаружены редкие мутации в про-

торной области гена *EIF4E*, которые, как предполагается, приводят к усилению активности промотора [103]. У трансгенных мышей с повышенным уровнем белка eIF4E и у мышей, у которых отсутствует 4E-BP2, наблюдаются аномалии мозга, подобные тем, что наблюдаются у других моделей РАС, включая аномально усиленную *cap*-зависимую трансляцию в мозге. Воздействие на мышей, у которых отсутствует 4E-BP (нокаут *EIF4EBP2*) ингибитором, подавляющим взаимодействие eIF4E и eIF4G, восстанавливает синтез белка и устраняет аномалии синаптической пластичности, а также нормализует поведение, до воздействия напомиравшее РАС. Эти факты дают основание установить причинно-следственные связи между eIF4E-НС-РАС и избыточной *cap*-зависимой трансляцией, а также свидетельствуют о том, что это одна из мишеней, посредством которой ингибиторы mTORC1 могут восстановить синаптическую пластичность и устранить симптомы, характерные для РАС.

Идиопатический аутизм (И-РАС). В качестве возможных причин развития идиопатических РАС рассматриваются воздействие факторов окружающей среды (токсины, пестициды, инфекции), нарушение внутриутробного развития под действием различных факторов, включая вальпроовую кислоту (вальпроат) и случайные мутации *de novo*.

Основные используемые экспериментальные модели исследования И-РАС – это животные (мыши и крысы), аномалии развития которых индуцированы вальпроатом [11], инбредные мыши с фенотипическими поведенческими проявлениями, характерными для аутизма (например, мыши BTBR T^+Ipr3^{fl}/J [60]), лабораторные модели материнской иммунной активации (МИА) на животных [104] и индуцированные ППСК от пациентов [10].

Интересно, что в индуцированной вальпроатом мышинной модели И-РАС обнаружено нарушение регуляции 4E-BP1 [11].

Подобно нокаутным мышинным моделям мюногенных С-РАС, инбредные мыши BTBR T^+Ipr3^{fl}/J [60] с нарушениями в когнитивной сфере и социальном поведении могут служить моделью для исследования И-РАС. При подробном исследовании модели BTBR T^+Ipr3^{fl}/J была обнаружена конвергенция многих сигнальных путей и проявления определенных нейроанатомических характеристик. Также обнаружено, что рапамицин ослабляет нарушения социального поведения этих животных. Исследования мозга (гиппокампа) мышей показало значительное повышение уровня mTOR и фосфо-mTOR, p70S6K1 и фосфо-p70S6K, AMPK и фосфо-

АМПК, Ulk1 и фосфо-Ulk1 [105]. Нарушения регуляции сигнального пути mTOR и социального поведения этих мышей исчезали при системном введении IGF-2.

Известны лишь единичные работы, посвященные исследованиям mTOR у пациентов с И-РАС. Так, компоненты сигнального пути mTOR и MAPK при И-РАС анализировались в клетках периферической крови (лимфоцитах) детей 3–11 лет. Уровни экспрессии mTOR, 4E-BP1, p70S6K1, FMRP, TSC1, TSC2 и Rheb не различались между И-РАС и контролем, но было повышено содержание рибосомной субъединицы 40S (rpS6) и фосфорилированной формы eIF4E. Интересно, что уровни экспрессии компонентов этих сигнальных путей, а именно rpS6, p-eIF4E, TSC1 и p-MNK1, различались в зависимости от клинического диагноза (степени выраженности аутистических симптомов) [106].

Как было установлено при изучении С-РАС, изменения активности mTOR влияют на множество нейроонтогенетических процессов, включая дифференцировку нервной ткани, рост аксонов, миграцию клеток, формирование паттерна структур мозга, а при И-РАС отмечается нарушение всех этих процессов. В современных работах выдвигаются гипотезы, предполагающие, что нарушение регуляции именно каскада mTOR – центральное событие и вероятная причина И-РАС [107].

В попытках связать сведения, полученные при исследовании И-РАС (а при И-РАС обнаружен сниженный уровень синтеза таких белков, как различные изоформы PI3K, Akt, mTOR, p-mTOR, p70S6K1, eIF4B [38]), была выдвинута гипотеза о «разветвлении» молекулярных событий-причин С-РАС и И-РАС на уровне факторов инициации и элонгации белковой трансляции (посредством киназы p70S6K1 – мишени mTOR и eIF4B – мишени p70S6K1), причём если в большинстве случаев С-РАС синтез белка стимулируется, то при И-РАС – подавляется [38, 107].

Поскольку предполагается, что в патогенезе И-РАС задействован не сам mTOR, а его мишени, необходимо отдельно рассмотреть роль mTOR в регуляции *cap*-зависимой трансляции.

Инициация белковой трансляции регулируется в мозге рядом белковых факторов инициации трансляции (eIF3, eIF4A, eIF4B, eIF4G и *cap*-связывающим eIF4E). Механизм, посредством которого mTOR регулирует трансляцию, реализуется через мишени – 4E-BP или p70S6K1. 4E-BP связывается с eIF4E и ингибирует инициацию трансляции. Когда mTORC1 фосфорилирует 4E-BP1, сродство 4E-BP1 к eIF4E снижается, что позволяет эффективно

сформироваться комплексу eIF4F, при этом повышается общая интенсивность белкового синтеза (рисунок).

Субстратами активированной киназы p70S6K1 служат рибосомный белок S6 на субъединице 40S, несколько факторов трансляции, включая eIF4B (стимулятор геликазной активности фактора eIF4A) и eEF2K (так же, как и самого mTORC1, на рисунке не показано). Таким образом, p70S6K1 фосфорилирует и инактивирует фактор репрессии трансляции eEF2K, который фосфорилирует и инактивирует фактор элонгации трансляции eEF2, стимулирующий включение аминокислот в растущую полипептидную цепь. Фосфорилирование eEF2K фактора eEF2 предотвращает его ассоциацию с рибосомой, таким образом снижая скорость элонгации, и предполагается, что данный механизм реализуется при И-РАС [107]. Таким образом, при И-РАС важна не только и не столько активность самого mTOR, сколько сбалансированность активностей его мишеней. При этом предполагается, что в снижении интенсивности синтеза белка при посредстве p70S6K1 и eIF4B задействован также путь NGF, который здесь играет роль дополнительного регулятора, но насколько весом его вклад – пока неизвестно. Тем не менее предполагается, что сами белки-мишени регуляции mTOR – p70S6K1, eIF4B – могут послужить новыми терапевтическими мишенями фармакологического действия препаратов при РАС [107].

Кроме того, по сравнению с нормальным развитием, при И-РАС обнаружены различия в уровнях киназы рецептора тропомиозина TrkB, а TrkB регулирует путь Akt/mTOR (рисунок) [10, 11]. Заметим, что роль различных изоформ Trk при РАС пока не изучена, хотя роль, которую TrkA играет в пути NGF, известна: TrkA является рецептором NGF, и этот путь имеет значение в патогенезе болезни Альцгеймера и синдрома Дауна.

В таблице суммированы наиболее часто встречающиеся аномалии мозга при И-РАС.

Рассматривая данные относительно молекулярной основы патологии дендритных шипиков при РАС, можно отметить исследования Nicolini et al. [38], показавшие, что путь Akt/mTOR, регулирующий трансляцию белка в дендритных шипиках, является потенциальным молекулярным субстратом этой патологии, что, возможно, играет роль при И-РАС. Их исследования на постмортальном мозге 11 больных с И-РАС показали снижение активности сигналинга mTORC1 [38]. Авторы подчеркивают, что сниженная активность каскада mTOR может неблагоприятно влиять на формирование шипиков,

нарушая регуляцию кортикальных путей, задействованных в высших нервных функциях и поведении, что обуславливает аутистический фенотип. Hutsler и Zhang [61] также выдвинули гипотезу о том, что нарушение пути mTOR лежит в основе аномалий формирования шипиков (их повышенной плотности) и вносит вклад в развитие И-РАС.

Однако разнородной в данных об активности mTOR и других систем фосфорилирования при И-РАС пока не позволяет сложить четкую картину данных. Так, в отличие от Nicolini et al. [38], в работе Onore et al. [30] при И-РАС обнаружено повышение общей концентрации IRS-1 и повышение уровней фосфорилирования PTEN, TSC2 и mTOR у больных с аутизмом по сравнению с нормой; наблюдалась повышенная активность пути Akt/mTOR, внеклеточной рецепторной киназы и p70S6K и сниженная активность киназы гликогенсинтазы 3 α (GSK3 α) и туберина (TSC2).

Хотя описанные аномалии могут быть вызваны различными причинами в результате конвергенции событий в ходе развития нервной системы, исследования показывают, что в обширном ряду И-РАС имеются по меньшей мере подгруппы с отклонением сигнальной активности mTORC1 от нормы, причем, возможно, как в сторону снижения, так и повышения.

Так, в постмортальном мозге пациентов с И-РАС наблюдалась сверхактивация каскада mTORC1, а также исследования показали нарушения аутофагии и синаптического прунинга в детском и юношеском возрасте, приводящие к увеличению плотности дендритных шипиков и, следовательно, усилению возбуждающей активности [62]. С этим согласуется тот факт, что в культивированных нейронах, производных от индуцированных ППСК, выделенных от пациентов с И-РАС, обнаружено нарушение равновесия Е/І синапсов [108].

Сходные наблюдения описаны и при исследовании мышинной модели КТС (С-РАС). Это подтверждает, что для постнатального прунинга нейронов спинного мозга необходимо своевременное снижение активности mTORC1 [62].

Повышенный уровень фосфорилирования белков (уровень фосфорилированного mTOR (p-mTOR^{S2448}) и его мишеней) и повышенная активность mTORC1 наблюдались и в не нейронных клетках, производных индуцированных ППСК, выделенных от троих из 13 обследованных пациентов с И-РАС, хотя наблюдаемые изменения сильно зависели от экспериментальных условий выделения и индукции ППСК [39, 102]. Интересно, что в клетках лимфобластомы пациента с усиленной активностью mTORC1

также наблюдалось усиление экспрессии субъединицы p110 δ киназы PI3K и синтеза белка, который можно было подавить ингибитором, специфичным к p110 δ [39].

Высокая гетерогенность И-РАС может объяснить расхождение сведений относительно активации либо снижения активности сигналинга mTORC1, поэтому необходимы дополнительные исследования для того, чтобы понять причинную связь между каскадом mTORC1 и дисфункциями при И-РАС. Следовательно, хотя в ряде исследований обнаружен дефект сигналинга mTORC1 у субкогорт пациентов с И-РАС [38, 39, 102], нужны дальнейшие функциональные исследования для получения доказательств связи между аномалиями mTORC1 и развитием аутизма в такой гетерогенной группе, как И-РАС.

Исследования с выделенными от пациентов не нейрональными клетками [39, 102], в том числе тромбоцитами и лимфоцитами, предоставляют возможность широкомасштабного скрининга сигнальных дефектов mTORC1 с использованием наиболее легко доступных биологических материалов от пациентов. Это поможет ответить на вопрос, какова доля пациентов с нарушениями mTORC1 среди всех пациентов с РАС неизвестной этиологии, и будет способствовать выявлению тех пациентов, которым, возможно, принесут пользу лекарственные средства с действием, направленным на каскад mTORC1 либо его мишени.

СИГНАЛЬНЫЕ КАСКАДЫ БЕЛКОВОГО ФОСФОРИЛИРОВАНИЯ В КЛЕТКАХ КРОВИ

В качестве объектов исследования сигнальных каскадов белкового фосфорилирования в клетках периферической крови при РАС использовались лимфоциты и тромбоциты. В основном клетки крови применялись при моделировании синдрома Х-ФРА. Сравнение тромбоцитов с лимфоцитами в общем говорит в пользу первых: их легче выделить в большем количестве, их протеом более стабилен при выделении и в течение времени в организме, они устроены проще, и их сигнальные пути менее вариабельны под влиянием физиологических изменений, что позволяет провести на них биохимические исследования, в том числе и при РАС. Период продолжительности жизни тромбоцитов короче (~10 дней), чем лимфоцитов (от нескольких недель до лет), поэтому изменения, происходящие в экспрессии генов в мегакариocyтах, сравнительно быстро отражаются на протеоме тромбоцитов. В неактивированных тромбоцитах не задействованы сигнальные пути, они не реаги-

руют на стимулы, иные, чем стимулы тромбообразования. В отличие от тромбоцитов, лимфоциты реагируют на значительное число внешних стимулов и сравнительно более метаболически активны. Их центральные киназы, например ERK, активно участвуют во многих сигнальных путях, и наблюдать не слишком выраженные изменения, связанные, например, с патологией PAC, в них трудно. Хотя сигнальные пути в тромбоцитах существенно упрощены по сравнению с нейронами, они происходят от различных клеток-предшественников в эмбриональном развитии, и молекулярный интерактом тромбоцитов не такой обширный, как нейронов, тем не менее тромбоциты признаны удачной периферической моделью исследования нейронов и используются при изучении компонентов нейромедиаторных систем [109]. Интерактом тромбоцитов содержит важнейшие сигнальные каскады белкового фосфорилирования, вторичные мессенджеры и сигнальные киназы, рассматриваемые как «хабы» биохимических путей [110]. Благодаря биохимической «гомологии» тромбоцитов с нейронами тромбоциты могут служить адекватной клеточной биохимической «суррогатной» моделью X-ФРА [72], их относительно легко получать малоинвазивным способом забора периферической крови, выделять, а в изолированном виде в них сохраняется активность тромбоцитарных ферментов.

Тромбоциты при нарушениях нейроонтогенеза исследованы мало, и, хотя описаны некоторые общие биохимические аномалии в тромбоцитах при PAC, трудно понять, насколько они имеют отношение к патогенезу аутизма из-за слабой изученности патологии мозга при PAC, особенно И-PAC, и пока неизвестно, коррелируют ли эти периферические аномалии в тромбоцитах с процессами, происходящими в мозге. Биохимические исследования тромбоцитов при PAC показали ряд отклонений от контроля, например, в концентрации тромбоцитарного серотонина и серотонинового метаболита N-ацетилсеротонина, плотности серотонинового переносчика, концентрации гамма-аминомасляной кислоты (ГАМК), секреции гранул с АТР, но ни один из перечисленных показателей не был валидирован как биомаркер для использования в клинике при диагностике PAC.

Хотя упомянутая модель X-ФРА *Fmr1* KO на мышцах позволила открыть биохимические закономерности, наблюдающиеся при утрате FMRP (повышенная активность Gp1 mGluR-зависимого сигналинга, сниженный уровень образования цАМФ, снижение активности ингибиторной ГАМК-ергической нейромедиаторной системы, усиление трансляции матриксной ме-

таллопротеиназы MMP9), однако данные, полученные на этой модели, оказались бесполезными при клинических исследованиях в предикции эффективности разрабатываемых лекарственных препаратов при их апробации в контролируемых исследованиях на пациентах. Таким образом, потребность в модели PAC (в том числе, X-ФРА и И-PAC), основанной на клетках периферических тканей человека, очевидна, и известны примеры таких разработок на лимфоцитах, тромбоцитах [72] и фибробластах пациентов [111].

Однако, по сравнению с лимфоцитами и фибробластами, а также по сравнению С-PAC с другими формами PAC (НС-PAC и И-PAC в целом), наиболее веские основания получены в пользу применения тромбоцитов как модели исследования X-ФРА [72]. Основой адекватности модели является наличие FMRP в тромбоцитах и их предшественниках — мегакариоцитах. Отметим, что как в мегакариоцитах, так и в активируемых глутаматом mGluR-содержащих нейронах, кроме FMRP, обнаружены и другие РНК-связывающие белки: STAU1, STAU2, CASC3 [112]. Функциональная роль FMRP (стабилизация и транспорт мРНК) в мегакариоцитах вполне отражает его роль в нейронах [112]. Поскольку тромбоциты происходят из мегакариоцитов, образуясь путём выпячивания и отпочковывания цитоплазмы, содержащей все компоненты тромбоцитов, для доставки мРНК в отпочковывающиеся тромбоциты с помощью микротрубочек используются РНК-связывающие белки, в том числе FMRP.

В настоящее время диагностика синдрома X-ФРА основана на ПЦР и Саузерн-блот-анализе, но также предложены тесты, основанные на определении концентрации FMRP в лимфоцитах или волосяных фолликулах иммунохимическим методом с антителами к FMRP. И хотя с применением этих методов была обнаружена связь концентрации FMRP с уровнем интеллекта, в случае мозаицизма чувствительность методов оказалась ограниченной: чувствительность и специфичность метода, доходившие до 100% у мужчин, у женщин оказались значительно ниже и составили всего 41–43%. Результаты же измерения уровня тромбоцитарного FMRP в контрольной группе и у больных с подтвержденным X-ФРА показали, что больных можно уверенно отделить от здоровых (площадь под ROC-кривой 0,948). Содержание FMRP в тромбоцитах также оказалось связанным с уровнем интеллекта в тесте Векслера. Что касается исследований белков, компонентов каскадов белкового фосфорилирования при X-ФРА с использованием тромбоцитов, проведены лишь первые

эксперименты на ограниченном числе больных [113], при этом авторы отметили влияние условий выделения и обработки биопроб на оценки степени фосфорилирования белков.

Ряд ключевых молекулярных нарушений регуляции, обнаруженных в нейронах человека при Х-ФРА и у моделирующих Х-ФРА мышей *Fmr1* KO, воспроизводятся в тромбоцитах, что также подтверждает возможность их использования для моделирования Х-ФРА, например гиперактивность путей MAPK/ERK и PI3K/Akt/mTOR. Так, показано, что при синдроме Х-ФРА в тромбоцитах усилено фосфорилирование ERK и Akt по сравнению с нормой примерно в 1,6 раз, и это свидетельствует о том, что в норме FMRP регулирует эти сигнальные пути [113]. Также были обнаружены отрицательные корреляции между уровнями фосфорилированных pERK и фосфорилированной по Ser473 Akt (pAkt^{Ser473}) и когнитивными функциями по тесту Векслера.

Кроме того, удалось оценить уровень вариабельности (повышения) фосфорилирования ERK и Akt в зависимости от уровня FMRP в тромбоцитах. Оказалось, что в подгруппе с уровнем тромбоцитарного FMRP, не поддающимся обнаружению, достоверно усилено фосфорилирование ERK (отношение pERK/ERK повышено в 2,27 раз) и Akt (pAkt^{Ser473}/Akt повышено в 2 раза). А у индивидуумов-мозаиков, сохраняющих некоторый уровень экспрессии FMRP, превышение над контролем уровней фосфорилирования этих киназ было незначительным и недостоверным [113]. Более того, лечение ловастатином в течение трех месяцев корректировало гиперактивацию ERK в тромбоцитах Х-ФРА пациентов [72], однако ловастатин не снижал достоверно уровень фосфорилирования Akt (pAkt^{Ser473}/Akt) по сравнению с базовым уровнем. Есть косвенные указания на то, что на активность ERK могут влиять психостимуляторы, антидепрессанты, антипсихотики и лекарства, снижающие артериальное давление, хотя прямых данных пока не получено.

Для сравнения, в исследованиях белкового фосфорилирования лимфоцитов при Х-ФРА обнаружено превышение над контролем фосфорилирования Akt [29, 76], но не ERK, что сильно ставит под удар адекватность лимфоцитарной модели как модели патологии Х-ФРА. Следовательно, тромбоциты — более адекватная модель, которая полнее отражает события, происходящие в нейронах, по меньшей мере при Х-ФРА.

Важно, что в тромбоцитах обнаружены рецепторы нейромедиаторных систем (глутаматной, серотониновой, дофаминовой), нарушения со стороны которых были зарегистрирова-

ны в мозге при Х-ФРА. Некоторые лекарственные вещества, влияющие на метаболизм и синаптическое высвобождение моноаминовых нейромедиаторов в нейронах (серотонин, дофамин, норадреналин) сходным образом действуют и на тромбоциты. Примечательно, что ингибиторы ацетилхолинэстеразы, используемые для лечения симптомов болезни Альцгеймера, нормализуют нарушенную регуляцию метаболизма тромбоцитарного APP параллельно со стабилизацией снижения когнитивных функций: эти факты важны и для исследований в области аутизма, поскольку, как отмечалось выше, APP является одним из регуляторов синаптической пластичности, связанным с сигнальным каскадом mTOR [84].

В будущем, для того чтобы расширить возможности использования тромбоцитарной модели, резонно исследовать, изменен ли уровень синтеза белка в тромбоцитах пациентов с Х-ФРА и других С-РАС, поскольку повышенный уровень синтеза белка обнаружен в лимфоцитах и фибробластах пациентов с Х-ФРА.

Эти находки свидетельствуют о том, что изучение множества биохимических параметров тромбоцитов окажется полезным в предикции когнитивного фенотипа индивидуумов с РАС (по меньшей мере при Х-ФРА), что, в свою очередь, может способствовать улучшению клинического сопровождения пациентов. А пока известны лишь отдельные попытки применения параметров белкового фосфорилирования в качестве биомаркера при испытании действия препаратов в целях предикции терапевтического ответа на лекарства: это степень активации ERK в лимфоцитах в клинических исследованиях лития, рилузола, и статус базового фосфорилирования ERK в тромбоцитах в исследовании ловастатина при Х-ФРА [72].

Тромбоциты не только воспроизводят биохимические нарушения, обнаруженные в нейронах при Х-ФРА, но также и «реагируют» на лекарства, направленные на центральную нервную систему и на молекулярные механизмы, лежащие в основе патологии. В связи с этим такой биомаркер, как тромбоцитарный уровень фосфорилирования ERK, применялся в исследовании ловастатина [72]. Примечательно, что под действием лечения повышенный уровень основного фосфорилирования ERK поддавался коррекции у большинства обследованных [72]. Кроме того, изменения фосфорилирования ERK коррелировали с клиническим ответом, судя по оценке Шкалы адаптивного поведения Вайнленд (VABS) [72]. Значит, параметры тромбоцитов могут помочь и в оценках эффективности лечения препаратами, нацеленными на

путь MAPK/ERK, хотя ограничения в оценках улучшения состояния и исходов лечения пациентов с РАС вносят трудности в применение биомаркёров в целом. Тем не менее «коррекция» уровней периферических биомаркёров свидетельствует о том, что наблюдаемые улучшения в клинических испытаниях можно отнести к благоприятному действию лекарства на центральную патофизиологию X-ФРА.

Гипотетически другие сигнальные пути тромбоцитов и белки сигнального каскада mTOR могут послужить биомаркёрами в клинических испытаниях эффективности лекарств, действие которых направлено на сигнальные регуляторные пути.

То, что компоненты сигнального каскада mTOR и сопряженных с ним путей обнаружены в тромбоцитах, дает возможность опробовать эти белки в качестве претендентов на роль биохимических биомаркёров с целью выделения из клинических групп больных РАС тех подгрупп, в которых будут обнаружены отклонения активности сигнального каскада mTOR от контрольных диапазонов, для возможных целенаправленных клинических испытаний действия специфических препаратов. Учитывая современный уровень разработки проблемы, это направление исследований авторам обзора представляется наиболее перспективным и реальным по выполнимости в ближайшее время.

Так как эксперименты с моделями C-РАС показали, что ингибиторы mTOR и сопряженных с ним путей способны предотвратить, но не обратить развитие структурных аномалий и аутистического фенотипа, можно предположить, что эффективным окажется как можно более

раннее применение разрабатываемых лекарственных препаратов.

Поскольку не всегда при РАС нарушения сигнальных каскадов фосфорилирования затрагивают именно путь mTOR, но также и расположенные выше него эффекторы, и его мишени, и, кроме того, сопряженные с ним пути, перспективна разработка комплексных, сочетанных препаратов, воздействующих (ингибирующих) не только mTOR, но и эти, затронутые патологическими изменениями, звенья.

Применение тромбоцитов в качестве модели биохимических исследований аномалий белкового фосфорилирования при РАС позволило бы проверить гипотезы и о наличии «подгрупп» пациентов с РАС, у которых повышена либо снижена активность mTOR и сопряженных с ним сигнальных каскадов фосфорилирования, и о необходимости регуляции активности сигнального каскада mTOR в определенных границах (диапазоне), и об актуальности временного «окна» в регуляции активности mTOR в процессе онтогенетического развития детей как можно в более раннем возрасте, т.е. ответить на вопросы, поднятые в начале обзора.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Благодарности. Авторы признательны д-ру Ричарду Лозиеру за помощь в подготовке версии рукописи на английском языке.

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

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Simashkova, N. V., Boksha, I. S., Klyushnik, T. P., Iakupova, L. P., Ivanov, M. V., and Mukaetova-Ladinska, E. B. (2019) Diagnosis and management of autism spectrum disorders in Russia: clinical-biological approaches, *J. Autism Dev. Disord.*, **49**, 3906-3914.
2. Mukaetova-Ladinska, E. B., Simashkova, N. V., Mukaetova, M. S., Ivanov, M. V., and Boksha, I. S. (2018) Autism spectrum disorders in children and adults: the experience of researches from different countries, *Zh. Nevrol. Psikiatr. Im S. S. Korsakova*, **118**, 92-99.
3. Trifonova, E. A., Khlebodarova, T. M., and Gruntenko, N. E. (2017) Molecular mechanisms of autism as a form of synaptic dysfunction, *Russ. J. Genet. Appl. Res.*, **7**, 869-877.
4. Vorstman, J. A. S., Parr, J. R., Moreno-De-Luca, D., Anney, R. J. L., Nurnberger, J. I., Jr., and Hallmayer, J. F. (2017) Autism genetics: opportunities and challenges for clinical translation, *Nat. Rev. Genet.*, **18**, 362-376.
5. Chauvin, C., Koka, V., Nouschi, A., Mieulet, V., Hoareau-Aveilla, C., et al. (2014) Ribosomal protein S6 kinase activity controls the ribosome biogenesis transcriptional program, *Oncogene*, **33**, 474-483.
6. Bockaert, J., and Marin, P. (2015) mTOR in brain physiology and pathologies, *Physiol. Rev.*, **95**, 1157-1187.
7. Lipton, J. O., and Sahin, M. (2014) The neurology of mTOR, *Neuron*, **84**, 275-291.
8. Mandy, W., and Lai, M. C. (2016) Annual research review: the role of the environment in the developmental psychopathology of autism spectrum condition, *J. Child Psychol. Psychiatry*, **57**, 271-292, doi: 10.1111/jcpp.12501.
9. Miles, J. H., Takahashi, T. N., Bagby, S., Sahota, P. K., Vaslow, D. F., et al. (2005) Essential versus complex autism: definition of fundamental prognostic subtypes, *Am. J. Med. Genet. A*, **135**, 171-180, doi: 10.1002/ajmg.a.30590.
10. Liu, X., Campanac, E., Cheung, H. H., Ziats, M. N., Canterel-Thouennon, L., et al. (2017) Idiopathic autism: cellular and molecular phenotypes in pluripotent stem cell-derived neurons, *Mol. Neurobiol.*, **54**, 4507-4523.
11. Nicolini, C., and Fahnstock, M. (2018) The valproic acid-induced rodent model of autism, *Exp. Neurol.*, **299**, 217-227.
12. Trifonova, E. A., Klimenko, A. I., Mustafin, Z. S., Lashin, S. A., and Kochetov, A. V. (2019) The mTOR signaling

- pathway activity and vitamin d availability control the expression of most autism predisposition genes, *Int. J. Mol. Sci.*, **20**, 6332.
13. Sandin, S., Lichtenstein, P., Kuja-Halkola, R., Larsson, H., Hultman, C. M., and Reichenberg, A. (2014) The familial risk of autism, *JAMA*, **311**, 1770-1777.
 14. Gaugler, T., Klei, L., Sanders, S. J., Bodea, C. A., Goldberg, A. P., et al. (2014) Most genetic risk for autism resides with common variation, *Nat. Genet.*, **46**, 881-885.
 15. DeRosa, B. A., El Hokayem, J., Artimovich, E., Garcia-Serje, C., Phillips, A. W., et al. (2018) Convergent pathways in idiopathic autism revealed by time course transcriptomic analysis of patient-derived neurons, *Sci. Rep.*, **8**, 8423.
 16. Wen, Y., Alshikho, M. J., and Herbert, M. R. (2016) Pathway network analyses for autism reveal multisystem involvement, major overlaps with other diseases and convergence upon MAPK and calcium signaling, *PLoS One*, **11**, e0153329.
 17. Liu, G. Y., and Sabatini, D. M. (2020) mTOR at the nexus of nutrition, growth, ageing and disease, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, **21**, 183-203.
 18. Madigan, J. P., Hou, F., Ye, L., Hu, J., Dong, A., et al. (2018) The tuberous sclerosis complex subunit TBC1D7 is stabilized by Akt phosphorylation-mediated 14-3-3 binding, *J. Biol. Chem.*, **293**, 16142-16159.
 19. Parkhitko, A. A., Favorova, O. O., Khabibullin, D. I., Anisimov, V. N., and Henske, E. P. (2014) Kinase mTOR: regulation and role in maintenance of cellular homeostasis, tumor development, and aging, *Biochemistry (Moscow)*, **79**, 88-101.
 20. Winden, K. D., Ebrahimi-Fakhari, D., and Sahin, M. (2018) Abnormal mTOR activation in autism, *Annu. Rev. Neurosci.*, **41**, 1-23.
 21. Pupyshev, A. B., Korolenko, T. A., and Tikhonova, M. A. (2018) Effects and mechanisms of rapamycin action on experimental neurodegeneration, *Neurochem. J.*, **12**, 347-358.
 22. Sarbassov, D. D., Ali, S. M., Sengupta, S., Sheen, J. H., Hsu, P. P., et al. (2006) Prolonged rapamycin treatment inhibits mTORC2 assembly and Akt/PKB, *Mol. Cell*, **22**, 159-168.
 23. Gleason, C. E., Oses-Prieto, J. A., Li, K. H., Saha, B., Situ, G., et al. (2019) Phosphorylation at distinct subcellular locations underlies specificity in mTORC2-mediated activation of SGK1 and Akt, *J. Cell Sci.*, **132**, jcs224931, doi: 10.1242/jcs.224931.
 24. Costa-Mattioli, M., and Monteggia, L. M. (2013) mTOR complexes in neurodevelopmental and neuropsychiatric disorders, *Nat. Neurosci.*, **16**, 1537-1543.
 25. Menon, S., Dibble, C. C., Talbott, G., Hoxhaj, G., Valvezan, A. J., et al. (2014) Spatial control of the TSC complex integrates insulin and nutrient regulation of mTORC1 at the lysosome, *Cell*, **156**, 771-785.
 26. Han, J. M., and Sahin, M. (2011) TSC1/TSC2 signaling in the CNS, *FEBS Lett.*, **585**, 973-980.
 27. Dan, H. C., Ebbs, A., Pasparakis, M., Van Dyke, T., Basseres, D. S., and Baldwin, A. S. (2014) Akt-dependent activation of mTORC1 complex involves phosphorylation of mTOR (mammalian target of rapamycin) by I κ B kinase α (IKK α), *J. Biol. Chem.*, **289**, 25227-25240.
 28. Crespi, B. J. (2019) Comparative psychopharmacology of autism and psychotic-affective disorders suggests new targets for treatment, *Evol. Med. Public Health*, **2019**, 149-168.
 29. Hoeffler, C. A., and Klann, E. (2010) mTOR signaling: at the crossroads of plasticity, memory and disease, *Trends Neurosci.*, **33**, 67-75.
 30. Onore, C., Yang, H., Van de Water, J., and Ashwood, P. (2017) Dynamic Akt/mTOR signaling in children with autism spectrum disorder, *Front. Pediatr.*, **5**, 43.
 31. Hevner, R. F. (2015) Brain overgrowth in disorders of RTK-PI3K-AKT signaling: a mosaic of malformations, *Semin. Perinatol.*, **39**, 36-43.
 32. Yeung, K. S., Tso, W. W. Y., Ip, J. J. K., Mak, C. C. Y., Leung, G. K. C., et al. (2017) Identification of mutations in the PI3K-AKT-mTOR signalling pathway in patients with macrocephaly and developmental delay and/or autism, *Mol. Autism*, **8**, 66.
 33. Berdichevsky, Y., Dryer, A. M., Saponjian, Y., Mahoney, M. M., Pimentel, C. A., et al. (2013) PI3K-Akt signaling activates mTOR-mediated epileptogenesis in organotypic hippocampal culture model of post-traumatic epilepsy, *J. Neurosci.*, **33**, 9056-9067.
 34. Gilbert, J., and Man, H. Y. (2017) Fundamental elements in autism: from neurogenesis and neurite growth to synaptic plasticity, *Front Cell Neurosci.*, **11**, 359.
 35. Sun, J., Liu, Y., Moreno, S., Baudry, M., and Bi, X. (2015) Imbalanced mechanistic target of rapamycin C1 and C2 activity in the cerebellum of Angelman syndrome mice impairs motor function, *J. Neurosci.*, **35**, 4706-4718.
 36. Huber, K. M., Klann, E., Costa-Mattioli, M., and Zukin, R. S. (2015) Dysregulation of mammalian target of rapamycin signaling in mouse models of autism, *J. Neurosci.*, **35**, 13836-13842.
 37. Oguro-Ando, A., Rosensweig, C., Herman, E., Nishimura, Y., Werling, D., et al. (2015) Increased CYFIP1 dosage alters cellular and dendritic morphology and dysregulates mTOR, *Mol. Psychiatry*, **20**, 1069-1078.
 38. Nicolini, C., Ahn, Y., Michalski, B., Rho, J. M., and Fahnstoc, M. (2015) Decreased mTOR signaling pathway in human idiopathic autism and in rats exposed to valproic acid, *Acta Neuropathol. Commun.*, **3**, 3.
 39. Poopal, A. C., Schroeder, L. M., Horn, P. S., Bassell, G. J., and Gross, C. (2016) Increased expression of the PI3K catalytic subunit p110 δ underlies elevated S6 phosphorylation and protein synthesis in an individual with autism from a multiplex family, *Mol. Autism*, **7**, 3.
 40. Ruppe, V., Dilsiz, P., Reiss, C. S., Carlson, C., Devinsky, O., Zagzag, D., et al. (2014) Developmental brain abnormalities in tuberous sclerosis complex: a comparative tissue analysis of cortical tubers and perituberal cortex, *Epilepsia*, **55**, 539-550.
 41. Sato, A., Kasai, S., Kobayashi, T., Takamatsu, Y., Hino, O., et al. (2012) Rapamycin reverses impaired social interaction in mouse models of tuberous sclerosis complex, *Nat. Commun*, **3**, 1292.
 42. Telias, M., Kuznitsov-Yanovsky, L., Segal, M., and Ben-Yosef, D. (2015) Functional deficiencies in fragile X neurons derived from human embryonic stem cells, *J. Neurosci.*, **35**, 15295-15306.
 43. Pacey, L. K., Guan, S., Tharmalingam, S., Thomsen, C., and Hampson, D. R. (2015) Persistent astrocyte activation in the fragile X mouse cerebellum, *Brain Behav.*, **5**, e00400.
 44. Wang, X., Snape, M., Klann, E., Stone, J. G., Singh, A., et al. (2012) Activation of the extracellular signal-regulated kinase pathway contributes to the behavioral deficit of fragile x-syndrome, *J. Neurochem.*, **121**, 672-679.
 45. Lugo, J. N., Smith, G. D., Arbuckle, E. P., White, J., Holley, A. J., et al. (2014) Deletion of PTEN produces autism-like behavioral deficits and alterations in synaptic proteins, *Front. Mol. Neurosci.*, **7**, 27.
 46. Hobert, J. A., Embacher, R., Mester, J. L., Frazier, T. W., 2nd, and Eng, C. (2014) Biochemical screening and PTEN mutation analysis in individuals with autism spectrum disorders and macrocephaly, *Eur. J. Hum. Genet.*, **22**, 273-276.
 47. Vanderver, A., Tonduti, D., Kahn, I., Schmidt, J., Medne, L., et al. (2014) Characteristic brain magnetic res-

- onance imaging pattern in patients with macrocephaly and PTEN mutations, *Am. J. Med. Genet. A*, **164a**, 627-633.
48. Huang, W. C., Chen, Y., and Page, D. T. (2016) Hyperconnectivity of prefrontal cortex to amygdala projections in a mouse model of macrocephaly/autism syndrome, *Nat. Commun.*, **7**, 13421.
 49. Karlsgodt, K. H., Rosser, T., Lutkenhoff, E. S., Cannon, T. D., Silva, A., and Bearden, C. E. (2012) Alterations in white matter microstructure in neurofibromatosis-1, *PLoS One*, **7**, e47854.
 50. Petrella, L. I., Cai, Y., Sereno, J. V., Gonçalves, S. I., Silva, A. J., and Castelo-Branco, M. (2016) Brain and behaviour phenotyping of a mouse model of neurofibromatosis type-1: an MRI/DTI study on social cognition, *Genes Brain Behav.*, **15**, 637-646.
 51. Kim, E., Wang, Y., Kim, S. J., Bornhorst, M., Jecrois, E. S., et al. (2014) Transient inhibition of the ERK pathway prevents cerebellar developmental defects and improves long-term motor functions in murine models of neurofibromatosis type 1, *Elife*, **3**, e05151, doi: 10.7554/eLife.05151.
 52. Buiting, K., Williams, C., and Horsthemke, B. (2016) Angelman syndrome - insights into a rare neurogenetic disorder, *Nat. Rev. Neurol.*, **12**, 584-593.
 53. Maranga, C., Fernandes, T. G., Bekman, E., and da Rocha, S. T. (2020) Angelman syndrome: a journey through the brain, *FEBS J*, **287**, 2154-2175.
 54. Castro, J., Garcia, R. I., Kwok, S., Banerjee, A., Petravic, J., et al. (2014) Functional recovery with recombinant human IGF1 treatment in a mouse model of Rett Syndrome, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **111**, 9941-9946.
 55. Ricciardi, S., Boggio, E. M., Grosso, S., Lonetti, G., Forlani, G., et al. (2011) Reduced AKT/mTOR signaling and protein synthesis dysregulation in a Rett syndrome animal model, *Hum. Mol. Genet.*, **20**, 1182-1196.
 56. Yoo, T., Cho, H., Park, H., Lee, J., and Kim, E. (2019) Shank3 Exons 14-16 Deletion in glutamatergic neurons leads to social and repetitive behavioral deficits associated with increased cortical layer 2/3 neuronal excitability, *Front. Cell Neurosci.*, **13**, 458.
 57. Bidinosti, M., Botta, P., Krüttner, S., Proenca, C. C., Stoehr, N., et al. (2016) CLK2 inhibition ameliorates autistic features associated with SHANK3 deficiency, *Science*, **351**, 1199-1203.
 58. Lee, Y., Kim, S. G., Lee, B., Zhang, Y., Kim, Y., et al. (2017) Striatal Transcriptome and interactome analysis of Shank3-overexpressing mice reveals the connectivity between Shank3 and mTORC1 signaling, *Front. Mol. Neurosci.*, **10**, 201.
 59. Piochon, C., Kloth, A. D., Grasselli, G., Titley, H. K., Nakayama, H., et al. (2014) Cerebellar plasticity and motor learning deficits in a copy-number variation mouse model of autism, *Nat. Commun.*, **5**, 5586.
 60. Meyza, K. Z., and Blanchard, D. C. (2017) The BTBR mouse model of idiopathic autism – current view on mechanisms, *Neurosci. Biobehav. Rev.*, **76**, 99-110.
 61. Hutsler, J. J., and Zhang, H. (2010) Increased dendritic spine densities on cortical projection neurons in autism spectrum disorders, *Brain Res.*, **1309**, 83-94.
 62. Tang, G., Gudsnuk, K., Kuo, S. H., Cotrina, M. L., Rosoklija, G., et al. (2014) Loss of mTOR-dependent macroautophagy causes autistic-like synaptic pruning deficits, *Neuron*, **83**, 1131-1143.
 63. Overwater, I. E., Rietman, A. B., Mous, S. E., Bindels-de Heus, K., Rizopoulos, D., et al. (2019) A randomized controlled trial with everolimus for IQ and autism in tuberous sclerosis complex, *Neurology*, **93**, e200-e209.
 64. Tyagi, R., Shahani, N., Gorgen, L., Ferretti, M., Pryor, W., et al. (2015) Rheb Inhibits protein synthesis by activating the PERK-eIF2 α signaling cascade, *Cell Rep.*, **10**, 684-693.
 65. Zeng, L. H., Rensing, N. R., Zhang, B., Gutmann, D. H., Gambello, M. J., and Wong, M. (2011) Tsc2 gene inactivation causes a more severe epilepsy phenotype than Tsc1 inactivation in a mouse model of tuberous sclerosis complex, *Hum. Mol. Genet.*, **20**, 445-454.
 66. Meikle, L., Pollizzi, K., Egnor, A., Kramvis, I., Lane, H., et al. (2008) Response of a neuronal model of tuberous sclerosis to mammalian target of rapamycin (mTOR) inhibitors: effects on mTORC1 and Akt signaling lead to improved survival and function, *J. Neurosci.*, **28**, 5422-5432.
 67. French, J. A., Lawson, J. A., Yapici, Z., Ikeda, H., Polster, T., et al. (2016) Adjunctive everolimus therapy for treatment-resistant focal-onset seizures associated with tuberous sclerosis (EXIST-3): a phase 3, randomised, double-blind, placebo-controlled study, *Lancet*, **388**, 2153-2163.
 68. Mizuguchi, M., Ikeda, H., Kagitani-Shimono, K., Yoshinaga, H., Suzuki, Y., et al. (2019) Everolimus for epilepsy and autism spectrum disorder in tuberous sclerosis complex: EXIST-3 substudy in Japan, *Brain Dev.*, **41**, 1-10.
 69. Saffari, A., Brösse, I., Wiemer-Kruel, A., Wilken, B., Kreuzaler, P., et al. (2019) Safety and efficacy of mTOR inhibitor treatment in patients with tuberous sclerosis complex under 2 years of age – a multicenter retrospective study, *Orphanet J. Rare Dis.*, **14**, 96.
 70. Martin, P., Wagh, V., Reis, S. A., Erdin, S., Beauchamp, R. L., et al. (2020) TSC patient-derived isogenic neural progenitor cells reveal altered early neurodevelopmental phenotypes and rapamycin-induced MNK-eIF4E signaling, *Mol. Autism*, **11**, 2.
 71. Bramham, C. R., Jensen, K. B., and Proud, C. G. (2016) Tuning specific translation in cancer metastasis and synaptic memory: control at the MNK-eIF4E axis, *Trends Biochem. Sci.*, **41**, 847-858.
 72. Pellerin, D., Çaku, A., Fradet, M., Bouvier, P., Dubé, J., and Corbin, F. (2016) Lovastatin corrects ERK pathway hyperactivation in fragile X syndrome: potential of platelet's signaling cascades as new outcome measures in clinical trials, *Biomarkers*, **21**, 497-508.
 73. Darnell, J. C., and Klann, E. (2013) The translation of translational control by FMRP: therapeutic targets for FXS, *Nat. Neurosci.*, **16**, 1530-1536.
 74. Sledziowska, M., Galloway, J., and Baudouin, S. J. (2020) Evidence for a contribution of the Ngn3/Cyflp1/Fmrl pathway in the pathophysiology of autism spectrum disorders, *Neuroscience*, **445**, 31-41.
 75. Sharma, A., Hoeffler, C. A., Takayasu, Y., Miyawaki, T., McBride, S. M., et al. (2010) Dysregulation of mTOR signaling in fragile X syndrome, *J. Neurosci.*, **30**, 694-702.
 76. Gross, C., Banerjee, A., Tiwari, D., Longo, F., White, A. R., et al. (2019) Isoform-selective phosphoinositide 3-kinase inhibition ameliorates a broad range of fragile X syndrome-associated deficits in a mouse model, *Neuropsychopharmacology*, **44**, 324-333.
 77. Bhattacharya, A., Mamcarz, M., Mullins, C., Choudhury, A., Boyle, R. G., et al. (2016) Targeting translation control with p70 S6 kinase 1 inhibitors to reverse phenotypes in fragile X syndrome mice, *Neuropsychopharmacology*, **41**, 1991-2000.
 78. Auerbach, B. D., Osterweil, E. K., and Bear, M. F. (2011) Mutations causing syndromic autism define an axis of synaptic pathophysiology, *Nature*, **480**, 63-68.
 79. Bartley, C. M., O'Keefe, R. A., Blice-Baum, A., Mihailescu, M. R., Gong, X., et al. (2016) Mammalian FMRP S499 is phosphorylated by CK2 and promotes secondary phosphorylation of FMRP, *eNeuro*, **3**, ENEURO0092-16.2016, doi: 10.1523/ENEURO.0092-16.2016.
 80. Papa, A., and Pandolfi, P. P. (2019) The PTEN-PI3K axis in cancer, *Biomolecules*, **9**, 153.

81. Song, M. S., Salmena, L., and Pandolfi, P. P. (2012) The functions and regulation of the PTEN tumour suppressor, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, **13**, 283-296.
82. Nikolaeva, I., Kazdoba, T. M., Crowell, B., and D'Arcangelo, G. (2017) Differential roles for Akt and mTORC1 in the hypertrophy of Pten mutant neurons, a cellular model of brain overgrowth disorders, *Neuroscience*, **354**, 196-207.
83. Sokol, D. K., Maloney, B., Westmark, C. J., and Lahiri, D. K. (2019) Novel contribution of secreted amyloid- β precursor protein to white matter brain enlargement in autism spectrum disorder, *Front. Psychiatry*, **10**, 165.
84. Lahiri, D. K., Sokol, D. K., Erickson, C., Ray, B., Ho, C. Y., and Maloney, B. (2013) Autism as early neurodevelopmental disorder: evidence for an sAPP α -mediated anabolic pathway, *Front. Cell Neurosci.*, **7**, 94.
85. Kaczorowski, J. A., Smith, T. F., Shrewsbury, A. M., Thomas, L. R., Knopik, V. S., and Acosta, M. T. (2020) Neurofibromatosis type 1 implicates Ras pathways in the genetic architecture of neurodevelopmental disorders, *Behav. Genet.*, **50**, 191-202.
86. Garg, S., Brooks, A., Burns, A., Burkitt-Wright, E., Kerr, B., et al. (2017) Autism spectrum disorder and other neurobehavioural comorbidities in rare disorders of the Ras/MAPK pathway, *Dev. Med. Child Neurol.*, **59**, 544-549.
87. Banerjee, S., Crouse, N. R., Emnett, R. J., Gianino, S. M., and Gutmann, D. H. (2011) Neurofibromatosis-1 regulates mTOR-mediated astrocyte growth and glioma formation in a TSC/Rheb-independent manner, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **108**, 15996-16001.
88. Weiss, B., Widemann, B. C., Wolters, P., Dombi, E., Vinks, A., et al. (2015) Sirolimus for progressive neurofibromatosis type 1-associated plexiform neurofibromas: a neurofibromatosis Clinical Trials Consortium phase II study, *Neuro Oncol.*, **17**, 596-603.
89. Richards, C., Jones, C., Groves, L., Moss, J., and Oliver, C. (2015) Prevalence of autism spectrum disorder phenomenology in genetic disorders: a systematic review and meta-analysis, *Lancet Psychiatry*, **2**, 909-916.
90. Zoghbi, H. Y., and Bear, M. F. (2012) Synaptic dysfunction in neurodevelopmental disorders associated with autism and intellectual disabilities, *Cold Spring Harb Perspect Biol*, **4**, a009886.
91. Sun, J., Liu, Y., Tran, J., O'Neal, P., Baudry, M., and Bi, X. (2016) mTORC1-S6K1 inhibition or mTORC2 activation improves hippocampal synaptic plasticity and learning in Angelman syndrome mice, *Cell. Mol. Life Sci.*, **73**, 4303-4314.
92. Zhang, Z. N., Freitas, B. C., Qian, H., Lux, J., Acab, A., et al. (2016) Layered hydrogels accelerate iPSC-derived neuronal maturation and reveal migration defects caused by MeCP2 dysfunction, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **113**, 3185-3190.
93. Wang, H., Xu, H., Wang, X., Zhou, A., Wu, M., et al. (2016) Amyloid precursor protein associates with autism spectrum disorder: a potential candidate biomarker for early screening, *Int. J. Clin. Exp. Med.*, **9**, 22259-22266.
94. Li, Y., Wang, H., Muffat, J., Cheng, A. W., Orlando, D. A., et al. (2013) Global transcriptional and translational repression in human-embryonic-stem-cell-derived Rett syndrome neurons, *Cell Stem Cell*, **13**, 446-458.
95. Monteiro, P., and Feng, G. (2017) SHANK proteins: roles at the synapse and in autism spectrum disorder, *Nat. Rev. Neurosci.*, **18**, 147-157.
96. Shcheglovitov, A., Shcheglovitova, O., Yazawa, M., Portmann, T., Shu, R., et al. (2013) SHANK3 and IGF1 restore synaptic deficits in neurons from 22q13 deletion syndrome patients, *Nature*, **503**, 267-271.
97. Vahdatpour, C., Dyer, A. H., and Tropea, D. (2016) Insulin-like growth factor 1 and related compounds in the treatment of childhood-onset neurodevelopmental disorders, *Front. Neurosci.*, **10**, 450.
98. Durand, C. M., Betancur, C., Boeckers, T. M., Bockmann, J., Chaste, P., et al. (2007) Mutations in the gene encoding the synaptic scaffolding protein SHANK3 are associated with autism spectrum disorders, *Nat. Genet.*, **39**, 25-27.
99. Okamoto, N., Kubota, T., Nakamura, Y., Murakami, R., Nishikubo, T., et al. (2007) 22q13 Microduplication in two patients with common clinical manifestations: a recognizable syndrome? *Am. J. Med. Genet. A*, **143a**, 2804-2809.
100. Khlebodarova, T. M., Kogai, V. V., Trifonova, E. A., and Likhoshvai, V. A. (2018) Dynamic landscape of the local translation at activated synapses, *Mol Psychiatry*, **23**, 107-114. doi: 10.1038/mp.2017.245.
101. Burnside, R. D., Pasion, R., Mikhail, F. M., Carroll, A. J., Robin, N. H., et al. (2011) Microdeletion/microduplication of proximal 15q11.2 between BP1 and BP2: a susceptibility region for neurological dysfunction including developmental and language delay, *Hum. Genet.*, **130**, 517-528.
102. Suzuki, A. M., Griesi-Oliveira, K., de Oliveira Freitas Machado, C., Vadasz, E., Zachi, E. C., et al. (2015) Altered mTORC1 signaling in multipotent stem cells from nearly 25% of patients with nonsyndromic autism spectrum disorders, *Mol. Psychiatry*, **20**, 551-552.
103. Neves-Pereira, M., Müller, B., Massie, D., Williams, J. H., O'Brien, P. C., et al. (2009) Deregulation of EIF4E: a novel mechanism for autism, *J. Med. Genet.*, **46**, 759-765.
104. Meyer, U. (2013) Prenatal poly(i:C) exposure and other developmental immune activation models in rodent systems, *Biol. Psychiatry*, **75**, 307-315, doi: 10.1016/j.biopsych.2013.07.011.
105. Steinmetz, A. B., Stern, S. A., Kohtz, A. S., Descalzi, G., and Alberini, C. M. (2018) Insulin-like growth factor II targets the mtor pathway to reverse autism-like phenotypes in mice, *J. Neurosci.*, **38**, 1015-1029.
106. Rosina, E., Battan, B., Siracusanò, M., Di Criscio, L., Hollis, F., et al. (2019) Disruption of mTOR and MAPK pathways correlates with severity in idiopathic autism, *Transl. Psychiatry*, **9**, 50.
107. Ganesan, H., Balasubramanian, V., Iyer, M., Venugopal, A., Subramaniam, M. D., et al. (2019) mTOR signalling pathway - A root cause for idiopathic autism? *BMB Rep.*, **52**, 424-433.
108. Mariani, J., Coppola, G., Zhang, P., Abyzov, A., Proveni, L., et al. (2015) FOXP1-dependent dysregulation of GABA/glutamate neuron differentiation in autism spectrum disorders, *Cell*, **162**, 375-390.
109. Baier, P. C., Koch, J. M., Seeck-Hirschner, M., Ohlmeyer, K., Wilms, S., et al. (2009) A flow-cytometric method to investigate glutamate-receptor-sensitivity in whole blood platelets - results from healthy controls and patients with schizophrenia, *J. Psychiatr. Res.*, **43**, 585-591.
110. Boyanova, D., Nilla, S., Birschmann, I., Dandekar, T., and Dittrich, M. (2012) PlateletWeb: a systems biologic analysis of signaling networks in human platelets, *Blood*, **119**, e22-34.
111. Kumari, D., Bhattacharya, A., Nadel, J., Moulton, K., Zeak, N. M., et al. (2014) Identification of fragile X syndrome specific molecular markers in human fibroblasts: a useful model to test the efficacy of therapeutic drugs, *Hum. Mutat.*, **35**, 1485-1494.
112. McCoy, M., Poliquin-Duchesneau, D., and Corbin, F. (2016) Molecular dynamics of FMRP and other RNA-binding proteins in MEG-01 differentiation: the role of mRNP complexes in non-neuronal development, *Biochem. Cell Biol.*, **94**, 597-608.
113. Pellerin, D., Lortie, A., and Corbin, F. (2018) Platelets as a surrogate disease model of neurodevelopmental disorders: insights from fragile X syndrome, *Platelets*, **29**, 113-124.

PROTEIN PHOSPHORYLATION SIGNALING CASCADES IN AUTISM WITH EMPHASIS ON THE mTOR PATHWAY

Review

**I. S. Boksha^{1,2*}, T. A. Prokhorova¹, E. B. Tereshkina¹,
O. K. Savushkina¹, and G. Sh. Burbaeva¹**

¹ *Mental Health Research Center, 115522 Moscow, Russia; E-mail: boksha_irina@mail.ru*

² *Gamaleya Research Center of Epidemiology and Microbiology, Ministry of Health of the Russian Federation, 123098 Moscow, Russia; E-mail: boksha_irina@gamaleya.org*

The mammalian target of rapamycin (mTOR) signaling pathway is a central regulator of cell metabolism, growth, and survival in response to hormones, growth factors, nutrients, and stress-induced signals. For this review, we analyzed the available literature that describes how molecular abnormalities of signaling cascades associated with mTOR are encountered in autism spectrum disorders (ASDs), and we outline prospects for pathogenetically-targeted pharmacotherapeutic approaches to ASDs, especially in syndromic ASDs. Considering the available experimental and clinical data, we suggest that very early detection of molecular abnormalities in ASD risk groups can be facilitated from studies of peripheral blood platelets. Also, the determination of a time window in which critical dysregulations in the activity of the described pathways in risk groups might suggest promising directions for further studies that could lead to more effective pharmacotherapeutic interventions in ASDs.

Keywords: mTOR, signaling cascades, protein phosphorylation, autism spectrum disorders

ОТДАЛЕННЫЕ ИСХОДЫ СЕПСИСА

Мини-обзор

© 2021 О.А. Гребенчиков*, А.Н. Кузовлев

НИИ общей реаниматологии имени В.А. Неговского ФНКЦ РР, 107031 Москва, Россия;
электронная почта: oleg.grebenchikov@yandex.ru

Поступила в редакцию 10.12.2020

После доработки 16.03.2021

Принята к публикации 22.03.2021

Сепсис — одна из важнейших проблем современной медицины. Отдаленные исходы у пациентов, перенесших септический шок, который развивается при тяжелом течении сепсиса, демонстрируют удручающую картину — у 75% людей, выживших после сепсиса и перенесших септический шок, отмечаются признаки органной недостаточности и стойкий функциональный дефицит. Характер течения острого септического процесса и объем лечения в отделении реанимации в значительной степени определяют патогенез дальнейших осложнений. В этой связи заслуживает внимания и обсуждения среди врачей-реаниматологов концепция «феноптоза», предложенная В.П. Скулачевым, в рамках которой септический шок считается «суицидальным механизмом» запрограммированной смерти организма, который защищает человеческую популяцию от опасно инфицированных индивидов. В статье предложена концепция потенциального лечения сепсиса, основанная на идентификации и блокаде всех рецепторов, участвующих в обработке феноптического сигнала, вызванного липополисахаридом и другими иницирующими септический шок веществами. Представляется перспективным поиск средств, которые могут блокировать молекулярные механизмы реализации феноптозного сигнала.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: сепсис, септический шок, липополисахарид, летальность, феноптоз.

DOI: 10.31857/S0320972521050043

ВВЕДЕНИЕ

Сепсис — одна из важнейших проблем современной медицины. Представление врачей-анестезиологов-реаниматологов о сепсисе начало складываться в 1991 г. с концепции континуума системного воспалительного ответа, сепсиса, тяжелого сепсиса и септического шока. В 2001 г. диагностические критерии сепсиса были расширены, однако это не позволило повысить их чувствительность и специфичность [1]. В 2016 г. были разработаны обновленные критерии, получившие название Sepsis-3 [2, 3]. Согласно им, сепсис определяют как жизнеугрожающую органную дисфункцию вследствие дисрегуляторного ответа организма на инфекцию. В России в настоящее время сепсис определяют как патологический процесс, в основе которого лежит реакция организма в виде генерализованного (системного) воспаления на инфекцию различной природы (бактериальную, вирусную, грибковую) в сочетании с остро возникшими признаками органной дисфункции и/или доказательствами микробной диссеминации [4].

Септический шок — это циркуляторные, клеточные и метаболические нарушения при сепсисе, сопровождающиеся высокой летальностью, гипотензией, требующие введения вазопрессоров, и гиперлактатемией > 2 ммоль/л, несмотря на адекватную инфузию [5].

Таким образом, из клинической практики реаниматологии исключается термин «системная воспалительная реакция» в связи с его недостаточной специфичностью. В то же время любой сепсис по определению считается тяжелым, то есть с наличием признаков органной недостаточности.

В качестве универсальной оценки степени тяжести органной недостаточности предложена шкала SOFA (Sequential Organ Failure Assessment), которая уже длительное время используется врачами-анестезиологами-реаниматологами. Для среднего медицинского персонала также разработаны критерии ранней диагностики признаков нестабильности пациента — qSOFA (quick SOFA).

Частота встречаемости сепсиса — от 148 до 288 случаев на 100 000 госпитализаций, что только в США составляет около 1,7 млн случаев в год [6, 7]. Сепсис — одна из наиболее распро-

* Адресат для корреспонденции.

страненных причин смерти в некардиологических отделениях реанимации во всем мире [8], при которой летальность достигает 26%, что для США составляет около 270 тыс. случаев в год [9]. Что же касается мировой статистики, то ежегодно более 19 млн человек переживают сепсис, определяемый как опасная для жизни острая дисфункция органов, вторичная по отношению к инфекции. Около 14 млн человек доживают до выписки из больницы [10].

По данным многочисленных исследований, частота развития септического шока при поступлении в отделение реанимации и интенсивной терапии (ОРИТ) оценивается в 10,4% (95%-ный доверительный интервал 5,9–16,1%) [11], при этом госпитальная летальность от септического шока 20–25 лет назад составляла более 50% [12, 13]. На сегодняшний день, несмотря на усилия медицинского и научного сообщества, летальность остается значительно высокой: по данным недавнего систематического обзора, проведенного Shankar-Nari et al., летальность от септического шока составила в среднем 46,5% [14]. И только последний мета-анализ, выполненный Vincent J.-L. et al., показал тенденцию к улучшению результатов лечения септического шока в Европе и Северной Америке: по их данным, уровень смертности от септического шока составил 38% [15].

Основа лечения сепсиса: своевременная диагностика и контроль очага инфекции, сбалансированное проведение инфузии и введение вазопрессорных препаратов, рациональная антибиотикотерапия. Приблизительно у 75% пациентов, выживших после сепсиса, отмечаются признаки органной недостаточности и функциональный дефицит (физический, когнитивный, психологический) [16]. Дальнейшая судьба пациентов, переживших сепсис, выглядит следующим образом: половина пациентов выздоравливает, одна треть умирает в течение следующего года, одна шестая имеет тяжелые стойкие функциональные нарушения (например, неспособность самостоятельно обслуживать себя в быту). У выживших пациентов наблюдается 3-кратное ухудшение умеренных и тяжелых когнитивных нарушений (6,1 и 16,7% до и после госпитализации соответственно), высокая распространенность психических проблем, включая тревогу (32%), депрессию (29%) или посттравматическое стрессовое расстройство (44%). Около 40% пациентов повторно госпитализируются в течение 90 дней после выписки: из них по поводу инфекции – 11,9%, сердечной недостаточности – 5,5%, острой почечной недостаточности – 3,3% [17–20].

