

СОДЕРЖАНИЕ

Том 86, выпуск 11, 2021

Генерация фотоэлектрических ответов ядерными комплексами фотосистемы 2 в присутствии экзогенного цитохрома с <i>Л.А. Витухновская, Р.А. Симонян, А.Ю. Семенов, М.Д. Мамедов</i>	1611
Протеолиз IGFBP-4 под действием RAPP-A в первичной культуре неонатальных кардиомиоцитов крысы в норме и при гипертрофии <i>Д.В. Серебряная, Д.А. Адашева, А.А. Конев, М.М. Артемьева, И.А. Катруха, А.Б. Постников, Н.А. Медведева, А.Г. Катруха</i>	1620
Роль глутатионпероксидаз и пероксиредоксинов при свободнорадикальных патологиях (обзор) <i>М.Г. Шаповалов, С.В. Гудков, В.З. Ланкин, В.И. Новоселов</i>	1635
Роль транскрипционного фактора STAT3 в патогенезе бронхиальной астмы (обзор) <i>А.А. Никольский, И.П. Шиловский, Е.Д. Барвинская, А.В. Корнеев, М.С. Сундукова, М.Р. Хаитов</i>	1654
Роль движений земли в ориентации растений — планетарный механизм (обзор) <i>А.М. Оловников</i>	1668
Параметры микроокружения опухоли определяют эффективность анти-PD-1/PD-L1-терапии (обзор) <i>Л.А. Таширева, Д.Т. Муравьева, Н.О. Попова, В.Е. Гольдберг, С.В. Вторушин, В.М. Перельмутер</i>	1677
Ингибирование miR-21 способствует процессу старения полученных из клеток NT2 астроцитов <i>V. Balint, D. Stanisavljevic-Ninkovic, N. Anastasov, S. Lazic, N. Kovacevic-Grujicic, M. Stevanovic, A. Lazic</i>	1687
Цитотоксические эффекты селективных лигандов мембранных рецепторов прогестерона в клетках ВхРС3 аденокарциномы поджелудочной железы человека <i>А.И. Гончаров, И.С. Левина, В.Л. Шляпина, И.А. Морозов, П.М. Рубцов, И.В. Заварзин, О.В. Смирнова, Т.А. Щелкунова</i>	1702
Основанные на молекулярном пути EGFR генные подписи клинически значимых мутаций при раке молочной железы, легких, щитовидной железы и при меланоме <i>М. Раевский, М. Сорокин, У. Владимирова, М. Сунцова, В. Ефимов, А. Гаража, А. Дробышев, А. Моисеев, П. Румянцев, З. Ли, А. Буздин</i>	1719

CONTENTS

Vol. 86, Publ. 11, 2021

Generation of Photoelectric Responses by Photosystem II Core Complexes in the Presence of Externally Added Cytochrome <i>c</i> <i>L. A. Vitukhnovskaya, R. A. Simonyan, A. Yu. Semenov, and M. D. Mamedov</i>	1611
IGFBP-4 Proteolysis by PAPP-A in a Primary Culture of Rat Neonatal Cardiomyocytes in Normal and Hypertrophic Conditions <i>D. V. Serebryanaya, D. A. Adasheva, A. A. Konev, M. M. Artemieva, I. A. Katrukha, A. B. Postnikov, N. A. Medvedeva, and A. G. Katrukha</i>	1620
The Role of Glutathione Peroxidases and Peroxyredoxins in Free-Radical Pathologies (Review) <i>M. G. Sharapov, S. V. Gudkov, V. Z. Lankin, and V. I. Novoselov</i>	1635
The Role of Transcription Factor STAT3 in the Pathogenesis of Bronchial Asthma (Review) <i>A. A. Nikolskii, I. P. Shilovskiy, E. D. Barvinskaia, A. V. Korneev, M. S. Sundukova, and M. R. Khaitov</i>	1654
Role of the Earth's Motions in Plant Orientation – Planetary Mechanism (Review) <i>A. M. Olovnikov</i>	1668
Parameters of Tumor Microenvironment Determine the Effectiveness of anti-PD-1/PD-L1 Therapy (Review) <i>L. A. Tashireva, D. T. Muravyova, N. O. Popova, V. E. Goldberg, S. V. Vtorushin, and V. M. Perelmuter</i>	1677
Inhibition of miR-21 Promotes Cellular Senescence in NT2-Derived Astrocytes <i>Vanda Balint, Danijela Stanisavljevic-Ninkovic, Natasa Anastasov, Stefan Lazic, Natasa Kovacevic-Grujicic, Milena Stevanovic, and Andrijana Lazic</i>	1687
Cytotoxic Effects of the Selective Ligands of Membrane Progesterone Receptors in Human Pancreatic Adenocarcinoma Cells BxPC3 <i>A. I. Goncharov, I. S. Levina, V. L. Shliapina, I. A. Morozov, P. M. Rubtsov, I. V. Zavarzin, O. V. Smirnova, and T. A. Shchelkunova</i>	1702
Pathway-Based Gene Signatures of EGFR, BRAF, PIK3CA, and KRAS Gene Mutations in Breast, Lung, Thyroid Cancers and in Melanoma <i>M. Raevskiy, M. Sorokin, U. Vladimirova, M. Suntsova, V. Efimov, A. Garazha, A. Drobyshev, A. Moiseev, P. Rumiantsev, X. Li, and A. Buzdin</i>	1719

УДК 577.23

ГЕНЕРАЦИЯ ФОТОЭЛЕКТРИЧЕСКИХ ОТВЕТОВ ЯДЕРНЫМИ КОМПЛЕКСАМИ ФОТОСИСТЕМЫ 2 В ПРИСУТСТВИИ ЭКЗОГЕННОГО ЦИТОХРОМА *c*

© 2021 Л.А. Витухновская^{1,2}, Р.А. Симонян¹, А.Ю. Семенов^{1,2}, М.Д. Мамедов^{1*}

¹ НИИ физико-химической биологии имени А.Н. Белозерского,
Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова,
119992 Москва, Россия; электронная почта: mahirmamedov@yandex.ru

² Институт химической физики РАН имени Н.Н. Семенова, 119991 Москва, Россия

Поступила в редакцию 10.08.2021

После доработки 20.09.2021

Принята к публикации 20.09.2021

Влияние экзогенного цитохрома *c* (цит *c*) на кинетику фотоэлектрических ответов ($\Delta\Psi$) в двух типах ядерных комплексов фотосистемы 2 (ФС2) (нативные, ФС2 с активным комплексом окисления воды, и Mn-лишенные), реконструированных в липосомы, было исследовано прямым электрометрическим методом. Комплексы ФС2 были локализованы в мембранах протеолипосом донорной стороной наружу. В присутствии окисленного цит *c* (цит c^{3+}), локализованного во внутреннем пространстве протеолипосом, содержащих нативные комплексы ФС2, исследовалась кинетика образования $\Delta\Psi$ в ответ на лазерную вспышку света. Помимо быстрого основного (< 0,3 мкс) электрогенного компонента, обусловленного переносом электрона от редокс-активного тирозина Y_Z к первичному хинонному акцептору Q_A , появлялась дополнительная электрогенная компонента. Эта компонента с характеристическим временем $\tau \approx 40$ мкс и относительной амплитудой $\sim 10\%$ от суммарной $\Delta\Psi$ была приписана векторному переносу электрона от Q_A^- к цит c^{3+} , выступающему в качестве экзогенного акцептора электрона. При добавлении восстановленного цит *c* (цит c^{2+}) к суспензии протеолипосом, содержащих Mn-лишенные ядерные комплексы ФС2, в кинетике образования $\Delta\Psi$ также появлялась дополнительная электрогенная компонента с $\tau \approx 70$ мкс и относительной амплитудой $\sim 20\%$ от суммарной $\Delta\Psi$. Данная компонента была приписана электрогенному переносу электрона от цит c^{2+} на фотоокисленный тирозин Y_Z . Полученные данные свидетельствуют о том, что цит c^{3+} может служить весьма эффективным экзогенным акцептором электрона для Q_A^- в случае нативного ФС2, а цит c^{2+} — эффективным искусственным донором электронов для Y_Z в ФС2, лишенной Mn-кластера. Полученные данные о роли цит c^{2+} и цит c^{3+} в качестве донора и акцептора электронов для ФС2 соответственно могут быть использованы при создании гибридных фотоэлектрохимических систем преобразования солнечной энергии на основе фотосинтетических пигмент-белковых комплексов.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: фотосистема 2, протеолипосомы, фотоэлектрический ответ, перенос электрона, цитохром *c*.