Перенесенный сепсис может непосредственно способствовать развитию или прогрес-

сированию сердечно-сосудистых заболеваний. В наблюдательном исследовании с участием 4179 пациентов, которые были выписаны из стационара после перенесенного сепсиса, частота новых сердечно-сосудистых событий (инфаркт миокарда, инсульт, внезапная сердечная смерть и желудочковые аритмии) в течение года составила 29,5%, что в 1,9 раза выше по сравнению с контрольной популяцией [21, 22].

Что касается летальности в отдаленном периоде после перенесенного сепсиса, то на сегодняшний день существует ряд ретроспективных популяционных исследований. При исследовании когорты из 970 пациентов, включающей людей с перенесенным инсультом и сепсисом, то 1-, 2- и 5-летняя летальность от всех причин составила 23, 28,8 и 43,8% соответственно по сравнению с показателями летальности среди тех пациентов, которые не переносили сепсис – 1, 2,6 и 8,3% соответственно [23]. В другом исследовании, выполненном в Шотландии, были изучены отдаленные исходы у 439 пациентов, переживших тяжелый сепсис в отделении интенсивной терапии. Летальность через 3,5 года составила 58%, а через 5 лет – 61% [24].

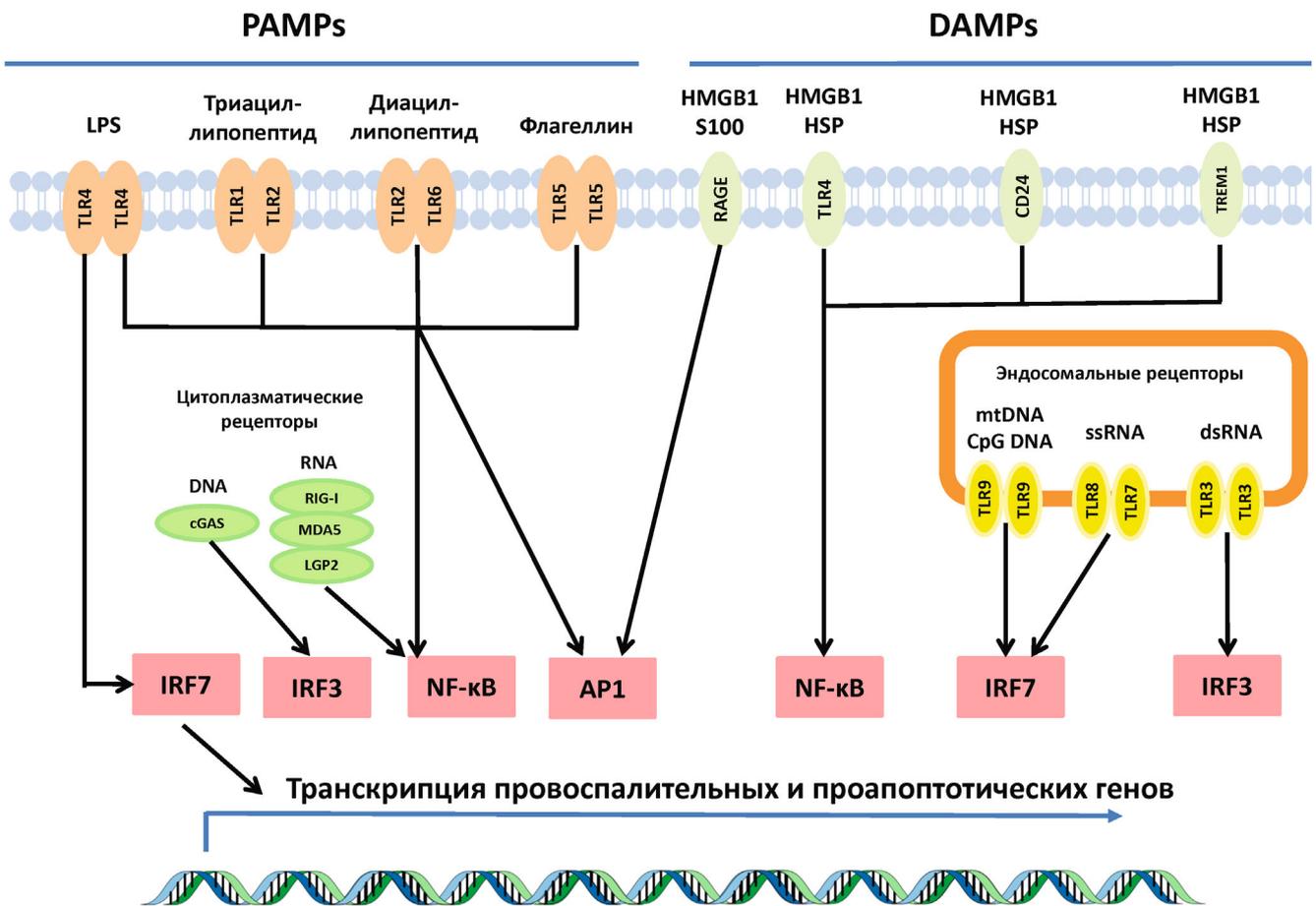
И, наконец, наибольший интерес представляет обширное ретроспективное когортное исследование, в котором были проанализированы данные о 83 974 пациентах, перенесших септический шок, сепсис и тяжелые инфекции в промежутке 2009–2016 гг. в Германии. Важность этого исследования заключается в том, что пациенты были отобраны с использованием критериев, близких к нынешнему определению Sepsis-3. Число выживших пациентов с тяжелыми инфекциями составило 28 449, с сепсисом – 53 085, с септическим шоком – 2440 человек. При этом 5-летняя летальность при развившемся септическом шоке составила 56,1% (1369 пациентов из 2440), при сепсисе – 62,1% (32 952/53 085) и при тяжелых инфекциях – 52,4% (14 909 / 28 449) [25].

На сегодняшний день практически не существует проспективных наблюдательных исследований о влиянии перенесенного сепсиса на исходы лечения в отдаленном периоде после выписки из стационара. Поэтому были инициированы исследования, которые позволят оценить среднесрочные и долгосрочные функциональные нарушения у пациентов, перенесших сепсис в ОРИТ. В немецком исследовании Mid-German Sepsis Cohort (MSC) предполагаемый расчетный объем выборки составляет 3000 пациентов, выписанных из ОРИТ после перенесенного сепсиса [26]. Будут проанализированы функциональная активность в повседневной жизни, а также 3- и 5-летняя летальность, ког-

нитивные, эмоциональные и физические нарушения. В четырех голландских клиниках в ОРИТ уже проводится MONITOR-IC, представляющее собой многоцентровое проспективное контролируемое когортное исследование. Пациенты включаются в исследование в период с июля 2016 г. по июль 2021 г. и будут наблюдаться в течение 5 лет. Согласно планированию исследования, предполагается отобрать 12 000 пациентов, выживших после лечения в ОРИТ, причем когорта пациентов, перенесших сепсис, будет проанализирована отдельно. Конечные точки исследования: функциональная активность, летальность, когнитивные, эмоциональные и физические нарушения [27].

Ухудшение состояния здоровья после перенесенного сепсиса имеет много причин: это и прогрессирование хронических заболеваний, и остаточная органная недостаточность, и нару-

шение функций иммунной системы. Патогенез осложнений перенесенного сепсиса после выписки из стационара изучен мало, но, вероятно, зависит от остроты септического состояния (например, тяжесть инфекции, особенности реакции хозяина на инфекцию) и качества оказанного лечения в ОИТ (например, своевременность и правильность оказания медицинской помощи при сепсисе, ятрогенные осложнения, связанные с лечением). Особого внимания заслуживает проблема лечения септического шока. Приведенные статистические данные говорят о том, что за последнюю четверть века не удалось заметно снизить госпитальную летальность, несмотря на постоянно совершенствуемые алгоритмы диагностики и лечения [28]. Отдаленные исходы у пациентов, перенесших септический шок, также демонстрируют удручающую картину: через 2 года в живых остается менее четверти



Основные рецепторы DAMPs, PAMPs и транскрипционные факторы, участвующие в передаче сигнала. Рецепторы PAMPs (оранжевые) и DAMPs (зелёные) находятся на плазматической мембране клетки. Стимуляция этих рецепторов приводит к активации внутриклеточного сигнального пути и транскрипционных факторов (обозначены прямоугольниками), инициации транскрипции провоспалительных цитокинов и других медиаторов воспаления и апоптоза. Внутриклеточные патогенные PAMPs могут узнаваться цитоплазматическими или эндосомальными рецепторами. (С цветным вариантом рисунка можно ознакомиться в электронной версии статьи на сайте: <http://sciencejournals.ru/journal/biokhsm/>)

пациентов с разной степенью выраженности органной дисфункции. В этой связи заслуживает внимания и обсуждения среди врачей-реаниматологов концепция «феноптоза», предложенная Владимиром Петровичем Скулачевым.

По его мнению, септический шок – это «суицидальный механизм» запрограммированной смерти организма, который было предложено назвать «феноптозом» (по аналогии с апоптозом), который защищает человеческую популяцию от опасно инфицированных пациентов [29]. Многие признаки септического шока указывают на то, что гибель больного инициирована самим организмом, в то время как роль возбудителя достаточно пассивна. Эндотоксин, вызывающий избыточную воспалительную реакцию – это липополисахарид, образующий стенку грамотрицательной бактерии. Токсичность эндотоксина зависит от эндотоксин-связывающего белка в крови пациента и некоторых рецепторов в плазматической мембране клеток человека (TLR4), после связывания с которыми инициируется массивный выброс цитокинов за счет активации транскрипционных факторов NF-κB, IRF3 и AP1 (рисунок), которые в крайних случаях могут вызывать апоптоз клеток органов-мишеней. По мнению Скулачева, вполне вероятно, что развитие септического шока будет невозможно, когда мы идентифицируем и блокируем все рецепторы, участвующие в обработке феноптотического сигнала, вызванного липополисахаридом и другими инициирующими веществами [30]. Что касается бактериального липополисахарида как такового, то он, по-видимому, не опасен до тех пор, пока не может быть распознан макроорганизмом, являясь сигналом

появления в крови и тканях грамотрицательных бактерий. Если степень заражения не слишком высока, то все эти меры, безусловно, полезны для организма. Вот почему общепринятое мнение о сепсисе состоит в том, что он представляет собой чрезмерное использование макроорганизмом своих защитных средств против патогенных микроорганизмов [31, 32]. В усилении воспалительного ответа, вызванного патогеном, принимают участие не только «чужеродные» молекулы этого патогена (PAMPs), но и разрушенные компоненты клеток и тканей организма-хозяина (DAMPs), которые, действуя совместно, приводят к активации целого ряда транскрипционных факторов (рисунок).

Феноптоз – это последняя линия обороны, когда самоликвидация наиболее опасных инфицированных особей предотвращает гибель популяции. На сегодняшний день мы смогли избавиться от большинства особо опасных инфекционных заболеваний, но феноптоз продолжает приводить к смерти пациентов с инфекциями, которые уже не представляют опасности для популяции. В такой ситуации становится важным поиск средств, которые могут сломать эту атаку программу самоуничтожения индивида и заблокировать молекулярные механизмы реализации феноптозного сигнала.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

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

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Angus, D. C., Linde-Zwirble, W. T., Lidicker, J., Clermont, G., Carcillo, J., and Pinsky, M. R. (2001) Epidemiology of severe sepsis in the United States: analysis of incidence, outcome, and associated costs of care, *Crit. Care Med.*, **29**, 1303-1310.
2. Singer, M., Deutschman, C. S., Seymour, C. W., Shankar-Hari, M., Annane, D., et al. (2016) The third international consensus definitions for sepsis and septic shock (sepsis-3), *JAMA*, **315**, 801-810, doi: 10.1001/jama.2016.0287.
3. Seymour, C. W., Liu, V. X., Iwashyna, T. J., Brunkhorst, F. M., et al (2016) Assessment of clinical criteria for sepsis: for the Third International Consensus Definitions for Sepsis and Septic Shock (Sepsis-3), *JAMA*, **315**, 762-774, doi: 10.1001/jama.2016.0288.
4. Руднов В. А., Кулабухов В. В. (2016) Сепсис-3: Обновленные ключевые положения, потенциальные проблемы и дальнейшие практические шаги, *Вестник анестезиологии и реаниматологии*, **13**, 4-11, doi: 10.21292/2078-5658-2016-13-4-4-11.
5. Rhodes, A., Evans, L. E., Alhazzani, W., Levy, M. M., Antonelli, M., et al. (2017) Surviving Sepsis Campaign: international guidelines for management of sepsis and septic shock, *Crit. Care Med.*, **45**, 486-552.
6. Zimmerman, J. E., Kramer, A. A., and Knaus, W. A. (2013) Changes in hospital mortality for United States intensive care unit admissions from 1988 to 2012, *Crit. Care*, **17**, R81.
7. Halpern, N. A., and Pastores, S. M. (2010) Critical care medicine in the United States 2000-2005: an analysis of bed numbers, occupancy rates, payer mix, and costs, *Crit. Care Med.*, **38**, 65-71.
8. Reinhart, K., Daniels, R., Kissoon, N., Machado, F. R., Schachter, R. D., and Finfer, S. (2017) Recognizing sepsis as a global health priority – a WHO resolution, *N. Engl. J. Med.*, **377**, 414-417.
9. Rhee, C., Dantes, R., Epstein, L., Murphy, D. J., Seymour, C. W., et al. (2017) Incidence and trends of sepsis in US hospitals using clinical vs claims data, 2009-2014, *JAMA*, **318**, 1241-1249.
10. Fleischmann, C., Scherag, A., Adhikari, N. K. J., Hartog, C. S., Tsaganos, T., et al. (2016) International forum of acute care trialists. Assessment of global incidence and mortality of hospital-treated sepsis: current esti-

- mates and limitations, *Am J. Respir. Crit. Care Med.*, **193**, 259-272.
11. Bauer, M., Groesdonk, H. V., Preissing, F., Dickmann, P., Vogelmann, T., et al. (2021) Mortality in sepsis and septic shock in Germany. Results of a systematic review and meta-analysis, *Anaesthetist*, **9**, 1-8, doi: 10.1007/s00101-021-00917-8.
 12. Brun-Buisson, C., Doyon, F., Carlet, J., Dellamonica, P., Gouin, F., et al. (1995) Incidence, risk factors, and outcome of severe sepsis and septic shock in adults. A multicenter prospective study in intensive care units. French ICU Group for Severe Sepsis, *JAMA*, **274**, 968-974.
 13. Annane, D., Aegerter, P., Jars-Guincestre, M. C., and Guidet, B. (2003) Current epidemiology of septic shock: the CUB-Rea Network, *Am. J. Respir. Crit. Care Med.*, **168**, 165-172.
 14. Shankar-Hari, M., Phillips, G. S., Levy, M. L., Seymour, C. W., Liu, V. X., et al. (2016) Developing a new definition and assessing new clinical criteria for septic shock: for the third international consensus definitions for sepsis and septic shock (Sepsis-3), *JAMA*, **315**, 775-787.
 15. Vincent, J.-L., Gabriel, J., David, S., Olariu, E., and Cadwell, K. (2019) Frequency and mortality of septic shock in Europe and North America: a systematic review and meta-analysis, *Crit. Care*, **23**, 196, doi: 10.1186/s13054-019-2478-6.
 16. Schmidt, K., Gensichen, J., Fleischmann-Struzek, C., Bahr, V., Pausch, C., et al. (2020) Long-term survival following sepsis, *Dtsch. Arztebl. Int.*, **46**, 775-782, doi: 10.3238/arztebl.2020.0775.
 17. Iwashyna, T. J., Ely, E. W., Smith, D. M., and Langa, K. M. (2010) Long-term cognitive impairment and functional disability among survivors of severe sepsis, *JAMA*, **304**, 1787-1794.
 18. Alobaidi, R., Basu, R. K., Goldstein, S. L., and Bagshaw, S. M. (2015) Sepsis-associated acute kidney injury, *Semin. Nephrol.*, **35**, 2-11.
 19. Prescott, H. C., Langa, K. M., and Iwashyna, T. J. (2015) Readmission diagnoses after hospitalization for severe sepsis and other acute medical conditions, *JAMA*, **313**, 1055-1057.
 20. Prescott, H., and Angus, D. (2018) Enhancing recovery from sepsis: a review, *JAMA*, **319**, 62-75, doi: 10.1001/jama.2017.17687.
 21. Yende, S., Linde-Zwirble, W., Mayr, F., Weissfeld, L. A., Reis, S., and Angus, D. C. (2014) Risk of cardiovascular events in survivors of severe sepsis, *Am. J. Respir. Crit. Care Med.*, **189**, 106501074.
 22. Ou, S.-M., Chu, H., Chao, P.-W., Lee, Yi-J., Kuo, S.-C., et al. (2016) Long-term mortality and major adverse cardiovascular events in sepsis survivors: a nationwide population-based study, *Am. J. Respir. Crit. Care Med.*, **194**, 209-217.
 23. Wang, H. E., Szychowski, J. M., Griffin, R., Safford, M. M., Shapiro, N. I., and Howard, G. (2014) Long-term mortality after community-acquired sepsis: a longitudinal population-based cohort study, *BMJ Open*, **4**, e004283, doi: 10.1136/bmjopen-2013-004283.
 24. Cuthbertson, H., Elders, A., Hall, S. (2013) Mortality and quality of life in the five years after severe sepsis, *Crit. Care*, **17**, R70.
 25. Rahmel, T., Schmitz, S., Nowak, H., Schepanek, K., Bergmann, L., et al. (2020) Long-term mortality and outcome in hospital survivors of septic shock, sepsis, and severe infections: the importance of aftercare, *PLoS One*, **15**, e0228952, doi: 10.1371/journal.pone.0228952.
 26. Scherag, A., Hartog, C. S., Fleischmann, C., Dominique Ouart, D., Hoffmann, F., et al. (2017) A patient cohort on long-term sequelae of sepsis survivors: study protocol of the Mid-German Sepsis Cohort, *BMJ Open*, **7**, e016827, doi: 10.1136/bmjopen-2017-016827.
 27. Geense, W., Zegers, M., Vermeulen, H., van den Boogaard, M., and van der Hoeven, J. (2017) MONITOR-IC study, a mixed methods prospective multicentre controlled cohort study assessing 5-year outcomes of ICU survivors and related healthcare costs: a study protocol, *BMJ Open*, **7**, e018006, doi: 10.1136/bmjopen-2017-018006.
 28. Henriksen, D. P., Pottgard, A., Laursen, C. B., Jensen, T. G., Hallas, J., et al. (2017) Intermediate-term and long-term mortality among acute medical patients hospitalized with community-acquired sepsis: a population-based study, *Eur J Emerg Med.*, **24**, 404-410, doi: 10.1097/MEJ.0000000000000379.
 29. Skulachev, V. P. (1997) Aging is a specific biological function rather than the result of a disorder in complex living systems: biochemical evidence in support of Weismann's hypothesis, *Biochemistry (Moscow)*, **62**, 1191-1195.
 30. Skulachev, V. P. (1999) Phenoptosis: programmed death of an organisms, *Biochemistry (Moscow)*, **64**, 1418-1426.
 31. Skulachev, V. P. (2002) Programmed death phenomena: from organelle to organism, *Ann N Y Acad Sci.*, **959**, 214-237, doi: 10.1111/j.1749-6632.2002.tb02095.x.
 32. Skulachev, V. P. (2003) Aging and the programmed death phenomenon, in *Top. Curr. Genet.* (Nystrom, T., and Osiewacz, H. D., eds.) Model System in Aging, Springer-Verlag, Berlin-Heidelberg, pp. 192-237.

LONG-TERM OUTCOMES AFTER SEPSIS

Mini-Review

O. A. Grebenchikov* and A. N. Kuzovlev

*Negovsky Scientific Research Institute of General Reanimatology, 107031 Moscow, Russia;
E-mail: oleg.grebenchikov@yandex.ru*

Sepsis is one of the most significant problems of modern medicine. Long-term outcomes in patients after septic shock seems very depressing: in 75% of patients who survived sepsis and underwent septic shock, there are signs of organ failure and persistent functional deficit. The acute septic process and the treatment in the intensive care unit itself largely determines the pathogenesis of further complications of sepsis. In this regard, the concept of "phenoptosis" proposed by Prof. Skulachev, in which septic shock is a suicidal mechanism of programmed death of an organism, which protects the human population from dangerously infected individuals. The article describes a potential treatment concept for sepsis based on the notion that septic shock will not be possible when we identify and block all receptors involved in the processing of phenoptotic signal caused by lipopolysaccharide and other substances that initiate septic shock. It seems promising to search for agents that can block the molecular mechanisms of the phenoptotic signal realization.

Keywords: sepsis, septic shock, lipopolysaccharide, lethality, phenoptosis

УДК 577.218

МИКРОРНК В ОНКОЛОГИИ: ОТ МЕХАНИЗМОВ РЕГУЛЯЦИИ ЭКСПРЕССИИ ГЕНОВ ДО ПЕРЕПРОГРАММИРОВАНИЯ МЕТАСТАТИЧЕСКОЙ НИШИ

Обзор

© 2021 Е.В. Семина^{1,2*}, К.Д. Рысенкова^{1,2}, К.Э. Трояновский²,
А.А. Шмакова¹, К.А. Рубина²

¹ Федеральное государственное бюджетное учреждение «Национальный медицинский исследовательский центр кардиологии» Министерства здравоохранения Российской Федерации, 121552 Москва, Россия; электронная почта: e-semina@yandex.ru

² Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, факультет фундаментальной медицины, 119192 Москва, Россия

Поступила в редакцию 11.03.2021

После доработки 11.03.2021

Принята к публикации 31.03.2021

Проект «Геном человека» к 2003 году позволил выявить полную структуру генома, но оказалось, что 97% ДНК приходится на последовательности, которые не кодируют белки. Объяснение этому пришло позднее, когда в нетранслируемых областях ДНК были обнаружены последовательности, кодирующие короткие микроРНК, длинные некодирующие РНК и другие типы нуклеотидных последовательностей, которые участвуют в регуляции экспрессии генов. Впервые идентифицированные в цитоплазме, с изначальной функцией деградации целевой мРНК, на сегодняшний день микроРНК обнаружены во всех компартментах клетки. В составе экзосом или в комплексе с белками микроРНК секретируются во внеклеточное пространство и участвуют в процессах морфогенеза и регенерации, а также онкогенезе, метастазировании и химиорезистентности клеток опухоли. В онкогенезе микроРНК играют двоякую роль: с одной стороны, они могут выступать в качестве онкосупрессоров, подавляя экспрессию онкогенов, с другой стороны, функционируя как онкогены, они нивелируют инактивирующее действие онкосупрессоров, стимулируют опухолевый ангиогенез и опосредуют иммуносупрессивные свойства в опухоли. Обзор описывает современное представление о биогенезе микроРНК, их функциях в цитоплазме и ядре. Особое внимание уделено неканоническим механизмам регуляции экспрессии генов, контролируемым микроРНК, и их участию в онкогенезе. В обзоре также приведено представление авторов о роли микроРНК в процессах метастазирования и формировании метастатической ниши.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: микроРНК, биогенез микроРНК, функции микроРНК в ядре, экзосомы, внеклеточные микроРНК, онкогенез, метастазирование, метастатическая ниша.

DOI: 10.31857/S0320972521050055

ВВЕДЕНИЕ

Первая микроРНК была обнаружена в 1993 г. у нематоды *C. elegans* в локусе гена *lin-4* [1]. Группа Lee et al. продемонстрировала считывание с этого гена 22-нуклеотидной РНК, комплементарной мРНК другого гена, *lin-14*, в результате чего происходило торможение его трансляции, определяющее переход *C. elegans* от первой

ко второй личиночной стадии [1]. Гораздо позднее, уже в 2000 г., двумя независимыми командами ученых было обнаружено, что небольшая (21 нуклеотид) РНК, *let-7*, играет важную роль в процессе развития личинок нематоды во взрослую особь *C. elegans* [2]. Впоследствии микроРНК были описаны у многих живых организмов, эволюционно друг от друга далёких, включая человека [3]. На сегодняшний день эти молекулы определены как малые некодирующие эволюционно консервативные РНК длиной 18–25 нуклеотидов, участвующие в регуляции экспрессии генов. Обнаружены и описаны тысячи микроРНК, информация о которых хранится в различных базах данных, основные из которых miRbase (<http://www.mirbase.org/>),

Принятые сокращения: МЭП – мезенхимально-эпителиальный переход; НТО – нетранслируемая область; ПТИГ – посттранскрипционная инактивация генов; ЭМП – эпителиально-мезенхимальный переход; Ago – белок аргонавт, каталитический компонент комплекса RISC; RISC – РНК-индуцируемый комплекс выключения гена.

* Адресат для корреспонденции.

miRDB (<http://mirdb.org/>) и miRTarBase (<http://mirtarbase.cuhk.edu.cn/php/index.php>).

Хорошо описанной функцией микроРНК является регуляция экспрессии генов путём связывания с 3'-нетранслируемой областью (НТО) мРНК-мишени и ингибирования её трансляции. Однако за последние несколько лет появились данные о взаимодействии микроРНК с другими мишенями, включая промоторы генов, кодирующих последовательность, и 5'-НТО [4]. В литературе накапливаются данные о свободном перемещении микроРНК между разными компартментами клетки, где они регулируют различные процессы, включая транскрипцию, трансляцию, альтернативный сплайсинг и репарацию ДНК. Кроме того, микроРНК секретируются во внеклеточное пространство и являются молекулярными маркерами онкологических заболеваний, в развитии которых могут играть ключевую роль. По всей вероятности, микроРНК способны выступать как в роли онкосупрессоров, подавляя прогрессию опухоли, так и в роли онкогенов, стимулируя канцерогенез [5]. Данный обзор посвящен описанию различных путей биогенеза микроРНК, их функциям в клетках, секреции во внеклеточное пространство и определению их потенциальной роли в формировании премеастатической ниши.

БИОГЕНЕЗ микроРНК

Биогенез микроРНК является многостадийным процессом и начинается с транскрипции их генов. В ядре микроРНК транскрибируются в виде длинной последовательности, называемой при-микроРНК (primary – pri-miRNA), с участием РНК-полимеразы II либо с собственных промоторов, либо с промотора гена-хозяина [6]. Биогенез микроРНК может происходить как по каноническому (рис. 1), так и по неканоническому пути, например, миртронному, при котором микроРНК образуются Drosha-независимым способом (см. ниже).

Предшественники микроРНК могут быть закодированы в коротких интронах [7] – именно они получили название миртроны. Такие предшественники имеют шпильчатую структуру, напоминающую пре-микроРНК. Однако после транскрипции миртроны не претерпевают процессинг комплексом Drosha–DGCR8 в отличие от классических при-микроРНК (рис. 1, справа). Вместо этого миртроны подвергаются сплайсингу, при котором образованный продукт, как и все сплайсированные интроны, формируется в виде лассо, в котором 5'-конец интрона присоединен к 2'-ОН (гидроксильной) группе аденозина.

После этого 2'–5'-фосфодиэфирная связь подвергается гидролизу с помощью линейаризирующего фермента лассо 1, DBR1 (Lariat debranching enzyme) [8]. Процессированный миртрон приобретает структуру пре-микроРНК и экспортируется в цитоплазму, где претерпевает дальнейший процессинг при помощи рибонуклеазы Dicer в двухцепочечную РНК длиной ≈ 22 п.о., что в конечном итоге приводит к образованию зрелой микроРНК, способной участвовать в регуляции экспрессии РНК-мишеней. В 2018 г. была разработана программа, которая отличает миртроны от предшественников канонических микроРНК по длине шпильки и содержанию GC-нуклеотидов. В будущем этот инструмент может способствовать изучению механизмов процессинга миртронов [9].

На сегодняшний день известна только одна микроРНК, которая подвергается Dicer-независимому пути биогенеза – это микроРНК-451. Ее процессинг осуществляет фермент Ago2, так как Dicer не может расцепить шпильку из-за её короткой длины (19 п.о.) [10]. Значимую роль в процессинге пре-микроРНК-451 играет еще один компонент RISC, а именно эукариотический фактор инициации трансляции 1A (EIF1A), который взаимодействует с Ago2, способствуя его активации. Далее происходит загрузка микроРНК-451 в состав RISC в цитоплазме, где она осуществляет свою стандартную деятельность – посттранскрипционную регуляцию экспрессии генов.

ФУНКЦИИ микроРНК В ЦИТОПЛАЗМЕ

На сегодняшний день большинство публикаций в этой области посвящено основной функции микроРНК, а именно связыванию с 3'-НТО мРНК-мишени с целью индукции трансляционной репрессии [11]. Однако в последнее время появляется все больше работ о взаимодействии микроРНК с 5'-НТО мРНК, приводящем к противоположному эффекту, а именно активации трансляции [12], что делает актуальным исследование функциональной значимости микроРНК в цитоплазме.

Основными компонентами микроРНК-индуцированного комплекса выключения гена (микроRISC) являются направляющая цепь микроРНК и белки Ago [13]. Для инициации Ago2, который проявляет эндонуклеазную активность в отношении мРНК, необходимым и достаточным условием является комплементарное взаимодействие начала последовательности микроРНК (2–8 нуклеотиды), получившей название «seed sequence», со своей мишенью [14].

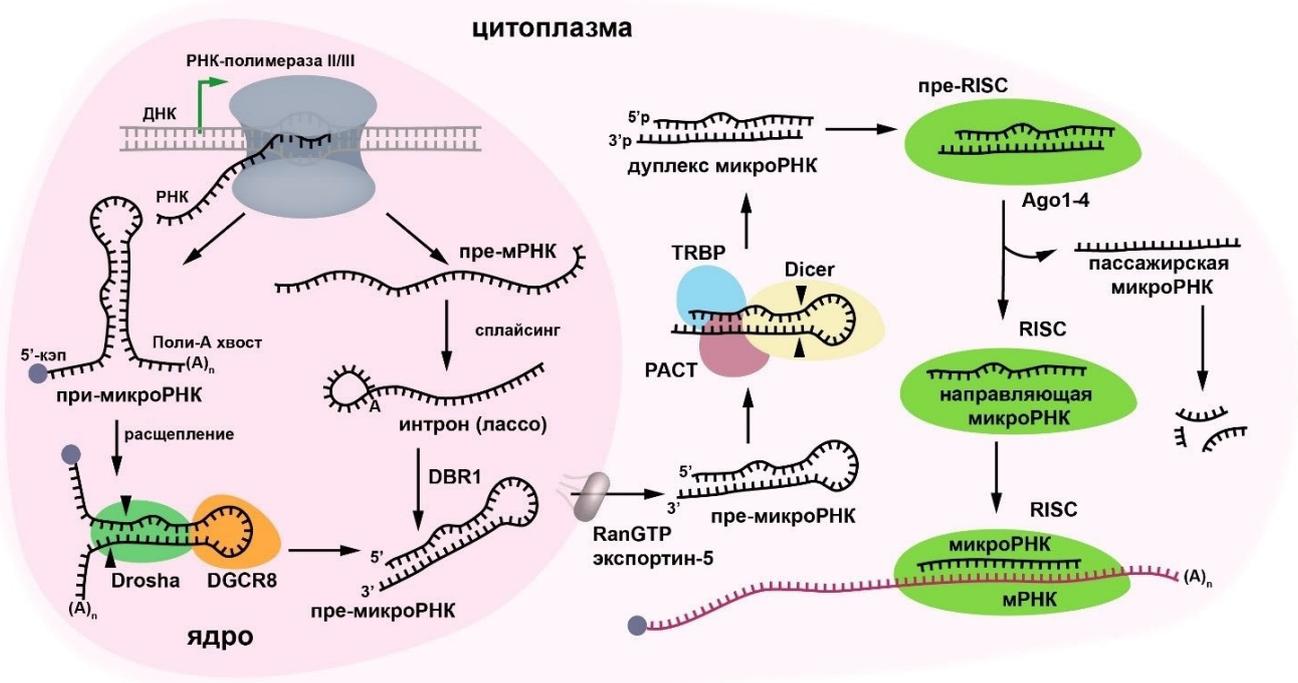


Рис. 1. Биогенез микроРНК. Классический биогенез микроРНК начинается с синтеза транскрипта при-микроРНК. Комплекс, состоящий из рибонуклеазы III Droscha и белка критической области синдрома ДиДжорджи 8 (DGCR8), расщепляет (первичную) при-микроРНК с образованием предшественника микроРНК (пре-микроРНК). При-микроРНК подвергается кэппированию на 5'-конце и полиаденилированию на 3'-конце. Пре-микроРНК может также формироваться с помощью линейаризирующего фермента лассо 1 (DBR1). После сплайсинга пре-микроРНК экспортируется в цитоплазму с помощью комплекса RanGTP – экспортин-5 и разрезается рибонуклеазой Dicer в присутствии кофакторов TRBP (белок, связывающий трансактивирующую РНК) и PACT (белковый активатор интерферон-индуцируемой протеинкиназы) с образованием дуплекса микроРНК. Последний связывается с белками Ago1–4, формируя предшественник РНК-индуцируемого комплекса выключения гена (пре-RISC), после чего пассажирская микроРНК покидает комплекс и разрушается, а в зрелом RISC остается направляющая микроРНК, готовая к связыванию своей мРНК-мишени. (С цветными вариантами рисунков можно ознакомиться в электронной версии статьи на сайте: <http://sciencejournals.ru/journal/biokhsm/>)

Как правило «seed sequence» используется для предсказания мишеней микроРНК, однако в ряде исследований было продемонстрировано, что условие комплементарности «seed sequence» не является достаточным для работы микроРНК – комплементарность 3'-концевой последовательности также важна для работы комплекса RISC [4]. Более того, взаимодействия микроРНК с таргетной мРНК могут контролироваться РНК-связывающими белками, определяя особенности их функционирования в разных типах клеток [15]. Важность участия белков Ago при формировании комплекса микроРНК–RISC также подтверждается их функцией по рекрутированию семейства белков TNRC6A–C [16] (рис. 2).

Долгое время считалось, что микроРНК участвуют только в подавлении экспрессии генов путём деградации их мРНК. Однако за последние несколько лет появилось множество

данных о микроРНК-опосредованной регуляции трансляции, где они могут выступать как в роли ингибиторов, так и коактиваторов трансляции. В частности, недавно появились данные о взаимодействии микроРНК-15а с 3'-НТО фактора инициации трансляции eIF4E с последующим снижением его экспрессии. Для инициации трансляции eIF4E узнает 5'-концевой кэп мРНК и рекрутирует другие факторы, включая eIF4G, eIF2, eIF3, РНК-хеликазу eIF4A, а также малую рибосомную субъединицу 40S, опосредуя поддержание трансляции [17]. Таким образом, микроРНК-15а выступает как репрессор трансляции, нацеливаясь не на мРНК-мишень, а действуя опосредованно, путем подавления экспрессии белков, формирующих трансляционный комплекс. В других исследованиях была показана роль микроРНК как активатора трансляции. Так, микроРНК let-7 в комплексе с белками Ago2 и FXR1 (белок 1, ассоциированный с

синдромом интеллектуальной недостаточности ломкой X-хромосомы) активируют трансляцию во время остановки клеточного цикла в клетках HeLa [18].

В рассмотренных примерах микроРНК регулируют экспрессию генов в цитоплазме как напрямую за счёт деградации мРНК-мишеней, так и опосредованно путём регуляции активности трансляционного комплекса — можно сказать, что эти два механизма дополняют друг друга. Для выявления приоритетного механизма необходимо проведение дальнейших исследований в этой области.

Совсем недавно была обнаружена новая функция микроРНК-1254. Было продемонстрировано, что она взаимодействует с 5'-НТО мРНК белка CCAR1 (белок-регулятор клеточного цикла и апоптоза 1) и ассоциированного с Ago2 микроRISC, стабилизируя этот комплекс, что приводит к увеличению экспрессии CCAR1. Также в этом исследовании было показано, что 5'-НТО CCAR1 может выполнять функцию естественного стабилизатора микроРНК-1254 (наподобие искусственно синтезированных молекул «miRancer», призванных стабилизировать ассоциированные с ними микроРНК). Показано, что такое взаимодействие повторно сенситизирует клетки рака молочной железы (РМЖ) к тамоксифену [19].

Другим необычным явлением оказалось существование микроРНК, обладающей способностью подавлять или активировать трансляцию в зависимости от степени её комплементарности мишени; для обоих процессов необходимо наличие белка Ago. Такого рода микроРНК была обнаружена в лямблиях и получила название микроРНК-3. В лямблиях микроРНК-3 подавляет трансляцию мРНК гистона H2A за счёт не полностью комплементарного спаривания, но увеличивает трансляцию, когда мРНК-мишень полностью комплементарна [20]. На *T. thermophilus* было показано, что наличие некомплементарного спаривания в позициях нуклеотида 10 или 11 в дуплексе микроРНК / мРНК-мишень делает мРНК-мишень устойчивой к расщеплению Ago [21]. Существуют и другие примеры двойной роли микроРНК в различных организмах. МикроРНК могут влиять на уровень мРНК, микро- и рибонуклеопротеинов как напрямую, так и опосредованно, регулируя активность промоторов своих мишеней. Было обнаружено, что микроРНК-369-3 у человека активирует трансляцию мРНК TNF- α во время остановки клеточного цикла, но подавляет её же в пролиферирующих клетках [18]. Все эти данные свидетельствуют о том, что описанные функции микроРНК в цитоплазме многообраз-

ны и выходят за рамки канонических представлений об их роли в организме как негативных регуляторов трансляции.

ФУНКЦИИ микроРНК В ЯДРЕ

Долгое время в литературе, посвящённой изучению биогенеза и функциям микроРНК, существовало утверждение о том, что после завершения биогенеза микроРНК остаются в цитоплазме клетки, однако в 2004 г. Meister et al. обнаружили высокое содержание микроРНК-21 в ядрах клеток линии аденокарциномы HeLa [22]. Чуть позже несколько исследований подтвердили существование зрелых микроРНК не только в цитоплазматической, но и в ядерной фракции. Позднее с помощью РНК-секвенирования были идентифицированы сотни микроРНК в ядрах различных типов клеток. Часть результатов были подтверждены с применением методов Northern blot, RT-qPCR, RT-PCR и *in situ* гибридизации (ISH), которые исключают сигналы предшественников микроРНК [23]. Рассматриваются три возможных механизма ядерной локализации: 1) присутствие сигнала ядерной локализации в последовательности микроРНК, что предопределяет её транспортировку в ядро; 2) существование независимого ядерного биогенеза микроРНК; 3) челночный перенос микроРНК из цитоплазмы в ядро с помощью комплекса RISC [24] (рис. 2).

Механизмы транспорта микроРНК в ядро. Наличие мотивов ядерной локализации было показано для микроРНК-29b и микроРНК семейства let-7 [24]. МикроРНК-29b, относящаяся к семейству микроРНК-29, является одной из наиболее изученных «ядерных» микроРНК. Она отличается от других членов семейства наличием уридина в 10-м положении и AGUGUU-мотива на 3'-конце (позиции 18–23), который отвечает за перемещение микроРНК-29b в ядро. В ядрах клеток эмбриональной клеточной линии C166 были обнаружены две другие микроРНК того же семейства [25]. Результаты исследований показали, что в отличие от микроРНК-29b, микроРНК-29a/c не имеют AGUGGU-мотива на 3'-конце, однако в большей степени локализуются в ядре [25], что позволяет предполагать существование и других механизмов, отвечающих за транспорт микроРНК в ядро клетки.

Кроме того, микроРНК, имеющие мотивы 5'-UUGCAUAGU-3' и 5'-AGGUUGKSUG-3', где К — уридин или гуанин, обнаружены в ядрах клеток эндотелия желточного мешка мыши. Эти последовательности присутствуют в основном в микроРНК семейства let-7 [25]. Более того, при-

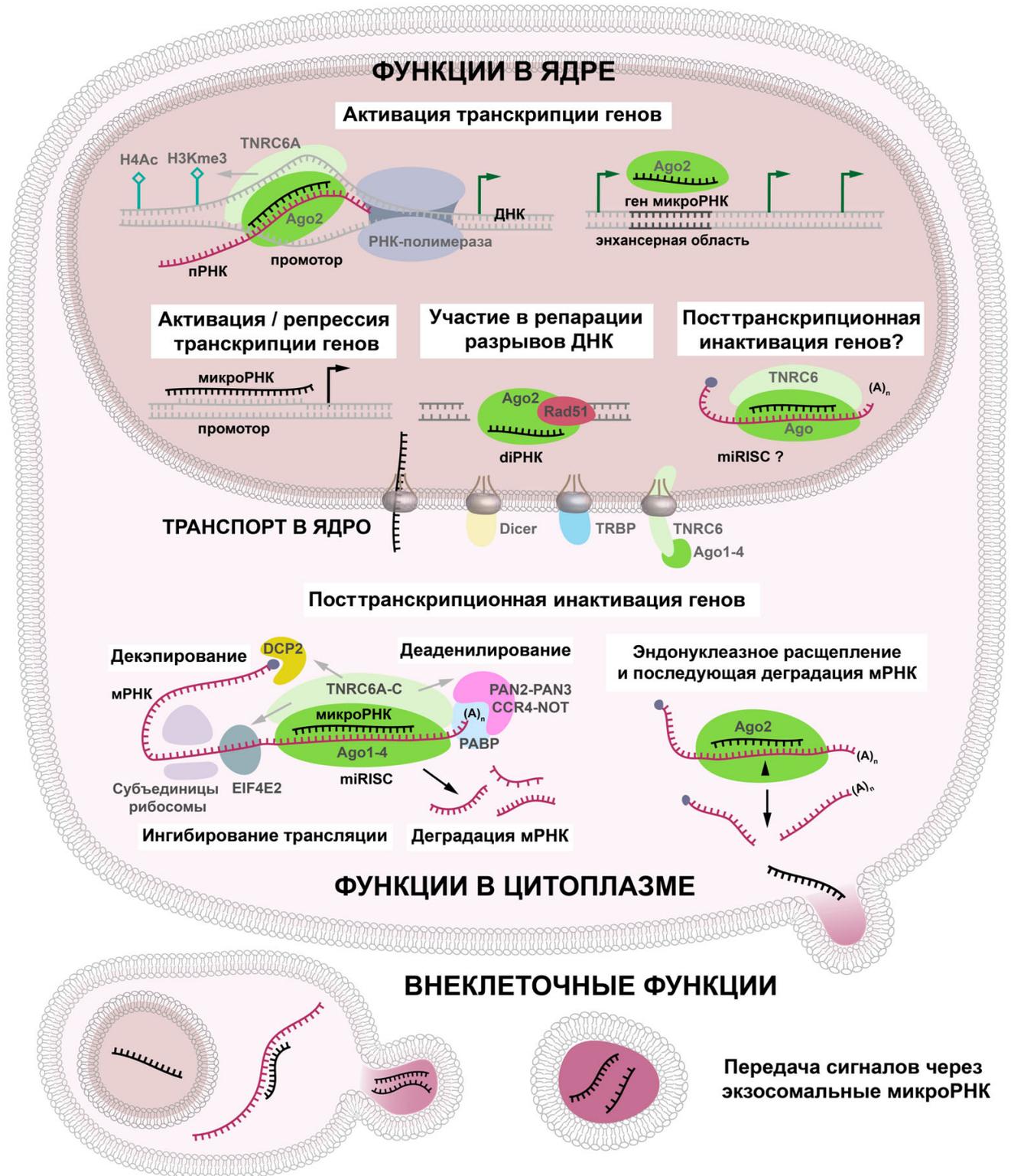


Рис. 2. Функции микроРНК в цитоплазме и ядре клетки, а также внеклеточные функции микроРНК в составе экзосом. Классическая функция микроРНК в цитоплазме клеток, состоящая в инициации деградации мРНК, расширена возможностью микроРНК проникать из цитоплазмы в ядро и участвовать в таких процессах, как активация или репрессия транскрипции генов, участие в репарации двуцепочечных разрывов ДНК, а также, возможно, в посттранскрипционной инактивации генов (ПТИГ). Секретируемые в составе экзосом микроРНК могут осуществлять все эти функции в клетках-реципиентах как непосредственно в зоне высвобождения экзосом, так и транспортируясь с током крови в различные органы и ткани

мерно треть ядерных микроРНК имеет консенсусную последовательность ASUS, где S — гуанин или цитозин. В целом, можно с уверенностью говорить о существовании последовательностей в структуре микроРНК, облегчающих их транспорт в ядро с участием РНК-связывающих белков, однако конкретный механизм и белки, принимающие в нем участие, до сих пор не известны.

Компоненты комплекса RISC, впервые идентифицированные в цитоплазме, такие как Ago1–4, TRBP и TNRC6A, также обнаружены в ядрах клеток млекопитающих [26]. Наличие этих факторов само по себе не является гарантией того, что ядерные микроРНК будут «загружаться» с RISC, так как для формирования функционального комплекса также необходимы белки HSP90, TRAX и TSN, находящиеся исключительно в цитоплазме [27]. Можно предположить, что часть ядерных микроРНК не имеют определенных функций и деградируют в ядре уже после процессинга ферментами Drosha и Dicer [24].

Появляются также данные, свидетельствующие об участии неканонических белков-погрузчиков в формировании комплекса RISC. Одним из кандидатов на эту роль является белок AUF1, который способен связывать микроРНК семейства let-7 и циркулировать между ядром и цитоплазмой [27]. Несмотря на отсутствие ясности относительно того, может ли погрузка микроРНК в ядро происходить в составе RISC, уже появляются данные о том, что компоненты комплекса RISC могут перемещаться между ядром и цитоплазмой, выступая в роли шаттл-белков. Например, такие белки, как экспортин-1 и -5, импортин-8 и кариоферины, опосредуют перемещение белков, несущих классические сигналы ядерной локализации и экспорта через ядерный поровый комплекс [28].

Регуляция экспрессии генов микроРНК в ядре.

В настоящее время известны два механизма регуляции экспрессии генов с помощью микроРНК в ядре: активация и репрессия транскрипции. Одним из способов регуляции транскрипции генов считается связывание микроРНК с промотором этого гена. В 2008 г. Plase et al. продемонстрировали способность микроРНК-373 активировать экспрессию белка CSDC2 (белок C2, содержащий домен холодового шока) и CDH1 (E-кадгерин) путем спаривания микроРНК с промоторами этих генов в линии клеток рака простаты PC-3, однако данные об индукции не подтвердились на другой линии клеток рака простаты (LNCaP); в линии клеток колоректального рака HCT-116 при действии микроРНК-373 наблюдалась индукция только CSDC2 [29], что может указывать на

специфичность наблюдаемых эффектов, зависящих от выбранной линии клеток. Можно также предположить, что эпигенетическое состояние генома влияет на активацию генов при помощи малых РНК. Так, нацеленная на промотор гена E-кадгерина малая двухцепочечная РНК вызывает его индукцию в клетках HeLa, в которых промотор гена E-кадгерина гиперметилирован, что препятствует работе малой двухцепочечной РНК; использование двухцепочечной РНК совместно с деметилирующим агентом вызывает индукцию экспрессии E-кадгерина в клетках HeLa [30]. Кроме того, микроРНК-373 взаимодействует с последовательностями, расположенными в генах *CDH1*, *CSCD2* и *PDE4D* в клетках карциномы молочной железы MCF-7, но не в клетках HeLa [31]. Другая микроРНК-552 ингибирует экспрессию цитохрома человека P450 2E1 (*CYP2E1*), связываясь с промоторной областью гена *CYP2E1* [32]. В целом, все эти данные говорят о том, что одним из механизмов регуляции экспрессии генов-мишеней является прямое взаимодействие микроРНК с целевыми последовательностями в самих генах, а не только канонический путь через связывание с мРНК и индукцию РНК-интерференции в цитоплазме клеток.

К настоящему моменту сложилось понимание того, что компоненты комплекса RISC могут находиться не только в цитоплазме, но и в ядре, что допускает возможность их участия в посттранскрипционной инактивации генов с участием микроРНК в ядре. Возможно также, что предшественники микроРНК или другие эндонуклеарные некодирующие РНК могут деградировать в ядре. В 2013 г. Matsui et al. обнаружили, что микроРНК-589 в комплексе с Ago2 и TNRC6A взаимодействует с промотор-ассоциированной РНК циклооксигеназы-2 (*COX-2*), в результате чего экспрессия фермента увеличивается, однако механизм этого феномена не известен. В то же время при этом взаимодействии индуцируются хроматиновые метки, связанные с активацией генов, такие как H3K4me3 и ацетилирование гистона H4 (H4Ac) [33]. Контроль со стороны ПТИГ также подвергается и длинная некодирующая РНК (*lncRNA*) размером более 200 нуклеотидов, MALAT1 (транскрипт 1, ассоциированный с метастазированием аденокарциномы легкого). MALAT1 связывается с микроРНК-9, что приводит к Ago2-зависимой деградации *lncRNA*. Еще одним примером служит работа MACC1-AS1, являющейся антисмысловой *lncRNA* из шестого интрона гена *MACC*. Основные функции этой *lncRNA* связывают с модулированием клеточной пролифера-

ции и опухолевой прогрессией при РМЖ. Однако связывание MASC1-AS1 с опухолевыми супрессорами микроРНК-384 и микроРНК-145 приводит к увеличению пролиферации клеток за счёт повышения экспрессии мРНК плейотрофина (PTN) и онкогена с-Мус [34].

Последовательности, кодирующие микроРНК, могут быть расположены в энхансерных областях белок-кодирующих генов. В недавнем исследовании было обнаружено, что микроРНК-26a-1, -339, -3179, -24-1 и -24-2 способны индуцировать экспрессию соседних генов. Так, ген микроРНК-26a-1 находится в окружении группы белок-кодирующих генов *ITGA9*, *CTDSPL*, *VILL* и *PLCD1*, и гиперэкспрессия этой микроРНК в линии клеток почечного эпителия HEK293T вызывает транскрипционную активацию двух из них — *ITGA9* и *VILL*, в то время как микроРНК-24-1 увеличивает экспрессию соседних генов, *FBP1* и *FANC* [35]. Более того, в некоторых случаях экспрессия микроРНК необходима для работы энхансеров — при их отсутствии эффект индукции транскрипции генов не наблюдается. Интересно, что для транскрипционной активации соседних генов требуется наличие Ago2 в локусе энхансера, в связи с чем был сделан вывод о том, что сама по себе микроРНК не может индуцировать активацию энхансера, что обуславливает особенности регуляции экспрессии этих генов [35].

МикроРНК могут влиять не только на процессы транскрипции генов, но также участвовать в регуляции факторов альтернативного сплайсинга, которые воздействуют на профили экспрессии различных мРНК [36]. Ярким примером служит управление микроРНК событиями альтернативного сплайсинга в постнатальном развитии сердца путем связывания с ELAV-подобными белками CELF, важными регуляторами стабильности мРНК. CELF связываются с интронами предшественников пре-мРНК в качестве посредников альтернативного сплайсинга: микроРНК-23a и -23b нацелены на мРНК белков CUGBP (CUG-связывающий белок) и CELF (ETR-3-подобный фактор). Эти белки контролируют образование почти половины сплайс-изоформ в эмбриогенезе сердца, что указывает на иерархию, в которой быстрое постнатальное повышение уровня специфических микроРНК контролирует экспрессию альтернативных регуляторов сплайсинга и их нисходящие мишени [36]. Другим примером может быть влияние микроРНК на правильный процессинг экзонов мРНК известными факторами сплайсинга *asd-2*, *hrg-2* и *smi-2*, которые в своей 3'-НТО содержат сайты связывания микроРНК. Причем было обнаружено, что при подавлении

действия микроРНК изменяется паттерн альтернативного сплайсинга соответствующих нижестоящих мишеней этих факторов сплайсинга (*unc-60*, *unc-52*, *lin-10* и *ret-1*, основные регуляторы развития *C. elegans*) [37].

За последние десять лет появилось большое количество данных, свидетельствующих об участии микроРНК в процессе репарации ДНК. Двухцепочечный разрыв (DSB) ДНК инициирует формирование микроРНК [38]. Известно, что эти микроРНК образуются из фланкирующих областей DSB-сайтов и подвергаются обработке Dicer. Такие микроРНК получили название DSB-индуцированные малые РНК (diRNA). В комплексе с Ago2 они транспортируются к DSB-сайтам, где Ago2 функционирует в роли адаптера и рекрутирует RAD51 — ключевой эукариотический фактор репарации ДНК [38]. Различные модификации ДНК, такие как окисление, метилирование, алкилирование и замена тимина на урацил, приводят к спонтанным повреждениям ДНК. Для ее защиты клетки используют механизм эксцизионной репарации оснований (base excision repair, BER). В процессе работы ферментов BER происходит специфическое узнавание этих повреждений и репарация ДНК. Некоторые микроРНК участвуют в регуляции компонентов BER. МикроРНК-16, -34c и -199a могут связываться с 3'-НТО урацил-ДНК-гликозилазы (UNG2), которая обеспечивает удаление урацила из ДНК в клетках опухоли [39]. Другим наглядным примером служит регулирование принимающей участие в репарации ДНК-полимеразы β (Pol β) с помощью микроРНК-499, которая также связывается с 3'-НТО мРНК Pol β и активирует ее деградацию [40].

В 2011 г. группа ученых из Китая обнаружила еще одну функцию, которую микроРНК выполняет в ядре — связывание с при-микроРНК. Так, было показано, что микроРНК-709 может связываться с при-микроРНК-15a и -16-1, ингибируя их дальнейший биогенез, что говорит о совершенно уникальной роли микроРНК в регуляции экспрессии генов [41]. Таким образом, диапазон действий микроРНК на сегодняшний день активно дополняется рядом их «ядерных» функций, в число которых входит активация/репрессия транскрипции, альтернативный сплайсинг и репарация ДНК.

ВНЕКЛЕТОЧНЫЕ микроРНК И ИХ ФУНКЦИИ В СОСТАВЕ ЭКЗОСОМ

В многочисленных исследованиях было показано, что микроРНК способны высвобож-

даться во внеклеточную среду и быть использованы в качестве биомаркеров при различных патологиях [42]. Внеклеточные микроРНК имеют высокую стабильность: они не подвергаются деградации при комнатной температуре в течение нескольких дней, в том числе при неблагоприятных условиях (таких как сильное изменение температуры и пребывание в среде с высоким или низким рН) [43]. На данный момент известно о существовании двух типов микроРНК во внеклеточном пространстве: одни присутствуют в везикулах, таких как экзосомы, микро-везикулы и апоптотические тельца, а другие – в растворимом виде в комплексе с белками, в частности с Ago2 [44]. Липопротеиды высокой плотности (ЛПВП) [45] и нуклеофосмин 1 (NPM1) [46] также являются молекулами, связывающими внеклеточные микроРНК. Нахождение микроРНК в комплексах необходимо для поддержания их стабильности и защиты во внеклеточной среде и в крови.

Экзосомы представляют собой внеклеточные везикулы диаметром 30–150 нм, секретируемые различными типами клеток и содержащие огромное количество различных соединений, в частности белков и нуклеиновых кислот [47]. Наиболее подробно состав экзосом описан в базе данных ExoCarta (<http://www.exocarta.org/>). Попадание микроРНК в экзосомы происходит под контролем белков hnRNPA2B1 и hnRNPA1, которые узнают специфические мотивы микроРНК. Описано также присутствие Ago2 совместно с микроРНК. Одним из механизмов экспорта экзосомальных микроРНК во внеклеточную среду является церамид-зависимый механизм: ингибирование nSMase 2 (нейтральной сфингомиелиназы 2), которая участвует в био-

синтезе церамида, снижает секрецию экзосом и высвобождение экзосомальных микроРНК во внеклеточную среду [48]. Вышеописанные механизмы сортировки экзосомальных микроРНК позволяют считать, что их экзоцитоз в целом является регулируемым процессом. Однако в определенных случаях (повреждение или гибель клеток) высокие концентрации микроРНК в составе экзосом считаются побочными клеточными продуктами.

В настоящее время механизмы поглощения экзосомальных микроРНК клетками изучены недостаточно. Существуют различные гипотезы о путях проникновения микроРНК в клетки. Считается, что микроРНК в составе экзосом оказываются внутри клеток путем эндоцитоза, фагоцитоза, микропиноцитоза или прямого слияния с плазматической мембраной [49]. В свою очередь, микроРНК вне экзосом могут проникать в клетку с помощью специфических рецепторов [49].

За последние несколько лет накоплены данные о внеклеточных микроРНК, выступающих в роли сигнальных молекул и выполняющих определенные функции в клетках-реципиентах как в норме (табл. 1), так и при различных патологиях. Особо следует отметить роль микроРНК в составе внеклеточных везикул в развитии и прогрессии различных типов злокачественных новообразований. После высвобождения опухолевыми клетками содержащих микроРНК экзосом происходит их поглощение клетками-реципиентами. В результате микроРНК оказываются внутри клеток и могут влиять на рост опухоли, стимулировать/ингибировать инвазию, метастазирование и опухолевый неангиогенез. Помимо влияния на клетки-реципиенты, микроРНК в составе экзосом могут изменять мик-

Таблица 1. Функции некоторых микроРНК при физиологических состояниях

Тип микроРНК	Процесс	Биообъекты, источники микроРНК	Дата публикации
МикроРНК-21-3p	стимуляция пролиферации и миграции фибробластов, индукция процессов ангиогенеза в эндотелиальных клетках	пуповинная кровь	2018 [50]
МикроРНК-214	стимуляция миграции, ангиогенеза в линии клеток HMEC-1	клеточная линия HMEC-1	2013 [51]
МикроРНК-335	подавление трансляции мРНК SOX-4 в антигенпрезентирующих клетках (APC), стимуляция иммунной системы	T-лимфоциты	2011 [52]
МикроРНК-143/145	стимуляция атеропротективных свойств в гладкомышечных клетках (SMS)	HUVECs	2012 [53]
МикроРНК-21	стимуляция регенерации аксонов периферических нервов	репаративные Шванновские клетки (rSC)	2020 [54]

Примечание. В квадратных скобках приведены ссылки на соответствующие публикации.

роокружение опухоли путем воздействия на внеклеточный матрикс, активацию и привлечение клеток иммунной системы [50–54].

В последнее время появляются данные о том, что мезенхимальные стромальные клетки (МСК) являются активными продуцентами микроРНК, в том числе в составе их секрета. В значительной степени эти микроРНК выполняют функцию противовоспалительных и антифибротических посредников, а также способны стимулировать рост сосудов и нервов при регенерации ткани [55]. Тем не менее обнаруженная в составе секрета МСК «антиангиогенная» микроРНК-92а [56, 57] указывает на гетерогенность популяции МСК, а также двойную функцию конкретной микроРНК [58]. В доказательство этого есть данные о том, что эффекты микроРНК-92а могут зависеть от выбранной линии клеток, условий эксперимента, клеточного микроокружения и пр. [58], а феномен гетерогенности популяции МСК был показан нашими коллегами на примере микроРНК-29с и микроРНК-21 в составе внеклеточных везикул, ассоциированных с фиброзом [59], хотя одним из хорошо описанных свойств секрета МСК является как раз подавление фиброза [60].

Обобщая данные, можно сказать, что приоритет исследователей, изучающих микроРНК, лежит в области идентификации и выявления их функций в клетках. В то же время работ по изучению механизмов доставки и поглощения клетками-реципиентами достаточно мало. Дополнительные исследования в этом направлении раскроют новый потенциал экзосомальных микроРНК в прикладном значении.

МИКРОРНК КАК ОНКОСУПРЕССОРЫ В ПРОГРЕССИИ И МЕТАСТАЗИРОВАНИИ РАКА

На сегодняшний день почти все исследования, связанные с микроРНК, основаны на сравнении профилей экспрессии микроРНК в аберрантных и нормальных клетках. Такой подход используется и при изучении функции микроРНК в патогенезе рака, что в результате дает информацию о ранее неизвестных микроРНК, которые могут выступать в качестве онкосупрессоров или онкогенов [5]. МикроРНК-супрессоры опухолей обычно предотвращают развитие опухоли, ингибируя онкогены и/или гены, контролирующие клеточную дифференцировку и апоптоз. Ниже на примере нескольких хорошо изученных микроРНК будут рассмотрены молекулярные механизмы онкосупрессивных свойств микроРНК, влияющих на инвазию

и метастазирование, эпителиально-мезенхимальный переход, а также пролиферацию и дифференцировку клеток опухоли.

При исследовании роли микроРНК-532-3р в развитии рака простаты было установлено, что её гиперэкспрессия *in vitro* подавляет инвазию и миграцию клеток рака простаты РС-3 за счёт прямого ингибирования экспрессии факторов транскрипции TRAF1/2/4 и снижения активности транскрипционного фактора NF-κB. Гиперэкспрессия микроРНК-532-3р *in vivo* ингибирует способность клеток РС-3 к метастазированию в костную ткань по сравнению с клетками контрольной группы [61]. Подобный механизм описан также для микроРНК-3664-5р и -145-5р, которые подавляют прогрессию опухоли, связываясь с посредниками NF-κB сигнального пути и инактивируя его, что в конечном счёте тормозит инвазию, миграцию и метастазирование опухолевых клеток различного происхождения [62, 63].

Другим хорошо описанным способом, с помощью которого микроРНК могут контролировать рост и метастазирование опухоли, является подавление эпителиально-мезенхимального перехода (ЭМП), играющего одну из ведущих ролей в канцерогенезе, запуская метастазирование и поддерживая химиорезистентность клеток опухоли. На примере подавления экспрессии микроРНК-2392 была показана её функция по сдерживанию инвазии, миграции и метастазирования клеток рака желудка *in vitro* и *in vivo*. Мишенями этой микроРНК служат гены *MAML3* и *WHSC1* и их нисходящие мишени *Slug* и *Twist1* соответственно, которые являются транскрипционными репрессорами гена *CDH1*, экспрессия которого поддерживает эпителиальный фенотип опухолевых клеток и препятствует появлению в них мезенхимальных маркеров, свойственных мигрирующим клеткам [64]. Такая особенность микроРНК-2392 ингибировать процесс ЭМП позволяет рассматривать её как перспективную мишень в лечении высокометастатической аденокарциномы желудка. Ещё одним онкосупрессором, подавляющим ЭМП, вероятно, является микроРНК-143-5р. Используя подход подавления экспрессии микроРНК, была показана её способность снижать экспрессию факторов *HIF-1α* и *Twist1*, а также ингибировать ЭМП в клетках рака желчного пузыря [65].

Нарушение сигнального пути Wnt/β-катенина/TCF в клетках опухоли может быть причиной её гиперпролиферации, дедифференцировки и химиорезистентности [66]. В одной из недавних работ была показана способность микроРНК-148а в клетках рака поджелудочной железы PANC-1 *in vitro* и *in vivo* подавлять Wnt/β-катенин-опосредованную пролифера-

цию и инвазию, а также инициировать апоптоз путём индукции онкосупрессора *MEG-3* (maternally expressed gene-3) [67]. Ещё одной микроРНК, способной влиять на сигнальный путь Wnt/ β -катенина, а также ЭМП, функционируя как опухолевый супрессор, является микроРНК-506. Подавляя экспрессию гомеобоксного белка LHX2 и фактора транскрипции TCF4, а также снижая активность Wnt/ β -катенина и фактора транскрипции Twist на ксенографтной модели, была показана способность гиперэкспрессии микроРНК-506 *in vivo* запускать апоптоз и подавлять метастазирование клеток рака носоглотки в лимфатических узлы; лабораторные результаты, полученные экспериментальным путём, проходят дальнейшую проверку в клинических образцах [68].

Несмотря на то что онкосупрессивные свойства микроРНК привлекают онкологов в качестве потенциального терапевтического подхода, требуется более тщательное их изучение. Настораживает, в частности, пример микроРНК-532-3р, которая может быть онкосупрессором при раке простаты [61], но высокая экспрессия которой способствует прогрессии аденокарциномы лёгких, т.е. она работает в качестве онкогена [69]. Подробно функции микроРНК как онкогенов рассмотрены ниже.

МИКРОРНК КАК ОНКОГЕНЫ В ПРОГРЕССИИ И МЕТАСТАЗИРОВАНИИ РАКА

МикроРНК, экспрессия которых повышена в опухолях, могут рассматриваться как онкогены, способствующие прогрессированию и метастазированию опухоли, ингибируя гены-супрессоры опухоли и/или гены, контролирующие клеточную дифференцировку или апоптоз. В 2009 г. для обозначения микроРНК, ассоциированных с метастазами, был предложен термин *metastamiR* [70], с тех пор микроРНК в метастазировании активно исследуются. Метастазирование является этапом опухолевой прогрессии, характеризующим негативное течение онкологических заболеваний. Это сложный многоступенчатый процесс, который включает в себя распространение клеток опухоли из первичного узла в окружающую строму (инвазия), кровь или лимфу и отдаленные органы и ткани. В таблице 2 суммированы функции наиболее известных микроРНК, имеющих отношение к прогрессии опухоли.

Опухолевые клетки являются активными продуцентами внеклеточных везикул с микроРНК в их составе, с помощью которых они

могут «обмениваться» информацией с окружающей опухоль стромой [98]. Процессу инвазии предшествует ремоделирование опухолевой ниши, разрушение структурных белков и межклеточных контактов, что облегчает проникновение опухолевых клеток в сосудистое русло. Было показано, что высокометастатические клетки РМЖ в составе экзосом высвобождают микроРНК-105, которая снижает экспрессию белка плотных контактов ZO-1 в эндотелиальных клетках, нарушая барьерную функцию и облегчая инвазию клеток опухоли сквозь стенку сосуда [71]. Стимуляция опухолевого неоангиогенеза также напрямую связана с ростом опухолевого узла и его метастазированием. Было показано, что нейтральная сфингомиелиназа *nSMase2* в составе экзосом эндотелиальных клеток HUVECs регулирует экспрессию микроРНК-210 в клетках РМЖ; в свою очередь, экзосомальная микроРНК-210 стимулирует ангиогенез и метастазирование за счёт влияния на экспрессию *Ephrin-A3* [72].

Другим характерным признаком опухолевой прогрессии является изменение метаболизма глюкозы не только в опухолевых клетках, но и метастатических нишах. В исследовании Fong et al. было продемонстрировано действие микроРНК-122, выделенной в составе экзосом опухолевых клеток РМЖ, на нормальные лёгочные фибробласты и астроциты – клетки, типичные для мест метастазирования при РМЖ. В частности, под влиянием «опухолевых» экзосом авторами было обнаружено снижение экспрессии гликолитического фермента пируваткиназы в нормальных клетках как *in vitro*, так и *in vivo* [73]. Данное перепрограммирование системного метаболизма может приводить к большей доступности глюкозы для опухолевых клеток, способствовать опухолевой прогрессии и формированию благоприятной среды в метастатической нише.

При раке предстательной железы наиболее часто наблюдаются метастазы в костную ткань и разрушение остеобластов, однако механизм такого «направленного» метастазирования в костную ткань и избирательного поражения остеобластов не известен. Было показано, что микроРНК-940 в составе экзосом опухолевых клеток стимулирует остеогенную дифференцировку МСК человека *in vitro*, и индуцирует образование обширных остеобластических и остеолитических метастазов *in vivo* у мышей [78]. Тот факт, что МСК являются резидентами костной ткани и могут дифференцироваться в остеогенном направлении, свидетельствует в пользу того, что микроРНК клеток опухоли перепрограммируют метастатическую нишу, формируя в ней благо-

Таблица 2. МикроРНК, вовлеченные в процессы онкогенеза и метастазирования различных типов рака

МикроРНК	Клеточная мишень	Процесс, регулируемый микроРНК	Тип рака	Дата публикации
МикроРНК-105	ZO 1	нарушение барьерной функции эндотелия	рак молочной железы	2014 [71]
МикроРНК-210	Ephrin-A3	ангиогенез		2013 [72]
МикроРНК-122	PKM	изменение метаболизма глюкозы		2015 [73]
Семейство микроРНК-200	Zeb1 Zeb2	активация МЭП		2014 [74]
МикроРНК-615-3p	PICK1	активация ЭМП		2020 [75]
МикроРНК-222	LBR	стимуляция инвазии и миграции		2019 [76]
МикроРНК-665	NR4A3	активация ЭМП инвазия		2019 [77]
МикроРНК-940	ARHGAP1 FAM134A	индукция остеобластических поражений	рак предстательной железы	2018 [78]
МикроРНК-21	TLR7	индукция секреции провоспалительных цитокинов	рак лёгкого	2012 [79]
МикроРНК-29a	TLR8	индукция секреции провоспалительных цитокинов		2012 [79]
МикроРНК-26a-5p	ITGβ8	миграция инвазия		2018 [80]
МикроРНК-214	SUFU	активация ЭМП		2018 [81]
МикроРНК-490-3p	PCBP1	активация ЭМП миграция инвазия		2016 [82]
МикроРНК-1247-3p	B4GALT3	индукция секреции провоспалительных цитокинов	рак печени	2018 [83]
МикроРНК-190	PHLPP1	активация ЭМП		2018 [84]
МикроРНК-92a-3p	PTEN	активация ЭМП		2020 [85]
МикроРНК-135a	GSK3β	активация ЭМП	рак мочевого пузыря	2018 [86]
МикроРНК-221	STMN1	активация ЭМП		2015 [87]
МикроРНК-301b	EGR1	активация ЭМП		2017 [88]
МикроРНК-301a	SOCS5	ангиогенез усиление миграции опухолевых клеток	рак поджелудочной железы	2020 [89]
МикроРНК-196a-5p	IκBα	активация ЭМП миграция инвазия	рак кишечника	2019 [90]
МикроРНК-188-5p	PTEN	миграция инвазия	рак желудка	2019 [91]
МикроРНК-187	FOXA2	миграция инвазия		2017 [92]
МикроРНК-155-5p	TP53INP1	миграция инвазия	рак шейки матки	2019 [93]

Окончание таблицы 2

МикроРНК	Клеточная мишень	Процесс, регулируемый микроРНК	Тип рака	Дата публикации
МикроРНК-652	RORA	миграция инвазия	рак эндометрия	2018 [94]
МикроРНК-590-3р	FOXA2	миграция инвазия	рак яичников	2018 [95]
МикроРНК-504	TP53INP1	миграция инвазия	рак костей	2017 [96]
МикроРНК-144-3р	ARID1A	миграция инвазия	рак почек	2017 [97]

Примечание. В квадратных скобках приведены ссылки на соответствующие публикации.

приятную среду для формирования вторичного опухолевого узла.

Секреция провоспалительных цитокинов клетками опухоли также может изменять опухолевое микроокружение, стимулируя рост и инвазию клеток опухоли. Показано, что связывание микроРНК-21 и микроРНК-29а, полученных из экзосом линий клеток опухоли лёгкого А-549 и SK-MES, с Toll-подобными рецепторами 8 и 7 (TLR8, TLR7) приводит к активации этих рецепторов в иммунных клетках. В результате чего инициируется фактор транскрипции NF-κB и запускается секреция цитокинов, которые далее могут активировать микроокружение опухоли, способствовать инвазии опухолевых клеток и появлению вторичных очагов опухолевого роста [79]. В другом исследовании было показано, что клетки высокометастатической гепатоклеточной карциномы в составе экзосом секретируют микроРНК-1247-3р, которая непосредственно нацелена на ген *B4GALT3*, приводящий к активации β1-интегрин/NF-κB сигнального пути в фибробластах, которые перепрограммируются в реактивные, т.н. опухоль-ассоциированные фибробласты. Такие клетки дополнительно способствуют прогрессированию заболевания, секретируя провоспалительные цитокины IL-6 и IL-8 и формируя реактивное опухолевое микроокружение [83].

Способность опухолевых клеток к метастазированию служит предиктором, определяющим неблагоприятный онкологический прогноз, т.к. одним из параметров диагностики является оценка инвазивного статуса первичного опухолевого узла. На примере микроРНК-188-5р была показана способность микроРНК провоцировать метастазирование линий клеток рака желудка AGS и MGC803, усиливая их инвазивные способности и увеличивая число метастазов в легкие [91].

Известно, что в сыворотке крови онкологических пациентов с подтвержденными метастазами повышается уровень микроРНК-200, регулирующей ЭМП [99]. Семейство микроРНК-200 включает, в частности, микроРНК-200а, -200b, -200с, -429, -141. Основной их функцией является подавление ЭМП и запуск обратного, мезенхимально-эпителиального перехода, МЭП. Механизмом этого процесса является прямое связывание микроРНК-200 с транскрипционными факторами *Zeb1/2* и их ингибирование, а также дальнейшая репрессия многих мезенхимальных генов [99]. Исследования Lee et al. *in vitro* показали, что экзосомальная микроРНК-200, выделенная из клеточной линии высокометастатического РМЖ, поглощается клетками неметастатической линии опухолевых клеток молочной железы, что приводит к изменению экспрессии генов в них и активации МЭП [74]. В наших исследованиях было обнаружено, что при выключении гена *uPAR* в клетках нейробластомы Neuro2a происходит повышение экспрессии микроРНК-34с-5р и снижение экспрессии микроРНК-141-3р, -28а-5р, -291-3р и -295-5р. Используя методы биоинформатического анализа, мы выявили кластеры генов-мишеней указанных микроРНК и определили среди них группы генов, ответственных за ЭМП (*Snai1*, *Zeb2*), индукцию апоптоза (*Bcl6*, *p21*), пролиферацию (*Af1*), адгезию и миграцию клеток (*CD93*, *ITGAV*), а также участвующих в биогенезе экзосом (*TSPAN2*, *TSPAN11*, *Rab11b*, *Rab21*) [100].

Совместно приведенные данные свидетельствуют в пользу того, что способность опухоли к метастазированию и формированию вторичных очагов опухолевого роста может быть приобретена посредством секреции везикул, содержащих микроРНК, способных выступать в роли гуморальных посредников, регулирующих меж-

клеточные коммуникации, ремоделирование внеклеточного матрикса и перепрограммирование премеастатической ниши при метастазировании.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Известно, что в процессах онкогенеза и метастазирования опухолевые клетки могут паракринно оказывать эффекты далеко за пределами их непосредственного микроокружения за счёт продукции внеклеточных везикул и входящих в их состав белков, микроРНК, рецепторов и их сигнальных посредников. Входящие в состав внеклеточных везикул микроРНК могут быть маркерами химиорезистентности опухоли и активного фиброза окружающей опухоль ткани. В этой связи использование микроРНК с целью диагностики и в качестве мишеней для терапевтического воздействия существенно расширяет арсенал имеющихся подходов в онкологии, т.к. использование экзосом с микроРНК лишено побочных эффектов и ограничений клеточных технологий.

Хочется отдельно подчеркнуть, что биоинформатические методы поиска мишеней микроРНК основываются на выявлении комплементарных им последовательностей в составе 3'-НТО мРНК-мишени, значительно ускоряя и упрощая задачу. Подходы, основанные на анализе прямого взаимодействия микроРНК с целевыми последовательностями в самих генах или даже с белками, используются редко. Большие надежды возлагают на идентификацию рецепторов микроРНК, которые, как предполагается, и будут определять эндоцитоз микроРНК и специфичность вызываемых ими эффектов в клетках-мишенях. На примере хорошо изучен-

ной микроРНК let-7i уже показаны не только её «классические» функции регуляции экспрессии генов, сдерживания инвазии клеток опухоли, но и уникальная способность работать как лиганд Toll-подобных рецепторов [101], активируя специфическую TLR-зависимую сигнализацию. Учитывая важную роль этих рецепторов в формировании противоопухолевого иммунитета, можно предположить, что использование let-7i в составе экзосом может стать эффективным противоопухолевым методом лечения.

Обобщая имеющиеся данные об экспрессии и функционировании микроРНК в составе экзосом, можно сказать, что они обладают свойствами гуморальных посредников при онкогенезе. Возможно, они не только отражают характер онкогенеза в первичном очаге, но также способны к активному перепрограммированию клеток в составе метастатической ниши. В этой связи использование подходов, сдерживающих синтез онкогенных микроРНК, или использование антисмысловых последовательностей будет актуальным как для подавления роста первичной опухоли и блокирования её инвазии/метастазирования, так и для препятствования формированию вторичных опухолевых узлов.

Финансирование. Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (грант РФФИ № 20-015-00186).

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

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

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Lee, R. C., Feinbaum, R. L., and Ambros, V. (1993) The *C. elegans* heterochronic gene *lin-4* encodes small RNAs with antisense complementarity to *lin-14*, *Cell*, **75**, 843-854, doi: 10.1016/0092-8674(93)90529-Y.
- Slack, F. J., Basson, M., Liu, Z. C., Ambros, V., Horvitz, H. R., and Ruvkun, G. (2000) The *lin-41* RBCC gene acts in the *C. elegans* heterochronic pathway between the *let-7* regulatory RNA and the *LIN-29* transcription factor, *Mol. Cell*, **5**, 659-669, doi: 10.1016/s1097-2765(00)80245-2.
- Pasquinelli, A. E., Reinhart, B. J., Slack, F., Martindale, M. Q., Kuroda, M. I., et al. (2000) Conservation of the sequence and temporal expression of *let-7* heterochronic regulatory RNA, *Nature*, **408**, 86-89, doi: 10.1038/35040556.
- Broughton, J. P., Lovci, M. T., Huang, J. L., Yeo, G. W., and Pasquinelli, A. E. (2016) Pairing beyond the seed supports microRNA targeting specificity, *Mol Cell*, **64**, 320-333, doi: 10.1016/j.molcel.2016.09.004.
- Zacharias, F., George, D., Michail, D., Ioannis, P., Marianna, T., et al. (2020) MicroRNAs determining carcinogenesis by regulating oncogenes and tumor suppressor genes during cell cycle, *MicroRNA*, **9**, 82-92, doi: 10.2174/2211536608666190919161849.
- Lee, Y., Kim, M., Han, J., Yeom, K.-H., Lee, S., et al. (2004) MicroRNA genes are transcribed by RNA polymerase II, *EMBO J.*, **23**, 4051-4060, doi: 10.1038/sj.emboj.7600385.
- Berezikov, E., Chung, W.-J., Willis, J., Cuppen, E., and Lai, E. C. (2007) Mammalian mirtron genes, *Mol. Cell*, **28**, 328-336, doi: 10.1016/j.molcel.2007.09.028.
- Ruby, J. G., Jan, C. H., and Bartel, D. P. (2007) Intronic microRNA precursors that bypass Drosha processing, *Nature*, **448**, 83-86, doi: 10.1038/nature05983.

9. Rorbach, G., Unold, O., and Konopka, B. M. (2018) Distinguishing mirtrons from canonical miRNAs with data exploration and machine learning methods, *Sci. Rep.*, **8**, doi: 10.1038/s41598-018-25578-3.
10. Cifuentes, D., Xue, H., Taylor, D. W., Patnode, H., Mishima, Y., et al. (2010) A Novel miRNA processing pathway independent of dicer requires argonaute2 catalytic activity, *Science*, **328**, 1694-1698, doi: 10.1126/science.1190809.
11. Huntzinger, E., and Izaurralde, E. (2011) Gene silencing by microRNAs: contributions of translational repression and mRNA decay, *Nat. Rev. Genet.*, **12**, 99-110, doi: 10.1038/nrg2936.
12. Kehl, T., Backes, C., Kern, F., Fehlmann, T., Ludwig, N., et al. (2017) About miRNAs, miRNA seeds, target genes and target pathways, *Oncotarget*, **8**, 107167-107175, doi: 10.18632/oncotarget.22363.
13. Kawamata, T., and Tomari, Y. (2010) Making RISC, *Trends Biochem. Sci.*, **35**, 368-376, doi: 10.1016/j.tibs.2010.03.009.
14. Lewis, B. P., Burge, C. B., and Bartel, D. P. (2005) Conserved Seed Pairing, often flanked by adenosines, indicates that thousands of human genes are microRNA targets, *Cell*, **120**, 15-20, doi: 10.1016/j.cell.2004.12.035.
15. Nussbacher, J. K., and Yeo, G. W. (2018) Systematic discovery of RNA binding proteins that regulate microRNA levels, *Mol. Cell*, **69**, 1005-1016.e7, doi: 10.1016/j.molcel.2018.02.012.
16. Behm-Ansmant, I., Rehwinkel, J., Doerks, T., Stark, A., Bork, P., and Izaurralde, E. (2006) mRNA degradation by miRNAs and GW182 requires both CCR4: NOT deadenylase and DCP1:DCP2 decapping complexes, *Genes Dev.*, **20**, 1885-1898, doi: 10.1101/gad.1424106.
17. Gingras, A.-C., Raught, B., and Sonenberg, N. (1999) eIF4 initiation factors: effectors of mRNA recruitment to ribosomes and regulators of translation, *Ann. Rev. Biochem.*, **68**, 913-963, doi: 10.1146/annurev.biochem.68.1.913.
18. Vasudevan, S., Tong, Y., and Steitz, J. A. (2007) Switching from repression to activation: microRNAs can up-regulate translation, *Science*, **318**, 1931-1934, doi: 10.1126/science.1149460.
19. Li, G., Wu, X., Qian, W., Cai, H., Sun, X., et al. (2016) CCAR1 5' UTR as a natural miRancer of miR-1254 overrides tamoxifen resistance, *Cell Res.*, **26**, 655-673, doi: 10.1038/cr.2016.32.
20. Saraiya, A. A., Li, W., and Wang, C. C. (2013) Transition of a microRNA from repressing to activating translation depending on the extent of base pairing with the target, *PLoS One*, **8**, e55672, doi: 10.1371/journal.pone.0055672.
21. Wang, Y., Juranek, S., Li, H., Sheng, G., Tuschl, T., and Patel, D. J. (2008) Structure of an argonaute silencing complex with a seed-containing guide DNA and target RNA duplex, *Nature*, **456**, 921-926, doi: 10.1038/nature07666.
22. Meister, G., Landthaler, M., Patkaniowska, A., Dorsett, Y., Teng, G., and Tuschl, T. (2004) Human Argonaute2 mediates RNA cleavage targeted by miRNAs and siRNAs, *Mol. Cell*, **15**, 185-197, doi: 10.1016/j.molcel.2004.07.007.
23. Wong, J. J., Ritchie, W., Gao, D., Lau, K. A., Gonzalez, M., et al. (2014) Identification of nuclear-enriched miRNAs during mouse granulopoiesis, *J. Hematol. Oncol.*, **7**, 42, doi: 10.1186/1756-8722-7-42.
24. Stavast, C. J., and Erkeland, S. J. (2019) The non-canonical aspects of microRNAs: many roads to gene regulation, *Cells*, **8**, 1465, doi: 10.3390/cells8111465.
25. Turunen, T. A., Roberts, T. C., Laitinen, P., Väänänen, M.-A., Korhonen, P., et al. (2019) Changes in nuclear and cytoplasmic microRNA distribution in response to hypoxic stress, *Sci. Rep.*, **9**, doi: 10.1038/s41598-019-46841-1.
26. Sarshad, A. A., Juan, A. H., Muler, A. I. C., Anastasakis, D. G., Wang, X., et al. (2018) Argonaute-miRNA complexes silence target mRNAs in the nucleus of mammalian stem cells, *Mol. Cell*, **71**, 1040-1050.e8, doi: 10.1016/j.molcel.2018.07.020.
27. Yoon, J.-H., Jo, M. H., White, E. J. F., De, S., Hafner, M., et al. (2015) AUF1 promotes let-7b loading on Argonaute 2, *Genes Dev.*, **29**, 1599-1604, doi: 10.1101/gad.263749.115.
28. Schraivogel, D., Schindler, S. G., Danner, J., Kremmer, E., Pfaff, J., et al. (2015) Importin- β facilitates nuclear import of human GW proteins and balances cytoplasmic gene silencing protein levels, *Nucleic Acids Res.*, **43**, 7447-7461, doi: 10.1093/nar/gkv705.
29. Place, R. F., Li, L.-C., Pookot, D., Noonan, E. J., and Dahiya, R. (2008) MicroRNA-373 induces expression of genes with complementary promoter sequences, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **105**, 1608-1613, doi: 10.1073/pnas.0707594105.
30. Li, L.-C., Okino, S. T., Zhao, H., Pookot, D., Place, R. F., et al. (2006) Small dsRNAs induce transcriptional activation in human cells, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **103**, 17337-17342, doi: 10.1073/pnas.0607015103.
31. Xun, Y., Tang, Y., Hu, L., Xiao, H., Long, S., et al. (2019) Purification and identification of miRNA target sites in genome using DNA affinity precipitation, *Front. Genet.*, **10**, doi: 10.3389/fgene.2019.00778.
32. Miao, L., Yao, H., Li, C., Pu, M., Yao, X., et al. (2016) A dual inhibition: microRNA-552 suppresses both transcription and translation of cytochrome P450 2E1, *Biochim. Biophys. Acta Gene Regul. Mechanisms*, **1859**, 650-662, doi: 10.1016/j.bbagr.2016.02.016.
33. Matsui, M., Chu, Y., Zhang, H., Gagnon, K. T., Shaikh, S., et al. (2013) Promoter RNA links transcriptional regulation of inflammatory pathway genes, *Nucleic Acids Res.*, **41**, 10086-10109, doi: 10.1093/nar/gkt777.
34. Zhang, X., Zhou, Y., Chen, S., Li, W., Chen, W., and Gu, W. (2019) LncRNA MACC1-AS1 sponges multiple miRNAs and RNA-binding protein PTBP1, *Oncogenesis*, **8**, doi: 10.1038/s41389-019-0182-7.
35. Xiao, M., Li, J., Li, W., Wang, Y., Wu, F., et al. (2016) MicroRNAs activate gene transcription epigenetically as an enhancer trigger, *RNA Biol.*, **14**, 1326-1334, doi: 10.1080/15476286.2015.1112487.
36. Kalsotra, A., Wang, K., Li, P. F., and Cooper, T. A. (2010) MicroRNAs coordinate an alternative splicing network during mouse postnatal heart development, *Genes Dev.*, **24**, 653-658, doi: 10.1101/gad.1894310.
37. Kotagama, K., Schorr, A. L., Steber, H. S., and Mangone, M. (2018) MiRNA activity contributes to accurate RNA splicing in *C. elegans* intestine and body muscle tissues, *bioRxiv*, doi: 10.1101/479832.
38. Gao, M., Wei, W., Li, M.-M., Wu, Y.-S., Ba, Z., et al. (2014) Ago2 facilitates Rad51 recruitment and DNA double-strand break repair by homologous recombination, *Cell Res.*, **24**, 532-541, doi: 10.1038/cr.2014.36.
39. Hegre, S. A., Sætrom, P., Aas, P. A., Pettersen, H. S., Otterlei, M., and Krokan, H. E. (2013) Multiple microRNAs may regulate the DNA repair enzyme uracil-DNA glycosylase, *DNA Rep.*, **12**, 80-86, doi: 10.1016/j.dnarep.2012.10.007.
40. Wang, Y., Feng, J., Zang, W., Du, Y., Chen, X., et al. (2015) MiR-499 enhances the cisplatin sensitivity of esophageal carcinoma cell lines by targeting DNA polymerase β , *Cell. Physiol. Biochem.*, **36**, 1587-1596, doi: 10.1159/000430321.
41. Tang, R., Li, L., Zhu, D., Hou, D., Cao, T., et al. (2011) Mouse miRNA-709 directly regulates miRNA-15a/16-1

- biogenesis at the posttranscriptional level in the nucleus: evidence for a microRNA hierarchy system, *Cell Res.*, **22**, 504-515, doi: 10.1038/cr.2011.137.
42. Pereira-da-Silva, T., Coutinho Cruz, M., Carrusca, C., Cruz Ferreira, R., Napoleão, P., and Mota Carmo, M. (2018) Circulating microRNA profiles in different arterial territories of stable atherosclerotic disease: a systematic review, *Am. J. Cardiovasc. Disease*, **8**, 1-13.
 43. Turchinovich, A., Weiz, L., Langhein, A., and Burwinkel, B. (2011) Characterization of extracellular circulating microRNA, *Nucleic Acids Res.*, **39**, 7223-7233, doi: 10.1093/nar/gkr254.
 44. Turchinovich, A., and Burwinkel, B. (2012) Distinct Ago1 and Ago2 associated miRNA profiles in human cells and blood plasma, *RNA Biol.*, **9**, 1066-1075, doi: 10.4161/rna.21083.
 45. Canfrán-Duque, A., Lin, C.-S., Goedeke, L., Suárez, Y., and Fernández-Hernando, C. (2016) Micro-RNAs and high-density lipoprotein metabolism, *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.*, **36**, 1076-1084, doi: 10.1161/atvbaha.116.307028.
 46. Hasan, S., Gadewal, N., Aher, S., Kumar, R., Varma, A., and Khattry, N. (2018) Identification of miRNA-mRNA network in NPM1 mutated acute myeloid leukemia, *Clin. Lymphoma Myeloma Leukemia*, **18**, S193, doi: 10.1016/j.clml.2018.07.035.
 47. Li, M., Zeringer, E., Barta, T., Schageman, J., Cheng, A., and Vlassov, A. V. (2014) Analysis of the RNA content of the exosomes derived from blood serum and urine and its potential as biomarkers, *Philos. Trans. R. Soc. B. Biol. Sci.*, **369**, 20130502-20130502, doi: 10.1098/rstb.2013.0502.
 48. Kubota, S., Chiba, M., Watanabe, M., Sakamoto, M., and Watanabe, N. (2014) Secretion of small/microRNAs including miR-638 into extracellular spaces by sphingomyelin phosphodiesterase 3, *Oncol. Rep.*, **33**, 67-73, doi: 10.3892/or.2014.3605.
 49. Tian, T., Zhu, Y.-L., Zhou, Y.-Y., Liang, G.-F., Wang, Y.-Y., et al. (2014) Exosome uptake through clathrin-mediated endocytosis and macropinocytosis and mediating miR-21 delivery, *J. Biol. Chem.*, **289**, 22258-22267, doi: 10.1074/jbc.m114.588046.
 50. Hu, Y., Rao, S.-S., Wang, Z.-X., Cao, J., Tan, Y.-J., Luo, J., et al. (2018) Exosomes from human umbilical cord blood accelerate cutaneous wound healing through miR-21-3p-mediated promotion of angiogenesis and fibroblast function, *Theranostics*, **8**, 169-184, doi: 10.7150/thno.21234.
 51. Van Balkom, B. W. M., de Jong, O. G., Smits, M., Brummelman, J., den Ouden, K., et al. (2013) Endothelial cells require miR-214 to secrete exosomes that suppress senescence and induce angiogenesis in human and mouse endothelial cells, *Blood*, **121**, 3997-4006, doi: 10.1182/blood-2013-02-478925.
 52. Mittelbrunn, M., Gutiérrez-Vázquez, C., Villarroya-Beltri, C., González, S., Sánchez-Cabo, F., et al. (2011) Unidirectional transfer of microRNA-loaded exosomes from T cells to antigen-presenting cells, *Nat. Commun.*, **2**, doi: 10.1038/ncomms1285.
 53. Hergenreider, E., Heydt, S., Tréguer, K., Boettger, T., Horrevoets, A. J. G., et al. (2012) Atheroprotective communication between endothelial cells and smooth muscle cells through miRNAs, *Nat. Cell Biol.*, **14**, 249-256, doi: 10.1038/ncb2441.
 54. López-Leal, R., Díaz-Viraqué, F., Catalan, R. J., Saquel, C., et al. (2020) Schwann cell reprogramming into repair cells increases exosome-loaded miRNA-21 promoting axonal growth, *J. Cell Sci.*, **133**, jcs.239004, doi: 10.1242/jcs.239004.
 55. Dong, R., Liu, Y., Yang, Y., Wang, H., Xu, Y., and Zhang, Z. (2019) MSC-derived exosomes-based therapy for peripheral nerve injury: a novel therapeutic strategy, *Biomed. Res. Int.*, **2019**, 6458237, doi: 10.1155/2019/6458237.
 56. Bonauer, A., Carmona, G., Iwasaki, M., Mione, M., Koyanagi, M., and Dimmeler, S. (2009) MicroRNA-92a controls angiogenesis and functional recovery of ischemic tissues in mice, *Science*, **324**, 1710-1713, doi: 10.1126/science.1174381.
 57. Efimenko, A., Sagaradze, G., Akopyan, Z., Lopatina, T., and Kalinina, N. (2016) Data supporting that miR-92a suppresses angiogenic activity of adipose-derived mesenchymal stromal cells by down-regulating hepatocyte growth factor, *Data Brief*, **6**, 295-310, doi: 10.1016/j.dib.2015.12.021.
 58. Zhang, L., Zhou, M., Qin, G., Weintraub, N. L., and Tang, Y. (2014) MiR-92a regulates viability and angiogenesis of endothelial cells under oxidative stress, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **446**, 952-958, doi: 10.1016/j.bbrc.2014.03.035.
 59. Basalova, N., Sagaradze, G., Arbatskiy, M., Evtushenko, E., Kulebyakin, K., et al. (2020) Secretome of mesenchymal stromal cells prevents myofibroblasts differentiation by transferring fibrosis-associated microRNAs within extracellular vesicles, *Cells*, **9**, 1272, doi: 10.3390/cells9051272.
 60. Chuang, H. M., Shih, T. E., Lu, K. Y., Tsai, S. F., Harn, H. J., and Ho, L. I. (2018) Mesenchymal stem cell therapy of pulmonary fibrosis: improvement with target combination, *Cell Transplant.*, **27**, 1581-1587, doi: 10.1177/0963689718787501.
 61. Wa, Q., Zou, C., Lin, Z., Huang, S., Peng, X., et al. (2020) Ectopic expression of miR-532-3p suppresses bone metastasis of prostate cancer cells via inactivating NF- κ B signaling, *Mol. Ther. Oncol.*, **17**, 267-277, doi: 10.1016/j.omto.2020.03.024.
 62. Jiao, Y., Yang, H., Qian, J., Gong, Y., Liu, H., et al. (2019) miR-3664-5P suppresses the proliferation and metastasis of gastric cancer by attenuating the NF- κ B signaling pathway through targeting MTDH, *Int. J. Oncology.*, **54**, 845-858, doi: 10.3892/ijo.2019.4680.
 63. Jin, C., Wang, A., Liu, L., Wang, G., Li, G., and Han, Z. (2019) miR-145-5p inhibits tumor occurrence and metastasis through the NF- κ B signaling pathway by targeting TLR4 in malignant melanoma, *J. Cell. Biochem.*, **120**, 11115-11126, doi: 10.1002/jcb.28388.
 64. Li, J., Li, T., Lu, Y., Shen, G., Guo, H., et al. (2017) MiR-2392 suppresses metastasis and epithelial-mesenchymal transition by targeting MAML3 and WHSC1 in gastric cancer, *FASEB J.*, **31**, 3774-3786, doi: 10.1096/fj.201601140RR.
 65. He, M., Zhan, M., Chen, W., Xu, S., Long, M., et al. (2017) MiR-143-5p deficiency triggers EMT and metastasis by targeting HIF-1 α in gallbladder cancer, *Cell. Physiol. Biochem.*, **42**, 2078-2092, doi: 10.1159/000479903.
 66. Zhang, Y., and Wang, X. (2020) Targeting the Wnt/ β -catenin signaling pathway in cancer, *J. Hematol. Oncol.*, **13**, 165, doi: 10.1186/s13045-020-00990-3.
 67. Sun, Y., Zhu, Q., Zhou, M., Yang, W., Shi, H., et al. (2019) Restoration of miRNA-148a in pancreatic cancer reduces invasion and metastasis by inhibiting the Wnt/ β -catenin signaling pathway via downregulating maternally expressed gene-3, *Exp. Ther. Med.*, **17**, 639-648, doi: 10.3892/etm.2018.7026.
 68. Liang, T. S., Zheng, Y. J., Wang, J., Zhao, J. Y., Yang, D. K., and Liu, Z. S. (2019) MicroRNA-506 inhibits tumor growth and metastasis in nasopharyngeal carcinoma through the inactivation of the Wnt/ β -catenin signaling pathway by down-regulating LHX2, *J. Exp. Cancer Res.*, **38**, 97, doi: 10.1186/s13046-019-1023-4.

69. Subat, S., Inamura, K., Ninomiya, H., Nagano, H., Okumura, S., and Ishikawa, Y. (2018) Unique microRNA and mRNA interactions in EGFR-mutated lung adenocarcinoma, *J. Clin. Med.*, **7**, 419, doi: 10.3390/jcm7110419.
70. Edmonds, M. D., Hurst, D. R., Welch, D. R. (2009) Linking metastasis suppression with metastamiR regulation, *Cell Cycle*, **8**, 2673-2675, doi: 10.4161/cc.8.17.9303.
71. Zhou, W., Fong, M. Y., Min, Y., Somlo, G., Liu, L., et al. (2014) Cancer-secreted miR-105 destroys vascular endothelial barriers to promote metastasis, *Cancer Cell*, **25**, 501-515, doi: 10.1016/j.ccr.2014.03.007.
72. Kosaka, N., Iguchi, H., Hagiwara, K., Yoshioka, Y., Takeshita, F., and Ochiya, T. (2013) Neutral sphingomyelinase 2 (nSMase2)-dependent exosomal transfer of angiogenic microRNAs regulate cancer cell metastasis, *J. Biol. Chem.*, **288**, 10849-10859, doi: 10.1074/jbc.m112.446831.
73. Fong, M. Y., Zhou, W., Liu, L., Alontaga, A. Y., Chandra, M., et al. (2015) Breast-cancer-secreted miR-122 reprograms glucose metabolism in premetastatic niche to promote metastasis, *Nat. Cell Biol.*, **17**, 183-194, doi: 10.1038/ncb3094.
74. Le, M. T. N., Hamar, P., Guo, C., Basar, E., Perdigão-Henriques, R., et al. (2014) MiR-200-containing extracellular vesicles promote breast cancer cell metastasis, *J. Clin. Invest.*, **124**, 5109-5128, doi: 10.1172/jci75695.
75. Lei, B., Wang, D., Zhang, M., Deng, Y., Jiang, H., and Li, Y. (2020) miR-615-3p promotes the epithelial-mesenchymal transition and metastasis of breast cancer by targeting PICK1/TGFBRI axis, *J. Exp. Clin. Cancer Res.*, **39**, 71, doi: 10.1186/s13046-020-01571-5.
76. Chatterjee, A., Jana, S., Chatterjee, S., Wastall, L. M., Mandal, G., et al. (2019) MicroRNA-222 reprogrammed cancer-associated fibroblasts enhance growth and metastasis of breast cancer, *Br. J. Cancer*, **121**, 679-689, doi: 10.1038/s41416-019-0566-7.
77. Zhao, X. G., Hu, J. Y., Tang, J., Yi, W., Zhang, M. Y., Deng, R., et al. (2019) miR-665 expression predicts poor survival and promotes tumor metastasis by targeting NR4A3 in breast cancer, *Cell Death Dis.*, **10**, 479, doi: 10.1038/s41419-019-1705-z.
78. Hashimoto, K., Ochi, H., Sunamura, S., Kosaka, N., Mabuchi, Y., et al. (2018) Cancer-secreted hsa-miR-940 induces an osteoblastic phenotype in the bone metastatic microenvironment via targeting ARHGAP1 and FAM134A, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **115**, 2204-2209, doi: 10.1073/pnas.1717363115.
79. Fabbri, M., Paone, A., Calore, F., Galli, R., Gaudio, E., et al. (2012) MicroRNAs bind to Toll-like receptors to induce prometastatic inflammatory response, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **109**, E2110-E2116, doi: 10.1073/pnas.1209414109.
80. Song, Q., Liu, B., Li, X., Zhang, Q., Cao, L., et al. (2018) MiR-26a-5p potentiates metastasis of human lung cancer cells by regulating ITGβ8- JAK2/STAT3 axis, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **501**, 494-500, doi: 10.1016/j.bbrc.2018.05.020.
81. Liu, C., Luo, J., Zhao, Y. T., Wang, Z. Y., Zhou, J., et al. (2018) TWIST1 upregulates miR-214 to promote epithelial-to-mesenchymal transition and metastasis in lung adenocarcinoma, *Int. J. Mol. Med.*, **42**, 461-470, doi: 10.3892/ijmm.2018.3630.
82. Li, J., Feng, Q., Wei, X., and Yu, Y. (2016) MicroRNA-490 regulates lung cancer metastasis by targeting poly r(C)-binding protein 1, *Tumour Biol.*, **37**, 15221-15228, doi: 10.1007/s13277-016-5347-9.
83. Fang, T., Lv, H., Lv, G., Li, T., Wang, C., et al. (2018) Tumor-derived exosomal miR-1247-3p induces cancer-associated fibroblast activation to foster lung metastasis of liver cancer, *Nat. Commun.*, **9**, 191, doi: 10.1038/s41467-017-02583-0.
84. Xiong, Y., Wu, S., Yu, H., Wu, J., Wang, Y., et al. (2018) miR-190 promotes HCC proliferation and metastasis by targeting PHLPP1, *Exp. Cell Res.*, **371**, 185-195, doi: 10.1016/j.yexcr.2018.08.008.
85. Yang, B., Feng, X., Liu, H., Tong, R., Wu, J., et al. (2020) High-metastatic cancer cells derived exosomal miR92a-3p promotes epithelial-mesenchymal transition and metastasis of low-metastatic cancer cells by regulating PTEN/Akt pathway in hepatocellular carcinoma, *Oncogene*, **39**, 6529-6543, doi: 10.1038/s41388-020-01450-5.
86. Mao, X. W., Xiao, J. Q., Li, Z. Y., Zheng, Y. C., and Zhang, N. (2018) Effects of microRNA-135a on the epithelial-mesenchymal transition, migration and invasion of bladder cancer cells by targeting GSK3β through the Wnt/β-catenin signaling pathway, *Exp. Mol. Med.*, **50**, e429, doi: 10.1038/emm.2017.239.
87. Liu, J., Cao, J., and Zhao, X. (2015) miR-221 facilitates the TGFβ1-induced epithelial-mesenchymal transition in human bladder cancer cells by targeting STMN1, *BMC Urol.*, **15**, 36, doi: 10.1186/s12894-015-0028-3.
88. Yan, L., Wang, Y., Liang, J., Liu, Z., Sun, X., and Cai, K. (2017) MiR-301b promotes the proliferation, mobility, and epithelial-to-mesenchymal transition of bladder cancer cells by targeting EGR1, *Biochem. Cell Biol.*, **95**, 571-577, doi: 10.1139/bcb-2016-0232.
89. Hu, H., Zhang, Q., Chen, W., Wu, T., Liu, S., et al. (2020) MicroRNA-301a promotes pancreatic cancer invasion and metastasis through the JAK/STAT3 signaling pathway by targeting SOCS5, *Carcinogenesis*, **41**, 502-514, doi: 10.1093/carcin/bgz121.
90. Xin, H., Wang, C., and Liu, Z. (2019) miR-196a-5p promotes metastasis of colorectal cancer via targeting IκBα, *BMC cancer*, **19**, 30, doi: 10.1186/s12885-018-5245-1.
91. Li, Y., Yan, X., Shi, J., He, Y., Xu, J., et al. (2019) Aberrantly expressed miR-188-5p promotes gastric cancer metastasis by activating Wnt/β-catenin signaling, *BMC Cancer*, **19**, 505, doi: 10.1186/s12885-019-5731-0.
92. Li, C., Lu, S., and Shi, Y. (2017) MicroRNA-187 promotes growth and metastasis of gastric cancer by inhibiting FOXA2, *Oncol. Rep.*, **37**, 1747-1755, doi: 10.3892/or.2017.5370.
93. Li, N., Cui, T., Guo, W., Wang, D., and Mao, L. (2019) MiR-155-5p accelerates the metastasis of cervical cancer cell via targeting TP53INP1, *OncoTargets Ther.*, **12**, 3181-3196, doi: 10.2147/OTTS193097.
94. Sun, X., Dongol, S., Qiu, C., Xu, Y., Sun, C., et al. (2018) miR-652 Promotes tumor proliferation and metastasis by targeting RORA in endometrial cancer, *Mol. Cancer Res.*, **16**, 1927-1939, doi: 10.1158/1541-7786.MCR-18-0267.
95. Salem, M., O'Brien, J. A., Bernaudo, S., Shower, H., Ye, G., et al. (2018) miR-590-3p promotes ovarian cancer growth and metastasis via a novel FOXA2-versican pathway, *Cancer Res.*, **78**, 4175-4190, doi: 10.1158/0008-5472.CAN-17-3014.
96. Cai, Q., Zeng, S., Dai, X., Wu, J., and Ma, W. (2017) miR-504 promotes tumour growth and metastasis in human osteosarcoma by targeting TP53INP1, *Oncol. Rep.*, **38**, 2993-3000, doi: 10.3892/or.2017.5983.
97. Xiao, W., Lou, N., Ruan, H., Bao, L., Xiong, Z., et al. (2017) Mir-144-3p promotes cell proliferation, metastasis, sunitinib resistance in clear cell renal cell carcinoma by downregulating ARID1A, *Cell. Physiol. Biochem.*, **43**, 2420-2433, doi: 10.1159/000484395.
98. Vu, L. T., Gong, J., Pham, T. T., Kim, Y., and Le, M. (2020) microRNA exchange via extracellular vesicles in cancer, *Cell Prolif.*, **53**, e12877, doi: 10.1111/cpr.12877.

99. Madhavan, D., Zucknick, M., Wallwiener, M., Cuk, K., Modugno, C., et al. (2012) Circulating miRNAs as surrogate markers for circulating tumor cells and prognostic markers in metastatic breast cancer, *Clin. Cancer Res.*, **18**, 5972-5982, doi: 10.1158/1078-0432.ccr-12-1407.
100. Рысенкова К. Д., Рубина К. А., Иванова К. А., Карагяур М. Н., Семина Е. В. (2019) Роль урокиназной системы в канцерогенезе и метастазировании опухолевых клеток с участием микроРНК, *Гены и клетки*, **14**, 200-200.
101. Bayraktar, R., Bertilaccio, M., and Calin, G. A. (2019) The interaction between two worlds: microRNAs and toll-like receptors, *Front. Immunol.*, **10**, 1053, doi: 10.3389/fimmu.2019.01053.

MICRORNA IN ONCOLOGY: FROM MECHANISMS OF GENE EXPRESSION REGULATION TO REPROGRAMMING OF THE METASTATIC NICHE

Review

E. V. Semina^{1,2*}, K. D. Rysenkova^{1,2}, K. E. Troyanovskiy², A. A. Shmakova¹, and K. A. Rubina²

¹ Federal State Budgetary Organization National Cardiology Research Center of the Ministry of Health of the Russian Federation, 121552 Moscow, Russia; E-mail: e-semina@yandex.ru

² Lomonosov Moscow State University, Faculty of Basic Medicine, 119192 Moscow, Russia

By 2003, the Human Genome project allowed revealing the complete structure of the human genome, but it appeared that 97% of the DNA did not encode any known proteins. The explanation for this emerged later, when the untranslated regions of DNA sequences were shown to encode short microRNAs and long noncoding RNAs and other nucleotide sequences involved in regulation of gene expression. First identified in the cytoplasm, miRNAs have now been discovered in all cell compartments, where their functions are not limited to degradation of the target mRNAs. Being a part of exosomes or of a protein complex, microRNAs are secreted into the extracellular milieu and are involved in morphogenesis and regeneration, oncogenesis, metastasis, and chemoresistance of cancer cells. MicroRNAs play a dual role in cancer: on one hand, they can act as oncosuppressors; on the other hand, they can stimulate cancer progression via inhibition of oncosuppressors or by stimulation of tumor neoangiogenesis and immunosuppression. The review focuses on the current landscape in the field of microRNAs biogenesis, their functions in cytoplasm and nucleus, non-canonical mechanisms of regulation of gene expression and microRNAs role in oncogenesis. The authors present their opinion on the potential role of microRNAs in the premetastatic niche organization and metastasizing *per se*.

Keywords: microRNA, RISC, Ago, biogenesis, exosomes, metastasis

АНАЛИЗ РЕПЕРТУАРОВ АНТИГЕННЫХ СПЕЦИФИЧНОСТЕЙ ЦИРКУЛИРУЮЩИХ АУТОАНТИТЕЛ КАК ИНСТРУМЕНТ ПОИСКА ОПУХОЛЕАССОЦИИРОВАННЫХ АНТИГЕНОВ: АКТУАЛЬНЫЕ ПРОБЛЕМЫ И ПУТИ ИХ РЕШЕНИЯ

Обзор

© 2021 П.В. Белоусов^{1,2}

¹ Центр высокоточного редактирования и генетических технологий для биомедицины,
Институт молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта РАН,
119991 Москва, Россия; электронная почта: belouasp@gmail.com

² НЦМУ «Национальный центр персонализированной медицины эндокринных заболеваний»,
ФГБУ «НМИЦ эндокринологии» Минздрава России, 117036 Москва, Россия

Поступила в редакцию 27.07.2020
После доработки 17.08.2020
Принята к публикации 24.08.2020

Циркулирующие аутоантитела к опухолеассоциированным аутоантигенам (ОАА) могут служить ценными биомаркерами для широкого спектра диагностических целей, и современная иммунология располагает большим количеством методов глубокого сравнительного анализа репертуаров антигенных специфичностей циркулирующих антител в норме и патологии. В то же время доля клинически успешных разработок к общему числу опубликованных исследований в данной области крайне мала, а многочисленные данные по репертуарам специфичностей циркулирующих аутоантител у онкологических пациентов крайне слабо интегрированы в современную картину иммунологического и молекулярного «ландшафтов» опухолей человека. Настоящий обзор является попыткой выявления и систематизации основных и в значительной мере универсальных концептуально-методических ограничений в области идентификации мишеней циркулирующих аутоантител при онкологических заболеваниях (экспрессионное смещение, вырожденность репертуаров ОАА, выявление в качестве ОАА мишеней «естественных» IgG, отсутствие патогенетически релевантного контекста в экспериментальных системах, используемых для выявления ОАА), а также обсуждению потенциальных и уже известных методических усовершенствований, способных значительно повысить выявляемость патогенетически и диагностически значимых *bona fide* ОАА.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: опухолеассоциированные антигены, аутоантитела, биомаркеры рака, иммунопротеомика.

DOI: 10.31857/S0320972521050067

ВВЕДЕНИЕ

Противоопухолевый В-клеточный иммунный ответ, манифестирующийся появлением в циркуляции антител к опухолеассоциированным аутоантигенам (ОАА), является источником высокоспецифичных аутоантительных биомаркеров опухолевого роста с высоким потенциалом использования для разнообразных диагностических целей [1–3]. В то же время, несмот-

ря на несколько десятилетий исследований, посвященных анализу репертуаров антигенных мишеней циркулирующих аутоантител в различных опухолях человека, на сегодняшний момент повсеместное применение в достаточно узком клиническом контексте нашёл лишь один класс ОАА, а именно онкогематологические аутоантитела к которым рутинно используют для доказательства паранеопластической природы неврологических нарушений [4–6]; анало-

Принятые сокращения: 2D-ЭФ – двумерный электрофорез; ОАА – опухолеассоциированный аутоантиген; ПНС – паранеопластический неврологический синдром; ПТМ – пост-трансляционные модификации; AMIDA – antibody-mediated identification of antigens/аутоантитело-опосредованная идентификация антигенов; DIGE – difference/differential electrophoresis/разностный электрофорез; déjà-vu-AA – déjà-vu-аутоантитела; N-IgG-aAb – natural IgG autoantibodies/естественные IgG аутоантитела; ORF – open reading frame/открытая рамка считывания; PhIP-Seq – phage immunoprecipitation–sequencing/фаговая иммунопреципитация–секвенирование; PLATO – parallel analysis of translated ORFs/параллельный анализ транслированных ORF; SEREX – serological analysis of tumor antigens by recombinant cDNA expression cloning/серологический анализ опухолевых антигенов путем экспрессионного клонирования рекомбинантной кДНК; SERPA – serological proteome analysis/серологический протеомный анализ.

гичные разработки появляются в последние годы также и в контексте других паранеопластических синдромов аутоиммунной природы [7, 8]. С определенными оговорками [9], в список успешных диагностических разработок можно также включить панель из семи ОАА **EarlyCDT Lung**, клинически валидированную [10, 11] и коммерчески доступную (<https://oncimmune.com/products/earlyctd-lung>) в качестве дополнительного к компьютерной томографии средства диагностики рака легких в группах среднего и высокого риска [12, 13]. Однако же, в целом крайне низкое соотношение количества успешных разработок к общему числу исследований в данной области иммунологии не может не удивлять.

Более того, огромный пласт накапливаемой информации, связанной с репертуарами специфичностей циркулирующих аутоантител у онкологических пациентов, крайне слабо интегрирован с фундаментальными исследованиями в области онкоиммунологии, в т.ч. со сравнительно недавно попавшими в фокус передовых исследований работами по роли В-клеточного звена иммунного ответа в противоопухолевом иммунном надзоре и иммунотерапии рака [14–19].

Вместе с тем по мере накопления данных, получаемых при помощи различных методов профилирования репертуаров, распознаваемых циркулирующими аутоантителами ОАА, помимо чисто методических ограничений каждого из них, на первый план выходят серьезные концептуальные ограничения, в той или иной мере прослеживающиеся в подавляющем большинстве работ в этом разделе онкоиммунологии. К таким ограничениям можно отнести ряд тесно взаимосвязанных, однако не вырожденных факторов, таких как смещение доступного для анализа аутоантигенного репертуара в сторону наиболее высокопредставленных белков (экспрессионное смещение), эффект *déjà-vu*, связанный с преимущественным выявлением одного и того же набора аутоантигенов вне зависимости от природы изучаемого заболевания, выявление в качестве ОАА мишеней «естественных» IgG, отсутствие патогенетически релевантного контекста в экспериментальных системах, используемых для выявления ОАА.

В настоящей работе приведен краткий обзор основных методов идентификации ОАА с последующим детальным анализом причин и следствий вышеперечисленных проблем и их роли в ограничении биологической релевантности и клинической применимости идентифицируемых ОАА, а также обсуждением широкого спектра концептуально-методических подходов, использование которых способно значи-

тельно повысить фундаментальную и прикладную ценность выявляемых ОАА и аутоантигенных сигнатур опухолей человека.

РАЗНООБРАЗИЕ МЕТОДОВ СИСТЕМНОГО АНАЛИЗА РЕПЕРТУАРОВ ОАА, РАСПОЗНАВАЕМЫХ ЦИРКУЛИРУЮЩИМИ АУТОАНТИТЕЛАМИ

SEREX. Первый высокопроизводительный скрининговый метод изучения репертуаров распознаваемых циркулирующими антителами аутоантигенов, а именно иммуноскрининг кДНК-экспрессионных библиотек на основе бактериофага λ (табл. 1) SEREX (SERological Analysis of Tumor Antigens by REcombinant cDNA EXpression Cloning), был разработан в середине 90-х годов прошлого века [20] и стал настоящим прорывом для своего времени, позволившим впервые изучить феномен противоопухолевого гуморального иммунного ответа на системном уровне. Фактически на протяжении последующих десяти лет SEREX прочно занимал позицию референс-метода среди всех технологий идентификации мишеней циркулирующих аутоантител, несмотря на ряд важных недостатков, таких как высокая трудоемкость и низкая скорость анализа, невозможность выявления иммуногенных пост-трансляционных модификаций (ПТМ) и ряд технологических сложностей, связанных с выявлением ложноположительных реакций (табл. 2) [21–23]. Интересно, что, с ретроспективной точки зрения, у SEREX есть одно значительное преимущество перед пришедшим ему на смену серологическим протеомным анализом SEPRa (см. ниже), особенно важное в контексте обсуждаемых в настоящем обзоре проблем, а именно возможность выявления иммуногенных белковых продуктов низкопредставленных транскриптов и в целом радикально меньшее смещение репертуара доступных для распознавания аутоантигенов в сторону высокопредставленных белков (табл. 2). Однако ряд вышеперечисленных недостатков в сочетании с бурным развитием протеомных технологий в первом десятилетии XXI века (см. ниже) привел к постепенному уходу SEREX с первых ролей в данной области онкоиммунологии.

Фаговый дисплей. В начале 2000-х годов параллельно SEREX-исследованиям начали предприниматься попытки адаптации для целей профилирования репертуаров ОАА, распознаваемых циркулирующими антителами, классического фагового дисплея антигенных пептидов (табл. 1) [24, 25]. Однако, несмотря на целый ряд преимуществ по сравнению с SEREX (быст-

Таблица 1. Методические принципы основных методов систематического анализа репертуаров ОАА, распознаваемых циркулирующими антителами

Метод	Тип библиотеки	Пул аутоантигенов	Иммунохимическая система	Метод идентификации
SEREX	фаговая кДНК-экспрессионная библиотека	фрагменты гетерологичных белков, высвобождаемые в ходе литической инфекции бактериофага	гибридизация АСП с нитроцеллюлозной «репликой» зон лизиса на газоне <i>Escherichia coli</i>	сэнгерское секвенирование
Фаговый дисплей	фаг-дисплейная RPL-либо кДНК-экспрессионная библиотека	фаговая популяция, несущая антигенные пептиды в виде слитных молекул с капсидным белком бактериофага	ИП АСП с антигенами или антиген-содержащими комплексами	высокопроизводительное секвенирование
PhIP-Seq	Библиотека синтетических олигонуклеотидов			
PLATO	кДНК-библиотека ORF-клонов	комплексы мРНК-рибосома-белок, получаемые в ходе <i>in vitro</i> транскрипции/трансляции		
Анализ иммунного комплекса плазмы	Н/П	присутствующие в циркуляции белки в составе циркулирующих иммунных комплексов	изоляция иммунных комплексов с использованием белков А/Г	масс-спектрометрия
AMIDA		белки, напрямую выделяемые из ткани либо клеточной линии	ИП АСП с выделенными белками → фракционирование преципитированных антигенов при помощи 2D-ЭФ	
SID-DIGE			иммуноаффинная деплеция белкового пула различными АСП → сравнительный анализ фильтратов при помощи разностного 2D-ЭФ	
SERPA/SPEAR/PROTEOMEX			фракционирование выделенных белков при помощи 2D-ЭФ → выявление иммунореактивных белков при помощи Вестерн-блот-анализа с различными АСП	
MAPPING			иммуноаффинная деплеция белкового пула контрольной АСП → иммуноаффинный захват белков из деплетированного пула экспериментальной АСП	

Примечание. Используемые сокращения: 2D-ЭФ – двумерный электрофорез; АСП – антителосодержащая проба; ИП – иммунопреципитация; AMIDA – autoantibody-mediated identification of antigens/аутоантитело-опосредованная идентификация антигенов; MAPPING – multiple affinity protein profiling/многомерное аффинное профилирование белков; PhIP-Seq – phage immunoprecipitation-sequencing/фаговая иммунопреципитация–секвенирование; PLATO – parallel analysis of translated ORFs/ параллельный анализ транслированных ORF; PROTEOMEX – proteomics + SEREX/протеомика + SEREX; SEREX – serological analysis of tumor antigens by recombinant cDNA expression cloning/серологический анализ опухолевых антигенов путем экспрессионного клонирования рекомбинантной кДНК; SERPA – serological proteome analysis/серологический протеомный анализ; SID-DIGE – sequential immunofluorescence depletion/последовательная иммуноаффинная деплеция + разностный электрофорез; SPEAR – serological and proteomic evaluation of antibody responses/серологическое и протеомное исследование антительных ответов.

рота, большая вероятность выявить низкопредставленный клон за счёт селекционной природы биопаннинга, возможность интеграции в процесс скрининга этапа отрицательной селек-

ции), данный метод не имел столь значительного успеха, по-видимому, в силу сильнейшей смещенности метода в сторону идентификации антигенных «мимик»/мимотопов, причём не толь-

Таблица 2. Сравнение аналитических характеристик основных методов систематического анализа репертуаров ОАА, распознаваемых циркулирующими антителами

Метод	Экспрессионное смещение	Сравнительный анализ на этапе скрининга	Выявление продуктов некорректных ORF/мимотопов	Выявление ПТМ	Выявление конформационных эпитопов	Ресурсоёмкость	Пропускная способность	Стоимость
SEREX	++	–	+	–	–	+	+	+
Фаговый дисплей	+	+	+++	–	–	+	+	+
PhIP-Seq/ PLATO	–	+++	–	–	–/+++	+++	++++	+++
SERPA/ SPEAR/ PROTEOMEX	++++	+++	–	++	–	+++	+++	++
Иммуноаффинный захват (AMIDA и др.)	+++	++/+++	–	++	+++	+++	++/+++	++

Примечание. Оценка выраженности параметра: отсутствует/невозможно (–), низкая (+), средняя (++) , высокая (+++) , очень высокая (++++). Используемые сокращения: ИП – иммунопреципитация; ПТМ – пост-трансляционные модификации; AMIDA – autoantibody-mediated identification of antigens/аутоантитело-опосредованная идентификация антигенов; MAPPING – multiple affinity protein profiling/многомерное аффинное профилирование белков; PhIP-Seq – phage immunoprecipitation–sequencing/фаговая иммунопреципитация–секвенирование; PLATO – parallel analysis of translated ORFs/параллельный анализ транслированных ORF; PROTEOMEX – proteomic + SEREX/протеомика + SEREX; SEREX – serological analysis of tumor antigens by recombinant cDNA expression cloning/серологический анализ опухолевых антигенов путем экспрессионного клонирования рекомбинантной кДНК; SERPA – serological proteome analysis/серологический протеомный анализ; SID-DIGE – sequential immunofluorescence depletion/последовательная иммуноаффинная деплеция + разностный электрофорез; SPEAR – serological and proteomic evaluation of antibody responses/серологическое и протеомное исследование антительных ответов.