DOI: 10.31857/S0320972521110014

ВВЕДЕНИЕ

Фотосистема 2 (ФС2) представляет собой димерный пигмент-белковый комплекс, расположенный в тилакоидных мембранах цианобактерий и хлоропластов, который функционирует как H_2O -пластохинон оксидоредуктаза [1–4]. У цианобактерий и растений каждый из мономеров ФС2 содержит 20 и 27 индивидуальных белковых субъединиц соответственно [5–8]. Две

основные интегральные субъединицы, D1 и D2, которые являются наиболее консервативными среди всех кислород-выделяющих фотосинтезирующих организмов, с пятью трансмембранными спиралями каждая, образуют реакционный центр (РЦ) комплекса ФС2, несущий большинство редокс-кофакторов. Этими кофакторами являются: первичный донор электронов — P_{680} , специальная пара молекул хлорофилла (Хл) *a* — P_{D1} и P_{D2} , два дополнительных Хл — Chl_{D1} и Chl_{D2} , два феофитина, два пластохинона, негемовое железо, а также две молекулы тирозина. Комплекс окисления воды (КОВ), состоящий из неорганического кластера Mn_4CaO_5 и окружающей белковой матрицы [5–10], расположен на люменальной стороне тилакоидной мембраны. Гидрофильные внешние субъединицы, так-

Принятые сокращения: КОВ — комплекс окисления воды; РЦ — реакционный центр; ФС2 — фотосистема 2; Хл — хлорофилл; цит *c* — цитохром *c*; ЭДТА — этилендиаминтетраацетат; HEPES — 4-(2-гидроксиэтил)-1-пиперазин-этансульфоновая кислота; $\Delta\Psi$ — трансмембранная разность электрических потенциалов.

* Адресат для корреспонденции.

же расположенные на донорной стороне РЦ, взаимодействуют с белками D1/D2 и стабилизируют кластер Mn_4CaO_5 .

В ядерном комплексе ФС2 вспышка света, поглощаемого непосредственно пигментами РЦ или светособирающей антенной (субъединицы 43 и 47 кДа), вызывает разделение зарядов между P_{680} и первичным хинонным акцептором (Q_A). Фотоокисленный P_{680}^+ восстанавливается редокс-активным тирозином Y_Z (Tyr161 субъединицы PsbA), а нейтральный радикал Y_Z , в свою очередь, окисляет марганцевый кластер. Далее происходит восстановление терминального хинонного акцептора Q_B в результате переноса электрона от Q_A^- . Последующие световые вспышки приводят к дальнейшему окислению марганцевого (Mn) кластера КОВ. В процессе переноса четырех электронов от двух молекул H_2O на фотоокисленный P_{680}^+ редокс-состояние (S) КОВ последовательно претерпевает переходы от S_0 до S_4 , где цифры 0–4 отражают величину положительного заряда, накапливающегося в КОВ. Таким образом, в комплексе ФС2 происходит сопряжение реакции одноэлектронного переноса между Y_Z и Q_A с двухэлектронным/двухпротонным восстановлением Q_B и четырехэлектронным/четырёхпротонным процессом окисления воды [1, 11–18].

Взаимодействие экзогенных окислительно-восстановительных медиаторов с фотосинтетическими пигмент-белковыми комплексами и электродами, которые в конечном счете аккумулируют восстановительные эквиваленты, образующиеся при освещении, особенно широко изучается в последние два десятилетия [19–22]. Одним из актуальных подходов, позволяющих осуществить эффективный перенос электронов от ФС2 на электрод, является использование экзогенных редокс-медиаторов, которые переносят электроны от восстановленных хинонов, главным образом с сайта Q_B , на поверхность электрода [23–26]. Существуют также данные о том, что экзогенные акцепторы электронов могут восстанавливаться непосредственно от первичного хинонного акцептора Q_A , минуя вторичный хинон Q_B [26]. Было показано, что экзогенными акцепторами электрона от восстановленного Q_A могут служить феррицианид, синтетические координационные комплексы кобальта, цит c [26].

Larom et al. [27] в экспериментах с тилакоидами из цианобактерий *Synechocystis* sp. PCC 6803 продемонстрировали, что мутация одной аминокислоты (Lys238 субъединицы PsbA) в непосредственной близости от Q_A в ФС2 создает новый путь переноса электронов, в котором заряды передаются от хинона Q_A к добавляемо-

му извне окисленному цит c (цит c^{3+}). Кроме того, на хлоропластах ранее было показано, что фотовосстановление цит c^{3+} может осуществляться либо непосредственно в результате переноса электрона от кофакторов ФС2, либо через супероксидные анион-радикалы ($\text{O}_2^{\bullet-}$), образующиеся в результате одноэлектронного восстановления O_2 [28, 29].

На мембранных фрагментах ФС2 из растений Хоробрых с соавт. обнаружили, что при инактивации КОВ фотовосстановление цит c^{3+} в стационарных условиях, связанное с его прямым окислительно-восстановительным взаимодействием с акцепторной стороной ФС2, снижалось, в то время как фотовосстановление цит c^{3+} через $\text{O}_2^{\bullet-}$ — активировалось [30]. Авторы продемонстрировали, что фотоокисление цит c^{2+} в мембранных фрагментах ФС2, лишенных КОВ, происходит на донорной стороне РЦ. Была также изучена роль цит c как медиатора переноса электрона между цианобактериальными комплексами ФС2 и фотосистемой 1 (ФС1) в фотоэлектродной системе ФС2/цит c/ФС1 [31]. Было продемонстрировано, что в такой системе восстановленный цит c, образующийся в результате фотоокисления ФС2, служит экзогенным донором электронов для фотоокисленного первичного донора ФС1 P_{700}^+ .

Ранее с помощью прямого электрометрического метода в ядерных комплексах ФС2 из шпината, лишенных Mn-кластера, было продемонстрировано электрогенное восстановление фотоокисленного тирозина Y_Z в результате переноса электрона от экзогенных окислительно-восстановительных медиаторов *N,N,N',N'*-тетраметил-*n*-фенилендиамина (ТМФД), 2,6-дихлорфенолиндофенола (ДХФИФ) [32], экзогенного Mn [33] и синтетических Mn-кластеров [34, 35].

Тем не менее до настоящего времени не было исследовано влияние экзогенного цит c^{2+} на кинетику генерации трансмембранной разности электрических потенциалов ($\Delta\psi$) в комплексах ФС2, лишенных марганцевого кластера. Кроме того, в настоящей работе мы также исследовали перенос электрона между акцепторной стороной РЦ и окисленным цит c в препаратах ФС2 с активным КОВ.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Ядерные комплексы ФС2 с активным КОВ из шпината получали по методу, описанному в работе [36], путем обработки мембранных фрагментов додецил- β -D-мальтозидом (ДМ) (при соотношении детергент : Хл = 10 : 1) с последующим центрифугированием в градиенте плот-

ности сахарозы (20–40%) с использованием ротора Beckman Vti50 («Beckman Coulter», США) при 210 000 *g* в течение 7 ч. Концентрированные образцы ФС2 ресуспендировали в 0,03 М буфере HEPES-NaOH (pH 7,5), содержащем 0,35 М сахарозу, 0,015 М NaCl, 0,005 М CaCl₂, 0,03% (*m/v*) ДМ (буфер А). Скорость выделения кислорода в нативных комплексах ФС2 при постоянном освещении (1000 μM фотонов $\text{m}^{-2} \times \text{s}^{-1}$) в присутствии 0,1 мМ 2,6-дихлоро-*n*-бензохинона и 1 мМ феррицианида калия составляла ~ 1500 мкмоль O₂/мг Хл $\times$ ч⁻¹.

Для удаления марганца и периферических белков ядерные комплексы ФС2 были инкубированы в присутствии 0,85 М буфера Tris-HCl (pH 8,3), содержащего 2 мМ ЭДТА, при слабом освещении в течение 30 мин при 23 °С. Затем суспензию ФС2 трижды промывали 0,03 М буфером HEPES (pH 7,5), содержащим 0,03% (*m/v*) ДМ [32].

Для реконструкции ядерных комплексов ФС2 в липосомы один миллилитр 0,05 М буфера HEPES-NaOH (pH 7,5), содержащего 0,1 М KCl, 1,4% октилглюкопиранозида и 20 мг фосфатидилхолина из сои (тип IV-S; «Sigma-Aldrich», США), озвучивали ультразвуком до прозрачности. Образцы ФС2 смешивали с липидной суспензией при соотношении липид : белок = 50 : 1 по массе (0,4 мг Хл) и инкубировали при 4 °С в течение 30 мин. Удаление детергента осуществляли элюированием суспензии через колонку Sephadex G-50 с использованием 0,03 М буфера HEPES-NaOH (pH 7,5), содержащего 0,005 М CaCl₂ и 0,015 мМ NaCl. В конце процедуры везикулы осаждали при 140 000 *g* при 4 °С в течение 1 ч на ультрацентрифуге Beckman L-90K и ресуспендировали в буфере А без детергента.