ко при использовании универсальных рандомизированных пептидных библиотек (Random Peptide Library, RPL) [26, 27], но и при использовании экспрессионных библиотек кДНК (табл. 2) [28, 29].

PhIP-Seq. Однако с развитием технологий высокопроизводительных вариантов олигонуклеотидного синтеза и секвенирования именно фаговый дисплей антигенных пептидов дал начало, пожалуй, одному из наиболее совершенных из разработанных на сегодняшний день методов системного анализа репертуаров распознаваемых циркулирующими антителами ОАА, а именно методу PhIP-Seq (Phage Immunoprecipitation–Sequencing) [30, 31]. В данном методе фаговая библиотека «представляет» несмещенный набор пептидов в естественных рамках считывания, покрывающих весь исследуемый протеом (к примеру, протеом человека), что достигается за счёт использования для конструкции библиотеки пула из нескольких сотен тысяч олигонуклеотидов, получаемых с использованием методов высокопроизводительного олигонуклеотидного синтеза (табл. 1). В отличие от

классического фагового дисплея, в PhIP-Seq используется только один раунд иммунопреципитации библиотеки, после чего напрямую следует этап получения библиотеки для глубокого секвенирования. При этом пробоспецифичное баркодирование позволяет в одном образце оценивать антителозависимое обогащение антигенных пептидов во множестве проб, что радикально снижает стоимость анализа в расчёте на одну антителосодержащую пробу.

PLATO. Концептуально сходным методом, однако реализованным методически иным образом, является метод PLATO (Parallel Analysis of Translated ORF) [32, 33], разработанный той же научной группой, что и PhIP-Seq. В этом методе ключевая «связка» антигена/эпитопа и кодирующей его нуклеиновой кислоты достигается при помощи технологии рибосомального дисплея [34], а высокое покрытие протеома и отсутствие экспрессионного смещения – при помощи использования в качестве антиген-кодирующих пулов кДНК библиотек открытых рамок считывания (ORF-омов) (табл. 1) [35]. Использование в качестве антигенных мишеней полно-

размерных белков предоставляет данному методу возможность выявлять широкий спектр конформационных эпитопов (в т.ч. «прерывающихся» (discontinuous)) (табл. 2). Покрытие протеома в PLATO-анализе с использованием доступных на сегодняшний день библиотек ORF приблизительно в полтора раза ниже, нежели уже в первой работе с использованием PhIP-Seq (16 000 [35] против 24 000 [30] ORF соответственно), однако по мере релиза новых версий ORF-ома человека [36] следует ожидать, что данное ограничение потеряет свою актуальность в ближайшие годы. Следует также отметить, что как PhIP-Seq, так и PLATO не выявляют ПТМ-эпитопы, что, по сути, является главным методическим ограничением этих методов (табл. 2).

SERPA, PROTEOMEX и SPEAR. С середины 2000-х годов, наряду со скринингом фаговых библиотек, начинается бурное развитие протеомных технологий, которое в полной мере затронуло и профилирование репертуаров мишеней циркулирующих аутоантител. Прототипным методом в этой группе является серологический протеомный анализ SERPA (SERological Proteome Analysis) [37], известный также как PROTEOMEX (PROTEOMe-Based Target Evaluation Combined With Immuno-Reactive Target Structure Identification Explored by Sera (SerEX)) [38] и SPEAR (Serological and Proteomic Evaluation of Antibody Responses) [39]. Данный метод основан на комбинации классического двумерного электрофореза (2D-ЭФ) белковой фракции выбранного клеточного источника (клеточная линия, первичная ткань опухоли и т.д.), вестерн-блот-анализа с использованием в качестве гибридационной пробы исследуемой сыворотки пациента и идентификации иммунореактивных белков при помощи масс-спектрального анализа (в настоящее время – в основном тандемной хромато-масс-спектрометрии) (табл. 1). Не будет преувеличением сказать, что в последние 10–15 лет наибольшее число работ по изучению репертуаров аутоантительных специфичностей в онкологических заболеваниях было выполнено при помощи различных модификаций SERPA, в связи с чем мы подробнее остановимся на преимуществах и ограничениях данного метода.

Популярность SERPA (помимо того, что он в значительной степени «поймал волну» становления и развития проекта «Протеом человека») [40] в основном диктовалась принципиальной возможностью детекции аутоантител против естественных ПТМ, а также сравнительно высокой (относительно SEREX) быстротой и пропускной способностью. Однако, пожалуй, главным преимуществом SERPA перед SEREX

является возможность в одном эксперименте получать исчерпывающую (в пределах чувствительности и разрешающей способности метода) глобальную визуально интерпретируемую картину иммунореактивности изучаемой антителосодержащей пробы против всего выбранного белкового пула. Получаемые паттерны (т.е. *de facto* визуальные отображения глобального репертуара антигенов, распознаваемых аутоантителами в различных антителосодержащих пробах) могут напрямую сравниваться друг с другом непосредственно в ходе скринингового этапа исследования (табл. 2) [41–44]. Это позволяет в режиме реального времени контролировать отбор аутоантигенов для последующего включения в валидационную панель, исходя из соотношения наблюдаемых частот и интенсивностей реактивности индивидуальных точек в группах изучаемого заболевания и контроля, что принципиально невозможно на этапе первичного SEREX-скрининга.

Среди недостатков SERPA обычно отмечают невозможность выявления конформационных эпитопов, слабую представленность в получаемых пулах белков мембранной фракции, а также сложность безошибочного внутри-экспериментального (гель для переноса → мембрана → гибридационная картина → препаративный гель) и межэкспериментального (сравнительный анализ гибридационных паттернов различных антителосодержащих проб между собой) «отслеживания» локализации индивидуальных белков; для решения второй проблемы был предложен и успешно использован целый ряд модификаций [45–51]. Однако же, по-видимому, ключевым недостатком SERPA является ограниченная глубина иммуномного профилирования и выраженная систематическая смещенность доступного для анализа аутоантигенного репертуара в сторону высокопредставленных белков (экспрессионная смещенность) (табл. 2) [52]. В основе этого недостатка лежат хорошо известные ограничения 2D-ЭФ, как ключевой методической составляющей SERPA, а именно: 1) ограниченная (и несопоставимая с диапазоном представленности различных белков в клетке) чувствительность как красителей для визуализации белков в гелях и на мембранах, так и вестерн-блот-анализа; 2) ограниченная разрешающая способность геля в двух направлениях; 3) эффект «экранирования» низкопредставленных белков более высокопредставленными белками и их изоформами («gel crowding») с близкими значениями изоэлектрической точки и молекулярной массы [53].

Поскольку одной из причин экспрессионного смещения SERPA является, таким образом,

высокая комплексность нефракционированных протеомов (и, соответственно, низкая эффективная разрешающая способность 2D-ЭФ), чувствительность метода может быть увеличена за счёт префракционирования белков выбранного клеточного источника антигенов. Однако исчерпывающее исследование всех фракций (к примеру, всех отдельных органелл), очевидно, несовместимо с последующим иммунохимическим анализом аутоантительной реактивности сколь-либо значимого количества антителосодержащих проб в разумных временных и ресурсных рамках. При этом фокусирование на какой-либо отдельной фракции при отсутствии сильных априорных данных о физико-химических свойствах или внутриклеточной локализации интересующих антигенов, по сути, является просто заменой одного систематического смещения другим, ещё более выраженным, при котором за пределами аналитических возможностей метода принципиально остаются все белки, не входящие в состав изучаемой фракции.

AMIDA. Вышеприведенные соображения, очевидным образом, не касаются тех случаев, когда изначальное иммуноаффинное фракционирование проводится с использованием собственно антител, входящих в состав изучаемой антителосодержащей пробы. Такой подход реализован в методе AMIDA (Autoantibody-Mediated Identification of Antigens) [54, 55], в котором ключевое иммунохимическое событие метода (образование комплекса антиген–антитело) и снижение комплексности анализируемого протеома объединены в единый этап иммунопреципитации антигенов нативного лизата клеток иммобилизованными на носителе (частицах, функционализированных белком А и/или белком G) IgG. Элюат преципитированных белков далее разделяют при помощи 2D-ЭФ, белки визуализируют в геле высокочувствительным красителем и напрямую идентифицируют при помощи тандемной хромато-масс-спектрометрии (табл. 1). Проведенный Ganesan et al. [52] мета-анализ достаточно ярко демонстрирует значительно лучшую сбалансированность AMIDA и концептуально сходных методов в выявлении низко- и высокопредставленных белков по сравнению с SERPA. Дополнительными преимуществами AMIDA являются отсутствие необходимости многоэтапного совмещения гелей, мембран и гибридизационных реплик (см. выше), а также возможность выявления конформационных эпитопов (табл. 2). В то же время нижний предел представленности выявляемых аутоантигенов оказался приблизительно таким же, как и в случае SERPA, а сглаживание экспрессионной

смещенности носило скорее количественный, но не качественный характер (табл. 2). Главным же недостатком AMIDA в его оригинальном варианте является неизбежная ко-элюция иммуноглобулинов вместе с аутоантигенами, в результате которой легкие и тяжелые цепи IgG формируют в 2D-электрофореграмме объемные «цепочки» точек, экранирующие значительную часть 2D-геля и делающие невозможным выявление белков в достаточно «богатых» областях 20–30 и 50–60 кДа щелочной части геля [52]. Для решения этих и других проблем AMIDA был предложен ряд модификаций оригинального метода [56, 57], однако все эти подходы не завоевали популярности, сопоставимой с SERPA.

Белковые и пептидные микроэрреи. Наконец, нельзя обойти вниманием технологии белковых [58, 59] и пептидных [60] микроэрреев (микроочипов). В то время как микроэрреи низкой/средней плотности (десятки-сотни точек на эррей) являются методами, широко используемыми для валидации диагностической ценности панелей аутоантигенов, ранее идентифицированных другими скрининговыми методами, современные микроэрреи высокой плотности (к примеру, HuProt™ array, <https://cdi.bio/huprot/>, содержащий более 20 000 рекомбинантных белков, экспрессированных в эукариотической системе) являются полноценными скрининговыми системами, и практически по всем аналитическим параметрам (прежде всего – по глубине/покрытию протеома и отсутствию проблемы экспрессионного смещения, детально обсуждаемой в настоящем обзоре) конкуренцию им могут составить лишь PhIP-Seq и PLATO. Однако ключевым недостатком белковых/пептидных микроэрреев является их стоимость. Так, в исследовании минимально-репрезентативной выборки пациентов и контролей (15–20 проб в каждой группе) без включения технических и биологических повторов прямые расходы только на сами микроэрреи составят от 50 до 100% годовой суммы, выделяемой в рамках грантов класса NIH R03 или РФФИ на исследования, проводимые отдельными научными группами. С учётом необходимости доступа к высокоспециализированному оборудованию и программному обеспечению для анализа данных, исследование сколь-либо адекватной выборки с использованием белковых микроэрреев высокой плотности в рамках относительно небольшого исследования не представляется выполнимым.

Данный раздел, разумеется, не претендует как на полноту цитирования всех работ, выполненных с использованием обсуждаемых методов, так и на исчерпывающее описание всех тех-

нологий, применяемых в данной области иммунологии. Так, мы не касались методов дрожжевого дисплея [61, 62], анализа иммунного комплекса плазмы крови [63–66], методов многомерной иммуноаффинной хроматографии MAPPING (Multiple Affinity Protein Profiling) [67, 68] и последовательной иммуноаффинной деплеции с разностным электрофорезом SID-DIGE (Sequential Immunoaffinity Depletion + Difference Gel Electrophoresis) [69] (табл. 1), а также большого количества модификаций вышеперечисленных методов, некоторые из которых описаны более детально в нижеследующих разделах настоящего обзора. Однако именно этот набор наиболее часто используемых и/или концептуально важных методов дает достаточное представление о структуре методологического спектра в области систематического анализа репертуаров ОАА, а также очерчивает базовую проблематику в этой области, анализу которой и посвящен настоящий обзор.

ПРОБЛЕМА ЭКСПРЕССИОННОГО СМЕЩЕНИЯ И «ЭФФЕКТ DÉJÀ-VU»

Систематическая смещенность изначально доступного для анализа аутоантигенного репертуара в сторону наиболее высокопредставленных белков является характерной и неотъемлемой чертой всех методов, использующих в качестве исходного материала естественно-распределенный пул транскриптов или белков той или иной первичной ткани или устойчивой клеточной линии (табл. 2). Однако же, если при иммуноскрининге фаговых библиотек данный эффект может быть в значительной степени скомпенсирован за счёт высокой численности проскринированных клонов (SEREX) либо аффинной селекции (фаговый дисплей), то в случае наиболее популярных иммунопротеомных подходов (прежде всего, SERPA) в основе данного смещения лежат слабомодифицируемые (в рамках сохранения основных преимуществ метода) аналитические характеристики используемых подходов (см. предыдущий раздел).

Важность этого ограничения сложно переоценить, поскольку оно заключается даже не в простой недоступности для анализа значительной части клеточного протеома, но в недоступности как раз той его части, которая содержит белки, наиболее важные в отношении тонкой регуляции клеточных процессов в норме и патологии, в том числе и в онкологических заболеваниях. Иными словами, смещение анализируемой выборки белков носит не только концентрационный, но и функциональный характер.

Поэтому преимущественное выявление в качестве ОАА наиболее высокопредставленных белков (по сути, в основном продуктов хаускипингенов) является качественным фактором, значительно ограничивающим как клиническую применимость выявляемых мишеней аутоиммунного ответа, так и возможности научной интеграции получаемых данных с фундаментальными механистическими исследованиями в области опухолевой иммунологии.

Одним из ярких следствий данного ограничения является вырожденность аутоантигенных репертуаров, выявляемых в совершенно не связанных между собой заболеваниях и патологических состояниях [51]. Данный эффект, очевидно, является феноменом, родственным так называемому «эффекту déjà-vu», описанному ещё в 2008 г. Petrak et al. [70] в контексте классической дифференциальной протеомики и заключающемуся в повторной идентификации в качестве «дифференциально экспрессируемых» одного и того же «хит-парада» белков практически вне зависимости от типа сравниваемых объектов, состояний, тканей, стимулов и даже видовой принадлежности исследуемого биоматериала. Для отдельных классов белков попадание в этот «хит-парад», очевидно, обусловлено аналитическими артефактами протеомных методов (эпидермальные кератины как убиквитарные «средовые» контаминанты; неэпидермальные белки цитоскелета (актины, тубулины, виментин), изоформы которых могут опосредовать эффект «gel crowding» [51, 53]). Однако для большинства белков в списках Petrak et al. попадание в них, очевидно, обусловлено тем, что они являются универсальными сенсорами клеточного стресса практически любой природы, высокая представленность которых в клетке приводит к их первоочередному выявлению в любом дифференциальном протеомном эксперименте.

В контексте же обсуждаемых в настоящем обзоре проблем крайне интересным представляется то, что практически все индивидуальные белки и белковые классы, входящие в «хит-парад» Petrak et al., также идентифицируются из работы в работу как аутоантигены, ассоциированные с патологическими состояниями самого широкого спектра [51]. Пожалуй, наиболее показательным в этом смысле аутоантигеном является фермент α -енолаза (ENOA, ENO1), катализирующая превращение 2-фосфо-D-глицериновой кислоты в фосфоенолпириват на предпоследней стадии гликолиза. Занимая ранги № 1 (32% экспериментов) и № 2 (29% экспериментов) в скомпилированных Petrak et al. [70] списках индивидуальных белков, наиболее час-

то идентифицируемых, как дифференциально-экспрессируемые в клетках грызунов и человека соответственно, этот же белок является наиболее часто идентифицируемой антигенной мишенью диагностически значимых аутоантител практически вне зависимости от природы изучаемой патологии. Аутоантитела против ENO1 были идентифицированы как «кандидатный биомаркёр» при привычном невынашивании беременности [71], мембранозном гломерулонефрите [72], фиброзе печени [73], эндометриозе [74], лимфоцитарном гипофизите [75], раке поджелудочной железы [76] и ещё более чем в двух десятках никак не связанных между собой заболеваний и патологических состояний [51].

DÉJÀ-VU-АУТОАНТИГЕНЫ (DÉJÀ-VU-AA) КАК МИШЕНИ ЕСТЕСТВЕННЫХ IgG-АУТОАНТИТЕЛ (N-IgG-aAb)

Представляется крайне важным, что многие из таких «универсальных» аутоантигенов (далее — déjà-vu-AA) также идентифицируются как мишени «естественных» IgG (N-IgG-aAb) в работах по таргетному изучению репертуаров аутоантительных специфичностей у условно-здоровых индивидов [77–82]. В рамках данного обзора мы не будем обсуждать многочисленные аспекты иммунобиологии N-IgG-aAb (в том числе терминологические тонкости), которые детально изложены в ряде обзорных статей последних лет [83–85]; некоторые важные для изложения детали будут обсуждены отдельно в нижеследующих разделах. В контексте настоящего обзора, под N-IgG-aAb мы будем понимать любые IgG-аутоантитела, присутствующие в циркуляции у условно-здоровых индивидов при отсутствии анамнестических данных о любых заболеваниях, в которых присутствует выраженный компонент аутоиммунного ответа (нейродегенеративные, неинфекционные воспалительные, онкологические и собственно аутоиммунные заболевания).

В наших собственных исследованиях (Белюсов с соавт., неопубликованные данные) при помощи выборочной идентификации антигенов, демонстрирующих в SERPA-анализе высокоинтенсивные реакции у >10% условно-здоровых доноров, нам удалось выявить по меньшей мере восемь аутоантигенов, ранее идентифицированных другими группами в качестве ОАА (ANXA2, ENO1, HSPA8, HSPA9, HSPD1, PGAM1, SOD2 и TIM); четыре из них (ANXA2, ENO1, PGAM1 и TIM) также были выявлены в качестве мишеней N-IgG-aAb с умеренными и высокими частотами реактивности (>10% инди-

видов) в работе Li et al. [77], посвященной исследованию репертуаров антигенных специфичностей циркулирующих IgG у 35 условно-здоровых индивидов при помощи SERPA-анализа. Следует отметить, что все остальные аутоантигены, выявленные в работе Li et al., также многократно выявлялись в качестве ОАА в других исследованиях. В силу того, что количество таких работ составляет по меньшей мере несколько десятков, а их упоминание в данном контексте имеет исключительно иллюстративную цель, в настоящем обзоре соответствующие публикации не процитированы, однако могут быть легко найдены при помощи обсуждаемой ниже базы данных AAgAtlas (http://biokb.ncpsb.org/aagatlas_portal/).

Общепризнанных объяснений, почему одни и те же белки в одних исследованиях демонстрируют значимую аутоантительную реактивность в группе условно-здоровых доноров, а в других — нет, в литературе не представлено. Однако значимыми факторами вариативности могут быть различия в клинико-демографических, средовых и генетических факторах изучаемых популяций, а также в используемых для исследования аналитических платформах. Так, в ходе изучения спектра антигенных специфичностей N-IgG-aAb при помощи микроэрегов высокой плотности Nagele et al. [81] продемонстрировали, что базовый репертуар N-IgG-aAb значительно шире у женщин (что согласуется с тем, что женщины в гораздо большей степени подвержены абсолютному большинству аутоиммунных заболеваний) и расширяется с возрастом у обоих полов. В свою очередь, Sanchez et al. [86] показали, что в вестерн-блот-анализе с белками линии рака простаты РС3 в качестве источника антигенов сыворотки афроамериканцев с раком простаты демонстрируют намного более выраженную общую и анти-ENO1 аутоантительную реактивность, нежели сыворотки американцев европейского происхождения с аналогичным диагнозом. Однако в ELISA-анализе с использованием очищенного рекомбинантного ENO1 в качестве антигена паттерн распознавания менялся на прямо противоположный. Так или иначе и вне зависимости от конкретного объяснения того, почему одни и те же белки в одних исследованиях идентифицируются как ОАА, а в других — как мишени N-IgG-aAb, очевидно, что множества déjà-vu-AA и мишеней N-IgG-aAb значительно пересекаются друг с другом.

Следует специфически обратить внимание на то, что значительное пересечение множеств, идентифицируемых в отдельных исследованиях кандидатных ОАА, déjà-vu-AA и мишеней N-IgG-aAb, в абсолютном большинстве случаев,

по-видимому, не является признаком грубых артефактов, связанных с дизайном или методологией исследований. Крайне интересные в этом смысле данные получают в работах с использованием генноинженерных мышинных моделей онкологических заболеваний, в которых влияние средовых и генетических факторов сведено практически к нулю. Так, Cappelletto et al. [87] использовали метод SERPA для выявления аутоантигенов, вызывающих аутоантительный ответ по мере взросления мышей KC (*LSL-Trp53^{R172H/+}; Pdx-1-Cre*) и KPC (*LSL-Kras^{G12D/+}; LSL-Trp53^{R172H/+}; Pdx-1-Cre*), спонтанно развивающих предопухолевые изменения протоков поджелудочной железы и протоковый рак. Из девяти антигенов, демонстрировавших значимые различия в частотах сывороточной реактивности между KC/KPC и контрольными *Pdx-1-Cre*-мышью, лишь один (11%) демонстрировал тотальное отсутствие реактивности в контрольных мышцах, в то время как восемь остальных (89%) демонстрировали повышение титра соответствующих аутоантител и частот их выявления с изначально ненулевых значений у *Pdx-1-Cre*-мышью. Ещё более интересно, что два из девяти (22%) идентифицированных аутоантигенов (ANXA2 и HNRNPL) также были выявлены в вышеупомянутой работе Li et al. [77] в качестве мишеней N-IgG-aAb человека с умеренными и высокими частотами реактивности.

Таким образом, в смысле соотношения множеств *déjà-vu*-AA и мишеней N-IgG-aAb друг с другом, по-видимому, речь идёт об иммунологически консервативном феномене, при котором концентрация и частота выявления некоторых концентрационно лабильных N-IgG-aAb резко возрастает при развитии в организме относительно серьёзных патологических изменений. При этом широкий спектр таких изменений (см. ниже) и высокая представленность соответствующих белков в протеоме приводит к их первоочередному выявлению в качестве кандидатных аутоантигенов в большом количестве работ, выполненных на методических платформах, характеризующихся экспрессионной смещённостью (табл. 2), что и приводит к вышеописанной проблеме вырожденности/эффекту *déjà-vu*.

Основная же проблема, связанная с выявлением *déjà-vu*-AA/мишеней концентрационно лабильных N-IgG-aAb, заключается в том, что такие аутоантитела в реальности не являются истинным (*bona fide*) «маркёрным» феноменом ни одного из заболеваний, в контексте которых они идентифицируются. При этом триггером активации В-клеточного ответа являются, по-видимому, в значительной степени неспецифи-

ческие клеточные и тканевые процессы, сопровождающие широкий спектр патологических состояний и гомеостатических процессов, таких как воспаление, компрессия здоровой ткани патологическим очагом с последующей её атрофией, некротические процессы, вторичное инфицирование, различные виды стресса, дисбаланс различных видов клеточной гибели, гиперактивация тканевых протеиназ, репаративные процессы в тканях, недостаточность фагоцитоза апоптотических клеток и т.д. [2]. Очевидно также, что диагностическая точность подобных кандидатных биомаркёров, демонстрируя порой весьма высокие значения в модельных условиях (к примеру, в сравнении пациентов с запущенными формами рака и условно-здоровых индивидов), не может не быть скомпрометирована в реальных клинических ситуациях, в которых, как правило, речь идёт о необходимости дискриминации локализованной формы рака и неонкологической патологии на фоне множества сопутствующих заболеваний.

Следует отметить, что сама по себе идентификация мишеней N-IgG-aAb является чрезвычайно важной задачей в контексте изучения роли таких антител в иммунной защите, тканевом гомеостазе и патогенезе неинфекционных (и прежде всего – аутоиммунных) заболеваний в целом. Однако же в контексте изучения «иммунома» конкретных онкологических патологий – как с точки зрения иммунобиологии рака, так и с точки зрения клинической онкологии, интерес представляют *bona fide* ОАА, т.е. те аутоантигены, иммуногенность которых максимально тесно связана с процессом злокачественной трансформации и прогрессии; при этом выявление *déjà-vu*-AA/мишеней N-IgG-aAb, очевидно, должно быть сведено к минимуму. В нижеследующих разделах обзора причины преимущественного выявления *déjà-vu*-AA/мишеней N-IgG-aAb будут рассмотрены более подробно в непосредственном контексте концептуальных и методических усовершенствований, способных изменить соотношение выявляемости *déjà-vu*-AA/мишеней N-IgG-aAb, с одной стороны, и *bona fide* ОАА – с другой, в сторону преимущественного выявления последних.

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ НЕСМЕЩЕННЫХ МЕТОДОВ ИММУНОМНОГО ПРОФИЛИРОВАНИЯ

Современные методы несмещённого анализа репертуаров, распознаваемых циркулирующими аутоантителами ОАА (белковые микроэреи высокой плотности [58, 59], PhIP-Seq

[30, 31] и PLATO [32, 33]), по определению лишены проблемы экспрессионного смещения (и, соответственно, в значительной степени — проблемы вырожденности/эффекта *déjà-vu*) и являются в этом смысле идеальной альтернативой методам классической иммунопротеомики (табл. 2). В то же время крайне высокая стоимость белковых микроэрезов высокой плотности фактически делает невозможным их использование в небольших поисковых исследованиях. Важными исключениями являются исследования, дизайн которых изначально предполагает использование крайне ограниченного набора проб в скрининговой части, а также прикладные научно-клинические задачи по идентификации мишеней аутоиммунного ответа у отдельных пациентов (к примеру, у пациента с вероятным паранеопластическим неврологическим синдромом (ПНС) и неопределяемым уровнем аутоантител к известным онкогематологическим аутоантигенам). В таких случаях современные несмещённые методы (в т.ч. белковые микроэрезы высокой плотности) являются, пожалуй, наилучшей альтернативой — с оговоркой на то, что чрезмерное ограничение числа антителосодержащих проб на скрининговом этапе исследования чревато дополнительными ограничениями, способными значительно нивелировать преимущества несмещённых методов (см. ниже).

Крайне привлекательной альтернативой белковым микроэревам являются методы PhIP-Seq [30, 31] и PLATO [32, 33] (табл. 1 и 2). По оценкам авторов, при пробоспецифичном баркодировании стоимость анализа в расчёте на одну антителосодержащую пробу в 10–100 раз меньше, нежели при использовании белковых микроэрезов. Тем не менее синтез олигонуклеотидной библиотеки или покупка ORF-библиотеки требует значительных разовых финансовых вложений (несколько десятков тысяч долларов США), а сами методы базируются на последовательном использовании нескольких высокотехнологичных подходов (табл. 1). Это требует не только доступа к широкому спектру специализированного оборудования и программного обеспечения, но ещё и наличия мультидисциплинарной исследовательской группы с широким спектром экспертиз. Наконец, относительно небольшое количество опубликованных работ, посвящённых профилированию репертуаров, распознаваемых циркулирующими аутоантителами ОАА при помощи PhIP-Seq [8, 30, 88–91] и PLATO [32, 88], пока не позволяют в полной мере оценить все положительные и отрицательные стороны этих методов, а также их реализуемость в контексте небольших пилотных исследований.

В завершение данного раздела следует отметить, что множество мишеней N-IgG-aAb, хотя и демонстрирует выраженную ассоциацию с группами *déjà-vu*-АА и/или высокопредставленных белков, однако последними отнюдь не ограничивается. Справедливо и обратное — сама по себе высокая представленность белка в организме или конкретной клеточной популяции отнюдь не является автоматическим указанием на то, что такой аутоантиген является мишенью N-IgG-aAb. Таким образом, проблема дискриминации *bona fide* ОАА и N-IgG-aAb актуальна и для несмещённых методов профилирования, в особенности при анализе небольших выборок, которые наиболее часто используются в контексте таких методов (в силу высокой стоимости анализа) и в которых невозможность адекватного контроля частот аутоантительной реактивности к кандидатным ОАА в обеих исследуемых группах закономерным образом приводит к обогащению набора идентифицируемых антигенов нерекуррентно реагирующими ОАА и мишенями N-IgG-aAb.

МОДИФИКАЦИЯ КРИТЕРИЕВ ПОДБОРА КОНТРОЛЬНЫХ ГРУПП

Важно отметить, что в силу вышеописанной вариабельности иммунореактивности N-IgG-aAb в зависимости от клинично-демографических, средовых и генетических факторов наличие статистически достоверных отличий в частотах встречаемости аутоантител определенной специфичности между двумя анализируемыми группами само по себе не является индикатором того, что идентифицированный аутоантиген представляет собой *bona fide* ОАА. Действительно, во всех вышеупомянутых исследованиях, приводивших к идентификации *déjà-vu*-АА/мишеней N-IgG-aAb, кандидатные ОАА демонстрировали высокосущественные отличия по встречаемости соответствующих аутоантител между группой изучаемого заболевания и корректно подобранной контрольной группой.

Таким образом, первой стратегией, реализуемой еще на этапе продумывания дизайна исследования и потенциально способной снизить долю *déjà-vu*-АА/мишеней N-IgG-aAb в результатах скрининга, является вытекающая из вариабельности аутоантительной реактивности таких антигенов в зависимости от различных факторов (см. выше) максимально возможная клинично-демографическая, средовая и генетическая диверсификация контрольной группы, реактивность в которой и составляет определяющее свойство N-IgG-aAb. Классический дизайн

контрольной группы, в котором распределение клинико-демографических (возраст, пол) и, по возможности, других факторов (средовые, генетические) в максимальной степени соответствует таковому в группе изучаемого заболевания, по-видимому, является субоптимальным в контексте идентификации ОАА. В действительности такой дизайн заведомо занижает вариабельность концентрации аутоантител в контрольной группе по сравнению с общепопуляционным, тем самым создавая благоприятные условия для первоочередного выявления *déjà-vu*-АА/мишеней N-IgG-aAb. В особенности данный пункт может оказаться актуальным в контексте онкозаболеваний, возникающих в группах с относительно узким спектром специфичностей N-IgG-aAb — дети и молодые взрослые мужчины [81].

К этому же пункту вплотную примыкает необходимость тщательного и продуманного контроля коморбидных, фоновых и сопутствующих заболеваний, в особенности если последние имеют воспалительную или аутоиммунную природу (что является крайне частой ситуацией при злокачественных поражениях самой разной тканевой и органной принадлежности), поскольку именно в таких ситуациях шанс выявления *déjà-vu*-АА/мишеней N-IgG особенно высок. Так, Looi et al. [92] использовали метод SERPA для профилирования репертуаров аутоантительных специфичностей у пациентов с гепатоцеллюлярной карциномой. Из 28 антигенов, демонстрировавших аутоантительную реактивность у пациентов с раком печени при отсутствии таковой в пулированной пробе сыровоток здоровых доноров, 17 антигенов (61%) также демонстрировали значимые частоты реактивности хотя бы в одной из групп пациентов с хроническим гепатитом или циррозом печени, и 8 антигенов (29%) значимо реагировали во всех трех исследованных группах.

Весьма интересные данные получаются при сопоставлении набора идентифицированных в данной работе кандидатных ОАА с объединённым списком выявляемых при помощи SERPA мишеней N-IgG-aAb с умеренными и высокими частотами реактивности (Li et al. [77], Белоусов с соавт., неопубликованные данные; суммарно 13 антигенов, см. выше). Доля таких мишеней N-IgG-aAb в группах кандидатных ОАА, реагирующих в одной (только у пациентов с карциномами), двух и трех проанализированных когортах, составляет 1/11 (9%), 1/9 (11%) и 3/8 (38%) соответственно. Следует отметить, что, поскольку вышеописанный референсный список из 13 антигенов составляет крайне небольшую часть от тотального репертуара N-IgG-aAb, приведённые доли мишеней N-IgG-aAb

должны рассматриваться исключительно как нижняя граница оценки данного параметра; реальные значения этих долей, разумеется, значительно больше. Таким образом, значительная часть антигенов, демонстрирующих «добавленную» реактивность в группах пациентов с хроническим гепатитом и циррозом печени, очевидно, представляет собой *déjà-vu*-АА/мишени N-IgG-aAb. «Индекс подозрительности» в отношении таких антигенов должен быть в особенности высоким, и без каких-либо мощных предпосылок к их более глубокому изучению они должны исключаться из дальнейшего анализа. Заметим, что даже вне контекста концепции *déjà-vu*-АА/мишеней N-IgG-aAb диагностическая ценность соответствующих аутоантител будет по очевидным причинам минимальной.

Интересно, что в обсуждаемой работе очевидный прирост обогащения кандидатных ОАА мишенями N-IgG-aAb с умеренными и высокими частотами реактивности происходит лишь в группе кандидатных ОАА, выявляемых циркулирующими аутоантителами во всех трех когортах (гепатоцеллюлярный рак, цирроз печени, хронический гепатит). При этом в группе антигенов, выявляемых в двух когортах (гепатоцеллюлярный рак + хронический гепатит или цирроз печени), доля подобных N-IgG-aAb фактически не отличается от таковой в группе наиболее опухолеспецифичных аутоантигенов. Наиболее вероятно, в данном исследовании это связано с тем, что среди антигенов, выявляемых в двух когортах, для 8/9 (89%) антигенов речь идет о «добавленной» реактивности в когорте пациентов с циррозом печени, который является одним из главных факторов риска развития гепатоцеллюлярного рака; поэтому в данном случае речь может идти об аутоантителах, являющихся биомаркерами наиболее ранних стадий злокачественной трансформации. Данную возможность следует иметь в виду при включении в дополнительные группы контроля пациентов с предраковыми заболеваниями и пограничными опухолями, и «индекс подозрительности» в плане отнесения антигенов, демонстрирующих иммунореактивность в таких группах, к потенциальным *déjà-vu*-АА/мишеням N-IgG-aAb должен быть закономерно ниже, нежели в ситуации, описанной абзацем выше.

ЭФФЕКТ *DÉJÀ-VU* И ПРОБЛЕМЫ ОНКО- И ИММУНОБИОЛОГИЧЕСКОГО КОНТЕКСТА

Отдельной, однако же тесно связанной с вышеописанным эффектом *déjà-vu*, проблемой яв-

ляется выраженная феноменологичность и чрезмерная клинично-диагностическая ориентированность подавляющего большинства исследований репертуаров распознаваемых циркулирующими аутоантителами ОАА. Действительно, в большинстве случаев речь идёт о простом сравнительном анализе репертуаров антигенов, распознаваемых циркулирующими аутоантителами в группе морфологически и молекулярно гетерогенных опухолей того или иного органа и группе контрольных индивидов.

Причины преимущественного выбора именно такого дизайна лежат на поверхности: во-первых, узкая функционально-биологическая «контекстуализация» исследования (см. ниже) значительно усложняет либо экспериментальную систему, либо процесс набора выборки для исследования, либо и то и другое. Во-вторых, морфологическая, молекулярная и иммунобиологическая гетерогенность опухолей в группе изучаемого заболевания создает теоретические предпосылки для выявления «универсального» биомаркёра той или иной нозологии без «привязки» к конкретному гистологическому варианту, онкогенному событию или молекулярной сигнатуре, что для подавляющего большинства клинично-диагностических целей является однозначным преимуществом. Однако же обратной стороной медали такой универсальности закономерным образом является опять-таки первоочередное выявление «максимально универсальных» *déjà-vu*-АА.

В связи с этим ещё одним подходом к снижению частоты выявления *déjà-vu*-АА/мишеней N-IgG-aAb является онко- и/или иммунобиологическая «контекстуализация» исследования, при которой отдельные компоненты экспериментальной системы, дизайна исследования, критериев отбора пациентов и т.д. будут оказывать значительное селекционное давление в сторону отбора *bona fide* ОАА, иммуногенность которых максимально тесно связана с процессами злокачественной трансформации, прогрессии и/или заведомо высокоэффективного противоопухолевого иммунного ответа.

ВОССОЗДАНИЕ МОЛЕКУЛЯРНОГО КОНТЕКСТА ИЗУЧАЕМОГО ЗАБОЛЕВАНИЯ В КЛЕТОЧНОЙ СИСТЕМЕ, ИСПОЛЬЗУЕМОЙ В КАЧЕСТВЕ ИЗНАЧАЛЬНОГО ПУЛА АУТОАНТИГЕНОВ

Наиболее очевидным способом контекстуализации исследований по изучению репертуаров аутоантительных специфичностей в онкологических заболеваниях человека является

воссоздание патогенетически релевантного контекста на уровне клеточной системы, используемой для получения пула антигенов для скрининга. При этом сравнение двух сингенных систем, единственным отличием которых друг от друга является «включение» той или иной транскрипционной программы, может представлять собой мощный аналитический фильтр для фокусирования анализа на аутоантигенах, экспрессия которых непосредственно связана с воссоздаваемым *in vitro* аспектом патогенеза изучаемого заболевания.

По-видимому, прототипным методом в рамках данной стратегии следует считать «метод триангуляции», разработанный Cottrell et al. [93] для идентификации патогенетически значимых аутоантигенов, распознаваемых циркулирующими антителами у пациентов с миозитом. В данном методе иммунопатологическая контекстуализация достигалась путем *in vitro* воссоздания в клеточной системе, используемой как источник аутоантигенного пула, одного из двух событий, тесно связанных с патогенезом изучаемого заболевания, а именно гиперстимуляции клеток IFN- α [94] либо дифференцировки миоцитов из миобластов как компонента регенерации скелетных мышц [95]. Авторы использовали пре-скрининг сывороток крови пациентов с миозитом при помощи стандартного одномерного вестерн-блот-анализа на способность специфично распознавать аутоантигены, экспрессия которых индуцировалась в клетках в результате обработки IFN- α либо *in vitro* дифференцировки миобластов. Дальнейший классический SERPA-анализ использовали для целенаправленной идентификации «новых» антигенных специфичностей аутоантител в отобранных по результатам пре-скрининга сыворотках. В результате проведенного анализа были идентифицированы антигены IFIT3 и MYL4, распознаваемые сывороточными аутоантителами пациентов с миозитом, экспрессия которых специфически индуцировалась в ходе стимуляции IFN- α и регенеративного процесса в мышцах соответственно.

Концептуально схожий подход, однако уже в контексте онкологического заболевания, был несколько позже использован Grandjean et al. [96]. В данном исследовании авторы сфокусировали свое внимание на возможном влиянии на аутоантигенный репертуар условий гипоксии, одного из ключевых параметров микроокружения опухоли, определяющих ее транскрипционную программу, фенотипические особенности, агрессивность и устойчивость к терапии [97]. Авторы культивировали клеточные линии колоноRECTАЛЬНОГО РАКА HCT116 и HT29 в условиях

нормоксии либо 48-часовой гипоксии. Тотальные белковые фракции полученных клеток использовали как источники антигенов в SERPA-анализе для гибридизации с пулированными сыворотками крови бестимусных мышей (NMRI-Foxp1^{nu/nu}), несущих подкожные ксенографты НСТ116 или HT29, либо сингенных контрольных мышей без опухоли. В этом комплексе сравнительном анализе авторов специфически интересовали белки, выявляемые только сыворотками мышей с опухолями (исключение мишеней N-IgG-aAb с высокими частотами реактивности) и только в клетках, культивируемых в условиях гипоксии («фокусировка» исследования на аутоантигенах, экспрессия которых непосредственно индуцируется гипоксией). Такой аутоантиген был идентифицирован как фосфорилированная (Thr56) форма фактора элонгации eEF2, при этом распознавания нефосфорилированной формы eEF2 не наблюдалось. Опосредованное eEF2K-зависимым фосфорилированием eEF2 ингибирование элонгации полипептидной цепи является важным компонентом клеточного ответа на гипоксический стресс [98–101]. Таким образом, аутоантительный ответ против p-eEF2 является феноменом, непосредственно связанным с внутриопухолевой гипоксией на молекулярно-патогенетическом уровне. Титр аутоантител против p-eEF2 нарастал по мере прогрессии опухоли в мышцах, причём детектируемый их уровень определялся уже на седьмой день после введения опухолевых клеток, когда пальпируемая опухоль ещё не определялась; таким образом, аутоантитела против p-eEF2 потенциально могут быть использованы для ранней диагностики. Это соотносилось с данными, полученными на панели сывороток пациентов с аденомами толстой кишки, колоректальным раком, а также здоровых доноров, у которых аутоантитела против p-eEF2 выявлялись исключительно в группах пациентов с опухолями толстой кишки. Однако следует отметить, что практически идентичные частоты выявления и распределения концентрации таких аутоантител в группах пациентов с аденомами и карциномами несколько компрометируют их клинико-диагностический потенциал. Также авторы справедливо отмечают, что не вполне ясно, является ли обнаруженный ими феномен аутоантительной реактивности против p-eEF2 специфичным к опухолевым заболеваниям либо же универсальным сенсором любого состояния выраженной тканевой гипоксии. Так или иначе, данное исследование ярко демонстрирует потенциал такого многомерного сравнительного подхода для идентификации *bona fide* аутоантигенов, непосредственно ассоциированных с

индукцией той или иной транскрипционной (в т.ч. онкогенной) программы.

Наконец, для фокусирования иммунопротеомного анализа на патогенетически значимых аутоантигенах наша группа разработала метод DISER (2D-DIGE+SERPA) [102]. В данном подходе конкретная онкогенная транскрипционная программа воссоздается *in vitro* в клеточной системе при помощи трансдукции иммортализованной линии нормального эпителия лентивирусным конструктом, кодирующим мутантный онкоген, специфичный для определенного морфомолекулярного класса опухолей. Ключевым отличием DISER от SERPA при этом является замена классического 2D-ЭФ на разностный электрофорез (2D-DIGE) с двумя дифференциально мечеными белковыми фракциями, одна из которых соответствует клеткам, трансдуцированным контрольным вектором, а другая – клеткам, трансдуцированным онкогеном. Таким образом, в каждом из экспериментов появляется опция фокусирования анализа на тех белках, экспрессия которых специфически индуцируется конкретным онкогенным событием. С использованием данного метода мы идентифицировали гликолитический фермент фосфоглицераткиназу 1 (PGK1) как *bona fide* ОАА, специфически индуцируемый мутантным онкогеном NRAS^{Q61R}, аутоантитела к которому селективно маркируют группу неинвазивных опухолей щитовидной железы RAS-подобного фенотипа.

ОПУХОЛЕАССОЦИИРОВАННЫЙ АУТОИММУНИТЕТ КАК КЛИНИКО-ИММУНОЛОГИЧЕСКИЙ КОНТЕКСТ ДЛЯ ВЫЯВЛЕНИЯ *bona fide* ОАА

Другим эффективным способом иммуно/онкобиологической контекстуализации исследований по изучению репертуаров распознаваемых циркулирующими аутоантителами ОАА является отбор для скрининговой части исследования пациентов с клиническими или морфологическими (по данным гистологического/иммуногистохимического анализа биопсий) признаками аномально сильного противоопухолевого иммунного ответа либо, в экстремальном варианте последнего, – паранеопластического аутоиммунного синдрома. Следует отметить, что именно аутоантигены, ассоциированные с ПНС, фактически являются единственным классом ОАА, находящим рутинное применение в клинической онкологии [4–6].

В исследовании Nagele et al. [81] абсолютная численность индивидуальных специфичностей

N-IgG-aAb значительно снижалась в группах пациентов с нейродегенеративными заболеваниями аутоиммунной/воспалительной природы (болезнь Альцгеймера, болезнь Паркинсона и рассеянный склероз) по сравнению с группами контроля с аналогичными показателями распределения возраста и соотношения полов. В наиболее простой интерпретации этого на первый взгляд отчасти парадоксального феномена антиген-специфичная пролиферация иммунных клеток (в т.ч. антителопродуцирующих плазмбластов) неизбежно приводит к конкуренции за анатомические и функциональные ниши, «победу» в которой имеет тенденцию одерживать потомство клеток, подвергшихся антигенной стимуляции сравнительно недавно [103]. Таким образом, мощная антигенная стимуляция при острой инфекции, вакцинации или аутоиммунном процессе будет закономерным образом приводить к гомеостатическому сужению репертуара выявляемых антигенных специфичностей N-IgG-aAb; при этом обогащаемыми специфичностями окажутся *bona fide* мишени активного иммунного ответа (в контексте паранеопластического аутоиммунитета – *bona fide* ОАА). Интересно, что в неселектированных выборках онкологических пациентов (по крайней мере, в отдельных нозологиях в работе Nagele et al. [81] – рак молочной железы) феномена сужения репертуара специфичностей N-IgG-aAb не наблюдается, что может объясняться сравнительно низкой иммуногенностью таких опухолей [104]. Крайне важно отметить, что данный факт отнюдь не говорит о том, что аутоантительный репертуар таких пациентов не содержит антител против *bona fide* ОАА, речь идёт лишь о том, что мощностю соответствующих антигенспецифичных ответов недостаточна для значимого гомеостатического сужения репертуара N-IgG-aAb.

Наиболее ярко данный эффект (следует признать, отчасти гипотетический) прослеживается в визуализационных методах анализа (таких как SERPA). Так, при использовании в качестве гибридационных проб сывороток пациентов с ПНС сигнал, соответствующий распознаваемому онконевральному антигену, часто оказывается наиболее интенсивным (и иногда единственным) во всей 2D-гибридационной реплике [105, 106], несмотря на сравнительно низкую представленность соответствующих аутоантигенов даже при использовании в качестве исходного аутоантигенного пула лизатов мозга или его отделов (по данным базы PaxDb [107], <https://pax-db.org/>). Получаемые в таких экспериментах низкокомплексные гибридационные паттерны резко контрастируют с высококом-

плексными паттернами (от 10 до >100 индивидуальных точек на блот), получаемыми в SERPA-анализе сывороток крови индивидов без активного иммунного процесса, в т.ч. условно-здоровых индивидов и неселектированных пациентов со злокачественными заболеваниями.

Хотя в основном такой подход используется в узком контексте выявления аутоантигенных мишеней различных ПНС, его реальный потенциал значительно шире. Так, большинство детально изученных к настоящему моменту онко-невральных аутоантигенов являются полноценными *bona fide* ОАА, иммунный ответ на которые в первую очередь ассоциирован с наличием онкологического заболевания, а не ПНС *per se* [108]. К примеру, анти-Hu (ANNA1) – аутоантитела, антигенными мишенями которых являются онко-невральные антигены HuB/ELAVL2, HuC/ELAVL3 и HuD/ELAVL4, выявляются в 10–20% случаев мелкоклеточного рака легких, не сопровождающихся клинической картиной анти-Hu/ANNA1 – ассоциированного энцефалита [109–112]. Аналогично, антитела к раково-сетчаточному аутоантигену рековерину выявляются в 15 и 20% случаев мелкоклеточного и немелкоклеточного рака легких соответственно, не сопровождающихся клиническими признаками раково-ассоциированной ретинопатии [113].

Важно отметить, что лишь у крайне небольшой доли онкологических пациентов без признаков ПНС титры аутоантител к онко-невральным антигенам сопоставимы с таковыми у пациентов с ПНС [110]. Данный факт никак не интерферирует с рутинным определением таких антител при их известной антигенной специфичности, однако, в сочетании с широким репертуаром N-IgG-aAb у таких пациентов, драматически снижает выявляемость соответствующих мишеней в скрининговом сеттинге, особенно с использованием методов гелевой протеомики, таких как SERPA. Таким образом, опухолеассоциированный аутоиммунитет может служить своего рода «линзой», фокусирующей аналитические мощности используемого метода на выявлении аберрантно/эктопически экспрессированных *bona fide* ОАА за счёт высоких титров соответствующих аутоантител и выраженного гомеостатического сужения репертуара N-IgG-aAb.

Наконец, следует отдельно упомянуть, что потенциал данного подхода отнюдь не ограничивается идентификацией ОАА, профиль экспрессии которых в нормальных тканях соответствует органной тропности паранеопластического аутоиммунного процесса. Теоретически, активный иммунный процесс, запускаемый

непосредственно опухолевыми клетками, закономерным образом должен вовлекать В-лимфоцитарные клоны как минимум нескольких антигенных специфичностей, в т.ч. отличных от специфичности клонов, ответственных за последующее возникновение аутоиммунного поражения отделенных органов. Так, Larman et al. [30] в своей пионерской статье по разработке метода PhIP-Seq проанализировали спектр специфичностей аутоантител в спинномозговой жидкости трех пациенток с немелкоклеточным раком легкого и доказанным ($n = 1$) либо вероятным ($n = 2$) ПНС и, наряду с известными (NOVA1) и выявленными впервые (TRIM67/TRIM9) онкогеновыми специфичностями, идентифицировали новый ОАА – TGIF2LX. Аутоантитела против TGIF2LX выявлялись в спинномозговой жидкости двух из трех пациенток, однако данный аутоантиген не экспрессируется в центральной нервной системе и, таким образом, не мог являться *bona fide* мишенью аутоиммунного ответа, приведшего к развитию ПНС (т.е. собственно онкогеновым антигеном); в настоящее время TGIF2LX относят к группе раково-семенниковых аутоантигенов [114]. Таким образом, «фокусирующая» способность опухолеассоциированного аутоиммунитета, по-видимому, реализуется в отношении идентификации *bona fide* ОАА широкого спектра, не ограничивающегося антигенами, в норме экспрессирующимися в органах-мишенях паранеопластической аутоиммунной атаки.

АНАЛИЗ РЕПЕРТУАРОВ СПЕЦИФИЧНОСТЕЙ АУТОАНТИТЕЛ, ПРОДУЦИРУЕМЫХ *in situ* В ОПУХОЛЕВОЙ ТКАНИ

Опухолеассоциированные третичные лимфоидные структуры (TLS) являются важнейшей составляющей тканевого окружения опухоли. Наличие и плотность TLS являются практически универсальными и независимыми от клинико-морфологических характеристик маркерами относительно благоприятного прогноза во всех изученных локализациях. Как и дренирующие опухоль регионарные лимфоузлы, TLS являются сайтами презентации/кросс-презентации опухолевых антигенов Т-клеткам, созревания и дифференцировки Т- и В-клеток, в т.ч. генерирования плазматических клеток [115]. Таким образом, крайне интересным способом обогащения выявляемых мишеней аутоантител *bona fide* ОАА является анализ репертуаров антител, продуцируемых *in situ* в опухолевой и/или перитуморальной ткани, в т.ч. с точки зрения

идентификации аутоантигенов, одновременно являющихся мишенями опухоль-инфильтрирующих CD4⁺ и CD8⁺ Т-клеток.

Ряд авторов продемонстрировали в тканях карцином молочной железы *in situ* синтез аутоантител против продуктов гранзим В-опосредованного протеолиза β-актина [116], ганглиозида D3 [117], раково-эмбрионального антигена, муцина-1 и фибронектина-1 [118], раково-семенникового антигена STAG1B (NY-ESO-1) и некоторых других [119]. Однако следует отметить, что данные исследования ограничены одной локализацией, и их методология не предусматривала анализа спектра специфичностей на полнотеомном уровне.

Недостатком данного подхода является то, что выявляемые с его помощью аутоантитела могут выходить в кровоток в крайне небольших количествах, что очевидным образом компрометирует их использование в качестве биомаркеров. Аналогично за пределами выявляемого в данном подходе спектра оказываются ОАА, аутоантитела к которым продуцируются плазматическими клетками, дифференцировавшимися из В-клеток в регионарных лимфоузлах и локализованными в классических костно-мозговых нишах. Подтверждением данных тезисов могут служить результаты вышеприведенной работы Garaud et al. [119], продемонстрировавших значительные отличия в репертуарах ОАА, выявляемых продуцируемыми *in situ* и аутологичными циркулирующими аутоантителами. Таким образом, для оценки реального потенциала данного подхода в выявлении диагностически значимых ОАА необходимы дальнейшие исследования с использованием обсуждаемых в настоящем обзоре высокопроизводительных методов с достаточной глубиной анализа в широком спектре онкопатологий.

АНАЛИТИЧЕСКАЯ И ПОСТ-АНАЛИТИЧЕСКАЯ ФИЛЬТРАЦИЯ КАК СПОСОБ СНИЖЕНИЯ ЧАСТОТ ВЫЯВЛЕНИЯ DÉJÀ-VU-AA/МИШЕНЕЙ N-IgG-aAb

Последней группой подходов, потенциально способных снизить долю déjà-vu-AA/мишеней N-IgG-aAb в результатах скрининговых исследований по идентификации ОАА, является фильтрация выявляемых кандидатов на финальных этапах иммуноскрининга.

Интересным наблюдением, сделанным нами в ходе собственных исследований, является то, что обилие слабых реакций в ограниченной контрольной выборке (даже при значительном

их отличии от сильных реакций в группе изучаемого заболевания) часто является предиктором провала кандидатного аутоантигена на этапе внешней валидации за счёт выявления значимого процента сильных реакций во внешней/расширенной контрольной выборке (Белоусов с соавт., неопубликованные данные). Таким образом, важным компонентом идентификации *bona fide* ОАА, по-видимому, является минимальная толерантность к слабым и относительно низко рекуррентным реакциям в контрольных группах.

Ещё один потенциально крайне интересный подход, который, однако, до сих пор не исследован систематически, связан с фундаментальными аспектами иммунологии N-IgG-aAb. В рамках настоящего обзора мы определяли N-IgG-aAb в достаточно широком смысле, как любые аутоантитела, присутствующие в циркуляции условно-здоровых индивидов при отсутствии анамнестических данных об аутоиммунных/воспалительных/онкологических заболеваниях. Однако во многих работах под N-IgG-aAb в узком смысле понимают аутоантитела изотипа IgG3, продуцируемые, наряду с естественными IgM, популяцией В-1-клеток [83]. Подобно последним, такие *bona fide* N-IgG-aAb полиреактивны, продуцируются в отсутствие антигенной стимуляции и Т-клеточной помощи и, с функциональной точки зрения, более близки к системе врожденного иммунитета. Ключевым их свойством в контексте проблематики настоящего обзора является их полиреактивность. Разумно предположить, что значительная часть выявляемых высококомплексного репертуара специфичностей N-IgG-aAb [77–82] в реальности обусловлена полиреактивными *bona fide* N-IgG-aAb изотипа IgG3. В этом случае дискриминация реактивности таких антител от реактивности аутоантител, продуцируемых потомством В-2-клеток в результате Т-зависимого иммунного ответа на *bona fide* ОАА, — это вопрос дифференциального выявления IgG3 и всех остальных подклассов IgG. В настоящее время это не представляет ни малейшей проблемы и легко выполняется при использовании в качестве реагента для выявления или захвата иммунного комплекса белка А (вместо наиболее часто используемых в настоящее время белка G или смесей А/G), не связывающего подавляющее большинство IgG3, либо множества коммерчески доступных вторичных подкласс-специфичных антител. Удивительно, но ни в одной работе по системному изучению репертуаров N-IgG-aAb [77–82] распределение подклассов IgG не изучалось. Это является крайне интересным вопросом для дальнейшего изучения и, возможно, способно привести

к разработке нового способа высокоэффективного дифференцирования мишеней N-IgG-aAb и *bona fide* ОАА, адаптируемого к широкому спектру аналитических платформ.

После достоверной идентификации мишенной аутоантительного ответа (к примеру, при помощи тандемной хромато-масс-спектрометрии) наиболее очевидным фактором, который должен порождать высокий «индекс подозрительности» в отношении того, что идентифицированный аутоантиген может принадлежать к одной или обоим группам *déjà-vu*-АА/мишеней N-IgG, является собственно факт его повторной идентификации во множестве исследований в совершенно различных клинических контекстах. Сравнительно недавно созданная база данных AAgAtlas [120] (http://biokb.ncpsb.org/aagatlas_portal/) предоставляет удобный интерфейс для глубокого поиска текстовых упоминаний индивидуальных белков в контексте аутоантительной реактивности в широком спектре заболеваний человека. Эта база данных не является исчерпывающей, однако в контексте выявления *déjà-vu*-АА данный инструмент является практически идеальным.

Не последнюю роль в персистирующем выявлении мишеней N-IgG-aAb в качестве антигенов, ассоциированных с тем или иным заболеванием, играет отсутствие каталогизированных данных по идентифицированным в вышеприведенных исследованиях мишеням N-IgG-aAb в удобном для быстрого и исчерпывающего поиска интерфейсе. Определенным важным шагом к такому «каталогу» является вышеупомянутая база данных AAgAtlas, в которой о вероятной принадлежности интересующего белка к этой группе аутоантигенов можно судить по аномально широкому спектру заболеваний и патологических состояний, в которых он был идентифицирован (*déjà-vu*-АА). Однако такой суррогатный подход очевидным образом не является исчерпывающим решением данной проблемы, и крайне актуальной задачей является подробная и аннотированная каталогизация уже полученных данных о мишенях N-IgG-aAb, равно как и получение новых первичных данных в различных популяциях и кроссплатформенных аналитических сеттингах.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В области идентификации распознаваемых циркулирующими аутоантителами ОАА и их применения в диагностических целях проблемные моменты и ограничения, разумеется, не исчерпываются факторами, рассмотренными в

настоящем обзоре. Однако именно концептуальные проблемы экспрессионного смещения, эффекта *déjà-vu*/вырожденности репертуаров ОАА, преимущественной идентификации мишеней N-IgG-aAb и отсутствия корректного биологического контекста являются, по мнению автора, теми факторами, которые принципиально ограничивают как клиническую валидность, так и биологическую значимость идентифицируемых ОАА и аутоантигенов/аутоантительных сигнатур. Как продемонстрировано в настоящем обзоре, влияние всех этих факторов может быть в той или иной степени снижено с использованием широкого спектра подходов на всех основных этапах исследования, начиная от дизайна, выбора методологии и формирования опытных и контрольных групп и заканчивая пост-аналитической фильтрацией списка выявленных кандидатных ОАА. Важно отметить, что все описанные подходы не являются взаимоисключающими, и их комбинированное использование вполне может демонстрировать аддитивный характер в плане повышения вероятности идентификации *bona fide* ОАА либо доли таких аутоантигенов среди идентифицируемых кандидатных ОАА.

Разумеется, далеко не каждый из вышеописанных подходов может быть применен в рамках конкретного исследования. Очевидно, что использование несмещённых методов плохо подходит для небольших пилотных исследований, компонент популяционно-генетической диверсификации контрольной группы будет крайне сложно реализовать в этнически гомо-

генных популяциях, а использование опухоле-ассоциированного аутоиммунитета в качестве «функционально-фокусирующего» фактора возможно только при анализе нозологий, в которых паранеопластический аутоиммунитет встречается сравнительно часто. Однако среди всего многообразия описанных подходов практически для любого исследования в этой области возможно найти по крайней мере несколько подходящих пунктов. Использование таких подходов в различных сочетаниях и экспериментальных контекстах, а также исследование ряда плохо изученных вопросов в этой области могут как значительно повысить клиническую применимость выявляемых аутоантительных биомаркёров, так и радикально улучшить интеграцию получаемых данных в современную картину иммунологического и молекулярного «ландшафтов» опухолей человека.

Финансирование. Исследование выполнено при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований в рамках научного проекта № 19-115-50248.

Благодарности. Автор выражает благодарность А.В. Боголюбовой-Кузнецовой за помощь в оформлении рукописи.

Конфликт интересов. Автор заявляет об отсутствии конфликта интересов.

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

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Anderson, K. S., and LaBaer, J. (2005) The sentinel within: exploiting the immune system for cancer biomarkers, *J. Proteome Res.*, **4**, 1123-1133, doi: 10.1021/pr0500814.
2. Zaenker, P., Gray, E. S., and Ziman, M. R. (2016) Autoantibody production in cancer – the humoral immune response toward autologous antigens in cancer patients, *Autoimmun. Rev.*, **15**, 477-483, doi: 10.1016/j.autrev.2016.01.017.
3. Wu, J., Li, X., Song, W., Fang, Y., Yu, L., et al. (2017) The roles and applications of autoantibodies in progression, diagnosis, treatment and prognosis of human malignant tumours, *Autoimmun Rev.*, **16**, 1270-1281, doi: 10.1016/j.autrev.2017.10.012.
4. Vedeler, C. A., Antoine, J. C., Giometto, B., Graus, F., Grisold, W., et al. (2006) Management of paraneoplastic neurological syndromes: report of an EFNS task force, *Eur. J. Neurol.*, **13**, 682-690, doi: 10.1111/j.1468-1331.2006.01266.x.
5. Zuliani, L., Graus, F., Giometto, B., Bien, C., and Vincent, A. (2012) Central nervous system neuronal surface antibody associated syndromes: review and guidelines for recognition, *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry.*, **83**, 638-645, doi: 10.1136/jnnp-2011-301237.
6. Zoccarato, M., Gastaldi, M., Zuliani, L., Biagioli, T., Brogi, M., et al. (2017) Diagnostics of paraneoplastic neurological syndromes, *Neurol. Sci.*, **38**, 237-242, doi: 10.1007/s10072-017-3031-5.
7. Lu, X., Peng, Q., and Wang, G. (2019) The role of cancer-associated autoantibodies as biomarkers in paraneoplastic myositis syndrome, *Curr. Opin. Rheumatol.*, **31**, 643-649, doi: 10.1097/BOR.0000000000000641.
8. Xu, G. J., Shah, A. A., Li, M. Z., Xu, Q., Rosen, A., et al. (2016) Systematic autoantigen analysis identifies a distinct subtype of scleroderma with coincident cancer, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **113**, E7526-E7534, doi: 10.1073/pnas.1615990113.
9. Chu, G. C. W., Lazare, K., and Sullivan, F. (2018) Serum and blood based biomarkers for lung cancer screening: a systematic review, *BMC Cancer*, **18**, 181, doi: 10.1186/s12885-018-4024-3.
10. Macdonald, I. K., Allen, J., Murray, A., Parsy-Kowalska, C. B., Healey, G. F., et al. (2012) Development and validation of a high throughput system for discovery of antigens for autoantibody detection, *PLoS One*, **7**, e40759, doi: 10.1371/journal.pone.0040759.

11. Jett, J. R., Peek, L. J., Fredericks, L., Jewell, W., Pingleton, W. W., and Robertson, J. F. R. (2014) Audit of the autoantibody test, EarlyCDT®-Lung, in 1600 patients: an evaluation of its performance in routine clinical practice, *Lung Cancer*, **83**, 51-55, doi: 10.1016/j.lungcan.2013.10.008.
12. Edelsberg, J., Weycker, D., Atwood, M., Hamilton-Fairley, G., and Jett, J. R. (2018) Cost-effectiveness of an autoantibody test (EarlyCDT-Lung) as an aid to early diagnosis of lung cancer in patients with incidentally detected pulmonary nodules, *PLoS One*, **13**, e0197826, doi: 10.1371/journal.pone.0197826.
13. Sullivan, F. M., Mair, F. S., Anderson, W., Armory, P., Briggs, A., et al. (2020) Earlier diagnosis of lung cancer in a randomised trial of an autoantibody blood test followed by imaging, *Eur. Respir. J.*, **56**, 2000670, doi: 10.1183/13993003.00670-2020.
14. Tsou, P., Katayama, H., Ostrin, E. J., and Hanash, S. M. (2016) The emerging role of B cells in tumor immunity, *Cancer Res.*, **76**, 5591-5601, doi: 10.1158/0008-5472.CAN-16-0431.
15. Tokunaga, R., Naseem, M., Lo, J. H., Battaglin, F., Soni, S., et al. (2019) B cell and B cell-related pathways for novel cancer treatments, *Cancer Treat Rev.*, **73**, 10-19, doi: 10.1016/j.ctrv.2018.12.001.
16. Corsiero, E., Delvecchio, F. R., Bombardieri, M., and Pitzalis, C. (2019) B cells in the formation of tertiary lymphoid organs in autoimmunity, transplantation and tumorigenesis, *Curr. Opin. Immunol.*, **57**, 46-52, doi: 10.1016/j.coi.2019.01.004.
17. Largeot, A., Pagano, G., Gonder, S., Moussay, E., and Paggetti, J. (2019) The B-side of cancer immunity: the underrated tune, *Cells*, **8**, 449, doi: 10.3390/cells8050449.
18. Zhao, K.-L., Yang, X.-J., Jin, H.-Z., Zhao, L., Hu, J.-L., and Qin, W.-J. (2019) Double-edge role of B cells in tumor immunity: potential molecular mechanism, *Curr. Med. Sci.*, **39**, 685-689, doi: 10.1007/s11596-019-2092-5.
19. Sharonov, G. V., Serebrovskaya, E. O., Yuzhakova, D. V., Britanova, O. V., and Chudakov, D. M. (2020) B cells, plasma cells and antibody repertoires in the tumour microenvironment, *Nat. Rev. Immunol.*, **20**, 294-307, doi: 10.1038/s41577-019-0257-x.
20. Sahin, U., Türeci, Ö., Schmitt, H., Cochlovius, B., Johannes, T., et al. (1995) Human neoplasms elicit multiple specific immune responses in the autologous host, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **92**, 11810-11813, doi: 10.1073/pnas.92.25.11810.
21. Desmetz, C., Maudelonde, T., Mangé, A., and Solassol, J. (2009) Identifying autoantibody signatures in cancer: a promising challenge, *Expert Rev. Proteomics*, **6**, 377-386, doi: 10.1586/epr.09.56.
22. Sahin, U., and Türeci, Ö. (2013) Antigen identification using SEREX, *Methods Mol. Biol.*, **1061**, 59-77, doi: 10.1007/978-1-62703-589-7_3.
23. Kiyamova, R., Kostianets, O., Malyuchik, S., Filonenko, V., Usenko, V., et al. (2010) Identification of tumor-associated antigens from medullary breast carcinoma by a modified SEREX approach, *Mol. Biotechnol.*, **46**, 105-112, doi: 10.1007/s12033-010-9285-2.
24. Somers, V. A., Brandwijk, R. J., Joosten, B., Moerkerk, P. T., Arends, J.-W., et al. (2002) A panel of candidate tumor antigens in colorectal cancer revealed by the serological selection of a phage displayed cDNA expression library, *J. Immunol.*, **169**, 2772-2780, doi: 10.4049/jimmunol.169.5.2772.
25. Pavoni, E., Vaccaro, P., Pucci, A., Monteriù, G., Beghetto, E., et al. (2004) Identification of a panel of tumor-associated antigens from breast carcinoma cell lines, solid tumors and testis cDNA libraries displayed on lambda phage, *BMC Cancer*, **4**, 78, doi: 10.1186/1471-2407-4-78.
26. Jiang, B., Ren, T., Dong, B., Qu, L., Jin, G., et al. (2010) Peptide mimic isolated by autoantibody reveals human arrest defective 1 overexpression is associated with poor prognosis for colon cancer patients, *Am. J. Pathol.*, **177**, 1095-1103, doi: 10.2353/ajpath.2010.091178.
27. Mintz, P. J., Rietz, A. C., Cardó-Vila, M., Ozawa, M. G., Dondossola, E., et al. (2015) Discovery and horizontal follow-up of an autoantibody signature in human prostate cancer, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **112**, 2515-2520, doi: 10.1073/pnas.1500097112.
28. Wang, X., Yu, J., Sreekumar, A., Varambally, S., Shen, R., et al. (2005) Autoantibody signatures in prostate cancer, *N. Engl. J. Med.*, **353**, 1224-1235, doi: 10.1056/NEJMoa051931.
29. Chen, G., Wang, X., Yu, J., Varambally, S., Yu, J., et al. (2007) Autoantibody profiles reveal ubiquitin 1 as a humoral immune response target in lung adenocarcinoma, *Cancer Res.*, **67**, 3461-3467, doi: 10.1158/0008-5472.CAN-06-4475.
30. Larman, H. B., Zhao, Z., Laserson, U., Li, M. Z., Ciccica, A., et al. (2011) Autoantigen discovery with a synthetic human peptidome, *Nat. Biotechnol.*, **29**, 535-541, doi: 10.1038/nbt.1856.
31. Mohan, D., Wansley, D. L., Sie, B. M., Noon, M. S., Baer, A. N., et al. (2018) PhIP-Seq characterization of serum antibodies using oligonucleotide-encoded peptidomes, *Nat. Protoc.*, **13**, 1958-1978, doi: 10.1038/s41596-018-0025-6.
32. Zhu, J., Larman, H. B., Gao, G., Somwar, R., Zhang, Z., et al. (2013) Protein interaction discovery using parallel analysis of translated ORFs (PLATO), *Nat. Biotechnol.*, **31**, 331-334, doi: 10.1038/nbt.2539.
33. Larman, H. B., Liang, A. C., Elledge, S. J., and Zhu, J. (2014) Discovery of protein interactions using parallel analysis of translated ORFs (PLATO), *Nat. Protoc.*, **9**, 90-103, doi: 10.1038/nprot.2013.167.
34. Li, R., Kang, G., Hu, M., and Huang, H. (2019) Ribosome display: a potent display technology used for selecting and evolving specific binders with desired properties, *Mol. Biotechnol.*, **61**, 60-71, doi: 10.1007/s12033-018-0133-0.
35. Yang, X., Boehm, J. S., Yang, X., Salehi-Ashtiani, K., Hao, T., et al. (2011) A public genome-scale lentiviral expression library of human ORFs, *Nat. Methods*, **8**, 659-661, doi: 10.1038/nmeth.1638.
36. Luck, K., Kim, D.-K., Lambourne, L., Spirohn, K., Begg, B., et al. (2019) A reference map of the human protein interactome, *bioRxiv*, **12**, 605451, doi: 10.1101/605451.
37. Klade, C. S., Voss, T., Krystek, E., Ahorn, H., Zatloukal, K., et al. (2001) Identification of tumor antigens in renal cell carcinoma by serological proteome analysis, *Proteomics*, **1**, 890-898, doi: 10.1002/1615-9861(200107)1:7<890::AID-PROT890>3.0.CO;2-Z.
38. Lichtenfels, R., Kellner, R., Bukur, J., Beck, J., Brenner, W., et al. (2002) Heat shock protein expression and anti-heat shock protein reactivity in renal cell carcinoma, *Proteomics*, **2**, 561-570, doi: 10.1002/1615-9861(200205)2:5<561::AID-PROT561>3.0.CO;2-K.
39. Unwin, R. D., Harnden, P., Pappin, D., Rahman, D., Whelan, P., et al. (2003) Serological and proteomic evaluation of antibody responses in the identification of tumor antigens in renal cell carcinoma, *Proteomics*, **3**, 45-55, doi: 10.1002/pmic.200390008.

40. Legrain, P., Aebersold, R., Archakov, A., Bairoch, A., Bala, K., et al. (2011) The human proteome project: current state and future direction, *Mol. Cell. Proteomics*, **10**, M111.009993, doi: 10.1074/mcp.o111.009993.
41. Gao, H., Zheng, Z., Mao, Y., Wang, W., Qiao, Y., et al. (2014) Identification of tumor antigens that elicit a humoral immune response in the sera of Chinese esophageal squamous cell carcinoma patients by modified serological proteome analysis, *Cancer Lett.*, **344**, 54-61, doi: 10.1016/j.canlet.2013.10.007.
42. Dai, L., Qu, Y., Li, J., Wang, X., Wang, K., et al. (2017) Serological proteome analysis approach-based identification of ENO1 as a tumor-associated antigen and its autoantibody could enhance the sensitivity of CEA and CYFRA 21-1 in the detection of non-small cell lung cancer, *Oncotarget*, **8**, 36664-36673, doi: 10.18632/oncotarget.17067.
43. Gao, H., Zheng, M., Sun, S., Wang, H., Yue, Z., et al. (2017) Chaperonin containing TCP1 subunit 5 is a tumor associated antigen of non-small cell lung cancer, *Oncotarget*, **8**, 64170-64179, doi: 10.18632/oncotarget.19369.
44. Rezaei, M., Nikeghbalian, S., Mojtahedi, Z., and Ghaderi, A. (2018) Identification of antibody reactive proteins in pancreatic cancer using 2D immunoblotting and mass spectrometry, *Oncol. Rep.*, **39**, 2413-2421, doi: 10.3892/or.2018.6285.
45. Almeras, L., Lefranc, D., Drobecq, H., De Seze, J., Dubucquoi, S., et al. (2004) New antigenic candidates in multiple sclerosis: Identification by serological proteome analysis, *Proteomics*, **4**, 2184-2194, doi: 10.1002/pmic.200300732.
46. Canelle, L., Bousquet, J., Pionneau, C., Deneux, L., Imam-Sghiouar, N., et al. (2005) An efficient proteomics-based approach for the screening of autoantibodies, *J. Immunol. Methods*, **299**, 77-89, doi: 10.1016/j.jim.2005.01.015.
47. Terrier, B., Tamby, M. C., Camoin, L., Guilpain, P., Broussard, C., et al. (2008) Identification of target antigens of antifibroblast antibodies in pulmonary arterial hypertension, *Am. J. Respir. Crit. Care Med.*, **177**, 1128-1134, doi: 10.1164/rccm.200707-1015OC.
48. Guilpain, P., Servettaz, A., Tamby, M. C., Chanseaud, Y., Tamas, N., et al. (2007) A combined SDS-PAGE and proteomics approach to identify target autoantigens in healthy individuals and patients with autoimmune diseases, *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, **1109**, 538-549, doi: 10.1196/annals.1398.060.
49. Beyer, N. H., Milthers, J., Lauridsen, B. A. M., Houen, G., and Frederiksen, L. J. (2007) Autoantibodies to the proteasome in monosymptomatic optic neuritis may predict progression to multiple sclerosis, *Scand. J. Clin. Lab. Invest.*, **67**, 696-706, doi: 10.1080/00365510701342062.
50. Tamesa, M. S., Kuramitsu, Y., Fujimoto, M., Maeda, N., Nagashima, Y., et al. (2009) Detection of autoantibodies against cyclophilin A and triosephosphate isomerase in sera from breast cancer patients by proteomic analysis, *Electrophoresis*, **30**, 2168-2181, doi: 10.1002/elps.200800675.
51. Dutoit-Lefèvre, V., Dubucquoi, S., Launay, D., Sobanski, V., Dussart, P., et al. (2015) An optimized fluorescence-based bidimensional immunoproteomic approach for accurate screening of autoantibodies, *PLoS One*, **10**, e0132142, doi: 10.1371/journal.pone.0132142.
52. Ganesan, V., Ascherman, D. P., and Minden, J. S. (2016) Immunoproteomics technologies in the discovery of autoantigens in autoimmune diseases, *Biomol. Concepts*, **7**, 133-143, doi: 10.1515/bmc-2016-0007.
53. Rabilloud, T., Chevallet, M., Luche, S., and Lelong, C. (2010) Two-dimensional gel electrophoresis in proteomics: past, present and future, *J. Proteomics*, **73**, 2064-2077, doi: 10.1016/j.jprot.2010.05.016.
54. Gires, O., Münz, M., Schaffrik, M., Kieu, C., Rauch, J., Ahlemann, M., et al. (2004) Profile identification of disease-associated humoral antigens using AMIDA, a novel proteomics-based technology, *Cell. Mol. Life Sci.*, **61**, 1198-1207, doi: 10.1007/s00018-004-4045-8.
55. Rauch, J., Ahlemann, M., Schaffrik, M., Mack, B., Ertongur, S., et al. (2004) Allogenic antibody-mediated identification of head and neck cancer antigens, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **323**, 156-162, doi: 10.1016/j.bbrc.2004.08.071.
56. Ganesan, V., Schmidt, B., Avula, R., Cooke, D., Maggiacomo, T., et al. (2015) Immuno-proteomics: development of a novel reagent for separating antibodies from their target proteins, *Biochim. Biophys. Acta*, **1854**, 592-600, doi: 10.1016/j.bbapap.2014.10.011.
57. Kamhieh-Milz, J., Sterzer, V., Celik, H., Khorramshahi, O., Moftah, R. F. H., and Salama, A. (2017) Identification of novel autoantigens via mass spectroscopy-based antibody-mediated identification of autoantigens (MS-AMIDA) using immune thrombocytopenic purpura (ITP) as a model disease, *J. Proteomics*, **157**, 59-70, doi: 10.1016/j.jprot.2017.01.012.
58. Atak, A., Mukherjee, S., Jain, R., Gupta, S., Singh, V. A., et al. (2016) Protein microarray applications: autoantibody detection and posttranslational modification, *Proteomics*, **16**, 2557-2569, doi: 10.1002/pmic.201600104.
59. Ayoglu, B., Schwenk, J. M., and Nilsson, P. (2016) Antigen arrays for profiling autoantibody repertoires, *Bioanalysis*, **8**, 1105-1126, doi: 10.4155/bio.16.31.
60. Grötzinger, C. (2016) Peptide microarrays for medical applications in autoimmunity, infection, and cancer, *Methods Mol. Biol.*, **1352**, 213-221, doi: 10.1007/978-1-4939-3037-1_16.
61. Mischo, A., Wädle, A., Wätzig, K., Jäger, D., Stockert, E., et al. (2003) Recombinant antigen expression on yeast surface (RAYS) for the detection of serological immune responses in cancer patients, *Cancer Immunol.*, **3**, 5.
62. Wädle, A., Mischo, A., Imig, J., Wüllner, B., Hensel, D., et al. (2005) Serological identification of breast cancer-related antigens from a *Saccharomyces cerevisiae* surface display library, *Int. J. Cancer.*, **117**, 104-113, doi: 10.1002/ijc.21147.
63. Raju, R., Rakocevic, G., Chen, Z., Hoehn, G., Semino-Mora, C., et al. (2006) Autoimmunity to GABAA-receptor-associated protein in stiff-person syndrome, *Brain*, **129**, 3270-3276, doi: 10.1093/brain/awl245.
64. Yamamoto, M., Naishiro, Y., Suzuki, C., Kokai, Y., Suzuki, R., et al. (2010) Proteomics analysis in 28 patients with systemic IgG4-related plasmacytic syndrome, *Rheumatol. Int.*, **30**, 565-568, doi: 10.1007/s00296-009-1030-4.
65. Ohyama, K., and Kuroda, N. (2013) Immune complexome analysis, *Adv. Clin. Chem.*, **60**, 129-141, doi: 10.1016/B978-0-12-407681-5.00004-0.
66. Ohyama, K., Baba, M., Tamai, M., Aibara, N., Ichinose, K., et al. (2015) Proteomic profiling of antigens in circulating immune complexes associated with each of seven autoimmune diseases, *Clin. Biochem.*, **48**, 181-185, doi: 10.1016/j.clinbiochem.2014.11.008.
67. Hardouin, J., Lasserre, J.-P., Canelle, L., Duchateau, M., Vlieghe, C., et al. (2007) Usefulness of autoantigens depletion to detect autoantibody signatures by multiple affinity

- protein profiling, *J. Sep. Sci.*, **30**, 352-358, doi: 10.1002/jssc.200600324.
68. Hardouin, J., Lasserre, J.-P., Sylvius, L., Joubert-Caron, R., and Caron, M. (2007) Cancer immunomics: from serological proteome analysis to multiple affinity protein profiling, *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, **1107**, 223-230, doi: 10.1196/annals.1381.024.
 69. Grandjean, M., Dieu, M., Raes, M., and Feron, O. (2013) A new method combining sequential immunoaffinity depletion and differential in gel electrophoresis to identify autoantibodies as cancer biomarkers, *J. Immunol. Methods*, **396**, 23-32, doi: 10.1016/j.jim.2013.07.006.
 70. Petrak, J., Ivanek, R., Toman, O., Cmejla, R., Cmejlova, J., et al. (2008) Déjà vu in proteomics. A hit parade of repeatedly identified differentially expressed proteins, *Proteomics*, **8**, 1744-1749, doi: 10.1002/pmic.200700919.
 71. Ye, Y., Kuhn, C., Kösters, M., Arnold, G. J., Ishikawa-Ankerhold, H., et al. (2019) Anti α -enolase antibody is a novel autoimmune biomarker for unexplained recurrent miscarriages, *EBioMedicine*, **41**, 610-622, doi: 10.1016/j.ebiom.2019.02.027.
 72. Bruschi, M., Carnevali, M. L., Murtas, C., Candiano, G., Petretto, A., et al. (2011) Direct characterization of target podocyte antigens and auto-antibodies in human membranous glomerulonephritis: α -enolase and borderline antigens, *J. Proteomics*, **74**, 2008-2017, doi: 10.1016/j.jprot.2011.05.021.
 73. Peng, B., Huang, X., Nakayasu, E. S., Petersen, J. R., Qiu, S., et al. (2013) Using immunoproteomics to identify alpha-enolase as an autoantigen in liver fibrosis, *J. Proteome Res.*, **12**, 1789-1796, doi: 10.1021/pr3011342.
 74. Nabeta, M., Abe, Y., Kagawa, L., Haraguchi, R., Kito, K., et al. (2009) Identification of anti- α -enolase autoantibody as a novel serum marker for endometriosis, *Proteomics Clin. Appl.*, **3**, 1201-1210, doi: 10.1002/prca.200900055.
 75. O'Dwyer, D. T., Smith, A. I., Matthew, M. L., Andronicos, N. M., Ranson, M., et al. (2002) Identification of the 49-kDa autoantigen associated with lymphocytic hypophysitis as α -enolase, *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, **87**, 752-757, doi: 10.1210/jcem.87.2.8205.
 76. Cappello, P., Tomaino, B., Chiarle, R., Ceruti, P., Novarino, A., et al. (2009) An integrated humoral and cellular response is elicited in pancreatic cancer by α -enolase, a novel pancreatic ductal adenocarcinoma-associated antigen, *Int. J. Cancer*, **125**, 639-648, doi: 10.1002/ijc.24355.
 77. Li, W.-H., Zhao, J., Li, H.-Y., Liu, H., Li, A.-L., et al. (2006) Proteomics-based identification of autoantibodies in the sera of healthy Chinese individuals from Beijing, *Proteomics*, **6**, 4781-4789, doi: 10.1002/pmic.200500909.
 78. Servettaz, A., Guilpain, P., Camoin, L., Mayeux, P., Broussard, C., et al. (2008) Identification of target antigens of antiendothelial cell antibodies in healthy individuals: a proteomic approach, *Proteomics*, **8**, 1000-1008, doi: 10.1002/pmic.200700794.
 79. Merbl, Y., Zucker-Toledano, M., Quintana, F. J., and Cohen, I. R. (2007) Newborn humans manifest autoantibodies to defined self molecules detected by antigen microarray informatics, *J. Clin. Invest.*, **117**, 712-718, doi: 10.1172/JCI29943.
 80. Madi, A., Hecht, I., Bransburg-Zabary, S., Merbl, Y., Pick, A., et al. (2009) Organization of the autoantibody repertoire in healthy newborns and adults revealed by system level informatics of antigen microarray data, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **106**, 14484-14489, doi: 10.1073/pnas.0901528106.
 81. Nagele, E. P., Han, M., Acharya, N. K., DeMarshall, C., Kosciuk, M. C., and Nagele, R. G. (2013) Natural IgG autoantibodies are abundant and ubiquitous in human sera, and their number is influenced by age, gender, and disease, *PLoS One*, **8**, e60726, doi: 10.1371/journal.pone.0060726.
 82. Neiman, M., Hellström, C., Just, D., Mattsson, C., Fagerberg, L., et al. (2019) Individual and stable autoantibody repertoires in healthy individuals, *Autoimmunity*, **52**, 1-11, doi: 10.1080/08916934.2019.1581774.
 83. Lobo, P. I. (2016) Role of natural autoantibodies and natural IgM anti-leucocyte autoantibodies in health and disease, *Front. Immunol.*, **7**, 198, doi: 10.3389/fimmu.2016.00198.
 84. Siloși, I., Siloși, C. A., Boldeanu, M. V., Cojocaru, M., Biciușcă, V., et al. (2016) The role of autoantibodies in health and disease, *Rom. J. Morphol. Embryol.*, **57**, 633-638.
 85. Maddur, M. S., Lacroix-Desmazes, S., Dimitrov, J. D., Kazatchkine, M. D., Bayry, J., and Kaveri, S. V. (2020) Natural antibodies: from first-line defense against pathogens to perpetual immune homeostasis, *Clin. Rev. Allergy Immunol.*, **58**, 213-228, doi: 10.1007/s12016-019-08746-9.
 86. Sanchez, T. W., Zhang, G., Li, J., Dai, L., Mirshahidi, S., et al. (2016) Immunoseroproteomic profiling in African American men with prostate cancer: evidence for an autoantibody response to glycolysis and plasminogen-associated proteins, *Mol. Cell. Proteomics*, **15**, 3564-3580, doi: 10.1074/mcp.M116.060244.
 87. Capello, M., Cappello, P., Linty, F. C., Chiarle, R., Sperduti, I., et al. (2013) Autoantibodies to Ezrin are an early sign of pancreatic cancer in humans and in genetically engineered mouse models, *J. Hematol. Oncol.*, **6**, 67, doi: 10.1186/1756-8722-6-67.
 88. Larman, H. B., Laserson, U., Querol, L., Verhaeghen, K., Solimini, N. L., et al. (2013) PhIP-Seq characterization of autoantibodies from patients with multiple sclerosis, type 1 diabetes and rheumatoid arthritis, *J. Autoimmun.*, **43**, 1-9, doi: 10.1016/j.jaut.2013.01.013.
 89. Davoudi, S., Ahmadi, T., Papavasiliou, E., Leskov, I., and Sobrin, L. (2018) Phage immunoprecipitation sequencing of autoantigens in autoimmune retinopathy, *Ocul. Immunol. Inflamm.*, **26**, 417-424, doi: 10.1080/09273948.2016.1232738.
 90. Vazquez, S. E., Ferré, E. M. N., Scheel, D. W., Sunshine, S., Miao, B., et al. (2020) Identification of novel, clinically correlated autoantigens in the monogenic autoimmune syndrome APS1 by proteome-wide PhIP-Seq, *eLife*, **9**, doi: 10.7554/eLife.55053.
 91. Mandel-Brehm, C., Dubey, D., Kryzer, T. J., O'Donovan, B. D., Tran, B., et al. (2019) Kelch-like Protein 11 antibodies in seminoma-associated paraneoplastic encephalitis, *N. Engl. J. Med.*, **381**, 47-54, doi: 10.1056/NEJMoa1816721.
 92. Looi, K. S., Nakayasu, E. S., De Diaz, R. A., Tan, E. M., Almeida, I. C., and Zhang, J. Y. (2008) Using proteomic approach to identify tumor-associated antigens as markers in hepatocellular carcinoma, *J. Proteome Res.*, **7**, 4004-4012, doi: 10.1021/pr800273h.
 93. Cottrell, T. R., Hall, J. C., Rosen, A., and Casciola-Rosen, L. (2012) Identification of novel autoantigens by a triangulation approach, *J. Immunol. Methods*, **385**, 35-44, doi: 10.1016/j.jim.2012.07.024.
 94. Greenberg, S. A., Higgs, B. W., Morehouse, C., Walsh, R. J., Won Kong, S., et al. (2012) Relationship between disease activity and type I interferon- and other cytokine-inducible gene expression in blood in dermatomyositis and

- polymyositis, *Genes Immun.*, **13**, 207-213, doi: 10.1038/gene.2011.61.
95. Mammen, A. L. (2011) Autoimmune myopathies: autoantibodies, phenotypes and pathogenesis, *Nat. Rev. Neurol.*, **7**, 343-354, doi: 10.1038/nrneurol.2011.63.
 96. Grandjean, M., Sermeus, A., Branders, S., Defresne, F., Dieu, M., et al. (2013) Hypoxia integration in the serological proteome analysis unmasks tumor antigens and fosters the identification of anti-phospho-EEF2 antibodies as potential cancer biomarkers, *PLoS One*, **8**, e76508, doi: 10.1371/journal.pone.0076508.
 97. Höckel, M., and Vaupel, P. (2001) Tumor hypoxia: definitions and current clinical, biologic, and molecular aspects, *J. Natl. Cancer Inst.*, **93**, 266-276, doi: 10.1093/jnci/93.4.266.
 98. Wouters, B. G., and Koritzinsky, M. (2008) Hypoxia signalling through mTOR and the unfolded protein response in cancer, *Nat. Rev. Cancer*, **8**, 851-864, doi: 10.1038/nrc2501.
 99. Connolly, E., Braunstein, S., Formenti, S., and Schneider, R. J. (2006) Hypoxia inhibits protein synthesis through a 4E-BP1 and elongation factor 2 kinase pathway controlled by mTOR and uncoupled in breast cancer cells, *Mol. Cell. Biol.*, **26**, 3955-3965, doi: 10.1128/mcb.26.10.3955-3965.2006.
 100. Romero-Ruiz, A., Bautista, L., Navarro, V., Heras-Garvín, A., March-Díaz, R., et al. (2012) Prolyl hydroxylase-dependent modulation of eukaryotic elongation factor 2 activity and protein translation under acute hypoxia, *J. Biol. Chem.*, **287**, 9651-9658, doi: 10.1074/jbc.M111.299180.
 101. Arora, S., Yang, J. M., Craft, J., and Hait, W. (2002) Detection of anti-elongation factor 2 kinase (calmodulin-dependent protein kinase III) antibodies in patients with systemic lupus erythematosus, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **293**, 1073-1076, doi: 10.1016/S0006-291X(02)00324-8.
 102. Belousov, P. V., Afanasyeva, M. A., Gubernatorova, E. O., Bogolyubova, A. V., Uvarova, A. N., et al. (2019) Multi-dimensional immunoproteomics coupled with *in vitro* recapitulation of oncogenic NRASQ61R identifies diagnostically relevant autoantibody biomarkers in thyroid neoplasia, *Cancer Lett.*, **467**, 96-106, doi: 10.1016/j.canlet.2019.07.013.
 103. Radbruch, A., Muehlinghaus, G., Luger, E. O., Inamine, A., Smith, K. G. C., et al. (2006) Competence and competition: the challenge of becoming a long-lived plasma cell, *Nat. Rev. Immunol.*, **6**, 741-750, doi: 10.1038/nri1886.
 104. Wang, S., He, Z., Wang, X., Li, H., and Liu, X. S. (2019) Antigen presentation and tumor immunogenicity in cancer immunotherapy response prediction, *eLife*, **8**, doi: 10.7554/eLife.49020.
 105. Tetsuka, S., Tominaga, K., Ohta, E., Kuroiwa, K., Sakashita, E., et al. (2013) Paraneoplastic cerebellar degeneration associated with an onconeural antibody against creatine kinase, brain-type, *J. Neurol. Sci.*, **335**, 48-57, doi: 10.1016/j.jns.2013.08.022.
 106. Darnell, J. C., Albert, M. L., and Darnell, R. B. (2000) Cdr2, a target antigen of naturally occurring human tumor immunity, is widely expressed in gynecological tumors, *Cancer Res.*, **60**, 2136-2139.
 107. Wang, M., Weiss, M., Simonovic, M., Haertinger, G., Schimpf, S. P., et al. (2012) PaxDb, a database of protein abundance averages across all three domains of life, *Mol. Cell. Proteomics*, **11**, 492-500, doi: 10.1074/mcp.O111.014704.
 108. Pittock, S. J., Kryzer, T. J., and Lennon, V. A. (2004) Paraneoplastic antibodies coexist and predict cancer, not neurological syndrome, *Ann. Neurol.*, **56**, 715-719, doi: 10.1002/ana.20269.
 109. Dalmau, J., Furneaux, H. M., Gralla, R. J., Kris, M. G., and Posner, J. B. (1990) Detection of the anti-Hu antibody in the serum of patients with small cell lung cancer – a quantitative western blot analysis, *Ann. Neurol.*, **27**, 544-552, doi: 10.1002/ana.410270515.
 110. Graus, F., Dalmau, J., Reñé, R., Tora, M., Malats, N., et al. (1997) Anti-Hu antibodies in patients with small-cell lung cancer: association with complete response to therapy and improved survival, *J. Clin. Oncol.*, **15**, 2866-2872, doi: 10.1200/JCO.1997.15.8.2866.
 111. Verschuuren, J. J., Perquin, M., Ten Velde, G., De Baets, M., Van Breda Vriesman, P., and Twijnstra, A. (1999) Anti-Hu antibody titre and brain metastases before and after treatment for small cell lung cancer, *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry*, **67**, 353-357, doi: 10.1136/jnnp.67.3.353.
 112. Matsumoto, T., Ryuge, S., Kobayashi, M., Kageyama, T., Hattori, M., et al. (2012) Anti-HuC and -HuD autoantibodies are differential sero-diagnostic markers for small cell carcinoma from large cell neuroendocrine carcinoma of the lung, *Int. J. Oncol.*, **40**, 1957-1962, doi: 10.3892/ijo.2012.1405.
 113. Bazhin, A. V., Savchenko, M. S., Shifrina, O. N., Demoura, S. A., Chikina, S. Y., et al. (2004) Recoverin as a paraneoplastic antigen in lung cancer: the occurrence of anti-recoverin autoantibodies in sera and recoverin in tumors, *Lung Cancer*, **44**, 193-198, doi: 10.1016/j.lungcan.2003.10.006.
 114. Djureinovic, D., Hallström, B. M., Horie, M., Margareta Mattsson, J. S., Fleur, L., et al. (2019) Profiling cancer testis antigens in non-small-cell lung cancer, *JCI Insight.*, **1**, 86837, doi: 10.1172/jci.insight.86837.
 115. Sautès-Fridman, C., Petitprez, F., Calderaro, J., and Fridman, W. H. (2019) Tertiary lymphoid structures in the era of cancer immunotherapy, *Nat. Rev. Cancer*, **19**, 307-325, doi: 10.1038/s41568-019-0144-6.
 116. Hansen, M., Nielsen, H., and Ditzel, H. (2001) The tumor-infiltrating B cell response in medullary breast cancer is oligoclonal and directed against the autoantigen actin exposed on the surface of apoptotic cancer cells, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **98**, 12659-12664, doi: 10.1073/pnas.171460798.
 117. Kotlan, B., Simsa, P., Teillaud, J.-L., Fridman, W. H., Toth, J., et al. (2005) Novel ganglioside antigen identified by B cells in human medullary breast carcinomas: the proof of principle concerning the tumor-infiltrating B lymphocytes, *J. Immunol.*, **175**, 2278-2285, doi: 10.4049/jimmunol.175.4.2278.
 118. Pavoni, E., Monteriù, G., Santapaola, D., Petronzelli, F., Anastasi, A., et al. (2007) Tumor-infiltrating B lymphocytes as an efficient source of highly specific immunoglobulins recognizing tumor cells, *BMC Biotechnol.*, **7**, 70, doi: 10.1186/1472-6750-7-70.
 119. Garaud, S., Zayakin, P., Buisseret, L., Rulle, U., Silina, K., et al. (2018) Antigen specificity and clinical significance of IgG and IgA autoantibodies produced *in situ* by tumor-infiltrating B cells in breast cancer, *Front. Immunol.*, **9**, 2660, doi: 10.3389/fimmu.2018.02660.
 120. Wang, D., Yang, L., Zhang, P., LaBaer, J., Hermjakob, H., et al. (2017) AAgAtlas 1.0: a human autoantigen database, *Nucleic Acids Res.*, **45**, D769-D776, doi: 10.1093/nar/gkw946.

**THE ANALYSIS OF THE REPERTOIRES OF THE CIRCULATING
AUTOANTIBODIES' ANTIGENIC SPECIFICITIES AS A SEARCH TOOL
FOR THE IDENTIFICATION OF THE TUMOR-ASSOCIATED ANTIGENS:
CURRENT PROBLEMS AND SOLUTIONS**

Review

P. V. Belousov^{1,2}

¹ *Center for Precision Genome Editing and Genetic Technologies for Biomedicine,
Engelhardt Institute of Molecular Biology, Russian Academy of Sciences,
119991 Moscow, Russia; E-mail: belousp@gmail.com*

² *National Center for Personalized Medicine of Endocrine Diseases,
National Medical Research Center for Endocrinology,
Ministry of Health of the Russian Federation, 117036 Moscow, Russia*

Circulating autoantibodies against tumor-associated autoantigens (TAA) may serve as valuable biomarkers for a wide range of diagnostic purposes. Modern immunology offers a large variety of methods for in-depth comparative analysis of the repertoires of circulating antibodies' antigenic specificities in health and disease. Nevertheless, this research field meets somewhat limited clinical success, while numerous data on the repertoires of the circulating autoantibodies' specificities in cancer patients are poorly integrated into the contemporary picture of the immunological and molecular "landscapes" of human tumors. This review is an attempt to identify and systematize the key and essentially universal conceptual and methodological limitations in the field of the analysis of the repertoires of circulating antibodies' antigenic specificities in cancer (expression bias, TAA repertoires' redundancy, identification of natural IgG, the absence of pathogenetically relevant context in experimental systems used to detect TAA), as well as to discuss potential and already known methodological improvements that may significantly increase the detectability of pathogenetically relevant and diagnostically significant bona fide TAA.

Keywords: tumor-associated antigens, autoantibodies, cancer biomarkers, immunoproteomics

УДК 577.152.315

МЕЛАТОНИН УЛУЧШАЕТ СНИЖЕННУЮ АКТИВНОСТЬ МЕМБРАННЫХ АТФаз И СОХРАНЯЕТ УЛЬТРАСТРУКТУРУ СЕРОГО И БЕЛОГО ВЕЩЕСТВА В МОДЕЛИ ИШЕМИИ/РЕПЕРФУЗИИ ГОЛОВНОГО МОЗГА КРЫС

© 2021 М. Тунсер^{1*}, Б. Пехливаноглу¹, С.Х. Суруджу², Т. Исбир³

¹ Department of Physiology, Hacettepe University Faculty of Medicine, 06100 Ankara, Turkey;
E-mail: metuncer@hacettepe.edu.tr; tuncermeltem@gmail.com

² Department of Anatomy, Koç University School of Medicine, 34450 Istanbul, Turkey

³ Department of Medical Biology, Faculty of Medicine, Yeditepe University, 34755 Istanbul, Turkey

Поступила в редакцию 11.11.2020

После доработки 22.03.2021

Принята к публикации 28.03.2021

Ишемия/реперфузия (И/Р) является одной из наиболее частых неврологических проблем, и раннее вмешательство имеет решающее значение для снижения повреждений, уменьшения уровня смертности и заболеваемости. Основываясь на сообщениях о благотворном влиянии мелатонина, мы исследовали его влияние на активность $\text{Na}^+/\text{K}^+/\text{Mg}^{2+}$ -АТФазы и $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ -АТФазы, а также на ультраструктуру серого и белого вещества переднего мозга крыс в И/Р-модели. Взрослые крысы-альбиносы линии Wistar ($n = 78$) были случайным образом разделены на группы: контрольная, ишемия (И), ишемия/реперфузия (И/Р), группы с низкой (И/Р + мелатонин 400 мкг/кг), умеренной (И/Р + мелатонин 1200 мкг/кг) и высокой (И/Р + мелатонин 2400 мкг/кг) дозой мелатонина. Были проведены двухсосудистая окклюзия в сочетании с гипотонией (15 мин), индуцированной ишемией, и реперфузия (75 мин), достигнутая реинфузией крови. Была исследована активность мембраносвязанных ферментов, уровень малонового диальдегида в мозге и ультраструктура мозгового вещества в лобно-теменной коре. Мелатонин дозозависимо снижает выработку малонового диальдегида. Активность ферментов, ослабленная при И и И/Р, повышалась при введении мелатонина. И и И/Р серьёзно нарушали морфологию серого и белого мозгового вещества. Мелатонин во всех применяемых дозах уменьшал повреждения ультраструктуры как в сером, так и в белом веществе. Благоприятное действие мелатонина можно объяснить его антиоксидантными свойствами, предполагающими, что он может быть перспективным нейропротекторным агентом против повреждений, вызванных И/Р, эффективным как для серого, так и для белого вещества благодаря благоприятным биологическим свойствам.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: малоновый диальдегид, мелатонин, $\text{Na}^+/\text{K}^+/\text{Mg}^{2+}$ -АТФаза, $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ -АТФаза, реперфузионное повреждение.

DOI: 10.31857/S0320972521050079

ВВЕДЕНИЕ

Ишемия/реперфузия (И/Р) головного мозга, широко известная как инсульт, имеет разрушительные патологические, физиологические и поведенческие последствия и занимает лидирующее место по уровню заболеваемости и смертности во всем мире [1]. В повреждении мозга, вызванном И/Р, участвует ряд взаимосвязанных биохимических событий [2, 3]. В основном длительная ишемия мозга снижает уровень аденозинтрифосфата (АТФ) и понижает внутриклеточный

точный рН из-за окислительного стресса и истощения субстрата и энергии. Эти ожидаемые условия нарушают активность мембраносвязанных АТФаз и зависимых от АТФаз механизмов транспорта ионов, что приводит к повышению внутриклеточного и митохондриального уровня кальция и, как следствие, гибели клеток по различным механизмам [4]. При реперфузии активные формы кислорода и провоспалительные нейтрофилы проникают в ишемизированные ткани с последующим высвобождением различных цитокинов и активацией микроглии и астроцитов, инициируя раннюю воспалительную реакцию и усугубляя ишемическое повреждение [4–8]. Хотя используются различные терапевтические агенты, действующие на различные мишени, показатели смертности и неврологических дисфункций после И/Р-повреждений

Принятые сокращения: И/Р – ишемия/реперфузия; МДА – малоновый диальдегид; САД – среднее артериальное давление; ЭЭГ – электроэнцефалография; Pi – неорганический фосфат.

* Адресат для корреспонденции.

всё ещё высоки, что указывает на постоянную потребность в разработке новых методов лечения.

Мелатонин (N-ацил-5-метокситриптами́н), эндогенный гормон пинеальной железы, синтезируемый N-ацетилированием из серотонина, обладает мощным антиоксидантным, антиапоптотическим и противовоспалительным действием в головном мозге через рецепторы, сопряжённые с G-белком, и ядерные мембранные рецепторы [9]. Недавние исследования показывают, что мелатонин проявляет защитное действие против И/Р-повреждений в различных тканях, включая мозг, с помощью нескольких механизмов, таких как снижение стресса эндоплазматического ретикулума, стимуляция выработки АТФ в митохондриях и модуляция внутриклеточного гомеостаза кальция [9–12]. На животных моделях было также показано, что мелатонин уменьшает повреждения серого и белого вещества, вызванные церебральной ишемией [13]. Известно, что экзогенный мелатонин модулирует активность Na^+ - K^+ / Mg^{2+} -АТФазы в эритроцитах человека и предотвращает острое этанол-индуцированное ингибирование Na^+ - K^+ / Mg^{2+} -АТФазы и Ca^{2+} / Mg^{2+} -АТФазы в синапсоматомах крыс [14], а также обращает вспять влияние И/Р на активность Na^+ - K^+ / Mg^{2+} -АТФазы при интрацеребровентрикулярном применении в 24-часовой реперфузии [15]. Однако о его остром влиянии на активность АТФазы мозга во время И/Р-повреждений не сообщалось. Необходимо выявить все возможные действия мелатонина при И/Р-повреждениях головного мозга для повышения его потенциала в качестве защитного и терапевтического средства при ишемическом инсульте.

Исходя из этого, мы предположили, что мелатонин защищает как серое, так и белое вещество мозга от И/Р-повреждений путём улучшения окислительного статуса и активности мембранных АТФаз. Поэтому мы поставили перед собой цель оценить потенциальное влияние мелатонина на активность Na^+ - K^+ / Mg^{2+} -АТФазы и Ca^{2+} / Mg^{2+} -АТФазы, а также на ультраструктуру серого и белого вещества в И/Р-модели мозга крыс.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Животные и экспериментальный план. В это исследование были включены 78 самцов крыс-альбиносов линии Wistar (1–16 недель, 200–250 г). Протокол эксперимента был одобрен Этическим комитетом по исследованиям на животных Университета Хаджеттепе (Hacettepe

University; Разрешение № 2018/68-07). Все эксперименты на животных проводили в соответствии с Руководством Национального института здравоохранения по уходу и использованию лабораторных животных (National Institutes of Health Guide for the Care and Use of Laboratory Animals). Крыс содержали в индивидуальных плексигласовых клетках при 12/12-часовом цикле свет/темнота и постоянной температуре ($23 \pm 2^\circ\text{C}$) и влажности ($55 \pm 10\%$). Животные имели свободный доступ к стандартной лабораторной пище и воде.

Животные были случайным образом разделены на шесть экспериментальных групп в соответствии с числами, сгенерированными компьютером: контроль (фиктивная операция, $n = 15$), ишемия (И, $n = 13$), ишемия/реперфузия (И/Р, $n = 13$), низкая доза мелатонина (И/Р + мелатонин 400 мкг/кг массы тела, $n = 12$), умеренная доза мелатонина (И/Р + мелатонин 1200 мкг/кг, $n = 13$) и высокая доза мелатонина (И/Р + мелатонин 2400 мкг/кг, $n = 12$). Для морфологического исследования было отобрано по пять животных из каждой группы. Животным давали возможность адаптироваться к лабораторным условиям (обращение, содержание и т.д.) в течение недели, а затем использовали в порядке прибытия в лабораторию, который описан ниже в протоколе эксперимента. Ни одно из животных не было исключено из исследования. Эксперименты начинали всегда в 9:00 и заканчивали в 12:00. Исследователи, проводившие структурный, биохимический и статистический анализ, не знали, с какой из исследуемых групп они имели дело, за исключением тех, кто выполнял хирургические операции.

Анестезия и хирургическая операция. Все животные были анестезированы 25%-ным уретаном («Urethane, ВР63 Synthetic», Дания) (1,2–1,4 г/кг, внутривенная инъекция). Этот анестетик предпочтителен из-за его благоприятного действия в моделях ишемии/реперфузии, он демонстрирует минимальное вмешательство в протокол [16]. Платиновые дисковые электроды помещали подкожно на теменные области с двух сторон и на носовую кость в качестве эталона, и все они были подключены к полиграфу («Grass Model 7 Polygraph», США) для записи электроэнцефалографии (ЭЭГ). Черепную и ректальную температуры измеряли с помощью термозондов («YSI 409B» и «YSI 401», США), подключённых к телетермометру («YSI Tele-thermometer 41TA», США) в качестве индикаторов температуры мозга и тела. Обе температуры поддерживали стабильными на уровне $37,0 \pm 0,5^\circ\text{C}$ с помощью нагревательной лампы. Трахею интубировали, и проводили искусствен-

ное дыхание с помощью респиратора для мелких животных с положительным давлением («V. Braun Apparatebau, Melsungen», Германия).

Верхнюю полую вену катетеризировали для внутривенного введения препарата и манипулирования объёмом крови. Правую бедренную артерию отделяли от связанной вены и нерва и канюлировали предварительно гепаринизированным катетером для непрерывного контроля артериального давления. Он был прикреплён к датчику давления («Statham Laboratories», «Physical Pressure Transducer P23AA», Пуэрто-Рико) и подключён к полиграфу. После того, как все приборы были присоединены, правая и левая общие сонные артерии были изолированы. Их подвешивали хирургическими шёлковыми нитями, пропущенными через крошечные стеклянные трубочки, и готовили к облитерации, как в модели окклюзии с двумя сосудами, описанной Smith et al. [17], за исключением группы фиктивных операций, где артерии обнажали только на соответствующее время. По завершении хирургических процедур животным давали стабилизироваться в течение 30 мин.

Глубину анестезии контролировали каждые пять минут в течение всего эксперимента, и при необходимости вводили дополнительную дозу анестетика.

Ишемия и реперфузия переднего мозга. Ишемия переднего мозга была вызвана окклюзией двух общих сонных артерий в сочетании с системной гипотензией [17]. Перед ишемией среднее артериальное давление (САД) снижали до 80 мм рт. ст., чтобы предотвратить ауторегуляторное повышение. Кровоток в общих сонных артериях был прерван, и САД снижалось до 35 мм рт. ст. за счёт забора крови. Снижение активности ЭЭГ указывало на начало ишемического периода. Отобранную кровь (всего 3–4 мл) до реинфузии хранили в гепаринизированном шприце при температуре 37 °С. Во время ишемии САД поддерживали постоянным за счёт забора крови и реинфузии, когда это было необходимо. На 14 минуте ишемии САД повысили до 80 мм рт. ст. реинфузией крови. Реперфузию начинали через 15 мин ишемии после визуализации кровотока, остаток крови вводили в течение 15–30 сек, и подтверждали изменение активности ЭЭГ. Мелатонин («Sigma-Aldrich», США), растворенный в абсолютном этаноле, разводили в физиологическом растворе до конечной концентрации этанола 1% и вводили внутривенно в первую минуту реперфузии в дозах 400, 1200 или 2400 мкг/кг массы тела или носителя. Объём инъекции составлял 1 мл/кг массы тела. Гидрокарбонат натрия («Drogsan», Турция) вводили внутривенно (50 мг/кг) для про-

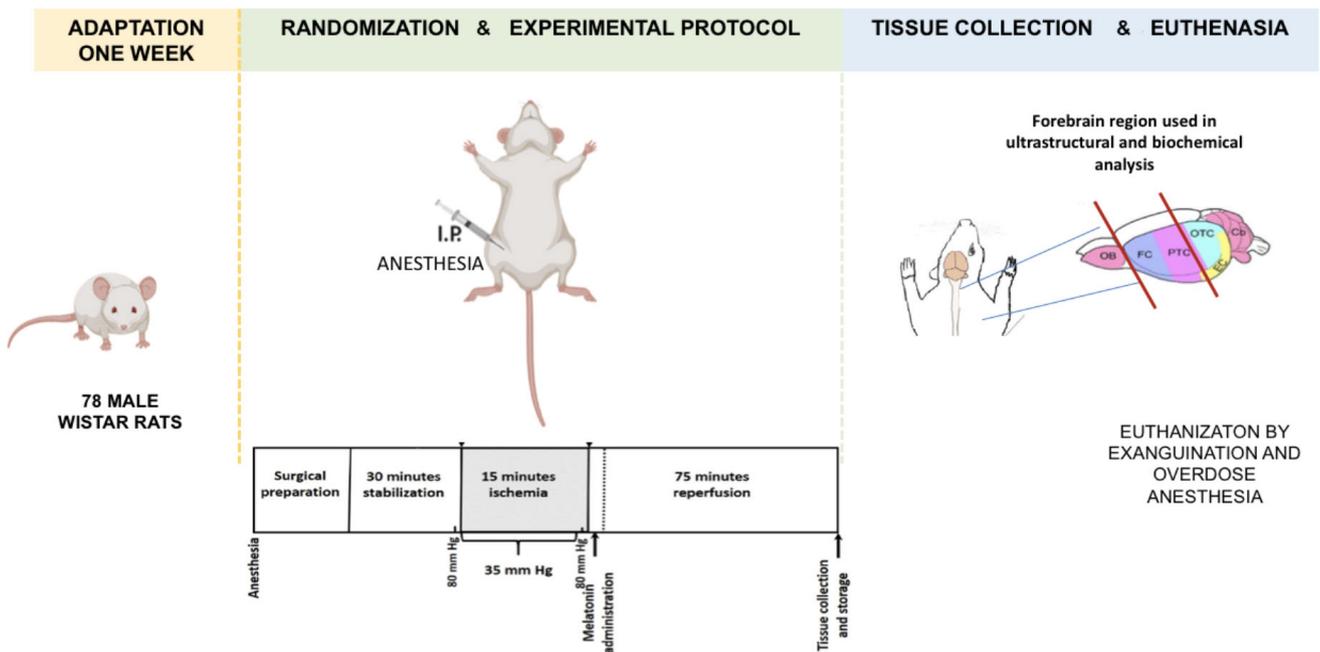


Рис. 1. План эксперимента. Временная шкала эксперимента, представляющая модель, использованную в исследовании. Принятые сокращения: ОБ (olfactory bulb) – обонятельная луковица; FC (frontal cortex) – лобная кора; PFC (parietal-temporal cortex) – теменно-височная кора; ОТС (occipital-temporal cortex) – затылочно-височная кора; Сb (cerebellum) – мозжечок; ЕС (entorhinal cortex) – энторинальная кора. (С цветными вариантами рисунков можно ознакомиться в электронной версии статьи на сайте: <http://sciencejournals.ru/journal/biokhsm/>)

филактики ацидоза, если это было необходимо. Реперфузию продолжали в течение 75 мин, параллельно вводили 0,9% NaCl для коррекции САД. Протокол эксперимента показан в виде схематической диаграммы на рис. 1.

Вскрытие мозга и завершение экспериментов по биохимическим измерениям. После реперфузии мозг и мозжечок осторожно извлекали. Для выделения переднего мозга полушария разрезали коронарно на 1–2 мм позади задней центральной извилины (рис. 1), а лобно-теменно-височную кору помещали в жидкий азот и хранили при температуре -80°C до использования в биохимических исследованиях. Вся процедура вскрытия завершалась менее чем за 5 мин, эксперименты прекращали передозировкой анестезии и обескровливанием.

Измерение перекисного окисления липидов в головном мозге. Для оценки перекисного окисления липидов мозга использовали уровень реактивных соединений тиобарбитуровой кислоты. Малоновый диальдегид (МДА), общий индикатор степени реакции перекисного окисления, является продуктом перекисного окисления липидов, который реагирует с тиобарбитуровой кислотой с образованием красных час-

тиц, поглощающих при длине волны 535 нм. Все ткани мозга были извлечены при температуре -20°C за день до анализа, разрезаны на мелкие кусочки с помощью ножниц и гомогенизированы (2 мин при 5000 об./мин) в 10 объёмах (1/10, w/v) охлаждённого во льду буфера Tris-HCl (50 mM, pH 7,4) с использованием стеклянного гомогенизатора с тефлоновым пестиком. К образцу мозга (менее 0,2 мл 10%-ного (w/v) гомогената ткани) добавляли 0,2 мл 8,1% додецилсульфата натрия и 1/5 (w/v) водного раствора тиобарбитуровой кислоты. Объём смеси доводили до 4 мл дистиллированной водой и нагревали на масляной бане при 95°C в течение 60 мин. После охлаждения водопроводной водой к образцу добавляли 1 мл дистиллированной воды вместе с 5 мл смеси N-бутанол/пиридин (15/1, v/v), затем энергично встряхивали. После центрифугирования при 4000 об./мин в течение 10 мин органический слой отделяли, и измеряли его поглощение при 535 нм на спектрофотометре «Gilford 250» («Gilford Instrument Laboratories, Inc.», США). Тетраметоксипропан использовали в качестве внешнего стандарта, а уровень перекисей липидов выражали в нмоль МДА на г влажной ткани [18].

Активность Na^+ - K^+ / Mg^{2+} -АТФазы и Ca^{2+} / Mg^{2+} -АТФазы. За сутки до биохимического анализа температуру всех тканей головного мозга довели до -20°C . 10%-ный тканевый гомогенат готовили в 0,3 М сахарозе, содержащей 1 mM магния, с помощью тефлонового пестика с зазором 0,25–0,38 мм при 1000 об./мин. АТФазную активность полученных супернатантов определяли путём измерения скорости высвобождения неорганического фосфата (Pi) из Na_2ATP [19]. Инкубационная среда была приготовлена, как описано ранее [20]: для Na^+ - K^+ / Mg^{2+} -АТФазы среда содержала 6 mM MgCl_2 , 5 mM KCl, 100 mM NaCl, 0,1 mM ЭДТА и 135 mM Tris-HCl, pH 7,4; для Ca^{2+} / Mg^{2+} -АТФазы – 6 mM MgCl_2 , 0,15 mM CaCl_2 , 0,1 mM ЭДТА и 135 mM Tris-HCl, pH 7,4. После 5-минутной предварительной инкубации при 37°C в каждую пробирку добавляли Na_2ATP («Boehringer, Mannheim», Germany) до конечной концентрации 3 mM. После инкубации при 37°C в течение 30 мин реакцию останавливали, помещая все образцы, включая холостую пробу и стандарт, на лёд, поскольку ранее было показано, что эта процедура предпочтительнее [21, 22]. Pi определяли в аликвотах объёмом 1 мл от инкубированных смесей с помощью добавления раствора луброл-молибдата («Sigma-Aldrich»), приготовленного, как описано ранее [20]. Смеси перемешивали на вортрексе и после 10-ми-

Таблица 1. Система оценки образцов при просвечивающей электронной микроскопии

Местоположение	Оценочные баллы	Обнаружение
Внутрицитоплазматический отёк ^а	0 1 2 3	отсутствие лёгкий средний тяжёлый
Ядро ^а	0 1 2 3	норма комковатость разрыхлённый хроматин дефект ядерной мембраны
Митохондрия ^б	0 1 2 3	норма лёгкий отёк средний отёк тяжёлый отёк
Аксон ^в	0 1 2 3	норма лёгкий отёк средний отёк тяжёлый отёк
Миелин ^в	0 1 2 3	норма трещина между слоями сог и экструдированные везикулы сильное растрескивание миелина

Примечание. ^а) 20 нейронов/образец, ^б) 100 митохондрий/образец, ^в) 100 аксонов/образец.

нутной инкубации при комнатной температуре измеряли поглощение при 240 нм на спектрофотометре «Gilford 250» («Gilford Instrument Laboratories, Inc.»). Все анализы (вместе с ферментом и холостыми реакциями) были выполнены в трех повторах. Содержание фосфатов в образцах сравнивали со стандартами K_2HPO_4 . Удельную активность рассчитывали как нмоль P_i /ч/мг белка [20, 23]. Все реагенты были аналитической чистоты, если не указано иное. Растворы готовили на деионизированной воде.

Содержание белка определяли по методу, описанному Лоури, в качестве стандарта использовали бычий сывороточный альбумин [24].

Просвечивающая электронная микроскопия. Все вышеупомянутые процедуры были применены к животным в группе, предназначенной для исследования с помощью просвечивающей электронной микроскопии. В конце протокола после ишемии или 75-минутного периода реперфузии ($n = 5$) выполняли транскардиальную перфузию сосудов, которую начинали с введения 250 мл физиологического раствора (37°C) с последующим введением ~ 1000 мл раствора, содержащего 2% параформальдегида и 2,5% глутаральдегида в фосфатном буфере (0,1 М, рН 7,4, 37°C). Животных умерщвляли с помощью передозировки анестезии в конце периода реперфузии. Ткань была постфиксирована с помощью OsO_3 , обезвожена в градиентной серии спиртовых растворов и залита «Araldite CY212». Ультратонкие срезы (60–90 нм) окрашивали уранилацетатом и цитратом свинца. Их исследовали и фотографировали с помощью просвечивающего электронного микроскопа «JEOL JEM 1200 EX» («JEOL Ltd.», Япония). Срезы тканей получали из коры и белого вещества лобной и теменной долей отдельно и с обеих сторон. Мы использовали систему оценок Görgülü et al. [25] и Kaptanoglu et al. [26] для оценки всех полей в каждой выборке (табл. 1). Внутрицитоплазматический отёк, морфологический вид ядра и митохондрий оценивали в сером веществе, в то время как аксоны и внешний вид миелиновых оболочек оценивали в белом веществе. Исследователь, оценивающий срезы, не знал, какую именно группу он анализирует.

Физиологические параметры. Газовый состав артериальной крови, т.е. парциальное давление кислорода и углекислого газа, рН и гематокрит, определяли с помощью анализатора газов крови «1640/Blood Gas and Electrolytes» («Beckman Coulter Inc.», США) в образцах артериальной крови, взятых до ишемии, и при необходимости поддерживали в физиологических пределах.

Статистический анализ. Минимальное количество животных в группах было предварительно определено программой «G-power» со значимостью $\alpha = 0,05$ и мощностью $\beta = 0,80$. Данные были выражены как среднее значение \pm стандартное отклонение и статистически проанализированы с помощью программы «SPSS 17.0» для Windows. Значение $p < 0,05$ считалось статистически значимым. Поскольку при тестировании с помощью критерия Шафиро–Уилка данные не распределялись нормально, мы применили дисперсионный анализ Краскела–Уоллиса с апостериорным критерием Данна, а затем U -тест Манна–Уитни для попарных сравнений с поправкой Бонферрони, примененной к p -значениям. Электронно-микроскопические данные оценивали с помощью теста хи-квадрат.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

Физиологические измерения. САД (мм рт. ст.), измеренное ранее, было сопоставимо между экспериментальными группами во время периодов ишемии и реперфузии (табл. 2). Доишемическое парциальное давление кислорода и углекислого газа в артериальной крови, рН и гематокрит находились в физиологических пределах во всех группах (табл. 3). Время до снижения активности ЭЭГ после начала ишемии было одинаковым в И- и И/Р-группах (табл. 3).