Протеолипосомы с окисленным цит *c*, находящимся во внутреннем объеме липосом, получали путем добавления цит *c*³⁺ к среде озвучивания суспензии липидов ультразвуком. В работе использовали цит *c* из сердца лошади производства «Sigma-Aldrich».

Дифференциальный спектр (дितिонит минус феррицианид) использовали для определения доли трехвалентного (³⁺) или двухвалентного (²⁺) состояния цит *c* в 0,03 М буфере HEPES-NaOH (pH 7,5). Концентрацию цит *c*²⁺ рассчитывали по значению оптической плотности в присутствии дितिонита натрия с использованием коэффициента экстинкции, равного 27,6 $\text{cm}^{-1} \times \text{mM}^{-1}$ [37], при 550 нм. Отделение цит *c* от восстановителя проводили элюированием суспензии через колонку с сефадексом G-50 (2,5 $\times$ 10 см). Также было проведено восстановление окисленного цит *c* аскорбатом натрия.

Регистрацию образования трансмембранной разности электрических потенциалов проводили прямым электрометрическим методом с использованием защищенных от света электродов Ag/AgCl в тefлоновой ячейке, состоящей из двух отсеков, разделенных пропитанной фосфолипидом коллодиевой пленкой, как описано в работе [38]. Суспензию протеолипосом добавляли в один из отсеков и через 1–1,5 ч перемешивания удаляли избыток образцов, не связавшийся с коллодиевой пленкой. После этого раствор в обоих отсеках был заменен буфером А без ДМ. Электроды Ag/AgCl подключали через операционный усилитель Burr Brown 3554BM («Burr-Brown», США) к регистратору переходных процессов CS8012, а затем к персональному компьютеру. В качестве источника ненасыщающих вспышек света (длина волны 532 нм; полуширина импульса 15 нс; энергия импульса 50 мДж) использовали лазер Quantel Nd («Les Ulis», Франция). Все измерения проводили при 23 °С.

Разложения кинетических кривых на индивидуальные экспоненты осуществляли с использованием программных пакетов Pluk [39] и Origin («OriginLab Corporation», США).

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

На рис. 1 показаны типичные индуцированные лазерной вспышкой электрические ответы в протеолипосомах, содержащих кислород-выделяющие ядерные комплексы ФС2, ассоциированные с коллодиевой пленкой в отсутствие цит *c* (см. обзоры [40, 41]). Видно, что под действием вспышки света наблюдается образование $\Delta\psi$ со знаком минус внутри протеолипосом. Увеличение амплитуды $\Delta\psi$ на $\sim 10\%$ при добавлении непроникающего через мембраны протеолипосом дितिонита натрия указывает на то, что около 90% комплексов ФС2 ориентированы донорной стороной во внешнюю водную фазу [32, 40]. Наблюдаемая в кинетике фотоэлектрического ответа неразрешимая во времени фаза $\Delta\psi$ обусловлена разделением зарядов между P_{680} и Q_A (200–250 пс) и ревосстановлением P_{680}^+ путем переноса электрона от тирозина Y_Z , происходящего за 30–200 нс [11, 12]. Временное разрешение использовавшейся установки составляет ~ 200 нс [38].

Кинетика спада $\Delta\psi$ достаточно хорошо аппроксимируется двумя кинетическими компонентами с $\tau_1 \approx 0,6$ с ($\sim 35\%$) и $\tau_2 \approx 5,6$ с ($\sim 65\%$), показано на рис. 1, а. Медленная компонента обусловлена рекомбинацией электронов между КОВ в состояниях S_2 и Q_A^- в ответ на первую вспышку света [24, 41], в то время как более

быстрая составляющая, вероятно, связана с рекомбинацией зарядов между Q_A^- и Y_Z^* [41]. Полученный результат свидетельствует в пользу того, что в протеолипосомах большинство комплексов ФС2 способны восстанавливать Y_Z^* в результате переноса электронов от КОВ. Следует отметить, что использованные нами образцы ядерных комплексов ФС2 не содержат терминального хинонного акцептора Q_B [36].

Тот факт, что донорная сторона ядерного комплекса ФС2 локализована снаружи протеолипосомальной мембраны, делает эту систему удобной для изучения ее взаимодействия с растворимым восстановленным цит c^{2+} как донором электрона. В то же время для исследования акцепторных свойств цит c его окисленная форма, цит c^{3+} , должна быть локализована внутри протеолипосом, содержащих ядерные комплексы ФС2.

Фотоэлектрические ответы в адаптированных к темноте кислород-выделяющих комплексах ФС2, встроенных в липосомальную мембрану в отсутствие (кривая 1) и в присутствии (кривая 2) цит c^{3+} , показаны на рис. 1, б. Как уже было отмечено выше, в ответ на лазерную вспышку света быстрая фаза генерации электрического ответа ($\tau \sim 0,2$ мкс) обусловлена переносом электрона от тирозина Y_Z к первичному хинону Q_A [42, 43]. В присутствии 30 мкМ цит c^{3+} внутри протеолипосом (кривая 2) индуцированная лазерной вспышкой быстрая кинетически неразрешимая во времени компонента генерации

$\Delta\Psi$ сопровождалась появлением дополнительной электрогенной фазы в субмиллисекундном временном диапазоне. Анализ разности между фотоэлектрическими ответами в отсутствие и в присутствии цит c^{3+} , продемонстрированной на вставке к рис. 1, б, выявил кинетическую компоненту со временем жизни $\tau \sim 40$ мкс и относительным вкладом $\sim 10\%$ в общую амплитуду $\Delta\Psi$. Дальнейшее увеличение концентрации цит c^{3+} внутри протеолипосом (до 50 мкМ) не влияло на кинетику и амплитуду дополнительной фазы генерации $\Delta\Psi$, в то время как при уменьшении концентрации цит c^{3+} до 20 мкМ кинетика дополнительной фазы была несколько медленнее (~ 65 мкс) (данные не приведены). Как упоминалось выше, фотовосстановление цит c^{3+} может происходить (i) либо через прямой перенос электрона от восстановленного хинонного акцептора, (ii) либо косвенно через супероксид анион-радикал [27–30, 44]. Добавление супероксиддисмутазы (СОД) (50 Ед/мл), а также включение восстановленного цит c^{2+} внутрь протеолипосом не влияло на генерацию $\Delta\Psi$ (данные не приведены). Полученные результаты демонстрируют, что дополнительная фаза генерации $\Delta\Psi$, наблюдаемая в присутствии окисленного цит c , обусловлена электрогенным восстановлением цит c^{3+} в результате переноса электрона от Q_A^- .

В следующей части работы мы исследовали возможную роль влияния цит c^{2+} как экзогенного донора электронов на генерацию $\Delta\Psi$ в протео-

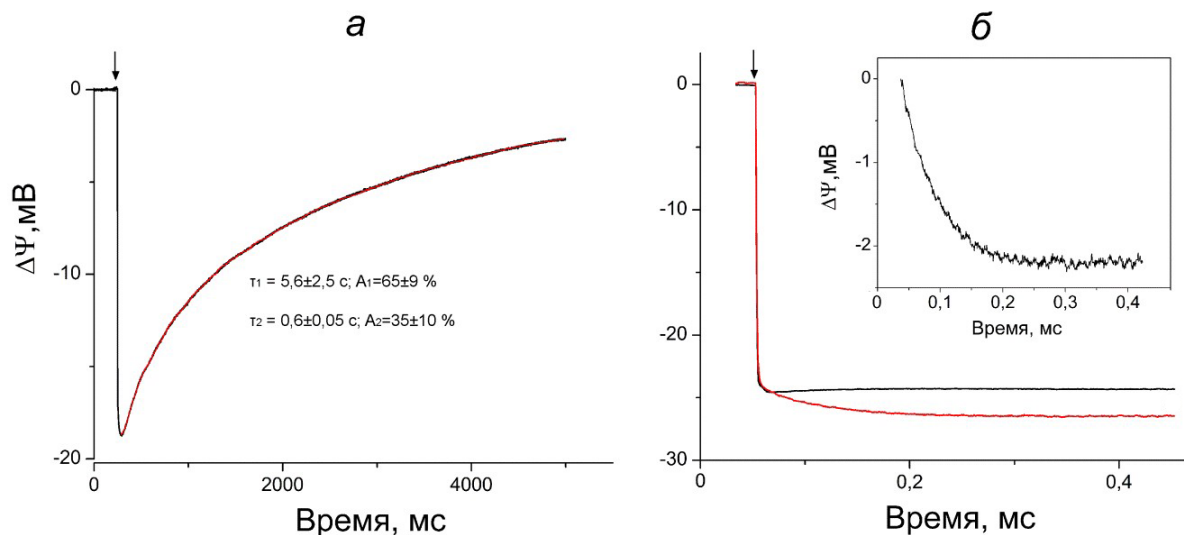


Рис. 1. Влияние экзогенного растворимого цит c^{3+} на генерацию $\Delta\Psi$, индуцированную единичной лазерной вспышкой света в протеолипосомах, содержащих ядерные комплексы ФС2 с активным КОВ. Цит c^{3+} в качестве внешнего акцептора электронов был локализован внутри протеолипосом. а – Кинетика спада $\Delta\Psi$ в отсутствие цит c ; б – кинетика нарастания $\Delta\Psi$ в отсутствие (кривая 1) и в присутствии 30 мкМ цит c^{3+} (кривая 2). Вставка – разность между кривыми 2 и 1. Инкубационная среда: 0,03 М буфер HEPES-NaOH (pH 7,5), 0,015 М NaCl, 0,005 М $CaCl_2$, 0,35 М сахароза. Стрелки здесь и далее обозначают лазерные вспышки