Перекисное окисление липидов мозга. Уровень МДА (индикатора перекисного окисления липидов) в головном мозге был самым низким ($22,0 \pm 0,6$ нмоль/г влажной ткани) в контрольной группе и самым высоким — в И/Р-группе ($164,0 \pm 1,3$ нмоль/г влажной ткани). Уровни МДА были значительно выше в И- и И/Р-группах по сравнению с контролем, причём уровень МДА был значительно выше в И/Р-группе по сравнению с И-группой (рис. 2). Введение мелатонина значительно снизило уровни МДА во всех трех применяемых дозах, хотя значения всё ещё были выше, чем в контрольной группе. Мелатонин проявлял дозозависимый эффект снижения МДА ($p < 0,05$).

Активность мембраносвязанных Na^+ - K^+ / Mg^{2+} -АТФазы и Ca^{2+} / Mg^{2+} -АТФазы. Значения активности мембраносвязанных АТФаз приведены на рис. 3. Активность Na^+ - K^+ / Mg^{2+} -АТФазы была самой высокой ($185,3 \pm 3,5$ нмоль P_i /мг белка) в контрольной группе и самой низкой ($82,4 \pm 3,7$ нмоль P_i /мг белка) — в И/Р-группе. Разница между контролем и всеми остальными группами была значительной. Активность фермента была выше в группах, которым вводили мелатонин, по сравнению с И/Р-группой

Таблица 2. Среднее артериальное кровяное давление (мм рт. ст.) исследуемых групп в ходе экспериментов

САД (мм рт. ст.)	Контроль ^а (n = 10)	И (n = 8)	И/Р (n = 8)	И/Р + мелатонин ^б 400 мкг/кг (n = 7)	И/Р + мелатонин ^б 1200 мкг/кг (n = 8)	И/Р + мелатонин ^б 2400 мкг/кг (n = 7)
Базальное	103,6 ± 10,5	100,0 ± 17,3	103,4 ± 19,1	96,7 ± 14,2	98,3 ± 14,9	99,3 ± 8,6
До ишемии	101,7 ± 8,5	74,9 ± 7,6	74,9 ± 4,5	74,7 ± 6,0	72,0 ± 4,0	74,7 ± 4,1
Ишемия	102,8 ± 8,9	33,7 ± 6,1	35,4 ± 3,6	36,7 ± 3,9	36,0 ± 3,3	32,7 ± 3,0
Реперфузия (5-я минута)	105,6 ± 7,7	–	87,4 ± 18,5	84,7 ± 13,5	94,9 ± 14,2	79,3 ± 10,6
Реперфузия (75-я минута)	107,6 ± 6,8	–	91,4 ± 18,4	91,3 ± 13,7	89,1 ± 8,6	91,3 ± 12,2

Примечание. САД – среднее артериальное давление; И – ишемия; Р – реперфузия.

^а) Значение САД у контрольных животных измеряли в моменты времени, соответствующие времени в экспериментальных группах.

^б) Мелатонин применялся на первой минуте реперфузии.

Результаты животных, использованных в группе электронной микроскопии, не включены.

Таблица 3. Уровни газа, рН и гематокрита крови до ишемии и время до снижения активности ЭЭГ после начала ишемии в экспериментальных группах

Параметры	Контроль (n = 10)	И (n = 8)	И/Р (n = 8)	И/Р + мелатонин 400 мкг/кг (n = 7)	И/Р + мелатонин 1200 мкг/кг (n = 8)	И/Р + мелатонин 2400 мкг/кг (n = 7)
pO ₂ (мм рт. ст.)	185,7 ± 25,0	197,9 ± 27,4	118,7 ± 42,6	151,3 ± 36,5	192,4 ± 19,0	183,5 ± 41,5
pCO ₂ (мм рт. ст.)	37,4 ± 4,1	38,3 ± 3,5	35,4 ± 2,3	36,3 ± 3,6	37,4 ± 4,5	39,1 ± 5,2
рН	7,38 ± 0,05	7,35 ± 0,06	7,37 ± 0,05	7,38 ± 0,04	7,37 ± 0,05	7,35 ± 0,04
Гематокрит (%)	44,2 ± 1,9	43,6 ± 1,5	43,3 ± 1,3	44,3 ± 1,5	45,1 ± 1,6	42,5 ± 4,1
Время до снижения ЭЭГ (с)	–	17,4 ± 3,5	18,8 ± 2,4	19,0 ± 2,1	17,7 ± 3,2	18,2 ± 2,6

Примечание. И – ишемия; Р – реперфузия; pO₂ – парциальное давление кислорода; pCO₂ – парциальное давление углекислого газа; ЭЭГ – электроэнцефалография.

Результаты животных, использованных в группе электронной микроскопии, не включены.

($p < 0,05$). Мелатонин проявлял дозозависимый эффект, повышая активность Na⁺-K⁺/Mg²⁺-АТФазы ($p < 0,05$), но группы, получавшие мелатонин, всё же имели более низкую активность Na⁺-K⁺/Mg²⁺-АТФазы, чем контрольная группа.

Активность фермента Ca²⁺/Mg²⁺-АТФазы также была различна в разных группах. Группа И/Р имела значительно более низкую активность фермента ($568,0 \pm 6,2$ нмоль Pi/мг белка) по сравнению со всеми другими группами ($p < 0,05$). Введение мелатонина значительно увеличивало уровень активности фермента ($p < 0,05$), хотя в отличие от активности Na⁺-K⁺/Mg²⁺-АТФазы зависимость от дозы не была значимой.

Просвечивающая электронная микроскопия. Изображения срезов мозга из каждой группы, полученные с помощью просвечивающей электронной микроскопии, представлены на рис. 4, а оценочные баллы, полученные в ходе исследования ультраструктуры мозга, представлены в табл. 4. Все параметры на изображе-

ниях просвечивающей электронной микроскопии показали значительные различия между группами. В контрольной группе наблюдалась нормальная ультраструктура мозга, за исключением небольшого внутрицитоплазматического отёка и небольшой комковатости в ядре. Митохондрии имели нормальный вид с хорошо заметными кристами. Аксональных изменений не было, миелиновые слои располагались равномерно (рис. 4). Самые низкие оценки по всем параметрам подтвердили эти наблюдения (табл. 4).

Наиболее заметные ультраструктурные изменения наблюдались в группах И и И/Р: в обеих группах присутствовали тяжёлый отёк, обширная вакуолизация и просветление цитоплазмы нейронов (рис. 4). Практически во всех образцах обнаружены дефекты клеточной мембраны и разрыхление хроматина ядер. Митохондрии демонстрировали отёк от умеренного до сильного без появления крист. Дегенерация миелина была тяжёлой, трещины между миелино-

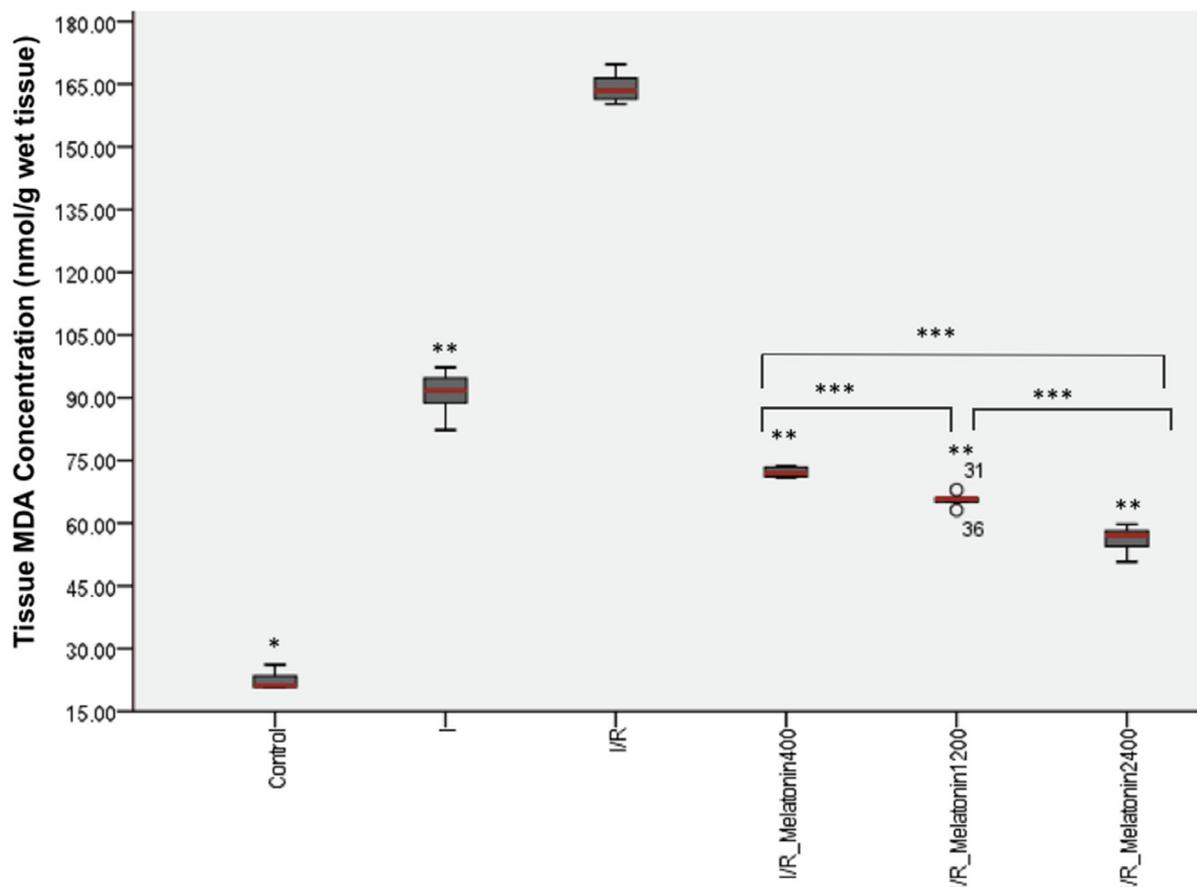


Рис. 2. Концентрация малонового диальдегида в головном мозге в опытных группах. Принятые сокращения: I – ишемия; R – реперфузия. * $p < 0,05$ (при сравнении контрольной группы со всеми другими экспериментальными группами); ** $p < 0,05$ при сравнении с I/R-группой; *** $p < 0,05$ при сравнении с другими группами, получавшими мелатонин

выми слоями были многочисленными. Везикулярная дегенерация, вид сот и экструдированные везикулы, наряду с обилием растрескавшегося миелина, наблюдались с разной интенсивностью почти во всех областях. Хотя степень

интрацитоплазматического отёка и повреждения ядер были аналогичны вышеупомянутым изменениям, наблюдаемым в И/Р-группе ($p > 0,05$), в И-группе деструкция была меньше по сравнению с И/Р-группой. Повреждения

Таблица 4. Оценочные баллы при просвечивающей электронной микроскопии

Местоположение	Контроль	И	И/Р	И/Р + мелатонин 400 мкг/кг	И/Р + мелатонин 1200 мкг/кг	И/Р + мелатонин 2400 мкг/кг
Внутрицитоплазматический отёк	0,05 ± 0,05	2,3 ± 0,13 ^а	2,68 ± 0,11 ^а	0,84 ± 0,14 ^{а,в}	0,57 ± 0,12 ^{а,в,г}	0,21 ± 0,1 ^{в,г}
Ядро	0,2 ± 0,1	1,78 ± 0,14 ^а	2 ± 0,11 ^а	0,58 ± 0,12 ^в	0,53 ± 0,12 ^в	0,37 ± 0,11 ^в
Митохондрия	0,10 ± 0,04	1,82 ± 0,09 ^а	2,35 ± 0,08 ^{а,б}	0,47 ± 0,07 ^{а,в}	0,41 ± 0,07 ^{а,в}	0,22 ± 0,06 ^в
Аксон	0,32 ± 0,11	1,95 ± 0,14 ^а	2,95 ± 0,05 ^{а,б}	0,42 ± 0,12 ^в	0,42 ± 0,12 ^в	0,21 ± 0,1 ^в
Миелин	0,11 ± 0,07	2 ± 0,15 ^а	2,95 ± 0,05 ^{а,б}	0,47 ± 0,12 ^в	0,42 ± 0,12 ^в	0,16 ± 0,09 ^в

Примечание. И – ишемия; Р – реперфузия.
^{а)} $p < 0,05$ при сравнении с контрольной группой.
^{б)} $p < 0,05$ при сравнении с И-группой.
^{в)} $p < 0,05$ при сравнении с И/Р-группой.
^{г)} $p < 0,05$ при сравнении с И/Р + мелатонин 400-группой.

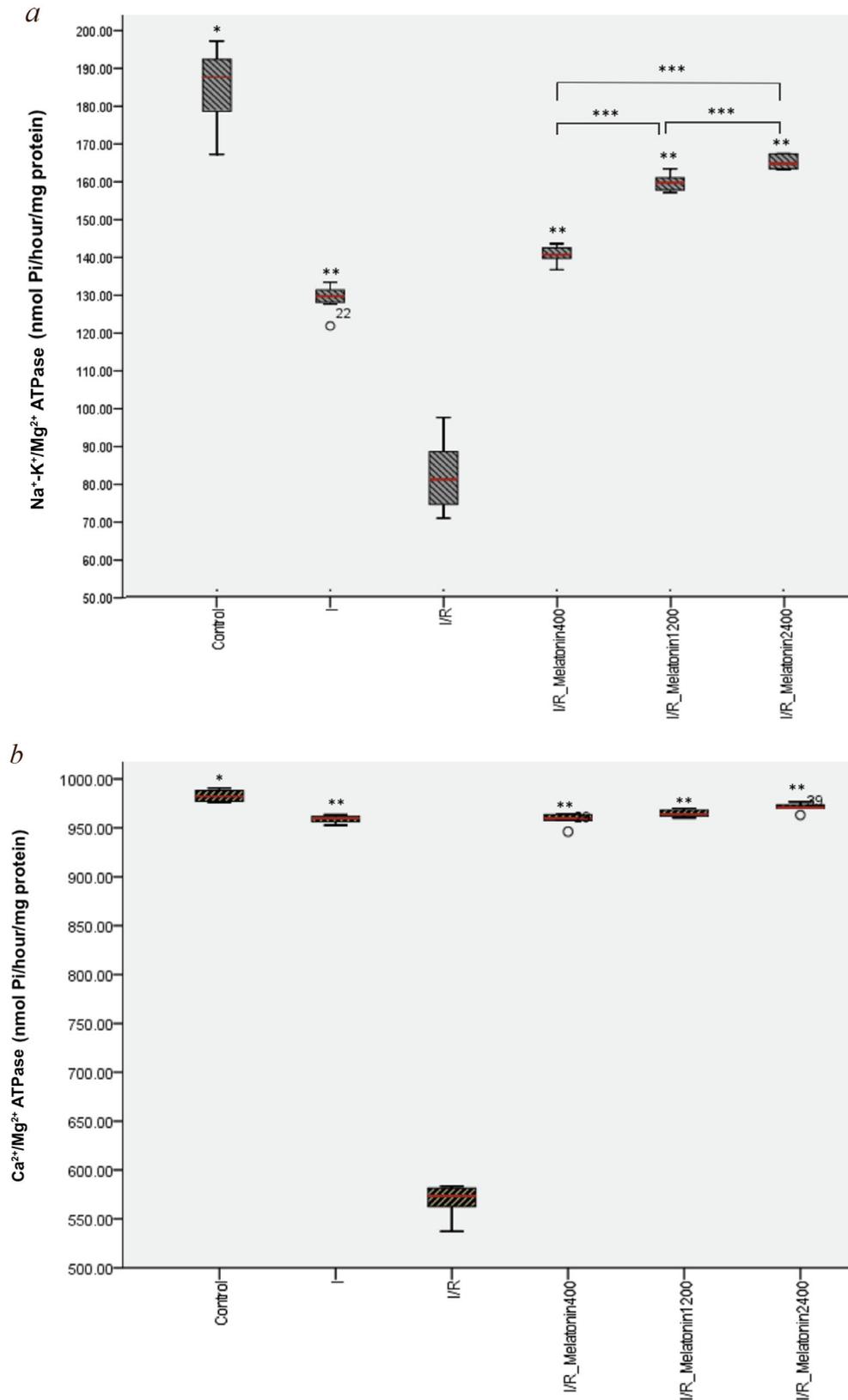


Рис. 3. Активность АТФаз в головном мозге. Активность $\text{Na}^+\text{-K}^+/\text{Mg}^{2+}$ -АТФазы (*a*) и $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ -АТФазы (*b*) в экспериментальных группах. Принятые сокращения: I – ишемия; R – реперфузия. * Контрольная группа значительно отличалась ($p < 0,05$) по сравнению со всеми другими экспериментальными группами; ** $p < 0,05$ при сравнении с группой I/R; *** $p < 0,05$ при сравнении с другими группами, получавшими мелатонин

митохондрий, дегенерация миелиновой оболочки и аксонов были менее выражены в И-группе, чем в И/Р-группе ($p < 0,05$). Мелатонин во всех дозах уменьшал ультраструктурные повреждения, наблюдаемые в И/Р-группе ($p < 0,05$) (рис. 4 и табл. 4). Лёгкий внутрицитоплазматический отёк был очевиден в некоторых образцах нейронов, обработанных мелатонином; ядра в целом были нормальными или имели небольшую комковатость без разрыхления хроматина и дефектов ядерной мембраны. Митохондрии в основном хорошо сохранились, кристы были хорошо видны. Аксоны и миелиновая оболочка выглядели нормально (с небольшим отёком или без отёка в аксонах) и без каких-либо трещин миелина. Не было различий между дозами мелатонина ($p > 0,05$), за исключением значительного различия в степени внутрицитоплазматического отёка между группами И/Р + мелатонин 400 и И/Р + мелатонин 2400 ($p < 0,05$). Несмотря на относительно нормальный внешний вид серого и белого вещества образцов, обработанных мелатонином, количество оценочных баллов просвечивающей электронной микроскопии всё ещё были выше, чем в контрольной группе.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Мы исследовали влияние мелатонина на перекисное окисление липидов, активность мембранных АТФаз и морфологические изменения в тканях мозга после ишемии и после И/Р-повреждений у крыс. Наши результаты продемонстрировали защитную роль мелатонина как в сером, так и в белом веществе головного мозга, реализуемую через его антиоксидантный эффект и за счёт повышения активности мембранных АТФаз.

Нейропатологические последствия транзиторной ишемии/реперфузии в ЦНС часто разрушительны и чрезвычайно трудно поддаются коррекции. Поэтому очень важно предотвратить возникновение И/Р и, в случае её возникновения, как можно раньше ограничить размер и/или распространение И/Р-повреждений [1]. Различные молекулы, включая мелатонин, были исследованы на экспериментальных моделях И/Р-повреждений для изучения возможных защитных эффектов [7, 27, 28]. Предыдущие исследования показали, что мелатонин исполняет защитную роль против И/Р-повреждений в нескольких тканях посредством различных путей, таких как активация каскада Raf–MEK–ERK и фосфорилирование его нижележащих мишеней, ослабление стресса эн-

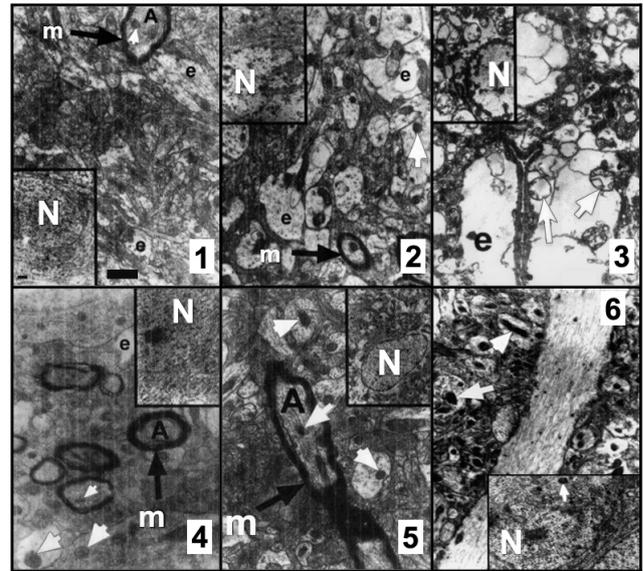


Рис. 4. Изображения образцов из каждой группы, полученные с помощью просвечивающей электронной микроскопии. В контрольной группе (1) нормальная ультраструктура наблюдалась в белом и сером веществе. Группа ишемии (2) показала меньше повреждений по сравнению с группой ишемии/реперфузии (3) с небольшим количеством интактных миелинизированных аксонов и менее отёчными областями. В группе ишемии/реперфузии (3) наблюдались тяжёлые повреждения с обширным аксоплазматическим и цитоплазматическим отёком. Большинство нейрональных элементов демонстрировали везикулярное разрушение, создавая вид сот. В группах, получавших мелатонин (4, 5 и 6 – для доз мелатонина 400, 1200 и 2400 мкг/кг соответственно), наблюдалась защита ультраструктуры с очень небольшим количеством отёчных участков и интактными митохондриями. Мелатонин вводили на первой минуте реперфузии. Принятые сокращения: белые стрелки – митохондрии; N – ядро, показанное на врезках; e – отёчные участки; m – миелин (черные стрелки); A – миелинизированные аксоны; масштабная линейка – 0,5 мкм

доплазматического ретикулума, высвобождение цитохрома *c* из повреждённых митохондрий и активация каспазы 3, формирование пор, изменяющих проницаемость митохондрий, улавливание свободных радикалов [11, 28–31]. В настоящем исследовании мы впервые оценили влияние мелатонина на активность АТФаз в головном мозге во время И/Р-повреждений.

В нашем исследовании ишемия привела к заметному количеству повреждений как в сером, так и в белом веществе по сравнению с контрольной группой, тогда как самые большие морфологические нарушения были обнаружены в И/Р-группе, что согласуется с предыдущими результатами [32]. Наиболее значительные изменения, наблюдаемые с помощью просвечивающей электронной микроскопии в И/Р-группе, были менее выражены во всех группах, которым

вводили мелатонин; самый высокий защитный эффект наблюдали в группе, получавшей самую высокую дозу лекарства. Это согласуется с результатами Lee et al. [27], продемонстрировавшими защитный эффект мелатонина при очаговой ишемии головного мозга у крыс.

В настоящем исследовании уровень МДА, индикатора перекисного окисления липидов в тканях головного мозга, как и ожидалось, был высоким как в И-группах, так и в И/Р-группах и снижался в группах, получавших мелатонин даже в самой низкой дозе. Этот результат соответствует литературным данным [33].

АТФ имеет решающее значение для функции нейронов по поддержанию поляризации мембраны, гомеостаза Ca^{2+} , внутриклеточной передаче сигналов, а также аксонального и дендритного транспорта. Аддитивный эффект перекисного окисления липидов мембран и потребление клеточного АТФ в результате И или И/Р изменяет активность мембраносвязанных АТФаз и в конечном итоге нормальные функции клеток [4]. Свободные радикалы ухудшают проницаемость мембраны и транспортные функции, разрушая особую структуру мембраны и устраняя биологическую активность [32]. Наши результаты показали, что повышенное перекисное окисление липидов в тканях и нарушение активности АТФаз после И и И/Р были скорректированы введением мелатонина в различных дозах в начале реперфузии, что может быть связано с морфологическими нарушениями в сером и белом веществе переднего мозга. Этот результат согласуется с хорошо известным антиоксидантным действием мелатонина как нейропротектора [34, 35].

Во время ишемического периода АТФ-зависимые функции нарушаются из-за истощения клеточных источников энергии [4]. Мембраносвязанные АТФазы выполняют жизненно важные функции, а как показано в нашем исследовании, активность Ca^{2+}/Mg^{2+} -АТФазы ослабляется ишемией, из-за этого повышается внутриклеточное содержание Ca^{2+} , что приводит к смерти. С другой стороны, снижение активности $Na^{+}-K^{+}/Mg^{2+}$ -АТФазы, как и в нашем исследовании, приводит к нарушению мембранного потенциала, объёма клеток и трансмембранных потоков Ca^{2+} , а также к нарушению работы возбуждающих нейромедиаторов [4, 36]. Снижение активности АТФаз может быть связано с повышенным перекисным окислением липидов из-за ишемии или И/Р [4]. Результаты настоящего исследования также указывают на восстановление активности мембраносвязанных АТФаз (вместе со значительным снижением уровня МДА) у животных, получавших мела-

тонин. Хотя И/Р-индуцированное снижение активности обеих АТФаз было значительно исправлено, оно всё ещё было ниже, чем в контрольной группе, однако можно ожидать, что дальнейшее увеличение дозы мелатонина улучшит результат.

Несмотря на то что накоплено огромное количество данных о И/Р-повреждениях и нейрозащитных мерах [2, 7], насколько нам известно, это одно из первых исследований, изучающих влияние мелатонина на активность мембранных АТФаз и на ультраструктуру серого и белого вещества мозга крыс. Белое вещество составляет ~50% мозга взрослого человека и является уязвимой мишенью для активных форм кислорода из-за высокого содержания липидов в миелиновой оболочке, большого количества эндотелиальных ферментов, продуцирующих активные формы кислорода в перфорирующих артериях, и низкого уровня внутренних антиоксидантов. Кроме того, более низкий кровоток и слабое коллатеральное кровообращение в белом веществе [37], чрезвычайно высокая чувствительность олигодендроцитов (в частности, к эксцитотоксичности [38, 39]), а также воспаление приводят к его высокой уязвимости во время ишемии, следовательно, белое вещество мозга часто повреждается серьёзнее, чем серое вещество [40]. Исследования, посвящённые повреждению белого вещества, ограничены из-за малого количества белого вещества у грызунов и отсутствия хорошего метода оценки [41]. Сообщалось, что двусторонняя модель окклюзии общей сонной артерии вызывает диффузную ишемию белого вещества в головном мозге крысы [42]. Исследования с использованием моделей двусторонней окклюзии сонной артерии или применения эндотелина-1 у грызунов показали наличие инсульта белого вещества и его влияние на смерть и различные аспекты дегенерации и восстановления [43]. Ясно, что количественная оценка повреждения серого и белого вещества одинаково важны для оценки эффективности потенциальных терапевтических агентов, поскольку оба вещества влияют на неврологическую дисфункцию и функциональное восстановление после инсульта. Многие вещества, успешно использованные в экспериментальных условиях, не смогли выступить в качестве терапевтических средств, потому что большинство исследователей упустили из виду долю белого вещества во время повреждения и/или восстановления. Хотя мы не исследовали изменения в глияльных клетках, стоит упомянуть астроциты, поскольку астроциты поддерживают нейроны, обеспечивая антиоксидантную защиту, субстраты для нейронального метаболизма и клиренс

глутамата в физиологических и патологических условиях [44]. Хотя астроциты более устойчивы, чем нейроны, ишемия или повреждения, вызванные И/Р, могут нарушать функции астроцитов, что может ещё больше усиливать гибель нейронов [45, 46].

Основным ограничением исследования является отсутствие данных о влиянии уровней экспрессии АТФаз на долгосрочные и поведенческие и/или функциональные результаты лечения мелатонином в И/Р-модели. Необходимы дальнейшие клинические и экспериментальные исследования *in vivo* и *in vitro*, чтобы подтвердить наши выводы о значительном эффекте мелатонина и механизмах, участвующих в его защитном действии при И/Р-повреждении, и предоставить поведенческие и/или функциональные данные для мелатонина, которые будут использоваться для профилактики и лечения И/Р-травм в клинической практике.

В заключение, скорее всего, благодаря своему антиоксидантному действию мелатонин повышает активность мембраносвязанных Na^+ - K^+ / Mg^{2+} -АТФазы и Ca^{2+} / Mg^{2+} -АТФазы, которая была подавлена во время И/Р-повреждений мозга. Таким образом, мелатонин может являться многообещающим нейропротекторным агентом против И/Р-повреждений, эффективным как для серого, так и для белого вещества благо-

даря своим благоприятным биологическим свойствам.

Благодарности. Авторы благодарны профессору З. Дикле Балканчи, доктору медицины, профессору физиологии на пенсии, за её критический вклад в исследование, а также профессору А. Эргуну Караагаоглу, доктору философии, профессору биостатистики, за его участие в статистическом анализе.

Вклад авторов. Все авторы внесли свой вклад в концепцию и дизайн исследования. Подготовка материалов, сбор данных и анализ были выполнены Мельтемом Тунсером и Билге Пехливаноглу. Ультроструктурный анализ был выполнен Сельчук Суруджу, а биохимические измерения были выполнены Тургай Исбир. Первый вариант рукописи был написан Мельтемом Тунсером и Билге Пехливаноглу; все авторы внесли свои комментарии в предыдущие версии рукописи. Все авторы прочитали и одобрили окончательную рукопись.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов в финансовой или иной сфере.

Соблюдение этических норм. Были соблюдены все применимые международные, национальные и/или институциональные инструкции по уходу и использованию животных.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Lee, R. H. C., Lee, M. H. H., Wu, C. Y. C., Couto, E. S. A., Possoit, H. E., et al. (2018) Cerebral ischemia and neuroregeneration, *Neural Regen. Res.*, **13**, 373-385, doi: 10.4103/1673-5374.228711.
- Granger, D. N., and Kvietys, P. R. (2015) Reperfusion injury and reactive oxygen species: the evolution of a concept, *Redox Biol.*, **6**, 524-551, doi: 10.1016/j.redox.2015.08.020.
- Li, Y., and Yang, G.-Y. (2017) *Pathophysiology of ischemic stroke*, in *Translational Research in Stroke* (Lapchak, P. A., and Yang, G.-Y., eds.) 1st Edn., Springer Singapore, pp. 51-75.
- Kalogeris, T., Baines, C. P., Krenz, M., and Korthuis, R. J. (2012) Cell biology of ischemia/reperfusion injury, *Int. Rev. Cell. Mol. Biol.*, **298**, 229-317, doi: 10.1016/b978-0-12-394309-5.00006-7.
- Godinho, J., de Sa-Nakanishi, A. B., Moreira, L. S., de Oliveira, R. M. W., Huzita, C. H., et al. (2018) Ethylacetate fraction of *Trichilia catigua* protects against oxidative stress and neuroinflammation after cerebral ischemia/reperfusion, *J. Ethnopharmacol.*, **221**, 109-118, doi: 10.1016/j.jep.2018.04.018.
- Phaniendra, A., Jestadi, D. B., and Periyasamy, L. (2015) Free radicals: properties, sources, targets, and their implication in various diseases, *Indian J. Clin. Biochem.*, **30**, 11-26, doi: 10.1007/s12291-014-0446-0.
- Rodrigo, R., Fernández-Gajardo, R., Gutiérrez, R., Matamala, J. M., Carrasco, R., et al. (2013) Oxidative stress and pathophysiology of ischemic stroke: novel therapeutic opportunities, *CNS Neurol. Disord. Drug Targets*, **12**, 698-714, doi: 10.2174/1871527311312050015.
- Weston, R. M., Jones, N. M., Jarrott, B., and Callaway, J. K. (2007) Inflammatory cell infiltration after endothelin-1-induced cerebral ischemia: histochemical and myeloperoxidase correlation with temporal changes in brain injury, *J. Cereb. Blood Flow Metab.*, **27**, 100-114, doi: 10.1038/sj.jcbfm.9600324.
- Ma, Z., Xin, Z., Di, W., Yan, X., Li, X., et al. (2017) Melatonin and mitochondrial function during ischemia/reperfusion injury, *Cell. Mol. Life Sci.*, **74**, 3989-3998, doi: 10.1007/s00018-017-2618-6.
- Hu, S., Zhu, P., Zhou, H., Zhang, Y., and Chen, Y. (2018) Melatonin-induced protective effects on cardiomyocytes against reperfusion injury partly through modulation of IP3R and SERCA2a via activation of ERK1, *Arq. Bras. Cardiol.*, **110**, 44-51, doi: 10.5935/abc.20180008.
- Lin, Y. W., Chen, T. Y., Hung, C. Y., Tai, S. H., Huang, S. Y., et al. (2018) Melatonin protects brain against ischemia/reperfusion injury by attenuating endoplasmic reticulum stress, *Int. J. Mol. Med.*, **42**, 182-192, doi: 10.3892/ijmm.2018.3607.
- Blanco, S., Hernández, R., Franchelli, G., Ramos-Álvarez, M. M., and Peinado, M. (2017) Melatonin influences NO/NOS pathway and reduces oxidative and nitrosative stress in a model of hypoxic-ischemic brain damage, *Nitric Oxide*, **62**, 32-43, doi: 10.1016/j.niox.2016.12.001.

13. Yawno, T., Mahen, M., Li, J., Fahey, M. C., Jenkin, G., and Miller, S. L. (2017) The beneficial effects of melatonin administration following hypoxia-ischemia in preterm fetal sheep, *Front. Cell Neurosci.*, **11**, 296, doi: 10.3389/fncel.2017.00296.
14. Chakravarty, S., and Rizvi, S. I. (2011) Circadian modulation of sodium-potassium ATPase and sodium – proton exchanger in human erythrocytes: *in vitro* effect of melatonin, *Cell Mol. Biol. (Noisy-le-Grand)*, **57**, 80–86.
15. Toklu, H. Z., Deniz, M., Yuksel, M., and Keyer-Uysal, M. (2009) The protective effect of melatonin and amlodipine against cerebral ischemia/reperfusion-induced oxidative brain injury in rats, *Marmara Med. J.*, **22**, 34–44.
16. Hoffmann, U., Sheng, H., Ayata, C., and Warner, D. S. (2016) Anesthesia in experimental stroke research, *Transl. Stroke Res.*, **7**, 358–367, doi: 10.1007/s12975-016-0491-5.
17. Smith, M. L., Bendek, G., Dahlgren, N., Rosén, I., Wieloch, T., and Siesjö, B. K. (1984) Models for studying long-term recovery following forebrain ischemia in the rat. 2. A 2-vessel occlusion model, *Acta Neurol. Scand.*, **69**, 385–401, doi: 10.1111/j.1600-0404.1984.tb07822.x.
18. Ildan, F., Oner, A., Polat, S., Isbir, T., Göçer, A. I., et al. (1995) Correlation of alterations on Na⁺-K⁺/Mg²⁺ ATPase activity, lipid peroxidation and ultrastructural findings following experimental spinal cord injury with and without intravenous methylprednisolone treatment, *Neurosurg. Rev.*, **18**, 35–44, doi: 10.1007/bf00416476.
19. Ildan, F., Göçer, A. I., Tuna, M., Polat, S., Kaya, M., et al. (2001) The effects of the pre-treatment of intravenous nimodipine on Na⁺-K⁺/Mg²⁺ ATPase, Ca²⁺/Mg²⁺ ATPase, lipid peroxidation and early ultrastructural findings following middle cerebral artery occlusion in the rat, *Neurol. Res.*, **23**, 96–104, doi: 10.1179/016164101101198208.
20. Reading, H. W., and Isbir, T. (1980) The role of cation-activated ATPases in transmitter release from the rat iris, *Q. J. Exp. Physiol. Cogn. Med. Sci.*, **65**, 105–116, doi: 10.1113/expphysiol.1980.sp002495.
21. Peterson, M. E., Daniel, R. M., Danson, M. J., and Eisenthal, R. (2007) The dependence of enzyme activity on temperature: determination and validation of parameters, *Biochem. J.*, **402**, 331–337, doi: 10.1042/bj20061143.
22. Atkinson, A., Gatenby, A. D., and Lowe, A. G. (1973) The determination of inorganic orthophosphate in biological systems, *Biochim. Biophys. Acta*, **320**, 195–204, doi: 10.1016/0304-4165(73)90178-5.
23. Reading, H. W., and Isbir, T. (1979) Action of lithium on ATPases in the rat iris and visual cortex, *Biochem. Pharmacol.*, **28**, 3471–3474, doi: 10.1016/0006-2952(79)90089-3.
24. Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L., and Randall, R. J. (1951) Protein measurement with the Folin phenol reagent, *J. Biol. Chem.*, **193**, 265–275.
25. Görgülü, A., Palaoglu, S., Ismailoğlu, O., Tuncel, M., Sürücü, M. T., et al. (2001) Effect of melatonin on cerebral edema in rats, *Neurosurgery*, **49**, 1434–1442, doi: 10.1097/00006123-200112000-00024.
26. Kaptanoglu, E., Palaoglu, S., Surucu, H. S., Hayran, M., and Beskonakli, E. (2002) Ultrastructural scoring of graded acute spinal cord injury in the rat, *J. Neurosurg.*, **97**, 49–56, doi: 10.3171/spi.2002.97.1.0049.
27. Lee, M. Y., Kuan, Y. H., Chen, H. Y., Chen, T. Y., Chen, S. T., et al. (2007) Intravenous administration of melatonin reduces the intracerebral cellular inflammatory response following transient focal cerebral ischemia in rats, *J. Pineal Res.*, **42**, 297–309, doi: 10.1111/j.1600-079X.2007.00420.x.
28. Ramis, M. R., Esteban, S., Miralles, A., Tan, D. X., and Reiter, R. J. (2015) Protective effects of melatonin and mitochondria-targeted antioxidants against oxidative stress: a review, *Curr. Med. Chem.*, **22**, 2690–2711, doi: 10.2174/0929867322666150619104143.
29. Cervantes, M., Morali, G., and Letechipía-Vallejo, G. (2008) Melatonin and ischemia-reperfusion injury of the brain, *J. Pineal Res.*, **45**, 1–7, doi: 10.1111/j.1600-079X.2007.00551.x.
30. Gim, S. A., and Koh, P. O. (2015) Melatonin attenuates hepatic ischemia through mitogen-activated protein kinase signaling, *J. Surg. Res.*, **198**, 228–236, doi: 10.1016/j.jss.2015.05.043.
31. Santofimia-Castaño, P., Clea Ruy, D., Garcia-Sanchez, L., Jimenez-Blasco, D., Fernandez-Bermejo, M., et al. (2015) Melatonin induces the expression of Nrf2-regulated antioxidant enzymes via PKC and Ca²⁺ influx activation in mouse pancreatic acinar cells, *Free Radic. Biol. Med.*, **87**, 226–236, doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2015.06.033.
32. Reiter, R. J., Sainz, R. M., Lopez-Burillo, S., Mayo, J. C., Manchester, L. C., and Tan, D. X. (2003) Melatonin ameliorates neurologic damage and neurophysiologic deficits in experimental models of stroke, *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, **993**, 35–47, doi: 10.1111/j.1749-6632.2003.tb07509.x.
33. Tütüncüler, F., Eskioçak, S., Başaran, U. N., Ekuclu, G., Ayyaz, S., and Vatanser, U. (2005) The protective role of melatonin in experimental hypoxic brain damage, *Pediatr. Int.*, **47**, 434–439, doi: 10.1111/j.1442-200x.2005.02085.x.
34. Reiter, R. J., Tan, D. X., Leon, J., Kilic, U., and Kilic, E. (2005) When melatonin gets on your nerves: its beneficial actions in experimental models of stroke, *Exp. Biol. Med. (Maywood)*, **230**, 104–117, doi: 10.1177/153537020523000205.
35. Tan, D. X., Manchester, L. C., Terron, M. P., Flores, L. J., and Reiter, R. J. (2007) One molecule, many derivatives: a never-ending interaction of melatonin with reactive oxygen and nitrogen species? *J. Pineal Res.*, **42**, 28–42, doi: 10.1111/j.1600-079X.2006.00407.x.
36. De Lores Arnaiz, G. R., and Ordieres, M. G. (2014) Brain Na⁺,K⁺-ATPase activity in aging and disease, *Int. J. Biomed. Sci.*, **10**, 85–102.
37. Harris, J. J., and Attwell, D. (2012) The energetics of CNS white matter, *J. Neurosci.*, **32**, 356–371, doi: 10.1523/jneurosci.3430-11.2012.
38. Domercq, M., Sánchez-Gómez, M. V., Sherwin, C., Etzebarria, E., Fern, R., and Matute, C. (2007) System xc⁻ and glutamate transporter inhibition mediates microglial toxicity to oligodendrocytes, *J. Immunol.*, **178**, 6549–6556, doi: 10.4049/jimmunol.178.10.6549.
39. Micu, I., Jiang, Q., Coderre, E., Ridsdale, A., Zhang, L., et al. (2006) NMDA receptors mediate calcium accumulation in myelin during chemical ischaemia, *Nature*, **439**, 988–992, doi: 10.1038/nature04474.
40. Wang, Y., Liu, G., Hong, D., Chen, F., Ji, X., and Cao, G. (2016) White matter injury in ischemic stroke, *Prog. Neurobiol.*, **141**, 45–60, doi: 10.1016/j.pneurobio.2016.04.005.
41. Matute, C., Domercq, M., Pérez-Samartín, A., and Ransom, B. R. (2013) Protecting white matter from stroke injury, *Stroke*, **44**, 1204–1211, doi: 10.1161/strokeaha.112.658328.

42. Pappas, B. A., Davidson, C. M., Bennett, S. A., de la Torre, J. C., Fortin, T., and Tenniswood, M. P. (1997) Chronic ischemia: memory impairment and neural pathology in the rat, *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, **826**, 498-501, doi: 10.1111/j.1749-6632.1997.tb48512.x.
43. Sozmen, E. G., Kolekar, A., Havton, L. A., and Carmichael, S. T. (2009) A white matter stroke model in the mouse: axonal damage, progenitor responses and MRI correlates, *J. Neurosci. Methods*, **180**, 261-272, doi: 10.1016/j.jneumeth.2009.03.017.
44. Rossi, D. J., Brady, J. D., and Mohr, C. (2007) Astrocyte metabolism and signaling during brain ischemia, *Nat. Neurosci.*, **10**, 1377-1386, doi: 10.1038/nn2004.
45. Nedergaard, M., and Dirnagl, U. (2005) Role of glial cells in cerebral ischemia, *Glia*, **50**, 281-286, doi: 10.1002/glia.20205.
46. Sekerdag, E., Solaroglu, I., and Gursoy-Ozdemir, Y. (2018) Cell death mechanisms in stroke and novel molecular and cellular treatment options, *Curr. Neuropharmacol.*, **16**, 1396-1415, doi: 10.2174/1570159x16666180302115544.

MELATONIN IMPROVES REDUCED ACTIVITIES OF MEMBRANE ATPases AND PRESERVES ULTRASTRUCTURE OF GRAY AND WHITE MATTER IN THE RAT BRAIN ISCHEMIA/REPERFUSION MODEL

Meltem Tuncer^{1*}, Bilge Pehlivanoglu¹, Selçuk H. Sürücü², and Turgay Isbir³

¹ Department of Physiology, Hacettepe University Faculty of Medicine, 06100 Ankara, Turkey; e-mail: metuncer@hacettepe.edu.tr; tuncermeltem@gmail.com

² Department of Anatomy, Koç University School of Medicine, 34450 Istanbul, Turkey

³ Department of Medical Biology, Faculty of Medicine, Yeditepe University, 34755 Istanbul, Turkey

Ischemia/reperfusion (I/R) is among the most frequent neurological problems and early intervention to limit the damage is crucial in decreasing mortality and morbidity. Based on reports regarding beneficial effects of melatonin, we investigated its impact on Na⁺-K⁺/Mg²⁺ ATPase and Ca²⁺/Mg²⁺ ATPase activities and ultrastructure of gray and white matter in the rat forebrain I/R model. Adult Wistar-albino rats (*n* = 78) were randomized into control, ischemia (I), ischemia/reperfusion (I/R), low (I/R + melatonin 400 µg/kg), moderate (I/R + melatonin 1200 µg/kg), and high (I/R + melatonin 2400 µg/kg) dose melatonin. Two-vessel occlusion combined with hypotension (15 min) induced ischemia and reperfusion (75 min) achieved by blood reinfusion were performed. Activities of the membrane-bound enzyme, brain malondialdehyde levels, and brain matter ultrastructure were examined in frontoparietal cortices. Melatonin lowered production of malondialdehyde in a dose-dependently. The enzyme activities attenuated under I and I/R, improved with melatonin treatment. I and I/R severely disturbed gray and white matter morphology. Melatonin, in all applied doses, decreased ultrastructural damages in both gray and white matter. Favorable effects of melatonin can be attributed to its antioxidant properties suggesting that it could be a promising neuroprotective agent against I/R injury being effective both for gray and white matter due to favorable biological properties.

Keywords: malondialdehyde, melatonin, Na⁺-K⁺/Mg²⁺ ATPase, Ca²⁺/Mg²⁺ ATPase, reperfusion injury

ЭЛЕКТРОСТИМУЛЯЦИЯ МИОТУБ КАК МОДЕЛЬ СОКРАТИТЕЛЬНОЙ АКТИВНОСТИ МЫШЦ *in vitro*: ТЕКУЩЕЕ СОСТОЯНИЕ И ПЕРСПЕКТИВЫ РАЗВИТИЯ

Обзор

© 2021 Т.Ф. Вепхвадзе¹, А.В. Воротников², Д.В. Попов^{1,3*}

¹ Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Государственный научный центр Российской Федерации Институт медико-биологических проблем РАН, 123007 Москва, Россия; электронная почта: danil-porov@yandex.ru

² Федеральное государственное бюджетное учреждение Национальный медицинский исследовательский центр кардиологии Министерства здравоохранения Российской Федерации, 121552 Москва, Россия

³ Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, факультет фундаментальной медицины, 119991 Москва, Россия

Поступила в редакцию 24.12.2020

После доработки 04.04.2021

Принята к публикации 05.04.2021

Скелетные мышцы составляют более трети массы тела человека и вносят значительный вклад в регуляцию метаболизма в организме. Хроническое уменьшение двигательной активности замедляет метаболизм и снижает функциональные возможности мышц, ведет к нарушению обмена веществ, а также развитию социально значимых заболеваний и снижению уровня и продолжительности жизни. Экспериментальные модели на основе клеток-предшественников, выделяемых из мышечной ткани человека при биопсии и дифференцированных в зрелые волокна *in vitro*, могут быть использованы для решения широкого спектра экспериментальных задач. В обзоре обсуждаются особенности динамики и регуляции миогенеза, имеющие критическое значение для создания адекватной клеточной модели. Основной функцией скелетной мышцы является сокращение, поэтому электростимуляция миотуб представляется перспективным подходом для успешного завершения миогенеза и для моделирования *in vitro* основных процессов, происходящих в скелетной мышце при физических нагрузках. В обзоре анализируются текущие недостатки и возможности оптимизации существующей клеточной модели, а также перспективы её развития для решения фундаментальных задач, связанных с физиологией и биохимией мышечной деятельности, а также изучением механизмов развития метаболических заболеваний.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: скелетная мышца, физическая нагрузка, сателлитные клетки, миогенез, электростимуляция, метаболизм, экспрессия генов.

DOI: 10.31857/S0320972521050080

ВВЕДЕНИЕ

Скелетные мышцы составляют более трети массы тела человека и в норме обладают высокой метаболической активностью. В покое они осуществляют до 90% инсулин-зависимого потребления глюкозы [1], дополнительно растущего при физических нагрузках [2]. При низкоин-

тенсивной и продолжительной нагрузке мышечные волокна с высокими окислительными возможностями активно используют жирные кислоты в качестве энергетических субстратов, координируя углеводно-жировой обмен в организме и препятствуя развитию ожирения и инсулинорезистентности как раннего проявления диабетических изменений [1–3]. Хроническое уменьшение двигательной активности снижает метаболизм и функциональные возможности скелетных мышц, приводит к нарушению обмена веществ, развитию ожирения, метаболического синдрома и диабета II типа, усугубляет развитие возрастной саркопении (потери мышечной массы), повышает риск развития сердечно-сосудистых заболеваний, депрессии и синдрома хронической усталости, а также сокращает продолжительность жизни [4–8].

Принятые сокращения: СК – сателлитные клетки; ЭМГ – электромиограмма; ЭМСК – эмбриональные мышечные стволовые клетки; АМРК – АМР-зависимая протеинкиназа; GLUT4 – инсулин-регулируемый транспортер глюкозы 4; mTORC1 – мишень рапамицина, комплекс 1; MyoG – миогенин; p38 MAPK – митоген-активируемая протеинкиназа p38; Pax3/Pax7 – спаренные гомеобоксные транскрипционные факторы 3/7; TNF1 – фактор некроза опухоли 1.

* Адресат для корреспонденции.

Во время интенсивной сократительной активности мышечные клетки испытывают механическое напряжение, повышается внутримышечная температура, изменяется содержание многих тканевых метаболитов, снижается рН и запасы гликогена. Эти и другие факторы активируют многочисленные сигнальные пути и заметно изменяют транскриптомный профиль (экспрессию сотен генов) в течение нескольких часов восстановления после активности [9, 10]. Во время и после работы скелетные мышцы выделяют множество метаболитов и миокинов, оказывающих эндо-, пара- и аутокринные воздействия [5, 11, 12]. Регулярные аэробные нагрузки (длительные и низкоинтенсивные, энергообеспечение которых идет в основном за счет окислительного фосфорилирования) являются эффективным инструментом для повышения функциональных возможностей скелетных мышц (чувствительности к инсулину, максимальной скорости окисления жиров и углеводов, работоспособности) и профилактики многих заболеваний, включая саркопению, сердечно-сосудистые заболевания и системные метаболические нарушения при диабете II типа [6, 7, 13–15]. У людей нетренированных и с пониженными функциональными возможностями работоспособность ограничена прежде всего низкой окислительной способностью скелетных мышц и их высокой утомляемостью, а не производительностью кислородтранспортной системы [16]. Это подчеркивает важность изучения молекулярных и биохимических механизмов адаптации скелетных мышц к сократительной активности.

Понимание сути изменений во внутриклеточной сигнализации и профиле экспрессии генов, происходящих в скелетной мышце при однократных и регулярных аэробных упражнениях, важно для поиска оптимальных подходов для профилактики и борьбы с метаболическими нарушениями (на уровне скелетных мышц и организма), а также при восстановлении после ограничения двигательной активности (малоподвижный образ жизни, длительное пребывание на постельном режиме, реабилитация космонавтов после полета и т.д.). Данная информация также важна для поиска эффективных путей увеличения функциональных возможностей скелетных мышц (и организма в целом) у людей с нормальным уровнем двигательной активности и спортсменов, тренирующих выносливость. Несмотря на большое количество исследований в этой области, молекулярные механизмы адаптации скелетной мышцы к аэробным нагрузкам остаются во многом неясными.

Исследования молекулярных и биохимических механизмов адаптации скелетной мышцы с

участием добровольцев *in vivo* связаны с этическими ограничениями: повторяющиеся биопсии мышц, использование фармакологических активаторов, ингибиторов и радиоактивных трейсеров, регуляция экспрессии генов (рис. 1). Применение животных моделей позволяет преодолеть часть ограничений, однако некоторые механизмы адаптации мышц грызунов к физическим нагрузкам отличаются от наблюдаемых у человека. Например, у грызунов в отличие от человека физические нагрузки изменяют соотношение мышечных волокон I и II типов [17, 18], значительно различающихся метаболическим профилем [19]. Помимо этого циркадные ритмы влияют на экспрессию нескольких сотен генов в мышцах грызунов [20, 21] и человека [22]. Это затрудняет сравнение и интерпретацию данных, полученных в разных моделях *in vivo* [23], поэтому использование клеточной модели для изучения механизмов адаптации скелетных мышц представляется оптимальным и может применяться на практике.

Проблема неспособности терминально дифференцированных мышечных клеток к культивированию решается путём выделения из мышечных биопсий сателлитных клеток-предшественников (СК), превращающихся в процессе пролиферации и последующей дифференцировки *in vitro* в функциональные миотубы (рис. 1). СК рассматриваются как «взрослые» стволовые клетки, которые отличаются от эмбриональных мышечных стволовых клеток (ЭМСК) профилем экспрессии транскрипционных факторов и степенью коммитированности. Контролируемый миогенез *in vitro* позволяет использовать СК как исходный материал для создания клеточной модели и решения широкого спектра экспериментальных задач, в том числе для исследования миогенного и регенеративного потенциала этих клеток в норме и при патологическом изменении метаболической активности.

Основной функцией скелетной мышцы является сократительная активность, которая должна быть смоделирована в эксперименте. Скелетная мышца состоит из мышечных волокон, представляющих собой многоядерный синцитий, образуемый при слиянии миоцитов в миотубы. Формирование миотуб, способных к сокращению *in vitro*, зависит от ряда факторов и является отдельной проблемой (см. ниже). Электростимуляция может дать ключ к ее решению, поскольку она служит основным триггером, запускающим сокращение миотуб. При этом происходят изменения внутриклеточной сигнализации, паттерна экспрессии генов, а также клеточного фенотипа. В условиях *in vitro* электростиму-

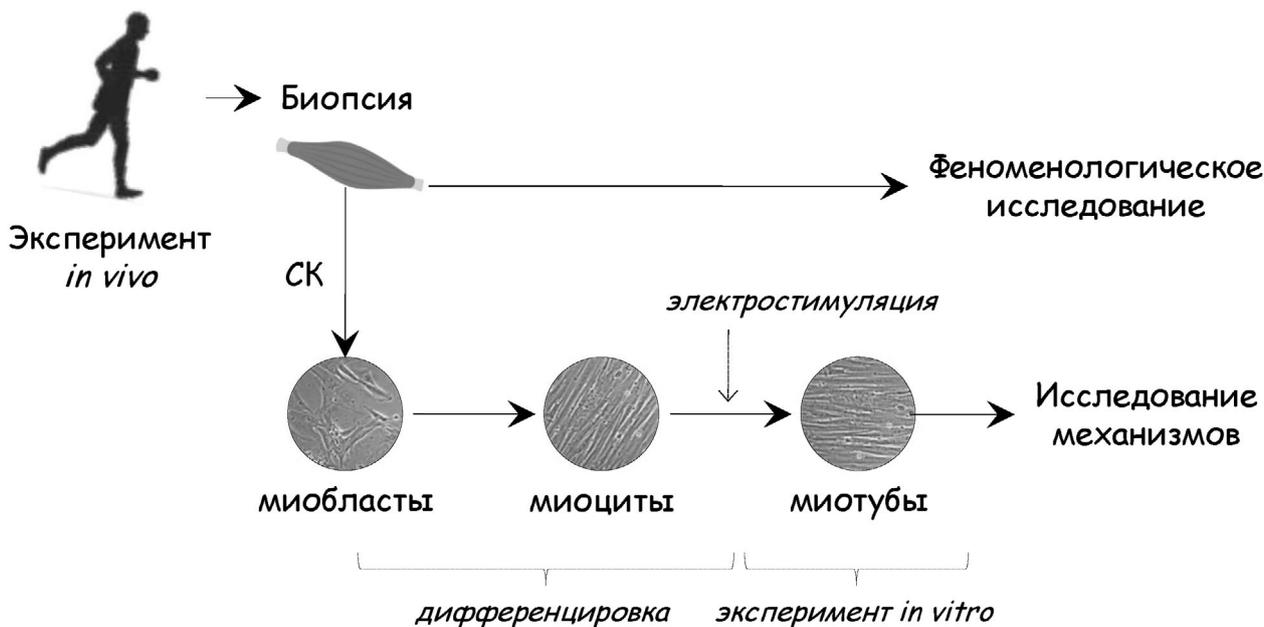


Рис. 1. Два подхода к исследованию молекулярных и биохимических механизмов адаптации сократительной активности мышц. В первом случае (вверху) используются пробы скелетных мышц, взятых до и после какого-либо воздействия или у различных когорт добровольцев (эксперимент *in vivo*) для анализа их феноменологических характеристик (активность ферментов, модификации белков, транскрипционная активность, профили экспрессии и т.п.); экспериментальные манипуляции с донорским материалом при таком подходе практически невозможны. Во втором случае (внизу) из мышечных биопсий выделяют сателлитные клетки, которые далее культивируют *in vitro*; дифференцированные в миотубы клетки доступны для широкого спектра экспериментальных воздействий, включая электростимуляцию, моделирующую различные режимы сократительной активности мышц

ления может инициировать молекулярные события последних стадий миогенеза и формирования функциональных миотуб (рис. 1).

МИОГЕНЕЗ И САТЕЛЛИТНЫЕ КЛЕТКИ

Миогенез представляет собой процесс формирования мышечных волокон из клеток-предшественников и обновления структур волокон, утрачиваемых в процессе жизнедеятельности. Обычно его разделяют на три фазы (рис. 2, а) [24–27].

Миогенез регулируется рядом транскрипционных факторов, главными на регенеративной стадии считаются 4 классических: Myf5, MyoD, MyoG (миогенин) и Mrf4 (Myf6) [24, 27–30]. Для поддержания стволового состояния и регенеративного потенциала важна работа факторов Pax3/Pax7 [29, 31]. Последовательные изменения уровня экспрессии всех этих факторов (рис. 2, б), инактивация и активация их генов *in vitro* [32], а также данные полногеномных исследований [30] указывают на сложные взаимосвязи между этими факторами и важность их взаимодействия в процессе миогенеза. Они формируют регуляторную сеть с многочисленными

прямыми и обратными связями (рис. 2, в), динамика которой меняется, определяя протекание миогенеза. Динамические изменения Myf5 и Pax3/Pax7 поддерживают СК в стволовом состоянии, MyoD регулирует мобилизацию СК из стволовой ниши, а MyoG участвует в формировании миотуб [24]. Первичная активация ЭМСК связана с падением экспрессии Pax3, индукцией Pax7 и транзитной экспрессией Myf5 и MyoD. Коммитирование ЭМСК в направлении СК обусловлено реактивацией экспрессии Myf5, дальнейшая дифференцировка до миобластов происходит при активации MyoD (рис. 2, б). Повышение уровня MyoG маркирует дифференцировку миобластов в миоциты, Mrf4 координирует формирование миотуб. При этом Pax7 служит базовым маркером СК, и его наличие позволяет контролировать выделение истинных СК из мышечных биопсий и поддержание их в клеточной культуре в виде стволовых клеток [29].