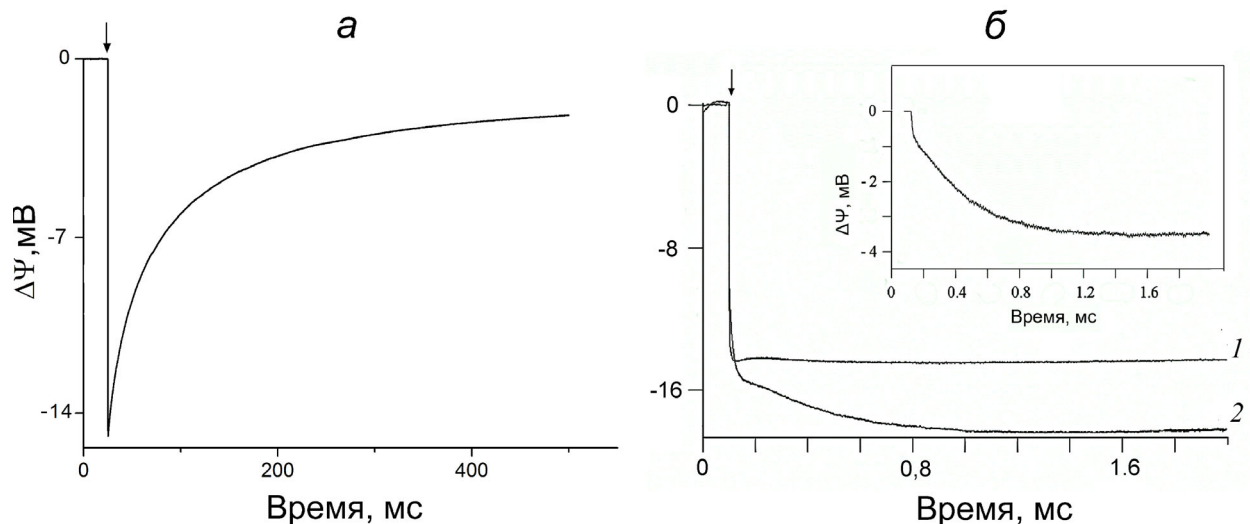


Рис. 2. Влияние цит c^{2+} на кинетику генерации $\Delta\Psi$ в протеолипосомах, содержащих ядерные комплексы ФС2, лишенные ионов марганца и периферических белков (Tris-обработанные). *a* — Кинетика спада $\Delta\Psi$ в отсутствие цит *c*; *б* — кинетика нарастания $\Delta\Psi$ в отсутствие (кривая 1) и в присутствии 20 мкМ цит c^{2+} (кривая 2). Вставка — разница между кривыми 2 и 1. Условия эксперимента соответствуют таковым на рис. 1

липосомах с ядерными комплексами ФС2, лишенными ионов марганца. В условиях инактивации КОВ природный донор электронов для фотоокисленного тирозина Y_Z отсутствует, и время жизни радикала $Y_Z^\bullet$ значительно увеличивается; в этих препаратах Y_Z служит основным донором электронов для фотоокисленного P_{680} . На рис. 2, *a* видно, что фотоэлектрический ответ спадает значительно быстрее, чем в случае нативных ядерных комплексов ФС2 (с характерным временем ~ 50 мс), что обусловлено рекомбинацией зарядов между Q_A^- и $Y_Z^\bullet$ [32, 45, 46].

Фотоэлектрические сигналы в ответ на лазерные вспышки света в адаптированных к темноте ядерных комплексах ФС2 в отсутствие (кривая 1) и в присутствии 20 мкМ цит c^{2+} (кривая 2) показаны на рис. 2, *б*. В отсутствие цит c^{2+} наблюдалась только быстрая кинетически неразрешенная фаза генерации $\Delta\Psi$ за счет переноса электрона от P_{680} на Q_A и последующего восстановления P_{680}^+ в результате переноса электрона от Y_Z . Добавление цит c^{2+} приводило к появлению дополнительной компоненты нарастания в кинетике фотоответа. Анализ различия между фотоэлектрическими ответами, индуцированными вспышкой света в отсутствие и в присутствии цит c^{2+} (вставка к рис. 2, *б*), выявил кинетическую составляющую с $\tau \sim 70$ мкс и относительной амплитудой $\sim 20\%$ от общей амплитуды сигнала $\Delta\Psi$. Эта компонента была приписана векторному переносу электрона от цит c^{2+} к фотоокисленному Y_Z . Дальнейшее увеличение концентрации растворимого цит c^{2+} (до 50 мкМ) не влияло на кинетику $\Delta\Psi$ (данные не

приведены). Амплитуда дополнительной медленной фазы изменялась незначительно во всем исследованном диапазоне концентраций цит *c* (от 5 до 50 мкМ), в то время как кинетика — ускорялась, с ~ 130 мкс при концентрации цит c^{2+} , равной 5 мкМ, до 70 мкс — при концентрации цит c^{2+} 20 мкМ.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Индукцированное лазерной вспышкой возбуждение реакционного центра ФС2 в протеолипосомах приводит к генерации $\Delta\Psi$. С помощью прямого электрометрического метода на протеолипосомах, содержащих ядерные комплексы ФС2 с активным КОВ в присутствии окисленного цит *c*, погруженного внутрь липидной везикулы, была зарегистрирована дополнительная фаза нарастания $\Delta\Psi$. Эта электрогенная фаза (~ 40 мкс, $\sim 10\%$) была приписана восстановлению цит c^{3+} от первичного хинонного акцептора Q_A^- , поскольку: (i) в присутствии цит c^{2+} этого эффекта не наблюдалось; (ii) используемые образцы не содержали Q_B ; (iii) эта электрогенная фаза была нечувствительна к СОД.

Ранее Хоробрых с соавт. [30] на основании данных, полученных на кислород-выделяющих мембранных фрагментах ФС2 с помощью измерения кинетики световых редокс-превращений цит *c* и фотоиндуцированных изменений выхода флуоресценции хлорофилла (ΔF), предположили, что восстановление добавленного цит c^{3+} может наблюдаться в результате переноса электро-

на от кофакторов акцепторного участка реакционного центра. Efrati et al. [31] показали, что освещение модифицированных ФС2/цит c /ФС1 золотых электродов приводит к каскадному переносу электронов, причем фотовозбуждение ФС2 приводит к выделению O_2 и восстановлению цит c с последующим донированием электронов от ФС1 на электрод и восстановлением P_{700}^+ от цит c^{2+} .

Помимо цит c , силикомолибдат, $Co[(terpy)_2]^{3+}$, Hg^{2+} и феррицианид также могут функционировать как акцепторы электронов для Q_A^- [47]. Окислительно-восстановительные медиаторы, такие как метиленовый синий (МС), ДХФИФ или ТМФД, добавленные в реакционную среду, также способны окислять Q_A^- [32]. Фактически даже при концентрации восстановленной формы ТМФД 1 мМ (в присутствии избытка аскорбата) концентрация его окисленной формы составляет 1 мкМ (средноточечный потенциал (E_m) для пары ТМФД/ТМФД $^+$ и аскорбата при pH 7,0 составляет ± 260 мВ и ± 80 мВ соответственно). Эта концентрация, по крайней мере, в пять раз превышает концентрацию реакционных центров ФС2 (обычно около 0,2–0,25 мкМ РЦ), и ТМФД $^+$ может непосредственно окислять анионный семихинон Q_A во фракции ФС2 перед вспышкой света. Отсутствие генерации $\Delta\psi$ при переносе электрона между Q_A^- и окисленными формами МС, ДХФИФ или ТМФД [32], в отличие от цит c^{3+} (рис. 1, б), может быть связано с особенностями их взаимодействия с реакционным центром ФС2 на акцепторной стороне.

Известно, что в образцах ФС2, лишенных марганцевого кластера и периферических белков (PsbO, PsbP, PsbQ), Y_Z находится в относительно гидрофильной среде ближе к границе белок–вода по сравнению с интактным комплексом ФС2. Наши ранние исследования, проведенные в присутствии восстановленных медиаторов ТМФД и ДХФИФ [32, 41] в Mn-лишенных образцах ФС2 продемонстрировали, что быстрая генерация $\Delta\psi$, связанная с векторным переносом электрона между Y_Z и Q_A , сопровождается дополнительной электрогенной фазой в миллисекундном временном диапазоне. Вклад этой фазы в общий электрогенез составлял ~20%.

На основании данных, полученных ранее для некоторых редокс-медиаторов и синтетических трехъядерных или двухъядерных марганцевых кластеров, мы пришли к заключению, что электрогенное восстановление $Y_Z^{\bullet}$ осуществляется в результате векторного переноса электрона от границы раздела белок–вода до погруженного в белок тирозина Y_Z [32–35, 41]. Поскольку вклады $\Delta\psi$ при добавлении искусственных до-

норов электронов [41] и в присутствии цит c^{2+} (настоящая работа) практически одинаковы, мы сделали вывод, что электрогенное восстановление $Y_Z^{\bullet}$ от цит c^{2+} также осуществляется в результате внутрибелкового векторного переноса электрона.

Наличие аналогичной фазы цит c -зависимой генерации $\Delta\psi$ на донорной стороне было также ранее продемонстрировано в изолированных комплексах РЦ из несерной пурпурной бактерии *Rhodospirillum rubrum* [48, 49], а также в комплексах ФС1 из цианобактерий [50]. Относительный вклад дополнительной электрогенной фазы $\Delta\psi$ в общий электрогенез в случае бактериальных РЦ составлял 22–24% в присутствии митохондриального цит c (при концентрации >5 –10 мкМ) и ~16% – в присутствии 7 мкМ цит c_2 из *R. rubrum* [49]. При этом характерное время этой фазы составляло >150 мкс. Что касается кинетики дополнительной электрогенной фазы в комплексах ФС1 в присутствии растворимого цит c , то она хорошо аппроксимировалась двумя кинетическими компонентами с $\tau_1 \approx 25$ мкс и $\tau_2 \approx 200$ мкс и относительными вкладами ~40% и ~60% соответственно.

Предполагаемая схема электрогенного восстановления цит c^{3+} от Q_A^- (а) и окисления цит c^{2+} тирозином $Y_Z^{\bullet}$ (б) на акцепторной и донорной сторонах комплексов ФС2 соответственно представлена на рис. 3. В случае восстановления цит c^{3+} были использованы протеолипосомы, содержащие ФС2 с активным КОВ, при этом цит c^{3+} находился внутри протеолипосом (рис. 3, а), тогда как в случае окисления цит c^{2+} изучались ядерные комплексы ФС2, лишенные ионов марганца и трех внешних субъединиц (рис. 3, б); при этом цит c^{2+} добавляли во внешнюю водную фазу.

Таким образом, измерение электрических сигналов в ответ на однократное разделение зарядов внутри мембранных белков РЦ может предоставить фундаментальную информацию о механизмах переноса заряда [40, 51, 52]. Можно предположить, что цит c^{3+} образует комплекс с акцепторной стороной поверхности белка ФС2 на расстоянии ~17 Å (согласно предварительным данным по моделированию) между гемом и первичным акцептором хинона Q_A , что обеспечивает быстрый перенос электрона (время жизни ~40 мкс) от Q_A^- до цит c^{3+} . Относительная амплитуда величины $\Delta\psi$, сопровождающая эту реакцию, составляет ~10% от общего фотоответа.

С другой стороны, становится очевидным, что восстановленный цит c^{2+} является чрезвычайно эффективным донором электронов для тирозина $Y_Z^{\bullet}$ в образцах ФС2, лишенных ионов марганца. При этом относительная амплитуда

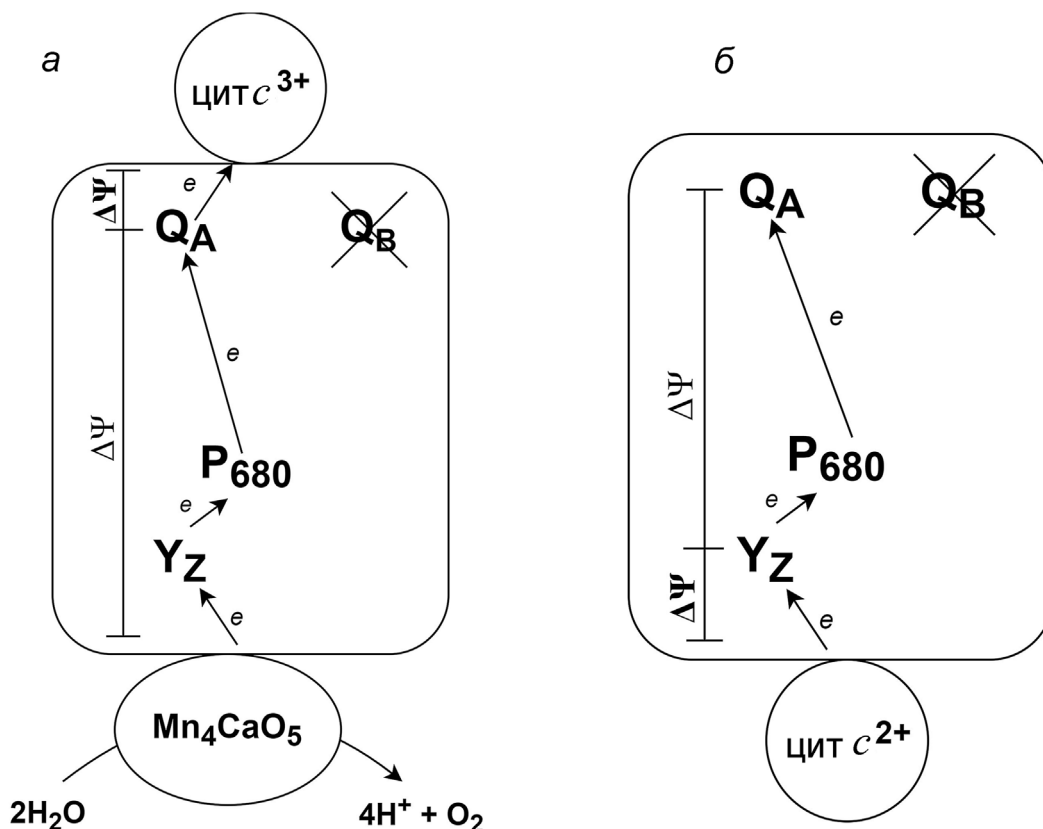


Рис. 3. Схема электрогенных реакций в интактных комплексах ФС2 с активными КОВ (а) и комплексах ФС2, лишенных Мн-кластера и периферических белков (б)

электрогенной фазы, обусловленной переносом электрона от цит c^{2+} к тирозину $Y_Z^{\bullet}$, составляет ~20%. Амплитуда сигнала примерно равна вкладу $\Delta\Psi$, который наблюдался ранее при восстановлении фотоокисленного Y_Z от искусственных доноров электронов – ТМФД, ДХФИФ и синтетических Мн-содержащих кластеров [32, 34, 35].

Таким образом, полученные в настоящей работе данные демонстрируют, что окисленная и восстановленная формы экзогенного цит *c* могут служить весьма эффективными акцептором и донором электрона для ФС2 соответственно. Результаты исследования электрогенных реакций между реакционным центром ФС2 и цит c^{2+} или цит c^{3+} могут быть использованы при создании фотоэлектрохимических систем преобразо-

вания солнечной энергии на основе фотосинтетических пигмент-белковых комплексов.

Финансирование. Исследование выполнено при финансовой поддержке Российского научного фонда (№ проекта 19-14-00366) и государственного задания «Химико-физические механизмы взаимодействия интенсивного лазерного излучения с биологическими системами» (№ АААА-А19-119012990175-9).