Внешние факторы также играют важную роль в поддержании стволового фенотипа частично коммитированных СК. В условиях *in vitro* они могут быть важными для удержания СК от преждевременной дифференцировки, позволяя провести наращивание культуры путем пролиферации. Как уже отмечено, одним их таких

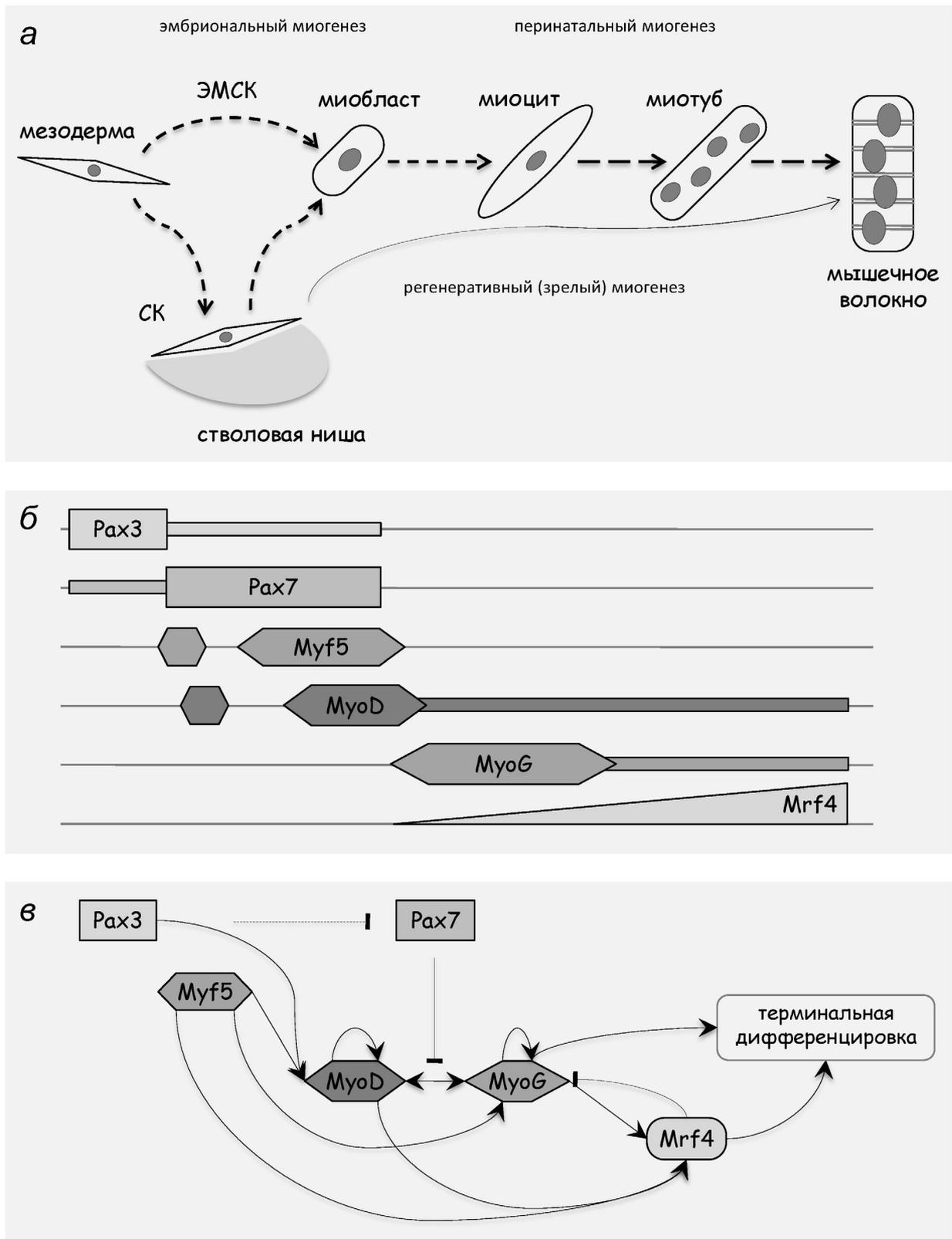


Рис. 2. *а* – Общая схема миогенеза, где условные фазы отражены различными пунктирными стрелками; *б* – профили экспрессии транскрипционных факторов, где высота затемненных фигур отражает уровень экспрессии указанного фактора в момент, соответствующий общей схеме миогенеза; *в* – регуляторные взаимоотношения транскрипционных факторов, где активирующие воздействия показаны стрелками, а ингибирующие – Т-образными связями

факторов является наличие внеклеточного матрикса вокруг клеток, который не только механически имитирует стволовую нишу, но и влияет на доступность для клеток кислорода и питательных веществ, гормонов и цитокинов, а также на способность к формированию межклеточных контактов. Регенеративные свойства и активность СК усиливаются при умеренной гипоксии, но снижаются при жесткой [33]. Это может быть связано с биогенезом митохондрий, активность которых способствует регенеративному миогенезу посредством работы с-Мус и кальциневрина, регулирующих экспрессию MyoD и MyoG [34]. Миогенез нарушается при воспалении под действием воспалительных интерлейкинов, фактора некроза опухолей (TNF α) и интерферона- γ [35]. Сходная картина наблюдается в жировой ткани, когда повышенный воспалительный фон препятствует жировой дифференцировке резидентных клеток-предшественников и играет ключевую роль в развитии инсулинорезистентности и других метаболических нарушений [8]. Анаболические гормоны, такие как инсулин и инсулиноподобный фактор роста 1, гормон роста и андрогены, противодействуют развитию воспаления и активируют синтез мышечных белков, однако их влияние на СК полностью не изучено [35]. При этом инсулин – активатор комплекса mTORC1 (ключевого регулятора синтеза белка) – часто используют как компонент среды для индукции миогенеза СК *in vitro*; напротив, подавление активности mTORC1 блокирует слияние миоцитов, образование и созревание миотуб в клеточных моделях [36]. С другой стороны, повышенное содержание глюкозы в среде ингибирует пролиферацию первичных миобластов мышцы [37] и дифференцировку клеток линии C2C12, влияя на содержание и локализацию MyoD [38, 39] и фактора транскрипции Mlx, регулирующего слияние миотуб [40]. Однако в других работах было показано, что гипергликемия ускоряла дифференцировку клеток C2C12 на фоне сниженной активности АМР-зависимой протеинкиназы (АМРК), ключевого регулятора углеводно-жирового обмена и биогенеза митохондрий, и максимальной скорости дыхания митохондрий [41, 42], а также увеличивала содержание митохондриальных белков в первичных миотубах человека [43]. Еще в одном исследовании различий в перечисленных выше характеристиках первичных миотуб выявлено не было [44]. Таким образом, данные о глюкозозависимой регуляции миогенеза достаточно противоречивы и требуют дополнительных исследований.

Физические контакты с соседними клетками и внеклеточным матриксом претерпевают изме-

нения на разных стадиях миогенеза. На ранней стадии активации ЭМСК запуск сигнального пути Notch и механизма эпителиально-мезенхимального перехода ведет к разрушению межклеточных контактов, опосредованных N-кадгеринами и β -катенином. В результате β -катенин перемещается в ядро, где запускает экспрессию Myf5 [45] и Pax7 [31], коммитируя развитие ЭМСК в мышечном направлении. Переход ЭМСК в СК дополнительно связан с формированием стволовой ниши на поверхности миотуб (или мышечных волокон), когда вокруг СК формируется оболочка внеклеточного матрикса, препятствующая межклеточным контактам и поддерживающая плюрипотентный/стволовой фенотип СК [24]. При этом СК могут делиться как симметрично вдоль волокна с образованием двух дочерних СК, так и асимметрично поперек волокна с образованием дочерней клетки, обеспечивающей регенеративный миогенез. Наконец, восстановление межклеточных контактов вносит критический вклад в слияние дифференцированных миобластов в миотубы или присоединение к мышечным волокнам [45].

Таким образом, использование СК из мышечных биопсий для создания клеточных моделей требует контроля нескольких ключевых этапов миогенеза. Во-первых, это характеристика выделяемых СК по наличию ключевых маркеров этих клеток. Во-вторых, это создание условий для пролиферации СК при сохранении их стволового фенотипа, что может быть достигнуто через ослабление межклеточных взаимодействий или путём регуляции экспрессии факторов транскрипции, таких как Pax7, Myf5 и MyoD. В-третьих, это контроль внешних факторов, включая гормоны для индукции дифференцировки, а также оптимизация клеточного субстрата, например, использование специальных субстратов с микроструктурой (см. ниже). Наконец, это обеспечение слияния миоцитов в миотубы, чему способствует восстановление межклеточных контактов за счет разрыхления внеклеточного матрикса или специфической стимуляции миоцитов. Как обсуждается ниже, применение электростимуляции миоцитов может использоваться как воздействие для ускорения завершения дифференцировки и формирования зрелых многоядерных миотуб.

КЛЕТОЧНАЯ МОДЕЛЬ СОКРАТИТЕЛЬНОЙ АКТИВНОСТИ МЫШЦ

Использовать электростимуляцию мышечных клеток в экспериментах *in vitro* начали уже в середине 70-х годов прошлого века. В начале

XXI века было проведено первое исследование с электростимуляцией первичных миотуб человека [46]. Для этого из биопсийной пробы ткани скелетной мышцы были выделены СК, мио-бласты культивировали и инициировали дифференцировку *in vitro* в миотубы. Такие клеточные модели особенно привлекательны для изучения миогенеза, поскольку позволяют ассоциировать конкретные изменения профиля экспрессии генов с изменениями морфологии и функциональных характеристик клеток. По-видимому, это частично объясняет резкое усиление интереса к этой модели, произошедшее в последнее десятилетие [47, 48].

Обычно миотубы выращивают и стимулируют в чашках Петри с помощью угольных или платиновых электродов, используя биполярные электрические импульсы. Известные протоколы стимуляции [48, 49] можно условно разделить на те, которые моделируют однократную физическую нагрузку (кратковременная стимуляция в течение 5–120 мин) и регулярные тренировки (длительная стимуляция от нескольких часов до двух суток). Клеточная модель электростимуляции миотуб из ткани человека дает несколько важных преимуществ в сравнении с использованием биопсийного материала в экспериментах *in vivo*. Она позволяет:

1. минимизировать влияние циркадных осцилляций;
2. использовать клетки человека, а не иммортализованные линии клеток лабораторных животных, такие как C2C12 или L6;
3. исследовать молекулярные ответы в мышечных клетках, а не в смеси различных клеток;
4. точно дозировать величину сократительной активности;
5. применять широкий набор экспериментальных воздействий (включая активацию или ингибирование экспрессии генов);
6. обеспечивать равномерную и одновременную доставку стимуляторов/ингибиторов.

Длительность стимуляции миотуб варьирует от нескольких минут до нескольких суток, а частота стимуляции от 1 до 100 Гц, что сопоставимо с частотой импульсации мотонейронов *in vivo*. Такая *in vitro* модель мышечной активности хорошо воспроизводит физиологические и молекулярные ответы, регистрируемые после однократной или регулярных аэробных физических нагрузок в скелетной мышце человека [47, 48]. Например, электростимуляция прикрепленных к подложке миотуб вызывает видимые ритмичные сокращения, сопровождающиеся отчетливыми кальциевыми волнами [50–53], приводит к увеличению потребления глюкозы и жирных кислот [54, 55] и снижению

запасов мышечного гликогена. Однократная стимуляция миотуб вызывает сходные с *in vivo* изменения внутриклеточной сигнализации: активацию АМРК и р38 MAP-киназы, увеличение уровня фосфорилирования транскрипционных факторов CREB1 и ATF1, а также усиление секреции миокинов (интерлейкинов, хемокинов семейств CXC, CC и др.) [51, 55–61]. Важно подчеркнуть, что любая стимуляция усиливает экспрессию ключевых генов-регуляторов углеводно-жирового обмена, ангиогенеза и митохондриального биогенеза (*PPARGC1A*, *GABPA*, *ESRRA*, *NR4A3*, *TFAM* и *PDK4*), повышает содержание митохондриальных белков, максимальную скорость дыхания митохондрий и инсулинозависимое потребление глюкозы [54, 55, 59, 62–65]. На основе этих данных можно сделать вывод, что описываемая клеточная модель представляется адекватной для моделирования процессов, происходящих в мышце как при однократных, так и при регулярных аэробных нагрузках.

В большинстве исследований с электростимуляцией миотуб использовались стандартные иммортализованные мышечные линии клеток мышцы C2C12 или крысы L6, а также первичные клетки, полученные из мышц грызунов. В последние годы резко увеличилось число исследований с использованием первичных клеток, полученных из скелетной мышцы человека. Сравнение миотуб иммортализованных миобластов грызунов и первичных миобластов человека выявило множество различий как на уровне базальной экспрессии генов (в частности, кодирующих сократительные белки), так и функциональных возможностей клеток (инсулинозависимое потребление глюкозы и синтез гликогена, максимальная скорость дыхания митохондрий), а также реакций клеток на электростимуляцию (изменение профиля экспрессии генов, потребления глюкозы) [66]. В другом исследовании было показано, что миотубы, полученные из сателлитных клеток человека, демонстрируют менее выраженный сократительный ответ на электростимуляцию по сравнению с миотубами из иммортализованных клеток грызунов. Экспрессия мРНК и различных миокинов в ответ на электростимуляцию в клетках человека также оказалась значительно ниже по сравнению с клетками линии C2C12 [58]. Указанные данные подтверждают, что результаты, полученные на иммортализованных клетках грызунов, следует с осторожностью экстраполировать на человека, подчеркивая важность проведения экспериментов непосредственно на клетках человека.

В ряде работ было продемонстрировано, что миотубы, выращенные из мышц разных доно-

ров, частично сохраняют нативные свойства биопсийной мышечной ткани и по-разному отвечают на электростимуляцию. Учитывая эту информацию, описываемая модель *in vitro* может быть использована для изучения механизмов развития различных патологий, таких как ожирение, диабет II типа и др. Так, миотубы, выращенные из миобластов мышц пациентов, страдающих синдромом хронической усталости, демонстрируют повышенную экспрессию MyoG и сниженную секрецию миокина IL-6 по сравнению с клетками, выращенными из мышц здоровых людей того же возраста. После 16 ч стимуляции в этих клетках, в отличие от контрольных, не увеличивался уровень фосфорилирования АМРК, потребления глюкозы и секреции IL-6 [56]. Сходная ситуация наблюдалась и в миотубах, полученных от пациентов с ожирением: стимуляция повышала чувствительность к инсулину только в инсулинорезистентных клетках, при этом приводила к увеличению скорости окисления жиров, повышению содержания митохондрий и экспрессии мРНК IL-6 только в контроле [67]. Активация АМРК в ответ на электростимуляцию (24 ч) была также снижена в миотубах, полученных из мышц людей с ожирением, по сравнению с миотубами, полученными от доноров с нормальной массой тела. Электростимуляция увеличила уровень фосфорилирования белков инсулинового каскада и транслокацию инсулинозависимого транспортера глюкозы, GLUT4, при стимуляции инсулином, однако эти изменения были менее выражены в миотубах от пациентов с ожирением, чем из контрольной группы [68]. Помимо этого, миотубы, полученные из мышечных биопсий тренированных людей, демонстрируют большую скорость окисления жиров и глюкозы по сравнению с миотубами из биопсий людей, ведущих обычный образ жизни [69]. Эти и другие работы с использованием клеточных моделей показывают, что ожирение, возраст и уровень двигательной активности доноров влияют на молекулярные и функциональные характеристики миотуб, причём отличия остаются заметными даже после культивирования и дифференцировки из первичных миобластов [70].

Тот факт, что миотубы, полученные от доноров с разным возрастом, двигательной активностью, окислительным и метаболическим статусом мышц, воспроизводят характерные функциональные и фенотипические различия даёт основания полагать, что этот феномен обусловлен эпигенетическими изменениями, произошедшими в СК до их выделения из тканевых биопсий. В единичных исследованиях описаны изменения паттерна метилирования ДНК миотуб,

происходящие при изменении уровня двигательной активности, ожирении и старении доноров [71–73]. Если особенности фенотипа миотуб обусловлены эпигенетическими характеристиками клеток донора, то возникает вопрос, как долго могут сохраняться эти изменения (например, паттерн метилирования) при культивировании клеток. По нашему мнению, изучение эпигенетических изменений, происходящих при культивировании клеток от разных доноров, может помочь в понимании механизмов, лежащих в основе этого феномена.

ПОТЕНЦИАЛЬНЫЕ ПРИЧИНЫ НЕСООТВЕТСТВИЙ МОДЕЛИ С РЕЗУЛЬТАТАМИ *in vivo* И ПЕРСПЕКТИВЫ ЕЕ РАЗВИТИЯ

Многokrратно показано, что в базальном состоянии дифференцированные миотубы и скелетные мышцы значительно различаются по ряду характеристик. Например, в миотубах преимущественно экспрессируются тяжёлые цепи миозина, характерные для быстросокращающихся волокон II типа, а экспрессия GLUT4, наоборот, снижена [70]. На сегодняшний день проведены десятки исследований, посвящённых эффектам кратковременной и длительной электростимуляции миотуб. Анализ их результатов показал, что кратковременная электростимуляция не полностью воспроизводит ключевые молекулярные ответы, наблюдаемые в скелетной мышце после однократной физической нагрузки [47]. Например, электростимуляция не всегда инициирует активацию p38 MAP-киназы, увеличение экспрессии транспортера GLUT4 и его транспортировку на клеточную мембрану, ускорение окисления жиров. Во многих работах молекулярные ответы, возникающие в скелетной мышце после однократной физической нагрузки, были зарегистрированы только после длительной электростимуляции миотуб. Например, 90-мин электростимуляция не активировала экспрессию гена *PPARGC1A*, ключевого регулятора углеводно-жирового обмена, ангиогенеза и биогенеза митохондрий; увеличение экспрессии этого гена происходило только после нескольких серий стимуляции в течение нескольких дней [63]. Ниже будут проанализированы потенциальные причины несоответствия модели электростимуляции миотуб результатам, полученным *in vivo*, а также обсуждены перспективы оптимизации этой модели.

Паттерн электростимуляции. В разных исследованиях используются протоколы электростимуляции, значительно различающиеся по дли-

тельности (от нескольких минут до нескольких суток), частоте (от 1 до 100 Гц), типу стимуляции (по силе тока или напряжению), а также паттерну стимуляции [48]. Отчасти это связано с отсутствием четкой методологии и терминологии в этой области и с желанием смоделировать *in vitro* различные эффекты сократительной активности *in vivo* [47]. Известно, что при низкоинтенсивной продолжительной (аэробной) физической нагрузке (десятки минут) в работу вовлечены медленно сокращающиеся мышечные волокна I типа. Они обладают высокой окислительной способностью и активируются мотонейронами с частотой импульсации 5–20 Гц. Энергообеспечение такой работы идет в основном за счет окислительного фосфорилирования с использованием жирных кислот в качестве субстрата. Регулярные упражнения такого типа ведут к увеличению окислительных возможностей мышц, повышению плотности митохондрий и аэробной работоспособности. Напротив, при коротких (от нескольких до десятков секунд) околорекрутационных физических нагрузках рекрутируются волокна II типа, которые активируются мотонейронами с частотой 50–100 Гц и характеризуются быстрой скоростью сокращения. Синтез АТФ при такой работе идет преимущественно за счет аденилаткиназной и креатинкиназной системы и анаэробного гликолиза. Такие регулярные нагрузки ведут к увеличению размеров мышечных волокон тренируемых мышц и их максимальной силы. При этом значимых изменений в окислительных возможностях (и выносливости) мышц не наблюдается. Различия в адаптационных ответах связаны с тем, что физические нагрузки вызывают специфические для них метаболические сдвиги в работающей мышце и крови, связанные с активацией различных сигнальных каскадов и изменением паттернов экспрессии генов и белков [74]. Очевидно, что для адекватного воспроизведения эффектов *in vitro* необходимо хотя бы приблизительно смоделировать режимы сократительной активности мышечных волокон, наблюдаемые *in vivo*.

Вместе с тем используемые протоколы электростимуляции миотуб кардинально отличаются от паттернов сократительной активности, наблюдаемых *in vivo* [48]. Так, во время однократной аэробной локомоторной нагрузки (например, велоэргометрия) работающие скелетные мышцы сокращаются с частотой ~ 1 Гц на протяжении нескольких десятков минут. При этом длительность каждого периода сокращения мышц составляет 400–500 мс. Тем не менее в наиболее популярных протоколах электростимуляции используется совершенно другой

паттерн: стимуляция идет не периодами (пачками), а одиночными импульсами, с частотой 1–100 Гц, что скорее напоминает паттерн сокращения кардиомиоцитов.

Электростимуляция мышечных волокон с частотой 20 Гц, в отличие от 100 Гц, активирует Ca^{2+} -зависимый сигнальный каскад кальциневрина и транскрипционных факторов NFATC и инициирует транслокацию последних в ядро [75]. NFATC участвуют в регуляции экспрессии специфических регуляторов миогенеза, таких как MyoG, Myf6 и MyoD1, а также играют ключевую роль в регуляции экспрессии тяжелых цепей миозина в мышечных волокнах – этот показатель тесно связан с метаболическими характеристиками клетки [76]. Sciancalepore et al. в качестве образца паттерна стимуляции миотуб использовали электромиограмму, записанную при ритмических мышечных сокращениях *in vivo*. Такой асинхронный режим стимуляции приводил к более выраженным внутриклеточным осцилляциям Ca^{2+} и увеличению количества сокращающихся миотуб по сравнению со стимуляцией с фиксированной частотой 1 или 45 Гц [52]. Однако при таком подходе сложно стандартизовать частоту сокращения миотуб и воспроизводить эксперимент в других лабораториях.

Для моделирования эффектов однократных аэробных упражнений перспективным, на наш взгляд, является протокол, где стимуляция осуществляется каждую секунду пачками по 400–500 мс. При этом используется частота импульсов, типичная для мышечных волокон I типа – до 20 Гц (рис. 3); по сравнению с протоколом стимуляции с частотой 1 Гц суммарное время электростимуляционной активности миотуб (например, за один час) возрастает в 8–10 раз. Можно предположить, что данный подход вызовет дополнительную активацию некоторых сигнальных каскадов. Подобный паттерн электростимуляции уже применялся ранее [64], однако его эффективность не сопоставлялась со стандартными протоколами.

Продолжительность кратковременной электростимуляции. Длительность кратковременной электростимуляции миотуб варьирует от нескольких минут до нескольких часов. Важно отметить, что сократительная активность мышц продолжительностью более 1 ч значительно истощает внутримышечные запасы гликогена и триглицеридов *in vivo*. Это может влиять на энергетическое обеспечение работы и приводить к активации специфических сигнальных молекул, например, AMPK [77]. Использовать протоколы кратковременной электростимуляции продолжительностью более часа следует с осторожностью, контролируя истощение этих

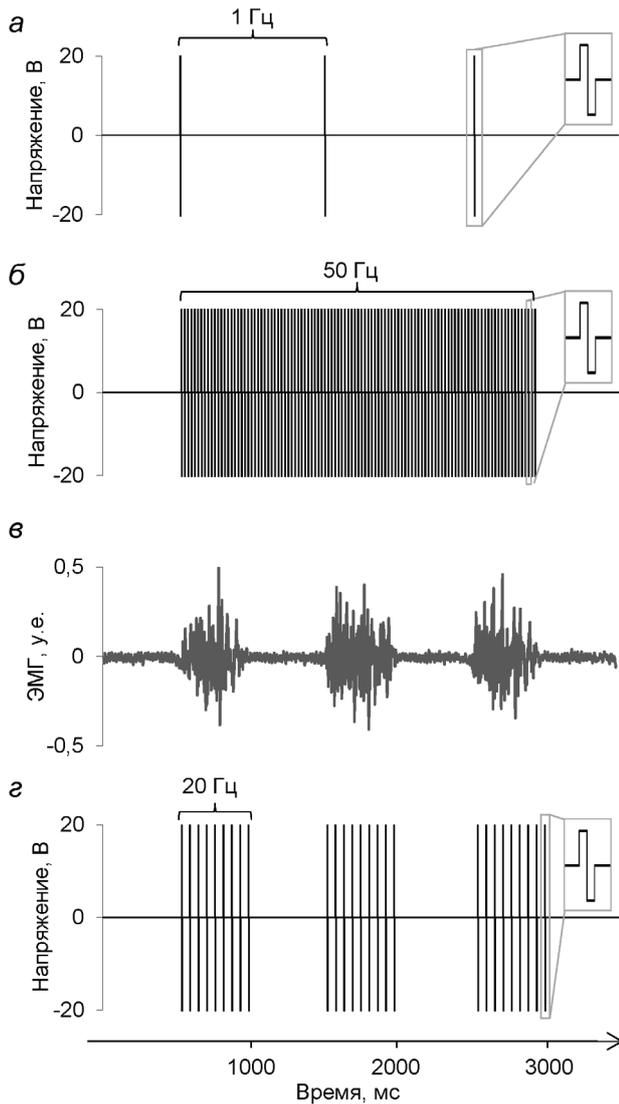


Рис. 3. Паттерны электростимуляции миотуб и электромиографическая (ЭМГ) активность скелетной мышцы при локомоциях. *а, б* – Электростимуляция с фиксированной частотой 1 и 50 Гц (наиболее популярные паттерны стимуляции); *в* – ЭМГ активность наружной головки четырехглавой мышцы бедра человека при работе на велоэргометре с частотой вращения педалей 1 Гц; *г* – паттерн электростимуляции миотуб, моделирующий сократительную активность волокон скелетной мышцы со следующими параметрами: частота импульсов внутри пачки – 20 Гц (типичная частота разряда медленных мотонейронов), продолжительность периода стимуляции – 500 мс, частота периодов сокращения – 1 Гц

внутриклеточных субстратов и снижение содержания глюкозы в среде.

Динамика молекулярных ответов после стимуляции. Активация сигнальных белков, индуцируемых сократительной активностью *in vivo* (таких как CaMK, AMPK, p38 MAPK), наблюдается сразу после окончания нагрузки [74, 78]. Наиболее выраженные изменения экспрессии генов

происходят в течение нескольких часов (до 8 ч) «отдыха», причем большая часть этих генов имеет определенный временной паттерн экспрессии [10, 23, 79]. В подавляющем большинстве исследований молекулярные ответы миотуб регистрировали в один момент времени (как правило, после окончания электростимуляции), и лишь в некоторых работах ответы регистрировали в нескольких временных точках [63–65, 80, 81]. Определение динамики развития молекулярных ответов на кратковременную однократную стимуляцию миотуб важно для сопоставления их специфичности *in vivo* и *in vitro*.

Использование методов широкого охвата, таких как фосфопротеомный и транскриптомный анализ, представляется наиболее перспективным решением этой задачи, поскольку дает возможность одновременно оценить реакции множества сигнальных молекул и генов и сопоставить направленность этих ответов с полученными *in vivo*. Так, представлены примеры исследований динамики фосфопротеома в различных клеточных культурах при стимуляции инсулином [82–86], а также в мышечных клетках сразу после фармакологических воздействий, имитирующих отдельные эффекты сократительной активности [87, 88]. Помимо этого, в нескольких работах изучались изменения транскриптомного профиля сразу после электростимуляции миотуб [51, 89]. Насколько нам известно, только в работе Hoshino et al. был проведен анализ динамики изменений транскриптома, метаболома и уровня фосфорилирования некоторых сигнальных молекул в миотубах линии C2C12 во время и после сократительной активности [90]. В работе проведено сопоставление эффектов непрерывной стимуляции (в течение 1 ч) с частотой 2 и 20 Гц, которое продемонстрировало, что многие молекулярные ответы по направленности совпадают с тем, что должно было происходить в скелетной мышце после сократительной активности. Однако прямого сопоставления с данными *in vivo* не проводилось.

Протоколы для исследования эффектов хронической сократительной активности. Периоды повышенной активности скелетной мышцы *in vivo* сочетаются с достаточно продолжительными (несколько часов, сутки) периодами низкой активности или покоя. После однократной аэробной нагрузки в мышце происходит транзиторная активация различных сигнальных каскадов [74, 78], изменяется (преимущественно увеличивается) экспрессия нескольких сотен генов [10, 23, 79], происходит транслокация транспортеров глюкозы (GLUT4) и жиров (CD36) [2, 14], активируется убиквитин-протеасомная система деградации поврежденных белков [91, 92] и уси-

ливаются синтез митохондриальных белков [93–95]. Очевидно, что эти процессы могут зависеть от соотношения АТР, АДФ и АМР в мышечной клетке и модулироваться наличием/отсутствием последующих периодов сократительной активности. Как упоминалось ранее, для моделирования эффектов сократительной активности используют, как правило, протоколы длительной и непрерывной (от нескольких часов до суток) электростимуляции миотуб [48], которые скорее воспроизводят сократительную активность сердца, чем скелетной мышцы. С одной стороны, использование протоколов с непрерывной стимуляцией укорачивает суммарное время воздействия, необходимое для изменения фенотипа (увеличения содержания специфических транспортеров, регуляторных белков, активности окислительных ферментов и митохондриальной плотности). С другой стороны, отсутствие периодов восстановления может оказывать значительное воздействие на скорость и направленность молекулярных ответов и изменений фенотипа. Следует отметить, что эффекты длительной электростимуляции миотуб изучены гораздо меньше, чем эффекты кратковременной стимуляции, а работы по оптимизации протоколов длительной стимуляции отсутствуют.

Степень дифференцировки миотуб. В разных исследованиях используют различные протоколы культивирования и дифференцировки клеток. До сих пор нет четких и общепризнанных критериев, характеризующих степень созревания миотуб на поздних этапах дифференцировки, что является одной из наиболее острых и нерешенных проблем при сопоставлении результатов исследований. Очевидно, что степень созревания миотуб влияет на функциональные возможности клеток и молекулярные ответы на экспериментальные воздействия [70]. Миотубы, полученные из СК человека, демонстрируют менее выраженный сократительный ответ на электростимуляцию по сравнению с миотубами из иммортализованных клеток грызунов [58], что может быть связано с недостаточной степенью дифференцировки миотуб, полученных из биопсии мышц человека.

Иннервация играет важную роль в созревании мышечных волокон [96], а частота импульсации мотонейрона является ключевым фактором, определяющим тип мышечного волокна [97]. Волокна классифицируются по экспрессии тяжелых цепей миозина, специфических для быстро и медленно сокращающихся волокон. В некоторых работах было отмечено, что при первой электростимуляции сократительный ответ у «дифференцированных» миотуб может отсут-

ствовать; при этом после электростимуляции уже через несколько часов он появляется или значительно усиливается [53, 55, 98, 99], причём наибольший сократительный ответ достигается при частоте стимуляции 1 Гц [53, 55]. Через несколько часов восстановления после 8-часовой электростимуляции (1 Гц) происходит увеличение размеров миотуб и индекса их слияния, снижается экспрессия миостатина и активируется комплекс mTORC1 (оба – анаболические маркеры) [80]. Сходные данные были получены при длительной стимуляции (~1 неделя, 1 или 10 Гц) пучка миотуб (искусственной мышцы) [100, 101]. В совокупности эти данные позволяют рассматривать электростимуляцию как один из подходов к ускорению созревания клеток, который может быть использован на финальных этапах дифференцировки миоцитов в миотубы до проведения основного эксперимента (т.е. и в экспериментальных культурах, и в контроле).

Скорость дифференцировки миобластов зависит от множества факторов, таких как состав среды, условия инкубации, тип используемого субстрата и т.д. Кроме того, этот показатель сильно зависит от наличия упорядоченной микроструктуры на субстрате. Для воспроизведения структуры, характерной для волокон скелетных мышц, было предложено использовать желатиновый гидрогель с параллельными бороздками шириной около 10 мкм [102–105]. Для этого методом «мягкой литографии» изготавливается мастер-форма (рис. 4, а), которую используют для создания штампов из полидиметилсилоксана (ПДМС) [106]. С помощью штампов изготавливают оттки на 10%-ном желатиновом гидрогеле, который затем инкубируют с транслютаминазой для повышения его модуля упругости до значений, сопоставимых с мышечной тканью (10–50 кПа) [107, 108]. Дифференцировка миобластов на таком субстрате (рис. 4, в) оказывает положительное влияние на клеточный цикл, пролиферацию и выживаемость миобластов, увеличивает количество формирующихся миотуб и их размер. При этом обеспечивается более плотная и упорядоченная (параллельная) организация миотуб, что позитивно влияет на их морфологию, степень созревания саркомерного аппарата, экспрессию саркомерных белков и их мРНК [89, 103, 105, 108].

Миобласты, культивируемые на субстратах без микроструктуры, могут отслаиваться во время дифференцировки. Интересно, что использование желатинового гидрогеля с микроструктурой позволяет снизить этот эффект и поддерживать культуру миотуб в течение длительного периода (до 3 недель) [108]. Эти данные свидетельствуют в пользу того, что использование

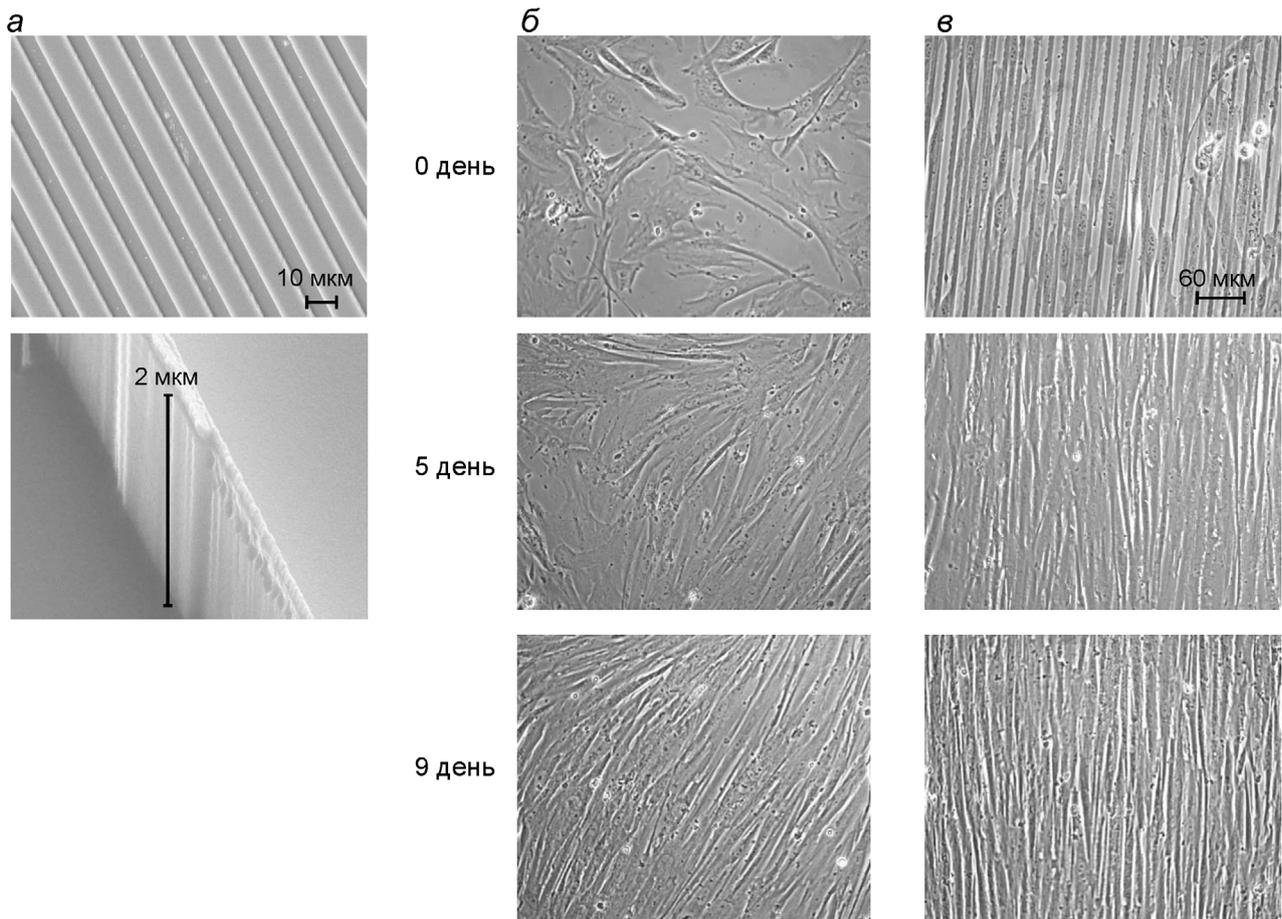


Рис. 4. Пример использования субстрата с микроструктурой для дифференцировки миотуб. *а* – Микрофотография мастер-формы, используемой для создания штампов из ПДМС: сверху представлен общий вид, внизу показана глубина бороздки; *б* и *в* – миотубы человека, дифференцирующиеся на гладком желатиновом субстрате и желатиновом гидрогеле с микроструктурой соответственно на 0-й, 5-й и 9-й день дифференцировки. При использовании микроструктуры, в отличие от гладкого субстрата, все миотубы располагаются упорядоченно вдоль бороздок (Вепхвадзе, Попов, неопубликованные данные). Масштаб – 60 мкм

микроструктур может увеличить выживаемость миотуб в экспериментах с кратковременной и в особенности с длительной электростимуляцией. Любопытно отметить, что для увеличения степени дифференцировки миотуб можно использовать не только субстрат с микроструктурой, но и монослой фибробластов [109].

Сокультивирование с другими клетками. Мышечные клетки секретируют миокины, оказывающие эндокринное действие на различные ткани. Миотубы могут быть сокультивированы с клетками других тканей, например, с фибробластами [109], раковыми клетками кишечника [110, 111], адипоцитами [112–114]. Эти исследования убедительно продемонстрировали, что такой подход открывает широкие возможности не только для исследования влияния миокинов, но также и действия цитокинов, секретируемых другими клетками, на миотубы. Учитывая выраженное распространение ожирения и диабета

II типа, проблема взаиморегуляции метаболизма мышечных и жировых клеток привлекает особое внимание. Гипертрофия адипоцитов и жировой ткани вызывает латентное воспаление и приводит к усилению секреции провоспалительных адипокинов, негативно влияя на функционирование различных тканей, в том числе и скелетных мышц [8, 115, 116]. Поскольку секреция миокинов значительно возрастает после сократительной активности, то совместное культивирование адипоцитов с миотубами представляется перспективной моделью для исследования механизмов межтканевой регуляции метаболизма.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Электростимуляция миотуб представляется адекватным методом для моделирования *in vitro*

основных процессов, происходящих в скелетной мышце, как при однократном аэробном упражнении, так и при регулярных аэробных нагрузках. Важно отметить, что миотубы, полученные из СК людей с разным уровнем двигательной активности, разного возраста, а также страдающих ожирением и диабетом II типа, воспроизводят наблюдаемые в условиях *in vivo* различия в некоторых функциональных и фенотипических характеристиках и по-разному отвечают на электростимуляцию. Данный феномен открывает перспективы для изучения молекулярных и биохимических процессов, ассоциированных с различными нарушениями работы скелетной мускулатуры, а также эпигенетических механизмов, ответственных за сохранение специфических характеристик в культуре мышечных клеток от разных доноров.

Один из основных текущих недостатков модели – это неполное соответствие между молекулярными ответами на кратковременную электростимуляцию миотуб и теми, которые характерны для скелетной мышцы после однократной физической нагрузки. Это может быть связано с недостаточной степенью дифференцировки миотуб, особенно полученных из первичных клеток человека. Перспективным подходом для ускорения и стандартизации дифференцировки может быть использование субстратов с упорядоченной микроструктурой в сочетании с электростимуляцией на финальных этапах дифференцировки. Ускорение созревания и повышение выживаемости миотуб особенно важно для экспериментов с длительной электростимуляцией. Наконец, оптимизация паттернов

электростимуляции миотуб также необходима для приведения их в соответствие с паттернами активации мышечных волокон, регистрируемыми *in vivo*.

Для дальнейшей оптимизации и валидации модели необходимо сопоставить динамику молекулярных ответов на сократительную активность в миотубах и в мышце, в том числе с помощью методов широкого охвата, таких как фосфопротеомный, протеомный и транскриптомный анализы. Эффекты длительной электростимуляции пока изучены значительно хуже по сравнению с короткими протоколами; они требуют дополнительной оптимизации. Длинные протоколы электростимуляции моделируют эффекты регулярных физических нагрузок *in vivo*, которые широко применяются для профилактики метаболических нарушений и поддержания работоспособности мышц и организма. Наконец, клеточная модель миотуб позволяет решать задачи, связанные с исследованием механизмов межклеточной регуляции метаболизма при совместном культивировании миотуб с клетками других тканей, в частности с адипоцитами.

Финансирование. Исследование выполнено при финансовой поддержке РФФИ в рамках научного проекта № 20-015-00415.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов в финансовой или какой-либо иной сфере.

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

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- DeFronzo, R. A., Gunnarsson, R., Bjorkman, O., Olsson, M., and Wahren, J. (1985) Effects of insulin on peripheral and splanchnic glucose metabolism in noninsulin-dependent (type II) diabetes mellitus, *J. Clin. Invest.*, **76**, 149-155.
- Sylov, L., Kleinert, M., Richter, E. A., and Jensen, T. E. (2017) Exercise-stimulated glucose uptake – regulation and implications for glycaemic control, *Nat. Rev. Endocrinol.*, **13**, 133-148.
- Frayn, K. N. (2003) The glucose-fatty acid cycle: a physiological perspective, *Biochem. Soc. Trans.*, **31**, 1115-1119.
- Agudelo, L. Z., Femenia, T., Orhan, F., Porsmyr-Palmertz, M., Gojny, M., et al. (2014) Skeletal muscle PGC-1 α modulates kynurenine metabolism and mediates resilience to stress-induced depression, *Cell*, **159**, 33-45.
- Pedersen, B. K., and Febbraio, M. A. (2012) Muscles, exercise and obesity: skeletal muscle as a secretory organ, *Nat. Rev. Endocrinol.*, **8**, 457-465.
- Demontis, F., Piccirillo, R., Goldberg, A. L., and Perrimon, N. (2013) The influence of skeletal muscle on systemic aging and lifespan, *Aging Cell*, **12**, 943-949.
- Lanza, I. R., Short, D. K., Short, K. R., Raghavakaimal, S., Basu, R., et al. (2008) Endurance exercise as a countermeasure for aging, *Diabetes*, **57**, 2933-2942.
- Vorotnikov, A. V., Stafeev, I. S., Menshikov, M. Y., Shestakova, M. V., and Parfyonova, Y. V. (2019) Latent inflammation and defect in adipocyte renewal as a mechanism of obesity-associated insulin resistance, *Biochemistry (Moscow)*, **84**, 1329-1345.
- Pillon, N. J., Gabriel, B. M., Dollet, L., Smith, J. A. B., Sardon, P. L., et al. (2020) Transcriptomic profiling of skeletal muscle adaptations to exercise and inactivity, *Nat. Commun.*, **11**, 470.
- Makhnovskii, P. A., Bokov, R. O., Kolpakov, F. A., and Popov, D. V. (2021) Transcriptomic signatures and upstream regulation in human skeletal muscle adapted to disuse and aerobic exercise, *Int. J. Mol. Sci.*, **22**, 1208, doi: 10.3390/ijms22031208.
- Schnyder, S., and Handschin, C. (2015) Skeletal muscle as an endocrine organ: PGC-1 α , myokines and exercise, *Bone*, **80**, 115-125.
- Whitham, M., Parker, B. L., Friedrichsen, M., Hingst, J. R., Hjorth, M., et al. (2018) Extracellular vesicles pro-

- vide a means for tissue crosstalk during exercise, *Cell Metab.*, **27**, 237-251.
13. Lee, D. C., Brellenthin, A. G., Thompson, P. D., Sui, X., Lee, I. M., and Lavie, C. J. (2017) Running as a key lifestyle medicine for longevity, *Prog. Cardiovasc. Dis.*, **60**, 45-55.
 14. Yoshida, Y., Jain, S. S., McFarlan, J. T., Snook, L. A., Chabowski, A., and Bonen, A. (2013) Exercise- and training-induced upregulation of skeletal muscle fatty acid oxidation are not solely dependent on mitochondrial machinery and biogenesis, *J. Physiol.*, **591**, 4415-4426.
 15. Chambers, T. L., Burnett, T. R., Raue, U., Lee, G. A., Finch, W. H., et al. (2020) Skeletal muscle size, function, and adiposity with lifelong aerobic exercise, *J. Appl. Physiol.* (1985), **128**, 368-378.
 16. Gifford, J. R., Weavil, J. C., and Nelson, A. D. (2016) Symmorphosis in patients with chronic heart failure? *J. Appl. Physiol.* (1985), **121**, 1039.
 17. Kovanen, V., and Suominen, H. (1987) Effects of age and life-time physical training on fibre composition of slow and fast skeletal muscle in rats, *Pflugers Arch.*, **408**, 543-551.
 18. Schantz, P. G., and Dhoot, G. K. (1987) Coexistence of slow and fast isoforms of contractile and regulatory proteins in human skeletal muscle fibres induced by endurance training, *Acta Physiol. Scand.*, **131**, 147-154.
 19. Schiaffino, S., and Reggiani, C. (2011) Fiber types in mammalian skeletal muscles, *Physiol. Rev.*, **91**, 1447-1531.
 20. McCarthy, J. J., Andrews, J. L., McDearmon, E. L., Campbell, K. S., Barber, B. K., et al. (2007) Identification of the circadian transcriptome in adult mouse skeletal muscle, *Physiol. Genomics*, **31**, 86-95.
 21. Miller, B. H., McDearmon, E. L., Panda, S., Hayes, K. R., Zhang, J., et al. (2007) Circadian and CLOCK-controlled regulation of the mouse transcriptome and cell proliferation, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **104**, 3342-3347.
 22. Perrin, L., Loizides-Mangold, U., Chanon, S., Gobet, C., Hulo, N., et al. (2018) Transcriptomic analyses reveal rhythmic and CLOCK-driven pathways in human skeletal muscle, *Elife*, **7**, e34114, doi: 10.7554/eLife.34114.
 23. Popov, D. V., Makhnovskii, P. A., Shagimardanova, E. I., Gazizova, G. R., Lysenko, E. A., et al. (2019) Contractile activity-specific transcriptome response to acute endurance exercise and training in human skeletal muscle, *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.*, **316**, e605-e614.
 24. Bentzinger, C. F., Wang, Y. X., and Rudnicki, M. A. (2012) Building muscle: molecular regulation of myogenesis, *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.*, **4**, a008342, doi: 10.1101/cshperspect.a008342.
 25. Chal, J., and Pourquie, O. (2017) Making muscle: skeletal myogenesis *in vivo* and *in vitro*, *Development*, **144**, 2104-2122.
 26. Tajbakhsh, S. (2009) Skeletal muscle stem cells in developmental versus regenerative myogenesis, *J. Intern. Med.*, **266**, 372-389.
 27. Zammit, P. S. (2017) Function of the myogenic regulatory factors Myf5, MyoD, Myogenin and MRF4 in skeletal muscle, satellite cells and regenerative myogenesis, *Semin. Cell Dev. Biol.*, **72**, 19-32.
 28. Asfour, H. A., Allouh, M. Z., and Said, R. S. (2018) Myogenic regulatory factors: The orchestrators of myogenesis after 30 years of discovery, *Exp. Biol. Med. (Maywood.)*, **243**, 118-128.
 29. Buckingham, M., and Relaix, F. (2015) PAX3 and PAX7 as upstream regulators of myogenesis, *Semin. Cell Dev. Biol.*, **44**, 115-125.
 30. Comai, G., and Tajbakhsh, S. (2014) Molecular and cellular regulation of skeletal myogenesis, *Curr. Top. Dev. Biol.*, **110**, 1-73.
 31. Olguin, H. C., and Pisconti, A. (2012) Marking the tempo for myogenesis: Pax7 and the regulation of muscle stem cell fate decisions, *J. Cell. Mol. Med.*, **16**, 1013-1025.
 32. Hutcheson, D. A., and Kardon, G. (2009) Genetic manipulations reveal dynamic cell and gene functions: Cre-ating a new view of myogenesis, *Cell Cycle*, **8**, 3675-3678.
 33. Chaillou, T., and Lanner, J. T. (2016) Regulation of myogenesis and skeletal muscle regeneration: effects of oxygen levels on satellite cell activity, *FASEB J.*, **30**, 3929-3941.
 34. Wagatsuma, A., and Sakuma, K. (2013) Mitochondria as a potential regulator of myogenesis, *Sci. World J.*, **2013**, 593267.
 35. Costamagna, D., Costelli, P., Sampaolesi, M., and Penna, F. (2015) Role of inflammation in muscle homeostasis and myogenesis, *Mediators Inflamm.*, **2015**, 805172.
 36. Ge, Y., and Chen, J. (2012) Mammalian target of rapamycin (mTOR) signaling network in skeletal myogenesis, *J. Biol. Chem.*, **287**, 43928-43935.
 37. Furuichi, Y., Kawabata, Y., Aoki, M., Mita, Y., Fujii, N. L., and Manabe, Y. (2021) Excess glucose impedes the proliferation of skeletal muscle satellite cells under adherent culture conditions, *Front. Cell. Dev. Biol.*, **9**, 640399.
 38. Grabiec, K., Gajewska, M., Milewska, M., Blaszczyk, M., and Grzelkowska-Kowalczyk, K. (2014) The influence of high glucose and high insulin on mechanisms controlling cell cycle progression and arrest in mouse C2C12 myoblasts: the comparison with IGF-I effect, *J. Endocrinol. Invest.*, **37**, 233-245.
 39. Luo, W., Ai, L., Wang, B. F., and Zhou, Y. (2019) High glucose inhibits myogenesis and induces insulin resistance by down-regulating AKT signaling, *Biomed. Pharmacother.*, **120**, 109498.
 40. Hunt, L. C., Xu, B., Finkelstein, D., Fan, Y., Carroll, P. A., et al. (2015) The glucose-sensing transcription factor MLX promotes myogenesis via myokine signaling, *Genes Dev.*, **29**, 2475-2489.
 41. Fulco, M., Cen, Y., Zhao, P., Hoffman, E. P., McBurney, M. W., Sauve, A. A., and Sartorelli, V. (2008) Glucose restriction inhibits skeletal myoblast differentiation by activating SIRT1 through AMPK-mediated regulation of Nampt, *Dev. Cell*, **14**, 661-673.
 42. Elkalaf, M., Andel, M., and Trnka, J. (2013) Low glucose but not galactose enhances oxidative mitochondrial metabolism in C2C12 myoblasts and myotubes, *PLoS One*, **8**, e70772.
 43. Costford, S. R., Crawford, S. A., Dent, R., McPherson, R., and Harper, M. E. (2009) Increased susceptibility to oxidative damage in post-diabetic human myotubes, *Diabetologia*, **52**, 2405-2415.
 44. Aguer, C., Gambarotta, D., Mailloux, R. J., Moffat, C., Dent, R., et al. (2011) Galactose enhances oxidative metabolism and reveals mitochondrial dysfunction in human primary muscle cells, *PLoS One*, **6**, e28536.
 45. Krauss, R. S., Joseph, G. A., and Goel, A. J. (2017) Keep your friends close: cell-cell contact and skeletal myogenesis, *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.*, **9**, a029298.
 46. Aas, V., Torbla, S., Andersen, M. H., Jensen, J., and Rustan, A. C. (2002) Electrical stimulation improves insulin responses in a human skeletal muscle cell model of hyperglycemia, *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, **967**, 506-515.
 47. Carter, S., and Solomon, T. P. J. (2019) *In vitro* experimental models for examining the skeletal muscle cell biology of exercise: the possibilities, challenges and future developments, *Pflugers Arch.*, **471**, 413-429.
 48. Nikolic, N., Gorgens, S. W., Thoresen, G. H., Aas, V., Eckel, J., and Eckardt, K. (2017) Electrical pulse stimulation of cultured skeletal muscle cells as a model for *in vitro* exercise – possibilities and limitations, *Acta Physiol. (Oxf)*, **220**, 310-331.
 49. Nikolic, N., and Aas, V. (2019) Electrical pulse stimulation of primary human skeletal muscle cells, *Methods Mol. Biol.*, **1889**, 17-24.

50. Valdes, J. A., Gaggero, E., Hidalgo, J., Leal, N., Jaimovich, E., and Carrasco, M. A. (2008) NFAT activation by membrane potential follows a calcium pathway distinct from other activity-related transcription factors in skeletal muscle cells, *Am. J. Physiol. Cell Physiol.*, **294**, C715-C725.
51. Sidorenko, S., Klimanova, E., Milovanova, K., Lopina, O. D., Kapilevich, L. V., et al. (2018) Transcriptomic changes in C2C12 myotubes triggered by electrical stimulation: Role of Ca(2+)-i-mediated and Ca(2+)-i-independent signaling and elevated [Na(+)]i/[K(+)]i ratio, *Cell Calcium*, **76**, 72-86.
52. Sciancalepore, M., Coslovich, T., Lorenzon, P., Ziraldo, G., and Taccola, G. (2015) Extracellular stimulation with human "noisy" electromyographic patterns facilitates myotube activity, *J. Muscle Res. Cell Motil.*, **36**, 349-357.
53. Fujita, H., Nedachi, T., and Kanzaki, M. (2007) Accelerated de novo sarcomere assembly by electric pulse stimulation in C2C12 myotubes, *Exp. Cell Res.*, **313**, 1853-1865.
54. Nikolic, N., Bakke, S. S., Kase, E. T., Rudberg, I., Flo, H., et al. (2012) Electrical pulse stimulation of cultured human skeletal muscle cells as an *in vitro* model of exercise, *PLoS One*, **7**, e33203.
55. Lambernd, S., Taube, A., Schober, A., Platzbecker, B., Gorgens, S. W., et al. (2012) Contractile activity of human skeletal muscle cells prevents insulin resistance by inhibiting pro-inflammatory signalling pathways, *Diabetologia*, **55**, 1128-1139.
56. Brown, A. E., Jones, D. E., Walker, M., and Newton, J. L. (2015) Abnormalities of AMPK activation and glucose uptake in cultured skeletal muscle cells from individuals with chronic fatigue syndrome, *PLoS One*, **10**, e0122982.
57. Li, Z., Yue, Y., Hu, F., Zhang, C., Ma, X., et al. (2018) Electrical pulse stimulation induces GLUT4 translocation in C2C12 myotubes that depends on Rab8A, Rab13, and Rab14, *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.*, **314**, E478-E493.
58. Chen, W., Nyasha, M. R., Koide, M., Tsuchiya, M., Suzuki, N., et al. (2019) *In vitro* exercise model using contractile human and mouse hybrid myotubes, *Sci. Rep.*, **9**, 11914.
59. Son, Y. H., Lee, S. M., Lee, S. H., Yoon, J. H., Kang, J. S., et al. (2019) Comparative molecular analysis of endurance exercise *in vivo* with electrically stimulated *in vitro* myotube contraction, *J. Appl. Physiol.*, **127**, 1742-1753.
60. Hartwig, S., Raschke, S., Knebel, B., Scheler, M., Irmeler, M., et al. (2014) Secretome profiling of primary human skeletal muscle cells, *Biochim. Biophys. Acta*, **1844**, 1011-1017.
61. Raschke, S., Eckardt, K., Bjorklund, H. K., Jensen, J., and Eckel, J. (2013) Identification and validation of novel contraction-regulated myokines released from primary human skeletal muscle cells, *PLoS One*, **8**, e62008.
62. Feng, H., Kang, C., Dickman, J. R., Koenig, R., Awoyinka, I., et al. (2013) Training-induced mitochondrial adaptation: role of peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator-1alpha, nuclear factor-kappaB and beta-blockade, *Exp. Physiol.*, **98**, 784-795.
63. Burch, N., Arnold, A. S., Item, F., Summermatter, S., Brochmann Santana, S. G., et al. (2010) Electric pulse stimulation of cultured murine muscle cells reproduces gene expression changes of trained mouse muscle, *PLoS One*, **5**, e10970.
64. Silveira, L. R., Pilegaard, H., Kusuhara, K., Curi, R., and Hellsten, Y. (2006) The contraction induced increase in gene expression of peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR)-gamma coactivator 1alpha (PGC-1alpha), mitochondrial uncoupling protein 3 (UCP3) and hexokinase II (HKII) in primary rat skeletal muscle cells is dependent on reactive oxygen species, *Biochim. Biophys. Acta*, **1763**, 969-976.
65. Beiter, T., Hudemann, J., Burgstahler, C., Niess, A. M., and Munz, B. (2018) Effects of extracellular orotic acid on acute contraction-induced adaptation patterns in C2C12 cells, *Mol. Cell Biochem.*, **448**, 251-263.
66. Abdelmoez, A. M., Sardon, P. L., Smith, J. A. B., Gabriel, B. M., Savikj, M., et al. (2020) Comparative profiling of skeletal muscle models reveals heterogeneity of transcriptome and metabolism, *Am. J. Physiol. Cell. Physiol.*, **318**, C615-C626.
67. Feng, Y. Z., Nikolic, N., Bakke, S. S., Kase, E. T., Guderud, K., et al. (2015) Myotubes from lean and severely obese subjects with and without type 2 diabetes respond differently to an *in vitro* model of exercise, *Am. J. Physiol. Cell. Physiol.*, **308**, C548-C556.
68. Park, S., Turner, K. D., Zheng, D., Brault, J. J., Zou, K., et al. (2019) Electrical pulse stimulation induces differential responses in insulin action in myotubes from severely obese individuals, *J. Physiol.*, **597**, 449-466.
69. Lund, J., Rustan, A. C., Lovsletten, N. G., Mudry, J. M., Langleite, T. M., et al. (2017) Exercise *in vivo* marks human myotubes *in vitro*: training-induced increase in lipid metabolism, *PLoS One*, **12**, e0175441.
70. Gaster, M. (2019) The diabetic phenotype is preserved in myotubes established from type 2 diabetic subjects: a critical appraisal, *APMIS*, **127**, 3-26.
71. Nilsson, E., and Ling, C. (2017) DNA methylation links genetics, fetal environment, and an unhealthy lifestyle to the development of type 2 diabetes, *Clin. Epigenetics*, **9**, 105.
72. Varemö, L., Henriksen, T. I., Scheele, C., Broholm, C., Pedersen, M., et al. (2017) Type 2 diabetes and obesity induce similar transcriptional reprogramming in human myocytes, *Genome Med.*, **9**, 47.
73. Turner, D. C., Gorski, P. P., Maasar, M. F., Seaborne, R. A., Baumert, P., et al. (2020) DNA methylation across the genome in aged human skeletal muscle tissue and muscle-derived cells: the role of HOX genes and physical activity, *Sci. Rep.*, **10**, 15360.
74. Hawley, J. A., Hargreaves, M., Joyner, M. J., and Zierath, J. R. (2014) Integrative biology of exercise, *Cell*, **159**, 738-749.
75. Tothova, J., Blaauw, B., Pallafacchina, G., Rudolf, R., Argentini, C., et al. (2006) NFATc1 nucleocytoplasmic shuttling is controlled by nerve activity in skeletal muscle, *J. Cell Sci.*, **119**, 1604-1611.
76. Ehlers, M. L., Celona, B., and Black, B. L. (2014) NFATc1 controls skeletal muscle fiber type and is a negative regulator of MyoD activity, *Cell Rep.*, **8**, 1639-1648.
77. Wojtaszewski, J. F., Mourtzakis, M., Hillig, T., Saltin, B., and Pilegaard, H. (2002) Dissociation of AMPK activity and ACCbeta phosphorylation in human muscle during prolonged exercise, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **298**, 309-316.
78. Popov, D. V. (2018) Adaptation of skeletal muscles to contractile activity of varying duration and intensity: the role of PGC1a, *Biochemistry (Moscow)*, **83**, 613-628.
79. Popov, D. V., Makhnovskii, P. A., Kurochkina, N. S., Lysenko, E. A., Vepkhvadze, T. F., and Vinogradova, O. L. (2018) Intensity-dependent gene expression after aerobic exercise in endurance-trained skeletal muscle, *Biol. Sport*, **35**, 277-289.
80. Tarum, J., Folkesson, M., Atherton, P. J., and Kadi, F. (2017) Electrical pulse stimulation: an *in vitro* exercise model for the induction of human skeletal muscle cell hypertrophy. A proof-of-concept study, *Exp. Physiol.*, **102**, 1405-1413.