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. Barber, J. (2016) Photosystem II: an enzyme of global significance, *Biochem. Soc. Trans.*, **34**, 619-631, doi: 10.1042/BST0340619.
2. Govindjee, Kern, J. F., Messinger, J., and Whitmarsh, J. (2010) Photosystem II, in: *Encycl., Life Sci.*, John Wiley & Sons, Ltd, Chichester, UK, doi: 10.1002/9780470015902.a0000669.pub2.
3. Najafpour, M. M., Renger, G., Hołyńska, M., Moghaddam, A. N., Aro, E. M., et al. (2016) Manganese compounds as water-oxidizing catalysts: from the natural

- water-oxidizing complex to nanosized manganese oxide structures, *Chem. Rev.*, **116**, 2886-2936, doi: 10.1021/acs.chemrev.5b00340.
4. Lubitz, W., Chrysina, M., and Cox, N. (2019) Water oxidation in photosystem II, *Photosynth. Res.*, **142**, 105-125, doi: 10.1007/s11120-019-00648-3.
 5. Ferreira, K. N., Iverson, T. M., Maghlaoui, K., Barber, J., and Iwata, S. (2004) Architecture of the photosynthetic oxygen-evolving center, *Science*, **303**, 1831-1838, doi: 10.1126/science.1093087.
 6. Guskov, A., Gabdulkhakov, A., Broser, M., Glöckner, C., Hellmich, J., et al. (2010) Recent progress in the crystallographic studies of photosystem II, *ChemPhysChem*, **11**, 1160-1171, doi: 10.1002/cphc.200900901.
 7. Umena, Y., Kawakami, K., Shen, J. R., and Kamiya, K. (2011) Crystal structure of oxygen-evolving photosystem II at a resolution of 1.9 Å, *Nature*, **473**, 55-60, doi: 10.1038/nature09913.
 8. Cao, P., Su, X., Pan, X., Liu, Z., Chang, W., and Li, M. (2018) Structure, assembly and energy transfer of plant photosystem II supercomplex, *Biochim. Biophys. Acta Bioenerg.*, **1859**, 633-644, doi: 10.1016/j.bbabi.2018.03.007.
 9. Yano, J., Kern, J., Sauer, K., Latimer, M. J., Pushkar, Y., Biesiadka, J., et al. (2006) Where water is oxidized to dioxygen: Structure of the photosynthetic Mn₄Ca cluster, *Science*, **314**, 821-825, doi: 10.1126/science.1128186.
 10. Suga, M., Akita, F., Hirata, K., Ueno, G., Murakami, H., Nakajima, Y., et al. (2015) Native structure of photosystem II at 1.95 Å resolution viewed by femtosecond X-ray pulses, *Nature*, **517**, 99-103, doi: 10.1038/nature13991.
 11. Renger, G., and Holzwarth, A. R. (2005) Primary electron transfer, in: *Photosystem II*, Springer-Verlag, pp. 139-175, doi: 10.1007/1-4020-4254-x_8.
 12. McEvoy, J. P., and Brudvig, G. W. (2006) Water-splitting chemistry of photosystem II, *Chem. Rev.*, **106**, 4455-4483, doi: 10.1021/cr0204294.
 13. Dau, H., and Haumann, M. (2007) Eight steps preceding O-O bond formation in oxygenic photosynthesis-A basic reaction cycle of the Photosystem II manganese complex, *Biochim. Biophys. Acta Bioenerg.*, **1767**, 472-483, doi: 10.1016/j.bbabi.2007.02.022.
 14. Rappaport, F., and Diner, B. (2008) Primary photochemistry and energetics leading to the oxidation of the (Mn)₄Ca cluster and to the evolution of molecular oxygen in Photosystem II, *Coord. Chem. Rev.*, **252**, 259-272, doi: 10.1016/j.ccr.2007.07.016.
 15. Muh, F., and Zouni, A. (2011) Light-induced water oxidation in photosystem II, *Front. Biosci.*, **16**, 3072-3132, doi: 10.2741/3900.
 16. Shevela, D., and Messinger, J. (2012) Probing the turnover efficiency of photosystem II membrane fragments with different electron acceptors, *Biochim. Biophys. Acta Bioenerg.*, **1817**, 1208-1212, doi: 10.1016/j.bbabi.2012.03.038.
 17. Cardona, T., Sedoud, A., Cox, N., and Rutherford, A. W. (2012) Charge separation in Photosystem II: a comparative and evolutionary overview, *Biochim. Biophys. Acta Bioenerg.*, **1817**, 26-43, doi: 10.1016/j.bbabi.2011.07.012.
 18. Barber, J. (2017) Photosynthetic water splitting by the Mn₄Ca²⁺O_x catalyst of photosystem II: its structure, robustness and mechanism, *Q. Rev. Biophys.*, **50**, e13, doi: 10.1017/S0033583517000105.
 19. Brinkert, K., Le Formal, F., Li, X., Durrant, J., Rutherford, A. W., and Fantuzzi, A. (2016) Photocurrents from photosystem II in a metal oxide hybrid system: Electron transfer pathways, *Biochim. Biophys. Acta Bioenerg.*, **1857**, 1497-1505, doi: 10.1016/j.bbabi.2016.03.004.
 20. Nguyen, K., and Bruce, B. D. (2014) Growing green electricity: progress and strategies for use of photosystem I for sustainable photovoltaic energy conversion, *Biochim. Biophys. Acta Bioenerg.*, **1837**, 1553-1566, doi: 10.1016/j.bbabi.2013.12.013.
 21. Musazade, E., Voloshin, R., Brady, N., and Mondal, J. (2018) Biohybrid solar cells: Fundamentals, progress, and challenges, *J. Photochem. Photobiol. C Photochem. Rev.*, **35**, 134-156, doi: 10.1016/j.jphotochemrev.2018.04.001.
 22. Zhang, J. Z., and Reisner, E. (2020) Advancing photosystem II photoelectrochemistry for semi-artificial photosynthesis, *Nat. Rev. Chem.*, **4**, 6-21, doi: 10.1038/s41570-019-0149-4.
 23. Badura, A., Kothe, T., Schuhmann, W., and Rögner, M. (2011) Wiring photosynthetic enzymes to electrodes, *Energy Environ. Sci.*, **4**, 3263-3274, doi: 10.1039/c1ee01285a.
 24. Kato, M., Zhang, J. Z., Paul, N., and Reisner, E. (2014) Protein film photoelectrochemistry of the water oxidation enzyme photosystem II, *Chem. Soc. Rev.*, **43**, 6485-6497, doi: 10.1039/c4cs00031e.
 25. Yehezkeili, O., Tel-Vered, R., Michaeli, D., Willner, I., and Nechushtai, R. (2014) Photosynthetic reaction center-functionalized electrodes for photo-bioelectrochemical cells, *Photosynth. Res.*, **120**, 71-85, doi: 10.1007/s11120-013-9796-3.
 26. Wiwczar, J., and Brudvig, G. W. (2017) Alternative electron acceptors for photosystem II, in *Photosynthesis: Structures, Mechanisms, and Applications* (Hou, H. J. M., et al., eds.) Springer, doi: 10.1007/978-3-319-48873-8_4.
 27. Larom, S., Salama, F., Schuster, G., and Adir, N. (2010) Engineering of an alternative electron transfer path in photosystem II, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **107**, 9650-9655, doi: 10.1073/pnas.1000187107.
 28. Nelson, N., Nelson, H., and Racker, E. (1972) Photoreaction of FMN-Tricine and its participation in photophosphorylation, *Photochem. Photobiol.*, **16**, 481-489, doi: 10.1111/j.1751-1097.1972.tb06316.x.
 29. Asada, K., Kiso, K., and Yoshikawa, K. (1974) Univalent reduction of molecular oxygen by spinach chloroplasts on illumination, *J. Biol. Chem.*, **249**, 2175-2181, doi: 10.1016/s0021-9258(19)42815-9.
 30. Khorobrykh, A. A., Yanykin, D. V., and Klimov, V. V. (2018) Photooxidation and photoreduction of exogenous cytochrome c by photosystem II preparations after various modifications of the water-oxidizing complex, *Photosynthetica*, **56**, 244-253, doi: 10.1007/s11099-017-0762-8.
 31. Efrati, A., Tel-Vered, R., Michaeli, D., Nechushtai, R., and Willner, I. (2013) Cytochrome c-coupled photosystem I and photosystem II (PSI/PSII) photo-bioelectrochemical cells, *Energy Environ. Sci.*, **6**, 2950, doi: 10.1039/C3EE41568F.
 32. Gupta, O. A., Tyunyatkina, A. A., Kurashov, V. N., Semenov, A. Y., and Mamedov, M. D. (2008) Effect of redox mediators on the flash-induced membrane potential generation in Mn-depleted photosystem II core particles, *Eur. Biophys. J.*, **37**, 1045-1050, doi: 10.1007/s00249-007-0231-6.
 33. Kurashov, V. N., Lovyagina, E. R., Shkolnikov, D. Yu., Solntsev, M. K., Mamedov, M. D., and Semin, B. K. (2009) Investigation of the low-affinity oxidation site for exogenous electron donors in the Mn-depleted photosystem II complexes, *Biochim. Biophys. Acta Bioenerg.*, **1787**, 1492-1498, doi: 10.1016/j.bbabi.2009.07.002.
 34. Kurashov, V. N., Allakhverdiev, S. I., Zharmukhamedov, S. K., Nagata, T., Klimov, V. V., et al. (2009) Electrogenic reactions on the donor side of Mn-depleted photosystem II core particles in the presence of MnCl₂ and synthetic trinuclear Mn-complexes, *Photochem. Photobiol. Sci.*, **8**, 162-166, doi: 10.1039/b813981d.
 35. Vitukhnovskaya, L. A., Zharmukhamedov, S. K., Najafpour, M. M., Allakhverdiev, S. I., Semenov, A. Y., and Mamedov, M. D. (2018) Electrogenic reactions in Mn-depleted photosystem II core particles in the presence of

- synthetic binuclear Mn complexes, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **503**, 222–227, doi: 10.1016/j.bbrc.2018.06.006.
36. Haag, E., Irrgang, K.-D., Boekema, E. J., and Renger, G. (1990) Functional and structural analysis of photosystem II core complexes from spinach with high oxygen evolution capacity, *Eur. J. Biochem.*, **189**, 47–53, doi: 10.1111/j.1432-1033.1990.tb15458.x.
 37. Margoiliash, E. (1954) The use of ion exchangers in the preparation and purification of cytochrome *c*, *Biochem. J.*, **56**, 529–535, doi: 10.1042/bj0560529.
 38. Semenov, A. Yu., Mamedov, M. D., and Chamorovsky, S. K. (2006) Electrogenic reactions associated with electron transfer in photosystem I, in *Advances in Photosynthesis and Respiration Series. Photosystem I: The Light-Driven, Plastocyanin:Ferredoxin Oxidoreductase* (Golbeck, J. H., ed) Springer, pp. 319–424.
 39. Kalaidzidis, L., Gavrilov, A. V., Zaitsev, P. V., Kalaidzidis, A. L., and Korolev, E. V. (1997) PLUK – an environment for software development, *Program. Comput. Softw.*, **23**, 206–212.
 40. Semenov, A. Y., Cherepanov, D. A., and Mamedov, M. D. (2008) Electrogenic reactions and dielectric properties of photosystem II, *Photosynth. Res.*, **98**, 121–130, doi: 10.1007/s11120-008-9377-z.
 41. Mamedov, M. D., Kurashov, V. N., Cherepanov, D. A., and Semenov, A. Y. (2010) Photosystem II: Where does the light-induced voltage come from? *Front. Biosci.*, **15**, 1007–1017, doi: 10.2741/3658.
 42. Мамедов М. Д., Ловягина Е. Р., Верховский М. И., Семенов А. Ю., Черепанов Д. А., Шинкарев В. П. (1994) Генерация разности электрических потенциалов фотосистемой II термофильных цианобактерий, *Биохимия*, **59**, 685–689.
 43. Haumann, M., Mulkidjanian, A., Junge, W. (1997) Electrogenicity of electron and proton transfer at the oxidizing side of photosystem II, *Biochemistry*, **36**, 9304–9315, doi: 10.1021/bi963114p.
 44. Larom, S., Kallmann, D., Saper, G., Pinhassi, R., Rothschild, A., et al. (2015) The Photosystem II D1-K238E mutation enhances electrical current production using cyanobacterial thylakoid membranes in a bio-photo-electrochemical cell, *Photosynth. Res.*, **126**, 161–169, doi: 10.1007/s11120-015-0075-3.
 45. Rappaport, F., and Lavergne, J. (1997) Charge recombination and proton transfer in manganese-depleted photosystem II, *Biochemistry*, **36**, 15294–15302, doi: 10.1021/bi971287o.
 46. Rappaport, F., Guergova-Kuras, M., Nixon, P. J., Diner, B. A., and Lavergne, J. (2002) Kinetics and pathways of charge recombination in photosystem II, *Biochemistry*, **41**, 8518–8527, doi: 10.1021/bi025725p.
 47. Ulas, G., and Brudvig, G. W. (2011) Redirecting electron transfer in photosystem II from water to redox-active metal complexes, *J. Am. Chem. Soc.*, **133**, 13260–13263, doi: 10.1021/ja2049226.
 48. Drachev, L. A., Kaminskaya, O. P., Konstantinov, A. A., Kotova, E. A., Mamedov, M. D., et al. (1986) The effect of cytochrome *c*, hexammineruthenium and ubiquinone-10 on the kinetics of photoelectric responses of *Rhodospirillum rubrum* reaction centres, *Biochim. Biophys. Acta Bioenerg.*, **848**, 137–146, doi: 10.1016/0005-2728(86)90169-6.
 49. Каминская О. П., Семенов А. Ю. (2021) Сотрудничество с Александром Константиновым в исследовании механизмов электрогенных реакций в бактериальных фотосинтетических реакционных центрах, *Биохимия*, **86**, 6–13, doi: 10.31857/s0320972521010012.
 50. Mamedov, M. D., Gadzhieva, R. M., Gourovskaya, K. N., Drachev, L. A., and Semenov, A. Y. (1996) Electrogenicity at the donor/acceptor sides of cyanobacterial photosystem I, *J. Bioenerg. Biomembr.*, **28**, 517–522, doi: 10.1007/BF02110441.
 51. Kim, I., Chakrabarty, S., Brzezinski, P., and Warshel, A. (2014) Modeling gating charge and voltage changes in response to charge separation in membrane proteins, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **111**, 11353–11358, doi: 10.1073/pnas.1411573111.
 52. Moser, C. C., Keske, J. M., Warncke, K., Farid, R. S., and Dutton, P. L. (1992) Nature of biological electron transfer, *Nature*, **355**, 796–802, doi: 10.1038/355796a0.

GENERATION OF PHOTOELECTRIC RESPONSES BY PHOTOSYSTEM II CORE COMPLEXES IN THE PRESENCE OF EXTERNALLY ADDED CYTOCHROME *c*

L. A. Vitukhnovskaya^{1,2}, R. A. Simonyan¹, A. Yu. Semenov^{1,2}, and M. D. Mamedov^{1*}

¹ Belozersky Institute of Physico-Chemical Biology, Moscow State University, 119992 Moscow, Russia; e-mail: mahirmamedov@yandex.ru

² Semenov Federal Research Center for Chemical Physics, Russian Academy of Sciences, 119991 Moscow, Russia

The effect of exogenous cytochrome *c* (cyt *c*) on kinetics of photoelectric responses ($\Delta\Psi$) of two types of photosystem II (PSII) core complexes (intact – PSII with active water-oxidizing complex and Mn-depleted complex) reconstituted into liposomes has been investigated by direct electrometric technique. PSII complexes were localized in the proteoliposome membranes with their donor side outward. An additional electrogenic phase was observed in the kinetics of $\Delta\Psi$ generation in response to a laser flash besides the main fast ($<0.3\ \mu\text{s}$) electrogenic component due to electron transfer from the redox-active tyrosine Y_Z to the primary quinone acceptor Q_A in the presence of oxidized cyt *c* (cyt c^{3+}) entrapped in the internal space of proteoliposomes with intact PSII complexes. This component with characteristic time $\tau \approx 40\ \mu\text{s}$ and relative amplitude of $\sim 10\%$ of the total $\Delta\Psi$ was attributed to the vectorial electron transfer from Q_A to cyt c^{3+} serving as an external acceptor. An additional electrogenic component with $\tau \sim 70\ \mu\text{s}$ and a relative amplitude of $\sim 20\%$ of the total $\Delta\Psi$ also appeared in the kinetics of $\Delta\Psi$ formation, when cyt c^{2+} was added to the suspension of proteoliposomes containing Mn-depleted PSII core complexes. This component was attributed to the electrogenic transfer of an electron from cyt c^{2+} to photooxidized tyrosine Y_Z . These data imply that cyt c^{3+} serves as a very effective exogenous electron acceptor for Q_A in the case of intact PSII core complexes, and cyt c^{2+} is an extremely efficient artificial electron donor for Y_Z in the Mn-depleted PSII. The obtained data on the roles of cyt c^{2+} and cyt c^{3+} as an electron donor and acceptor for PSII, respectively, can be used to develop hybrid photoelectrochemical solar energy-converting systems based on photosynthetic pigment–protein complexes.