81. Valero-Breton, M., Warnier, G., Castro-Sepulveda, M., Deldicque, L., and Zbinden-Foncea, H. (2020) Acute and chronic effects of high frequency electric pulse stimulation on the Akt/mTOR pathway in human primary myotubes, *Front. Bioeng. Biotechnol.*, **8**, 565679.
82. Humphrey, S. J., Yang, G., Yang, P., Fazakerley, D. J., Stockli, J., et al. (2013) Dynamic adipocyte phosphoproteome reveals that Akt directly regulates mTORC2, *Cell Metab.*, **17**, 1009-1020.
83. Humphrey, S. J., Azimifar, S. B., and Mann, M. (2015) High-throughput phosphoproteomics reveals *in vivo* insulin signaling dynamics, *Nat. Biotechnol.*, **33**, 990-995.
84. Sacco, F., Humphrey, S. J., Cox, J., Mischnik, M., Schulte, A., et al. (2016) Glucose-regulated and drug-perturbed phosphoproteome reveals molecular mechanisms controlling insulin secretion, *Nat. Commun.*, **7**, 13250.
85. Li, J., Li, Q., Tang, J., Xia, F., Wu, J., and Zeng, R. (2015) Quantitative Phosphoproteomics revealed glucose-stimulated responses of islet associated with insulin secretion, *J. Proteome Res.*, **14**, 4635-4646.
86. Tang, J. S., Li, Q. R., Li, J. M., Wu, J. R., and Zeng, R. (2017) Systematic synergy of glucose and GLP-1 to stimulate insulin secretion revealed by quantitative phosphoproteomics, *Sci. Rep.*, **7**, 1018.
87. Hoffman, N. J., Parker, B. L., Chaudhuri, R., Fisher-Wellman, K. H., Kleinert, M., et al. (2015) Global phosphoproteomic analysis of human skeletal muscle reveals a network of exercise-regulated kinases and AMPK substrates, *Cell Metab.*, **22**, 922-935.
88. Needham, E. J., Humphrey, S. J., Cooke, K. C., Fazakerley, D. J., Duan, X., et al. (2019) Phosphoproteomics of acute cell stressors targeting exercise signaling networks reveal drug interactions regulating protein secretion, *Cell Rep.*, **29**, 1524-1538.
89. Denes, L. T., Riley, L. A., Mijares, J. R., Arboleda, J. D., McKee, K., et al. (2019) Culturing C2C12 myotubes on micromolded gelatin hydrogels accelerates myotube maturation, *Skelet. Muscle*, **9**, 17.
90. Hoshino, D., Kawata, K., Kunida, K., Hatano, A., Yugi, K., et al. (2020) Trans-omic analysis reveals ROS-dependent pentose phosphate pathway activation after high-frequency electrical stimulation in C2C12 myotubes, *iScience*, **23**, 101558.
91. Stefanetti, R. J., Lamon, S., Wallace, M., Vendelbo, M. H., Russell, A. P., and Vissing, K. (2015) Regulation of ubiquitin proteasome pathway molecular markers in response to endurance and resistance exercise and training, *Pflugers Arch.*, **467**, 1523-1537.
92. Pagano, A. F., Py, G., Bernardi, H., Candau, R. B., and Sanchez, A. M. (2014) Autophagy and protein turnover signaling in slow-twitch muscle during exercise, *Med. Sci. Sports Exerc.*, **46**, 1314-1325.
93. Wilkinson, S. B., Phillips, S. M., Atherton, P. J., Patel, R., Yarasheski, K. E., et al. (2008) Differential effects of resistance and endurance exercise in the fed state on signalling molecule phosphorylation and protein synthesis in human muscle, *J. Physiol.*, **586**, 3701-3717.
94. Donges, C. E., Burd, N. A., Duffield, R., Smith, G. C., West, D. W., et al. (2012) Concurrent resistance and aerobic exercise stimulates both myofibrillar and mitochondrial protein synthesis in sedentary middle-aged men, *J. Appl. Physiol.* (1985), **112**, 1992-2001.
95. Di Donato, D. M., West, D. W., Churchward-Venne, T. A., Breen, L., et al. (2014) Influence of aerobic exercise intensity on myofibrillar and mitochondrial protein synthesis in young men during early and late postexercise recovery, *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.*, **306**, E1025-E1032.
96. Midrio, M. (2006) The denervated muscle: facts and hypotheses. A historical review, *Eur. J. Appl. Physiol.*, **98**, 1-21.
97. Salmons, S., and Sreter, F. A. (1976) Significance of impulse activity in the transformation of skeletal muscle type, *Nature*, **263**, 30-34.
98. Ferrari, M. B., Podugu, S., and Eskew, J. D. (2006) Assembling the myofibril: coordinating contractile cable construction with calcium, *Cell Biochem. Biophys.*, **45**, 317-337.
99. Nedachi, T., Fujita, H., and Kanzaki, M. (2008) Contractile C2C12 myotube model for studying exercise-inducible responses in skeletal muscle, *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.*, **295**, E1191-E1204.
100. Khodabukus, A., Madden, L., Prabhu, N. K., Koves, T. R., Jackman, C. P., et al. (2019) Electrical stimulation increases hypertrophy and metabolic flux in tissue-engineered human skeletal muscle, *Biomaterials*, **198**, 259-269.
101. Park, H., Bhalla, R., Saigal, R., Radisic, M., Watson, N., et al. (2008) Effects of electrical stimulation in C2C12 muscle constructs, *J. Tissue Eng. Regen. Med.*, **2**, 279-287.
102. Shimizu, K., Fujita, H., and Nagamori, E. (2009) Alignment of skeletal muscle myoblasts and myotubes using linear micropatterned surfaces ground with abrasives, *Biotechnol. Bioeng.*, **103**, 631-638.
103. Huang, N. F., Lee, R. J., and Li, S. (2010) Engineering of aligned skeletal muscle by micropatterning, *Am. J. Transl. Res.*, **2**, 43-55.
104. Huang, N. F., Thakar, R. G., Wong, M., Kim, D., Lee, R. J., and Li, S. (2004) Tissue engineering of muscle on micropatterned polymer films, *Conf. Proc. IEEE Eng. Med. Biol. Soc.*, **2004**, 4966-4969.
105. Huang, N. F., Patel, S., Thakar, R. G., Wu, J., Hsiao, B. S., et al. (2006) Myotube assembly on nanofibrous and micropatterned polymers, *Nano. Lett.*, **6**, 537-542.
106. Букатин А. С., Мухин И. С., Малышев Е. И., Кухтевич И. В., Евстапов А. А., Дубина М. В. (2016) Особенности формирования микроструктур с высоким аспектным соотношением при изготовлении полимерных микрофлюидных чипов для исследования единичных живых клеток *in vitro*, *Журнал технической физики*, **86**, 125-130.
107. Suh, G. C., Bettadapur, A., Santoso, J. W., and McCain, M. L. (2017) Fabrication of micromolded gelatin hydrogels for long-term culture of aligned skeletal myotubes, *Methods Mol. Biol.*, **1668**, 147-163.
108. Bettadapur, A., Suh, G. C., Geisse, N. A., Wang, E. R., Hua, C., et al. (2016) Prolonged culture of aligned skeletal myotubes on micromolded gelatin hydrogels, *Sci. Rep.*, **6**, 28855.
109. Cooper, S. T., Maxwell, A. L., Kizana, E., Ghoddusi, M., Hardeman, E. C., et al. (2004) C2C12 co-culture on a fibroblast substratum enables sustained survival of contractile, highly differentiated myotubes with peripheral nuclei and adult fast myosin expression, *Cell Motil. Cytoskelet.*, **58**, 200-211.
110. Lautaoja, J. H., Pekkala, S., Pasternack, A., Laitinen, M., Ritvos, O., and Hulmi, J. J. (2020) Differentiation of murine C2C12 myoblasts strongly reduces the effects of myostatin on intracellular signaling, *Biomolecules*, **10**, 695, doi: 10.3390/biom10050695.
111. Pekkala, S., Keskitalo, A., Kettunen, E., Lensu, S., Nykanen, N., et al. (2019) Blocking activin receptor ligands is not sufficient to rescue cancer-associated gut microbiota—a role for gut microbial flagellin in colorectal cancer and cachexia? *Cancers. (Basel)*, **11**, 1799, doi: 10.3390/cancers11111799.
112. Pandurangan, M., Jeong, D., Amna, T., Van, B. H., and Hwang, I. (2012) Co-culture of C2C12 and 3T3-L1 preadipocyte cells alters the gene expression of calpains, caspases and heat shock proteins, *In vitro Cell Dev. Biol. Anim.*, **48**, 577-582.

113. Pandurangan, M., and Hwang, I. (2014) Application of cell co-culture system to study fat and muscle cells, *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **98**, 7359-7364.
114. Takegahara, Y., Yamanouchi, K., Nakamura, K., Nakano, S., and Nishihara, M. (2014) Myotube formation is affected by adipogenic lineage cells in a cell-to-cell contact-independent manner, *Exp. Cell Res.*, **324**, 105-114.
115. Collins, K. H., Herzog, W., MacDonald, G. Z., Reimer, R. A., Rios, J. L., et al. (2018) Obesity, metabolic syndrome, and musculoskeletal disease: common inflammatory pathways suggest a central role for loss of muscle integrity, *Front. Physiol.*, **9**, 112.
116. Stafeev, I., Podkuychenko, N., Michurina, S., Sklyanik, I., Panevina, A., et al. (2019) Low proliferative potential of adipose-derived stromal cells associates with hypertrophy and inflammation in subcutaneous and omental adipose tissue of patients with type 2 diabetes mellitus, *J. Diabetes Complicat.*, **33**, 148-159.

ELECTRICAL STIMULATION OF CULTURED MYOTUBES *in vitro* AS A MODEL OF SKELETAL MUSCLE ACTIVITY: AN UPDATE AND PERSPECTIVES

Review

T. F. Vepkhvadze¹, A. V. Vorotnikov², and D. V. Popov^{1,3*}

¹ Federal State Budgetary Institution of Science State Scientific Center of the Russian Federation Institute of Biomedical Problems of the Russia Academy of Sciences, 123007 Moscow, Russia; E-mail: danil-popov@yandex.ru

² Federal State Budgetary Institution National Medical Research Center of Cardiology of the Ministry of Health of the Russian Federation, 121552 Moscow, Russia

³ Faculty of Fundamental Medicine, Lomonosov Moscow State University, 119991 Moscow, Russia

Skeletal muscle tissue comprises more than a third of the human body mass and makes a critical contribution to the regulation of metabolism in the organism. Chronic inactivity reduces metabolic activity and functional capabilities of muscles, leads to metabolic disorders, the development of common diseases, and reduces the quality and duration of life. Cell models based on progenitor cells isolated from human muscle biopsies and differentiated into mature fibers *in vitro* can be used to solve a wide range of experimental tasks. The review discusses the features of the dynamics and regulation of myogenesis, which are important for the creation of an adequate cell model. The main function of skeletal muscle is contraction; therefore, electrical stimulation seems to be important both for the successful completion of myogenesis and for *in vitro* modeling of the main processes induced in skeletal muscle by acute and regular physical exercise. The review analyzes current drawbacks and possibilities of optimizing this cellular model, as well as the prospects for its development for solving fundamental problems related to the physiology and biochemistry of muscle, and understanding the cellular and molecular mechanisms of metabolic diseases.

Keywords: skeletal muscle, physical exercise, satellite cells, myogenesis, electrical stimulation, metabolism, gene expression

УДК 577.336

ВЛИЯНИЕ ДИНИТРОЗИЛЬНЫХ КОМПЛЕКСОВ ЖЕЛЕЗА НА КОНФОРМАЦИЮ АЛЬБУМИНА

© 2021 Э.С. Аллахвердиев^{1,2*}, Г.В. Максимов^{1,3*}, О.В. Родненков², О.Г. Лунева¹,
Г.В. Цораев¹, А.Д. Иванов³, А.И. Юсипович¹, Т.В. Мартынюк²

¹ Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, биологический факультет,
119234 Москва, Россия; электронная почта: elvin21128@gmail.com; gmaximov@mail.ru

² Национальный медицинский исследовательский центр кардиологии Минздрава России, 121552 Москва, Россия

³ Федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего образования
«Национальный исследовательский технологический университет «МИСиС»», 119049 Москва, Россия

Поступила в редакцию 08.02.2021

После доработки 12.03.2021

Принята к публикации 22.03.2021

Связывание динитрозильного комплекса железа (ДНКЖ) с альбумином изучали с помощью методов флуоресценции с временным разрешением (пикосекундная флуоресценция, ПФ) и электронного парамагнитного резонанса. Установлено, что время жизни флуоресценции бычьего сывороточного альбумина (БСА) и сывороточного альбумина человека (ЧСА) уменьшается при связывании с ДНКЖ и зависит от концентрации ДНКЖ. Кинетика изменения амплитуды ПФ БСА обусловлена наличием в молекуле белка двух остатков триптофана. Вероятно, ДНКЖ образует в домене I альбумина устойчивые комплексы с остатком цистеина (Cys34). Показано, что время жизни флуоресценции Trp, входящего в БСА, уменьшалось при совместной инкубации с ДНКЖ и глутатионом. *In vitro* исследовали действие ДНКЖ на связывание спин-меченых жирных кислот с ЧСА плазмы крови человека. ДНКЖ в плазме крови не конкурирует за места связывания жирных кислот доменов II и III альбумина. Вероятно, взаимодействие между ДНКЖ и альбумином осуществляется без изменения конформации белка, а за счёт нитрозилирования остатка цистеина в домене I.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: альбумин, динитрозильный комплекс железа, ЭПР, оксид азота, пикосекундная флуоресцентная спектроскопия.

DOI: 10.31857/S0320972521050092

ВВЕДЕНИЕ

Известно, что альбумин регулирует изменение онкотического давления плазмы, а также транспорт ряда низкомолекулярных молекул (например, каротиноидов) и жирных кислот [1, 2]. Способность альбумина связывать широкий спектр лигандов напрямую зависит от конформации белка, поэтому разработка новых методологий оценки конформации альбумина важна для клинического применения. Гипертония является заболеванием с высоким фактором риска. Динитрозильный комплекс железа (ДНКЖ) относится к группе препаратов, обладающих сосудорасширяющим, антиагрегационным и рядом других свойств. В состав ДНКЖ входит оксид азота, и в плазме крови комплекс переносится альбумином. Оксид азота и S-нитрозоглутатион (GS-NO) обладают гипотензивным действием на эндотелиальные клетки [3, 4]. ДНКЖ и глутатион (GSH) использовали в качестве основных соединений для синтеза нового гипотензивного препарата (коммерческое название «Охасом»), не имеющего серьёзных побочных эффектов. Способность S-нитрозотиолов (S-НТ) формировать ДНКЖ в реакции с двухвалентным железом важна для эффективного взаимодействия ДНКЖ и S-нитрозотиолов. Ионы нитрозония, входящие в состав ДНКЖ, способны к S-нитрозилированию тиолов. Это было определено за счёт окисления железа и высвобождения четырёх ионов нитрозония (NO⁺). Связывание NO⁺ с тиоловыми группами глутатиона инициирует синтез GS-NO [5, 6]. Альбумин плазмы крови способствует потере гипотензивного эффекта ДНКЖ, что может быть нивелировано путём модификации цистеин-тиолового остатка альбумина (рис. 1).

Принятые сокращения: БСА – бычий сывороточный альбумин; ДНКЖ – динитрозильный комплекс железа; ПФ – пикосекундная флуоресценция; ЧСА – сывороточный альбумин человека; ЭПР – электронный парамагнитный резонанс; GSH – глутатион; GS-NO – S-нитрозоглутатион; S-НТ – S-нитрозотиол.

* Адресат для корреспонденции.

следует альбумином. Оксид азота и S-нитрозоглутатион (GS-NO) обладают гипотензивным действием на эндотелиальные клетки [3, 4]. ДНКЖ и глутатион (GSH) использовали в качестве основных соединений для синтеза нового гипотензивного препарата (коммерческое название «Охасом»), не имеющего серьёзных побочных эффектов. Способность S-нитрозотиолов (S-НТ) формировать ДНКЖ в реакции с двухвалентным железом важна для эффективного взаимодействия ДНКЖ и S-нитрозотиолов. Ионы нитрозония, входящие в состав ДНКЖ, способны к S-нитрозилированию тиолов. Это было определено за счёт окисления железа и высвобождения четырёх ионов нитрозония (NO⁺). Связывание NO⁺ с тиоловыми группами глутатиона инициирует синтез GS-NO [5, 6]. Альбумин плазмы крови способствует потере гипотензивного эффекта ДНКЖ, что может быть нивелировано путём модификации цистеин-тиолового остатка альбумина (рис. 1).

Следовательно, в присутствии NO образование тиоловых радикалов из GSH или белков может способствовать формированию GS-NO

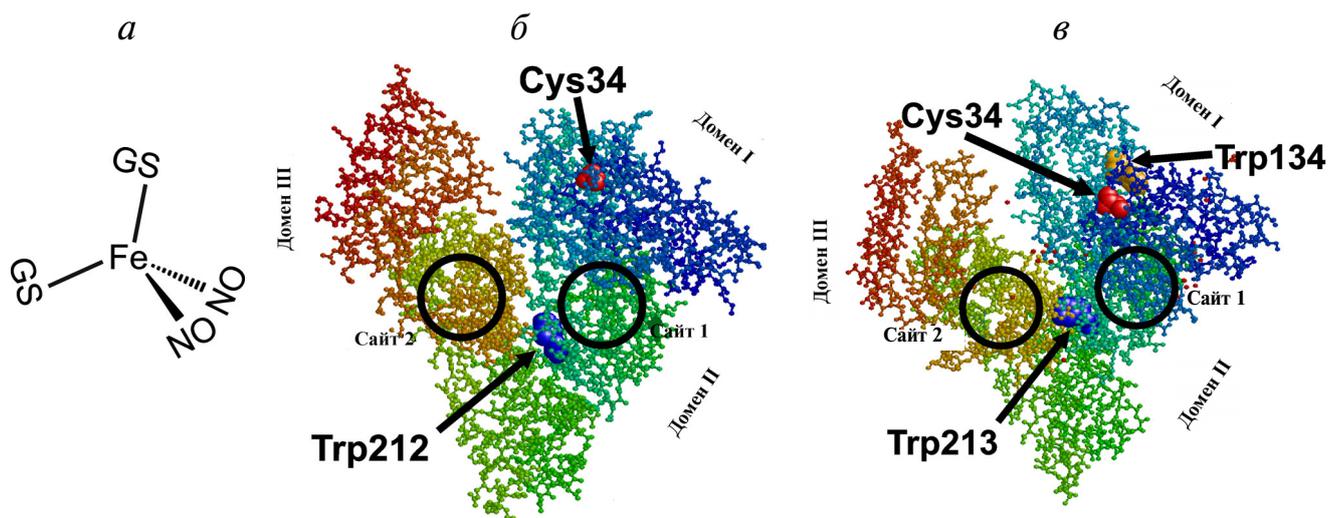


Рис. 1. Молекулярные структуры ДНКЖ (*а*), человеческого (*б*) и бычьего (*в*) сывороточного альбумина. *а* – ДНКЖ содержит атом железа, две молекулы оксида азота и тиоловый лиганд, глутатион; *б* – молекула сывороточного альбумина человека; *в* – молекула бычьего сывороточного альбумина. В альбумине обнаружены два основных сайта связывания жирных кислот и свободный остаток цистеина [3]. Координаты атомов получены из кристаллической структуры рекомбинантного сывороточного альбумина человека (PDB ID: 1UOR) и бычьего сывороточного альбумина (PDB ID: 3V03, биологическая сборка 2). Иллюстрация сделана с помощью RasMOL, версия 2.7.5.2. (С цветным вариантом рисунка можно ознакомиться в электронной версии статьи на сайте: <http://sciencejournals.ru/journal/biokhsm/>.)

или S-НТ. Динитрозильные комплексы негемового железа находятся в динамическом равновесии с S-нитрозотиолами, продуктами взаимодействия оксида азота и тиолов, хотя их время жизни намного короче. Как и динитрозильные комплексы негемового железа, S-НТ являются одной из форм поддержания стационарной концентрации NO в клетках. Наиболее стабильными среди них являются S-нитрозопротеины, так что ~95% S-НТ плазмы представлено нитрозилованным альбумином. Концентрация S-НТ в плазме на 3–4 порядка выше концентрации свободного NO; расщепление нитрозопротеинов катализируется ионами металлов с переменной валентностью, в первую очередь ионами железа. Gow et al. [7] предположили механизм образования S-НТ за счёт взаимодействия NO с тиолом (RSH) с образованием промежуточного радикала и его окислением кислородом или другим одноэлектронным акцептором (например, NAD⁺). GS-NO способен медленно реагировать с тиолами с образованием дисульфида, приводящего к S-глутатиолированию [7]. В неклеточных системах некоторые тиоловые группы белков скорее могут быть S-тиолированными, чем S-НТ. Например, значительное S-нитрозирование происходит после инкубации БСА с GS-NO. В аэробной среде условием для получения GS-NO является окисление NO, а нитрозирование осуществляется либо при синтезе триоксида диазота, либо путём присоединения NO к образующемуся в ходе реакции ради-

калу глутатиона. Клинический эффект ДНКЖ-GS опосредован переносом [Fe(NO)₂] на тиоловые группы белков миокарда, формирующие внутриклеточные пулы ДНКЖ [8].

Молекула ДНКЖ имеет плоскую квадратную структуру с неспаренным электроном, локализованным на d(z²)-орбитали атома железа d(7) (рис. 1). Результаты жидкостной хроматографии, УФ- и видимой спектроскопии, а также масс-спектрометрии свидетельствуют о том, что группа NO присоединена к индолъному азоту триптофана. Вероятно, гидрофобные сайты белков или фосфолипидов мембраны, представляют собой удобные участки для образования нитрозированных соединений [9]. Например, в присутствии липопротеинов низкой плотности образование GS-NO из GSH и NO, производного Proli/NO, более эффективно [10].

Как правило, исследования изменений конформации альбумина проводятся в модельных растворах *in vitro*, а данные *in vivo* практически отсутствуют. В сравнении с другими методами флуоресцентная спектроскопия широко используется как чувствительный метод исследования изменений конформации белка. Собственная флуоресценция остатков триптофана в белке является подходящим маркером для наблюдения за изменениями в молекулярной структуре благодаря высокой разрешающей способности метода и анализу ряда фотофизических параметров Trp (время жизни и квантовый выход флуоресценции, положение макси-

му спектра флуоресценции) по сравнению с его локальным окружением в молекуле белка [11]. В тканях, когда флуоресценция Trp не позволяла выявить изменения в конформации молекулы белка, используют спектроскопию электронного парамагнитного резонанса (ЭПР) плазмы крови человека [12, 13].

В данной работе исследовали молекулярный механизм действия ДНКЖ, учитывая как его прямое действие, так и косвенное влияние производных оксида азота (S-нитрозотиолов) на молекулу альбумина. Целью данной работы было изучение влияния ДНКЖ и S-нитрозоглутатиона на сайты связывания ДНКЖ в альбумине.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Реактивы. В настоящей работе использовали бычий сывороточный альбумин (БСА, без жирных кислот, «Sigma-Aldrich», США), сывороточный альбумин человека (ЧСА, без жирных кислот, «Sigma-Aldrich»), додецилсульфат натрия (SDS, «Sigma-Aldrich») и Tris-(гидроксиметил)-аминометан (Tris, «Диа-М», Россия) без предварительной очистки. Все растворы готовили на бидистиллированной воде. Буфер Tris-HCl (0,1 M) использовали для поддержания pH $7,40 \pm 0,05$. Все измерения проводили при комнатной температуре (25 ± 1 °C) без температурной стабилизации. В качестве донора оксида азота (источник динитрозильного комплекса железа) использовали препарат Охасом® (Российский медицинский исследовательский центр кардиологии, Россия) [6]. Охасом® растворяли в физиологическом растворе и добавляли к плазме крови человека или раствору альбумина непосредственно перед экспериментом [14].

Выделение плазмы крови. В данном исследовании были использованы образцы крови 16 пациентов мужского пола (35–73 года) с систолическим артериальным давлением менее 120 мм рт. ст. и диастолическим артериальным давлением менее 84 мм рт. ст. В исследовании ни один из пациентов никогда не проходил антигипертензивную терапию. Забор крови производили в Российском национальном медицинском исследовательском центре кардиологии. Плазму получали из образцов цельной крови тройным центрифугированием в цитратном буфере [15] при 1500 g в течение 10 мин при 4 °C. Плазму крови хранили при -80 °C и использовали в течение двух часов после разморозки.

Спектроскопия электронного парамагнитного резонанса со спиновыми метками. Данный метод основан на измерении параметров связывания

альбумина со спин-мечеными жирными кислотами. В качестве спиновой метки использовали коммерческую 16-доксил-стеариновую кислоту («Sigma-Aldrich», Германия). Это соединение характеризуется высокой константой связывания альбумина со стеариновой кислотой ($6,9 \times 10^7$ моль/литр), что приводит к $> 99,9\%$ связывания спиновой метки с альбумином при концентрации 0,58; 0,7 и 0,77 mM. Плазму получали центрифугированием (3000 g) в течение 10 мин и хранили при -20 °C. Плазму крови инкубировали с Охасом® (ДНКЖ – 0,1 и 2 мкМ, в течение 20 и 120 мин) и инкубировали с 16-доксил-стеариновой кислотой в концентрации 0,58; 0,7 и 0,77 mM в течение 10 мин. Образцы плазмы помещали в стеклянный капилляр (диаметр 1 мм) и регистрировали ЭПР-спектры с помощью прибора MMS 01-08 ESR-Analyzer (ESR-Analyzer/MMS, «Medin Medical Innovation GmbH», Германия) [15]. Полученные ЭПР-спектры были разложены на компоненты, соответствующие связыванию метки с сайтами альбумина высокого и низкого сродства, а также с мицеллами, и несвязанную метку. Значения параметров C1 и C2 означают процент молекул метки, связанных с сайтами связывания альбумина I и II соответственно.

УФ-поглощение. Спектры поглощения регистрировали на спектрофотометре USB 2000, оснащённом дейтериево-вольфрамовой галогенной лампой DT-MINI-2-GS («Ocean Optics», США), излучающей в диапазоне длин волн 250–500 нм при комнатной температуре.

Стационарная флуоресценция. Спектры флуоресценции растворов БСА (0,14 мг/мл) регистрировали в кварцевых 10-мм кюветах при комнатной температуре на спектрофлуориметре Fluorolog-3 («Horiba Jobin Yvon», США). Флуоресценцию аминокислот возбуждали лазером с длиной волны 280 нм (совместное возбуждение флуоресценции Trp и Tyr) и регистрировали в диапазоне длин волн 300–500 нм, ширина полосы обеих щелей составляла 2 нм.

Флуоресценция с временным разрешением (пикосекундная флуоресценция). Снижение амплитуды флуоресценции регистрировали с помощью системы однофотонного счёта SimpleTau 140 с пикосекундным разрешением («BeckerHickl», Германия). Измерение снижения флуоресценции плазмы или белка крови (100 мкл) проводили в термостатированной кювете (длина оптического пути 2 мм). Возбуждение осуществлялось импульсным светоизлучающим диодом с длиной волны 280 нм («Edinburgh Instruments», Великобритания), генерирующим импульсы длительностью 700 пс FWHM (полная ширина на уровне величины

амплитуды) средней мощности 0,8 мкВт с частотой 10 МГц. Для получения оптимального сигнала для процедуры его деконволюции сбор данных производился в течение 30 с для всех измерений. Зависимость снижения амплитуды флуоресценции Trp регистрировали в канале, соответствующем длине волны флуоресценции (~ 355 нм), что близко к максимуму излучения флуоресценции нативного белка. Предполагалось, что возможный вклад флуоресценции Tug на этой длине волны мал. Минимальное значение остатков затухания флуоресценции Trp было достигнуто путём аппроксимации с использованием суммы двух экспоненциальных функций затухания.

Кинетику затухания флуоресценции аппроксимировали с помощью программы SPC Image. Параметры τ_1 , τ_2 , a_1 , a_2 были рассчитаны с помощью следующего уравнения:

$$I = a_1 \cdot (\tau_1/\tau) + a_2 \cdot (\tau_2/\tau), \quad (1)$$

где τ_1 и τ_2 обозначают время жизни флуоресценции изоформ Trp, а параметры a_1 и a_2 соответствуют доле Trp в соответствующей таутомерной форме [16]. Для анализа спектров Trp использовали среднее время жизни флуоресценции, рассчитанное следующим образом:

$$\tau_m = (a_1 \cdot \tau_1 + a_2 \cdot \tau_2) / a_1 + a_2. \quad (2)$$

Расчет радиуса Фёрстера. Фёрстеровский резонансный перенос энергии (FRET) происходит, когда расстояние между донором (флуорофором) и акцептором находится в пределах 10 нм [17, 18]. Этот метод применяется при исследовании собственной флуоресценции белка, преимущественно Trp ($\lambda_{ex} \approx 280$ нм, $\lambda_{em} \approx 350$ нм). Известно, что длины волны и интенсивности флуоресценции триптофана зависят от молекулярного окружения, и это используется для изучения конформационных изменений белка. Используемый нами метод оценки резонансного переноса энергии Фёрстера за счёт изменений флуоресценции Trp сывороточного альбумина свидетельствует о том, что альбумин человека имеет один триптофан в домене II, тогда как бычий альбумин имеет дополнительный Trp134 в домене I. Согласно теории диполь-дипольной передачи энергии Фёрстера, эффективность передачи энергии можно использовать для оценки расстояния (R) между ДНКЖ и Trp. R_0 – это критическое расстояние, необходимое для передачи 50% энергии, которое можно рассчитать следующим образом:

$$R_0 = 0,2108 \times (\kappa^2 n^{-4} \Phi_D J)^{1/4}, \quad (3)$$

где κ – фактор ориентации диполя, Φ_D – квантовый выход донора флуоресценции, n – показатель преломления среды, J – интеграл перекрытия спектра флуоресценции донора со спектром поглощения акцептора. Спектральный анализ проводился при использовании программы Photochemcad 2.1.

Статистическая обработка результатов проводилась с использованием программного пакета Origin, версия 2018 («Origin Lab Corporation», США). Все данные характеризовались нормальным распределением, что было показано с помощью теста Шапиро–Уилка на нормальность, $p < 0,05$. Результаты представлены как среднее \pm стандартное отклонение. В данных ЭПР-спектроскопии статистическая значимость различий для C1 и C2 была рассчитана с использованием однофакторного дисперсионного анализа с повторными измерениями ANOVA, $p < 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

В соответствии с целью работы исследовали возможность связывания ДНКЖ и GS-NO в молекуле альбумина с помощью двух типов флуоресценции – стационарной и с ПФ. Среди флуорофоров альбумина (триптофан, тирозин и фенилаланин) чаще всего используются фотофизические параметры триптофана, поскольку осуществляется селективное возбуждение при длине волны 280 нм, а её квантовый выход максимален [19]. Гипотеза о взаимодействии альбумина и ДНКЖ через Cys34 была проверена путём сравнения времени жизни флуоресценции триптофана БСА и ЧСА при инкубации с различными концентрациями ДНКЖ (рис. 2).

Домен II ЧСА содержит единственный остаток триптофана (Trp212). Вполне вероятно, что два высокоаффинных сайта связывания ДНКЖ локализованы рядом с этим а.о.; таким образом, изменения флуоресценции Trp можно использовать как индикатор изменения связывания ДНКЖ с этими сайтами. В то же время в состав ЧСА входит 18 а.о. Tug, в БСА – 20 а.о. Tug. Таким образом, распределение Tug в структуре альбумина более равномерное по сравнению с распределением Trp. Вероятно, помимо конформационных изменений, связывание ДНКЖ с белком может приводить к снижению эффективности затухания флуоресценции Tug из-за возможного увеличения расстояния между некоторыми остатками тирозина и триптофана [20].

В этих экспериментах сумму двух экспоненциальных функций затухания использовали для аппроксимации кривых затухания флуоресценции Trp, соответствующих максимуму флуорес-

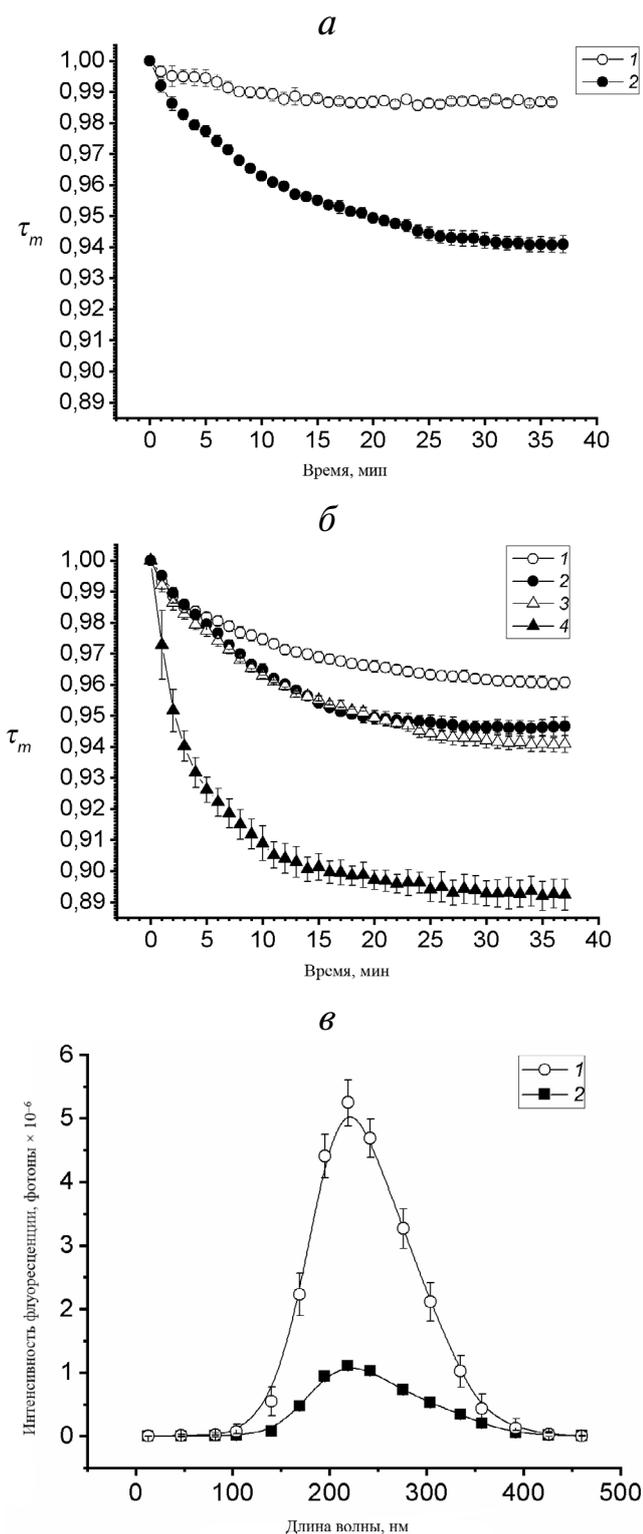


Рис. 2. а – Кинетика константы времени жизни флуоресценции (τ_m) в ЧСА (1) и БСА (2) при действии 1 мкМ ДНКЖ; б – кинетика константы времени жизни флуоресценции (τ_m) в БСА при действии 0,5; 0,75; 1 и 2 мкМ ДНКЖ (1–4 соответственно); в – спектры поглощения раствора БСА (1) и раствора БСА при действии 2 мкМ ДНКЖ (2). Данные представлены как среднее \pm стандартное отклонение ($n = 6$)

ценции альбумина. Наличие двух Trp в БСА с различным окружением, скорее всего, объясняет биэкспоненциальный характер затухания флуоресценции Trp. Однако наличие ротамеров триптофана в водном растворе также вызывает биэкспоненциальное затухание флуоресценции свободного Trp. Было установлено, что константа времени жизни флуоресценции БСА снижается сильнее, чем у ЧСА, и процесс зависит от концентрации ДНКЖ (рис. 2, б). Вероятно, что обнаруженные различия в кинетике флуоресценции альбумина обусловлены связыванием ДНКЖ с доменом I альбумина, расположенным близко к Trp134, взаимодействующим с Cys34 домена I: расстояние между Trp134 и Cys34 составляет около 17 Å, что достаточно для передачи энергии, хотя расстояние между Trp213 и Cys34 >100 Å [17] (рис. 1). Учитывая, что спектр поглощения ДНКЖ и спектр флуоресценции Trp альбумина перекрываются в области 290–450 нм, между этими молекулами возможна миграция энергии, в том числе эффективный перенос энергии альбумина Туг–Trp. На основе интеграла перекрытия спектров флуоресценции донора и поглощения акцептора ($6,07 \cdot \exp(-15)$), фактора ориентации k (принятого за 2/3), времени затухания флуоресценции (4,5 нс) и квантового выхода БСА (Φ_D), равного 0,13 [17], был рассчитан радиус Фёрстера, который составил 24,3 Å. Очевидно, что такой величины радиуса Фёрстера достаточно для эффективной передачи энергии от триптофана к ДНКЖ. Это косвенно подтверждает связывание ДНКЖ с этой аминокислотой. Для пары Туг–Trp радиус Фёрстера составляет ≈ 10 –18 Å, что является стандартным расстоянием между этими а.о. в белках, и здесь также возможен перенос энергии.

Основываясь на результатах по флуоресценции Trp, можно сделать вывод, что связывание ДНКЖ с БСА значительно отличается от связывания с его гомологом ЧСА. Предположительно, это различие объясняется расположением остатков Trp (Trp212 в ЧСА; Trp134 и Trp213 в БСА) и высокой аффинностью сайтов связывания ДНКЖ (рис. 1). В наших экспериментах использовался спиртовой раствор ДНКЖ (2%-ный (v/v) этанол). Известно, что зависимость флуоресценции Туг от концентрации спирта сходна для БСА и ЧСА, тогда как флуоресценция Trp существенно отличается. Полученные результаты выявили корреляцию между связыванием с альбумином с изменением эффективности внутримолекулярного переноса энергии от Туг к Trp, поскольку перенос энергии возбуждения между остатками в альбумине не является преобладающим механизмом затухания флуоресценции Туг [20, 21].

Уменьшение времени жизни флуоресценции может быть вызвано не только передачей энергии ДНКЖ или молекулам GS-NO. В зависимости от полярности среды максимум спектра флуоресценции Trp изменяется в диапазоне от 308 нм (в азурине) до 360 нм (в воде). В наших экспериментах снижение интенсивности флуоресценции не сопровождалось сдвигом максимума длины волны (рис. 2, в), что, возможно, указывает на отсутствие изменений полярности микроокружения триптофана и, как следствие, существенных изменений конформации альбумина. Следовательно, уменьшение интенсивности флуоресценции зависит от концентрации ДНКЖ и, возможно, от его связывания с Cys34 домена I альбумина [10]. Согласно нашим данным, время жизни флуоресценции триптофана БСА изменилось менее чем на 10%. ДНКЖ синтезируется в среде, содержащей железо, тиолы и NO и, предположительно, опосредует образование S-НТ [22]. Наличие этих комплексов в клетках позволяет считать их стабильными метаболитами NO, а также возможными медиаторами его активности. Для проверки гипотезы о том, что ДНКЖ являются предшественниками S-НТ, было продемонстрировано, что нитрозирование БСА происходит в присутствии железа и глутатиона, основных компонентов ДНКЖ. Установлено, что инкубация БСА с ДНКЖ и глутатионом в течение 25 мин снижала скорость замедления времени жизни флуоресценции Trp (рис. 3), а интенсивность флуоресценции Trp БСА практически не изменилась.

Возможно и другое объяснение эффекта, представленного на рис. 3: переход из связанных с белком ДНКЖ в ДНКЖ с глутатионом инициирован избытком глутатиона (5 мМ) по сравнению с содержанием тиола (Cys34) в растворе белка (2 мМ). Это делает передачу энергии от Trp134 к низкомолекулярному ДНКЖ-GSH в растворе незначительной.

Установлено, что даже в присутствии 10-кратного избытка глутатиона, не связанного с ДНКЖ при нейтральном pH, ДНКЖ вместе с глутатионом преимущественно представлены диамагнитной биядерной формой [22]. Прямые окислительно-восстановительные реакции NO с GSH протекают медленно [9, 12] и, вероятно, не вносят существенный вклад в биологическое потребление NO. Однако константы скорости обратимой ассоциации NO с GSH, приводящей к образованию тионитроксида, неизвестны [23]. Учитывая отсутствие взаимодействия между глутатионом и альбумином [24], мы предполагаем наличие конкуренции между БСА и глутатионом за связывание с ДНКЖ, что уменьшает ко-

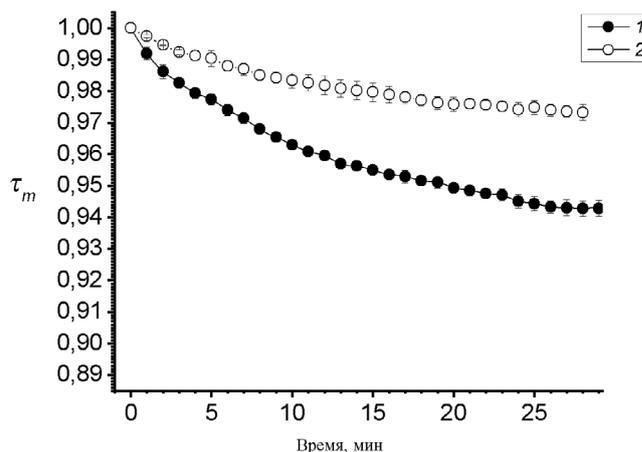


Рис. 3. Время жизни флуоресценции триптофана БСА при инкубации с 1 мкМ ДНКЖ (1), а также 1 мкМ ДНКЖ и 5 мМ глутатиона (2)

личество ДНКЖ, способных образовывать стабильные комплексы с альбумином.

Использование спиновых меток в сочетании с ЭПР-спектроскопией является эффективным методом для изучения структурных изменений альбумина. Изменения подвижности и доступности спиновых меток и расстояний между спиновыми метками позволяют исследовать изменения вторичной и третичной структуры белков. В наших экспериментах в качестве спиновой зонды использовали коммерческую 16-доксил-стеариновую кислоту, так как альбумин проявляет чрезвычайно высокое сродство к стеариновой кислоте ($6,9 \times 10^7$ моль/литр), что обеспечивает >99,9% связывания спиновой метки с альбумином в концентрациях 0,58; 0,7 и 0,77 мМ [15]. Как было указано ранее, альбумин содержит специфические сайты связывания для определенных жирных кислот (рис. 1), проявляющих высокое сродство к многочисленным лекарственным. Вероятно, ДНКЖ также может связываться с этими сайтами [6]. Чтобы проверить гипотезу о наличии конкуренции в связывании между ДНКЖ и жирной кислоты с конкретным сайтом альбумина, мы использовали спиновый зонд, способный образовывать комплекс с сайтами альбумина 1 и 2. В этих экспериментах было обнаружено, что сродство к жирным кислотам в сайте 1 было выше по сравнению с сайтом 2, но присутствие ДНКЖ (1 и 2 мкМ) в течение 20 или 120 мин инкубации на связывание метки не влияло (таблица).

Факт, что связывание меток жирных кислот не зависит от концентрации ДНКЖ, указывает на то, что метка не может соединиться с сайтом связывания ДНКЖ. Согласно полученным данным, присутствие ДНКЖ в плазме крови изменяет конформацию доменов альбумина II и III

Динамика связывания спин-меченых жирных кислот с сайтами альбумина плазмы крови в присутствии ДНКЖ

Динамика связывания спин-меченых жирных кислот с сайтами альбумина	Время, мин	Альбумин, сайт 1	Альбумин, сайт 2
ЧСА в плазме в отсутствие ДНКЖ, %	0	60,1 ± 0,8	34,4 ± 1,1
ЧСА в плазме с 1 мкМ ДНКЖ, %	20	60,6 ± 0,5	36,0 ± 0,8
ЧСА в плазме с 1 мкМ ДНКЖ, %	120	60,3 ± 0,6	36,5 ± 0,7
ЧСА в плазме с 2 мкМ ДНКЖ, %	20	60,4 ± 0,9	35,1 ± 1,4
ЧСА в плазме с 2 мкМ ДНКЖ, %	120	60,0 ± 0,9	36,3 ± 1,1

не за счёт связывания с участками связывания жирных кислот на поверхности этих доменов. Количество спиновых меток в 1-м и 2-м гидрофобных карманах альбумина не зависело от присутствия ДНКЖ. Эти данные свидетельствуют в пользу того, что ДНКЖ имеет низкое сродство к сайтам связывания 1 и 2 в доменах II и III альбумина.

Различные стадии взаимодействия между сайтами связывания ДНКЖ и доменами альбумина демонстрируют разнообразие кооперативности, энергии связывания и, как следствие, механизмов и типов сайтов связывания, а также влияния на вторичную и третичную структуру альбумина. Чтобы объяснить эти различия, Gelato и Tabak [25] показали, что сайты связывания первичных гасителей флуоресценции (сурфактантов) локализованы рядом с Trp134 в домене I БСА, но не были обнаружены вблизи остатка триптофана (Trp212 в ЧСА и Trp213 в БСА) домена II альбумина. Для тушения флуоресценции БСА необходим прямой контакт молекулы сурфактанта с индоллом Trp134. Для анализа механизмов связывания ДНКЖ с альбумином часто используются данные по связыванию миристиновой кислоты с альбумином. Считается, что с помощью флуоресценция Trp при связывании миристиловой кислоты можно обнаружить изменения не вторичной, а третичной структуры альбумина [21]. Мы предполагаем, что наиболее вероятным механизмом взаимодействия ДНКЖ с альбумином является образование комплексов за счёт нитрозирования остатка цистеина домена I альбумина. Однако это не меняет конформацию альбумина. Вероятно, это можно объяснить тем, что, как и при действии этанола, наблюдаемые изменения конформации ЧСА в присутствии низких концентрациях этанола (2%) могут быть вызваны как изменениями в сети водородных связей в первой гидратной сфере молекулы белка, так и связыванием молекул этанола. Действительно, молекулы этанола способны вытеснять воду в первой гидратной сфере и образовывать водо-

родные связи с боковыми цепями аминокислот [25].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Связывание ДНКЖ с альбумином изучали с помощью флуоресцентной спектроскопии с временным разрешением (ПФ) и электронного парамагнитного резонанса. Было выявлено, что время жизни флуоресценции БСА уменьшается больше, чем у ЧСА, и зависит от концентрации ДНКЖ. Биэкспоненциальный характер затухания флуоресценции триптофана БСА объясняется наличием в молекуле белка двух остатков этой аминокислоты. Вероятно, ДНКЖ образует комплексы за счёт нитрозирования цистеинового остатка домена I альбумина. В поддержку гипотезы о том, что ДНКЖ являются предшественниками S-НТ, было показано, что нитрозирование БСА происходит в присутствии железа и глутатиона, находящихся в ядре ДНКЖ. Влияние ДНКЖ на связывание конкретных спин-меченых жирных кислот с альбумином в плазме крови человека изучали *in vitro*. Результаты этого эксперимента свидетельствуют о том, что наличие ДНКЖ в плазме крови влияет на конформацию белка не за счёт связывания с участками связывания жирных кислот.

Благодарности. Авторы выражают свою благодарность д-ру Маргарите Родионовой за её незаменимый вклад в подготовку данной статьи.

Финансирование. Работа выполнена при поддержке Российского научного фонда (грант № 19-79-30062, полученный Максимовым Г.В. и Юсиповичем А.И.), а также Междисциплинарной научно-образовательной школы Московского Университета «Молекулярные технологии живых систем и синтетическая биология».

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов в финансовой или иной сфере.

Соблюдение этических норм. Все процедуры, выполняемые в исследованиях с участием людей, соответствовали этическим стандартам институционального и/или национального исследовательского комитета, а также Хельсин-

кской декларации 1964 года и более поздним поправкам к ней, или сопоставимым этическим стандартам. Перед забором крови от всех пациентов или их законных представителей было получено письменное информированное согласие.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- De Souza, T. C. F., Périssé, A. R. S., and Moura, M. (2015) Noise exposure and hypertension: investigation of a silent relationship, *BMC Public Health*, **15**, 328.
- Diao, D., Wright, J. M., Cundiff, D. K., and Gueyffier, F. (2012) Pharmacotherapy for mild hypertension, *Cochrane Database Syst. Rev.*, **8**, CD006742.
- Lundberg, J. O., Weitzberg, E., and Gladwin, M. T. (2008) The nitrate-nitrite-nitric oxide pathway in physiology and therapeutics, *Nat. Rev. Drug Discov.*, **7**, 156.
- Broniowska, K. A., Diers, A. R., and Hogg, N. (2013) S-nitrosoglutathione, *Biochim. Biophys. Acta*, **5**, 3173-3181.
- Liu, T., Zhang, M., Terry, M. H., Schroeder, H., Wilson, S., et al. (2018) Hemodynamic effects of glutathione-liganded binuclear dinitrosyl iron complex: evidence for nitroxyl generation and modulation by plasma albumin, *Mol. Pharmacol.*, **5**, 427-437.
- Chazov, E. I., Rodnenkov, O. V., Zorin, A. V., Lakomkin, V. L., Gramovich, V. V., et al. (2012) Hypotensive effect of Oxacom® containing a dinitrosyl iron complex with glutathione: animal studies and clinical trials on healthy volunteers, *Nitric Oxide*, **26**, 148-156.
- Gow, A. J., Buerk, D. G., and Ischiropoulos, H. (1997) A novel reaction mechanism for the formation of S-nitrosothiol *in vivo*, *J. Biol. Chem.*, **5**, 2841-2845.
- Lakomkin, V. L., Vanin, A. F., Timoshin, A. A., Kapelko, V. I., and Chazov, E. I. (2007) Long-lasting hypotensive action of stable preparations of dinitrosyl-iron complexes with thiol-containing ligands in conscious normotensive and hypertensive rats, *Nitric Oxide*, **16**, 413-418.
- Liu, X., Miller, M. J., Joshi, M. S., Thomas, D. D., and Lancaster, J. R. Jr. (1998) Accelerated reaction of nitric oxide with O₂ within the hydrophobic interior of biological membranes, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **95**, 2175-2179.
- Moller, M. N., Li, Q., Vitturi, D. A., Robinson, J. M., Lancaster, J. R., and Denicola, A. (2007) Membrane "lens" effect: focusing the formation of reactive nitrogen oxides from the NO/O₂ reaction, *Chem. Res. Toxicol.*, **20**, 709-714.
- Burstein, A., Vedenkina, N. S., and Ivkova, M. N. (1973) Fluorescence and the location of tryptophan residues in protein molecules, *Photochem. Photobiol.*, **18**, 263-279.
- Birkett, D. J., Myers, S. P., and Sudlow, G. (1977) Effects of fatty acids on two specific drug binding sites on human serum albumin, *Mol. Pharmacol.*, **13**, 987-992.
- Zhang, Y. Y., Xu, A. M., Nomen, M., Walsh, M., Keaney, J. F. Jr., and Loscalzo, J. (1996) Nitrosation of tryptophan residue(s) in serum albumin and model dipeptides. Biochemical characterization and bioactivity, *J. Biol. Chem.*, **271**, 14271-14279.
- Borodulin, R. R., Kubrina, L. N., Serezhenkov, V. A., Burbaev, D. S., Mikoyan, V. D., and Vanin, A. F. (2013) Redox conversions of dinitrosyl iron complexes with natural thiol-containing ligands, *Nitric Oxide*, **35**, 35-41.
- Kazmierczak, S. C., Gurachevsky, A., Matthes, G., and Muravsky, V. (2006) Electron spin resonance spectroscopy of serum albumin: a novel new test for cancer diagnosis and monitoring, *Clin. Chem.*, **52**, 2129-2134.
- Alcala, J. R., Gratton, E., and Prendergast, F. G. (1987) Fluorescence lifetime distributions in proteins, *Biophys. J.*, **51**, 597-604.
- Yukio, Y., and Jiro, T. (1972) Polarized absorption spectra of crystals of indole and its related compounds, *Bull. Chem. Soc. Japan*, **45**, 1362-1366.
- Amar, B. T. G., and Sang, J. C. (2014) Intrinsic tryptophan fluorescence in the detection and analysis of proteins: a focus on Förster resonance energy transfer techniques, *Int. J. Mol. Sci.*, **15**, 22518-22538.
- Lakowicz, J. (2007) *Principles of Fluorescence Spectroscopy*, Springer, New York, 3rd Edn.
- Zhdanova, N. G., Shirshin, E. A., Maksimov, E. G., Panchishin, I. M., Saletsky, A. M., and Fadeev, V. V., (2015) Tyrosine fluorescence probing of surfactant-induced conformational changes of albumin, *Photochem. Photobiol. Sci.*, **14**, 897-908.
- Anand, U., Jash, C., and Mukherjee, S. (2010) Spectroscopic probing of the microenvironment in a protein-surfactant assembly, *J. Phys. Chem. B*, **114**, 15839-15845.
- Boese, M., Mordvintcev, P., Vanin, A. F., Busse, R., and Mülsch, A. (1995) S-Nitrosation of serum albumin by dinitrosyl-iron complex, *J. Biol. Chem.*, **270**, 29244-29249.
- Vanin, A. F., Lozinsky, V. I., and Kapel'ko, V. I. (2005) Polymeric composition for designing a stabilized form of dinitrosyl-iron complex and the method of this complex form synthesis, *Russ. Pat.*, No. 2,291,880.
- Noble, D. R., Swift, H. R., and Williams, D. L. H. (1999) Nitric oxide release from S-nitrosoglutathione (GSNO), *Chem. Commun.*, **22**, 2317-2318.
- Gelamo, E. L., and Tabak, M. (2000) Spectroscopic studies on the interaction of bovine (BSA) and human (HSA) serum albumins with ionic surfactants, *Spectrochim. Acta Part A*, **56**, 2255-2271.

EFFECT OF DINITROSYL IRON COMPLEX ON ALBUMIN CONFORMATION

E. S. Allakhverdiev^{1,2*}, G. V. Maksimov^{1,3*}, O. V. Rodnenkov², O. G. Luneva¹,
G. V. Tsoraev¹, A. D. Ivanov³, A. I. Yusipovich¹, and T. V. Martynyuk²

¹ Faculty of Biology, Lomonosov Moscow State University, 119234 Moscow, Russia;
E-mail: elvin21128@gmail.com; gmaksimov@mail.ru

² National Medical Research Center of Cardiology Ministry of Health of the Russian Federation, 121552 Moscow, Russia

³ Federal State Autonomous Educational Institution of Higher Education
"National Research Technological University 'MISIS'", 119049 Moscow, Russia

Binding of dinitrosyl iron complex (DNIC) to albumin was studied using time-resolved fluorescence and electron spin resonance spectroscopy. It was found that the fluorescence lifetime of bovine serum albumin (BSA) and human serum albumin decreases with binding and depends on DNIC concentration. The observed biexponential pattern of the BSA tryptophan fluorescence decay is explained by the presence of two tryptophan residues in the protein molecule. We believe that DNIC forms stable complexes with the cysteine (Cys34) residue in the domain I of albumin. It was shown that the lifetime of albumin tryptophan fluorescence decreased during co-incubation of BSA with DNICs and glutathione. Effects of DNIC on the binding of specific spin-labeled fatty acids with albumin in human blood plasma were studied *in vitro*. The presence of DNIC in blood plasma does not change conformation of albumin domains II and III. We suggest that the most possible interaction between DNICs and albumin is the formation of a complex; and nitrosylation of the cysteine residue in the albumin domain I occurs without the changes in albumin conformation.

Keywords: albumin, dinitrosyl iron complex, electron spin resonance, nitrogen oxide, time-resolved fluorescence

ПРАВИЛА ДЛЯ АВТОРОВ

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

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

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

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

Журнал печатает заказанные редколлегией (или предлагаемые авторами и одобренные редколлегией) **обзоры** по наиболее актуальным проблемам биохимии и смежных наук. К обзорным статьям предъявляются следующие требования: 1) у авторов должны быть **свои работы** по теме обзора; 2) список цитированной литературы должен включать **работы**, опубликованные по данной теме в течение последние 5 лет; 3) обзор не должен быть пересказом или цитирова-

нием фрагментов ранее опубликованных работ, в нем должен быть критический разбор цитируемых материалов и своя концепция, свое видение проблемы, побудившее авторов написать данный обзор. Редакция и рецензенты строго следят за плагиатом!

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

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

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

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

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

Одновременно с русским желателен представить аутентичный английский вариант рукописи.

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

(см. соответствующие Положения на сайтах журнала и на порталах издательств Springer и Pleiades).

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

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

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

Текст статьи следует разбить на разделы: 1) Введение, 2) Методы исследования, 3) Результаты исследования, 4) Обсуждение результатов (объединенный раздел «Результаты и их обсуждение» допускается в тех случаях, когда обсуждение невелико по объему), 5) Список литературы; 6) Резюме на английском языке.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Если в статьях не содержится описания исследований с участием людей или использова-

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

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

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

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

1. Beltrami, C., Besnier, M., Shantikumar, S., Shearn, A. I. U., Rajakaruna, C., Laftah, A., Sessa, F., Spinetti, G., Petretto, E., Angelini, G. D., and Emanuelli, C. (2017) Human pericardial fluid contains exosomes enriched with cardiovascular-expressed microRNAs and promotes therapeutic angiogenesis, *Mol. Ther.*, **25**, 679–693, doi: 10.1016/j.yjthe.2016.12.022.
2. Sloan-Dennison, S., and Schultz, Z. D. (2018) Label-free plasmonic nanostar probes to illuminate *in vitro* membrane receptor recognition, *Chem. Sci.*, **10**, 1807–1815, doi: 10.1039/c8sc05035j.
3. Анисимов В. Н. (2008) *Молекулярные и физиологические механизмы старения*, Наука, СПб.
4. Sambrook, J., and Russell, D. W. (2001) *Molecular cloning: a laboratory manual*, Cold Spring Harbor, Cold Spring Harbor Laboratory Press, N.Y.
5. Tanphaichitr, V. (2001) in *Handbook of vitamins* (Rucker, R., and Suttie, J., eds), Marcell Dekker, N.Y., pp. 275–316.
6. Гендролис А. А., Серебрянников Н. В., Гандель В. Г. (1978) В кн. Простагландины (под ред. Ажгихина И. С.), Медицина, Москва, с. 332–347.
7. Гандельман О. А. (1992) *Кинетика и механизм биолюминесцентного окисления люциферина светляков*. Дис. канд. хим. наук, МГУ, Москва.
8. Rosenkranz, A. A., Slastnikova, T. A., Durymanov, M. O., and Sobolev, A. S. (2013) Malignant melanoma and melanocortin 1 receptor, *Biochemistry (Moscow)*, **11**, 1228–1237, doi: 10.1134/S0006297913110035.

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

Объем экспериментальной статьи, включая список литературы, таблицы, рисунки (3 рисун-

ка считаются за 1 страницу) и подписи к ним, резюме на английском языке, не должен превышать 20 машинописных страниц, количество рисунков — не более 8; краткое сообщение — не более 12 страниц (включая не более 4 рисунков и/или таблиц); мини-обзор — не более 16 страниц (включая не более 5 рисунков); обзор — не более 35 страниц (включая не более 8 рисунков); сообщения в разделе «Дискуссии» — до 4 страниц.

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

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

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

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

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

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

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

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

— независимо от типа графики, рисунок должен обладать высоким реальным разрешением: не

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

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

– векторные иллюстрации не должны содержать точечных закрасок, таких как «Noise», «Black&white noise», «Top noise». Для векторной графики все использованные шрифты должны быть включены в файл;

– шрифты внутри рисунков выбираются из гарнитуры Arial размером 9 пунктов;

– следует избегать сканирования рисунков из книг и других печатных изданий, так как такие файлы дают низкое качество при печати и имеют неоправданно большой размер.

Несоблюдение правил подготовки графического материала приводит к необходимости переработки рисунков авторами и задержке публикации рукописи.

Дополнительные материалы к статьям. Для более полного описания исследования к статье могут прилагаться дополнительные материалы (аудио- и видеофайлы, презентации, дополнительные таблицы, рисунки и пр.) при условии, что автор является правообладателем прилагаемых материалов. Дополнительные материалы публикуются только в электронной версии журнала на сайте: <http://link.springer.com>, а также на сайте журнала: <http://protein.bio.msu.ru/biokhimiya/>. При наличии дополнительных материалов в тексте необходимо разместить ссылку на Приложение к статье.

Все **физические величины** рекомендуется приводить в международной системе СИ.

Поступившей в редакцию правильно оформленной рукописи присваивается регистрационный номер и фиксируется дата поступления, о чем редакция информирует авторов по электронной почте. **Рукописи, оформленные не по правилам, возвращаются авторам без рассмотрения.**

Рецензирование. При подаче рукописи авторы могут указать двух потенциальных рецензентов (ФИО, адрес электронной почты) из числа специ-

алистов в данной области исследований, а также тех, чье участие в рецензировании нежелательно.

Все рукописи рассматривает Ответственный ученый секретарь (Executive Editor-in-Chief) и направляет Ответственному Редактору по соответствующей конкретной области исследований; он, в свою очередь, указывает двух-трех специалистов для рецензирования рукописи. Список Ответственных Редакторов и членов редколлегии размещен на сайтах журнала, а также на порталах Pleiades и Springer.

Рукопись, получившая высшую оценку двух независимых рецензентов, печатается со специальной пометкой «**Ускоренная публикация**» (срок публикации – 3–4 месяца).

В случае необходимости рукопись направляется авторам на доработку по замечаниям рецензентов и редакторов, после чего она повторно рецензируется, и редколлегия вновь решает вопрос о приемлемости рукописи для публикации.

В журнале принято «одностороннее слепое рецензирование» (single blind review), т.е. авторам недоступны имена рецензентов, и редакция строго соблюдает конфиденциальность рецензентов. Все редакционные письма авторам идут за подписью Ответственного ученого секретаря журнала.

Через месяц после сдачи очередного выпуска журнала в печать редакция рассылает авторам по электронной почте корректуру статьи в виде PDF-файла и инструкцию по работе с ней. **На стадии корректуры не допускаются замены текста, рисунков или таблиц.**

Каждый выпуск журнала готовится одновременно на русском и английском языках. Перевод статей осуществляет группа высококвалифицированных переводчиков-биохимиков. В ходе работы у переводчиков часто возникает необходимость связаться с авторами и устранить неточности в русском тексте статьи. Согласованные с авторами исправления вносятся и в русский, и в английский тексты на стадии корректуры.

Авторы, достаточно хорошо владеющие профессиональным английским языком, представляют в редакцию свой **аутентичный** перевод статьи.

Переводы редактируются английской редакцией журнала, подготовленный текст направляется авторам для корректировки.

После выхода журнала в свет редакция рассылает авторам отписки русского и английского вариантов статей в виде PDF-файлов.

(С полным текстом Правил для авторов можно ознакомиться на сайте журнала: <https://www.biochemistrymoscow.com>.)