Keywords: photosystem II, proteoliposomes, photoelectric response, electron transfer, cytochrome *c*

ПРОТЕОЛИЗ IGFBP-4 ПОД ДЕЙСТВИЕМ RAPP-A В ПЕРВИЧНОЙ КУЛЬТУРЕ НЕОНАТАЛЬНЫХ КАРДИОМИОЦИТОВ КРЫСЫ В НОРМЕ И ПРИ ГИПЕРТРОФИИ

© 2021 Д.В. Серебряная^{1*}, Д.А. Адашева¹, А.А. Конев², М.М. Артемьева³,
И.А. Катруха^{1,2}, А.Б. Постников^{1,2}, Н.А. Медведева³, А.Г. Катруха^{1,2}

¹ Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, биологический факультет, кафедра биохимии, 119234 Москва, Россия; электронная почта: dariaserebryanaya@gmail.com

² HyTest Ltd, 20520 Турку, Финляндия

³ Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, биологический факультет, кафедра физиологии человека и животных, 119234 Москва, Россия

Поступила в редакцию 06.08.2021

После доработки 03.09.2021

Принята к публикации 03.09.2021

Сердечно-сосудистые заболевания (ССЗ) являются одной из главных причин смертности и инвалидизации населения в мире. Белок А плазмы крови, ассоциированный с беременностью (RAPP-A), представляет собой матриксную металлопротеиназу, локализованную на поверхности клеток. Одним из субстратов RAPP-A является IGFBP-4 (insulin-like growth factor binding protein-4) – представитель семейства белков, связывающих IGF (insulin-like growth factor). Протеолиз IGFBP-4 под действием RAPP-A происходит по специфическому участку с образованием двух протеолитических фрагментов – N-концевого (NT-IGFBP-4) и C-концевого (CT-IGFBP-4) – и приводит к высвобождению IGF, который активирует такие клеточные процессы, как миграция, пролиферация и клеточный рост. Повышенный уровень протеолитических фрагментов IGFBP-4 коррелирует с развитием осложнений и риском летального исхода у больных такими ССЗ, как ишемическая болезнь сердца, острый коронарный синдром и сердечная недостаточность. Однако в литературе нет данных, демонстрирующих RAPP-A-зависимый протеолиз IGFBP-4 в сердечной ткани в норме и при патологических состояниях. В настоящей работе на модели первичной культуры неонатальных кардиомиоцитов крысы нами было показано: 1) процесс протеолиза IGFBP-4 под действием RAPP-A происходит в кондиционированной среде кардиомиоцитов, 2) переход кардиомиоцитов в гипертрофированное состояние сопровождается увеличением уровня RAPP-A-специфичного протеолиза IGFBP-4. Таким образом, можно предположить, что усиление расщепления IGFBP-4 и гипертрофические изменения кардиомиоцитов, сопровождающие некоторые ССЗ, взаимосвязаны, и RAPP-A является одним из активаторов IGF-зависимых процессов в кардиомиоцитах в норме и особенно при гипертрофии.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: сердечно-сосудистые заболевания, сердечная недостаточность, кардиомиоциты, первичная культура, протеолиз, RAPP-A, IGFBP-4, гипертрофия, кардиомаркер, эндотелин-1.

DOI: 10.31857/S0320972521110026

ВВЕДЕНИЕ

На сегодняшний день сердечно-сосудистые заболевания (ССЗ) являются главной причиной летальных исходов и инвалидности во всем мире [1]. Сердечная недостаточность (СН) – одно из самых распространенных ССЗ, характеризующееся изменениями в работе сердца, приводящими к нарушению кровоснабжения всего ор-

ганизма. При хронической форме СН снижается способность сердечной мышцы к сокращению и развивается патологическая гипертрофия – аномальное утолщение стенки миокарда, возникающее вследствие увеличения кардиомиоцитов в размере и изменений во внеклеточном матриксе сердечной ткани [2]. Гипертрофия также сопровождает и другие ССЗ, такие как ишемическая болезнь сердца (ИБС), гипертония, а

Принятые сокращения: ИБС – ишемическая болезнь сердца; ОКС – острый коронарный синдром; ССЗ – сердечно-сосудистые заболевания; СН – сердечная недостаточность; ФИА – флуороиммунный анализ; ЭТС – эмбриональная телячья сыворотка; BNP – натрийуретический пептид типа В; CT-IGFBP-4 – C-концевой протеолитический фрагмент IGFBP-4; DAPI – 4',6-диамидино-2-фенилиндол; dRAPP-A – димерная форма RAPP-A; IGF – инсулиноподобный фактор роста; IGFBP-2–IGFBP-5 – белки, связывающие инсулиноподобный фактор роста; NT-IGFBP-4 – N-концевой протеолитический фрагмент IGFBP-4; RAPP-A – ассоциированный с беременностью белок плазмы А; proMBP – предшественник основного щелочного белка эозинофилов.

* Адресат для корреспонденции.

также практически все известные на сегодняшний день типы врождённых и приобретенных пороков сердца [3].

Белок А плазмы, ассоциированный с беременностью (pregnancy associated plasma protein-A, PAPP-A), — матриксная металлопротеиназа, содержащая в активном центре ионы цинка и локализованная на поверхности клеток [4, 5]. Большая часть PAPP-A (~90%) в крови циркулирует в форме гетеротетрамера (htPAPP-A), в состав которого входят димер PAPP-A (dPAPP-A) и две субъединицы белка proMBP — предшественника основного щелочного белка эозинофилов. Тетрамерная форма PAPP-A является протеолитически неактивной [6]. Остальная часть PAPP-A, циркулирующего в крови, представлена его димерной формой, которая обладает протеолитической активностью [7]. Субстратами dPAPP-A в физиологических условиях являются белки, связывающие инсулиноподобный фактор роста: IGFBP-2 [8], IGFBP-4 [9] и IGFBP-5 [10]. Данные белки связываются с инсулиноподобным фактором роста (IGF), ингибируя его активность. В результате протеолиза комплекса IGFBP-белков с IGF под действием dPAPP-A IGF высвобождается из комплекса и активирует такие процессы, как клеточный рост, пролиферация, миграция и ангиогенез [11]. В случае IGFBP-4 PAPP-A является единственной протеазой, расщепляющей данный белок в физиологических условиях. Протеолиз IGFBP-4 под действием dPAPP-A происходит по специфическому участку, расположенному между аминокислотными остатками Met135 и Lys136, и в результате расщепления образуются два протеолитических фрагмента белка: N-концевой (NT-IGFBP-4) и C-концевой (CT-IGFBP-4) [12].

Ранее было показано, что уровень экспрессии dPAPP-A возрастает в атеросклеротической бляшке, а также, что dPAPP-A является маркером риска развития острого коронарного синдрома (ОКС) [13]. В ряде исследований было показано, что повышенный уровень протеолитических фрагментов IGFBP-4 (NT-IGFBP-4 и CT-IGFBP-4) ассоциирован с увеличением риска возникновения ОКС у пациентов с ИБС и наступлением смерти от ССЗ у больных диабетом 1-го типа [14, 15]. Недавно было обнаружено, что повышенный уровень протеолитических фрагментов IGFBP-4 в крови у больных сердечной недостаточностью — состоянием, которое может развиваться вследствие ОКС и инфаркта миокарда, также ассоциирован с повышенным риском летального исхода [16].

Несмотря на значительное количество исследований, демонстрирующих увеличение концентрации dPAPP-A и уровня протеолиза

IGFBP-4 в крови до начала развития осложнений при различных ССЗ, в литературе нет прямых доказательств протекания dPAPP-A-специфического протеолиза IGFBP-4 в миокарде в норме или при патологических состояниях. Поэтому данное исследование было проведено с целью установить взаимосвязь между dPAPP-A-специфическим протеолизом IGFBP-4 и гипертрофическими изменениями кардиомиоцитов, которые, как было упомянуто ранее, сопровождают многие ССЗ. Для исследования протеолиза IGFBP-4 в настоящей работе нами была разработана и охарактеризована клеточная модель гипертрофии, основанная на первичной культуре кардиомиоцитов крысы.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Все использованные биохимические реактивы имели аналитическую чистоту и были приобретены в компаниях «Sigma-Aldrich» (США), «Thermo Fisher Scientific» (США), «ICN» (США), «AppliChem» (Германия), «Merck» (США), «Диа-М» (Россия) и «Bio-Rad» (США). Реактивы, использованные для проведения культурально-биологических работ, были приобретены в компаниях «HyClone» (США), «Sigma-Aldrich» и «Costar» (Нидерланды). Вторичные антитела, специфичные к константной части иммуноглобулинов G (Fc-фрагментам) антитела мыши, конъюгированные с флуорофором Alexa-594, а также фаллоидин, конъюгированный с флуорофором Alexa-488, и краситель DAPI (4',6-диамидино-2-фенилиндол), были приобретены в компании «Thermo Fisher Scientific». Моноклональные антитела, специфичные к сердечной изоформе тропонина I (19C7, MF4), IGFBP-4 и его фрагментам (IBP3, IBP180, IBP182, IBP163), рекомбинантные IGFBP-4, dPAPP-A, NT-IGFBP-4 и CT-IGFBP-4, а также эндогенный натрийуретический пептид В-типа (BNP) человека были любезно предоставлены компанией «HyTest» (Финляндия).

Получение первичной культуры кардиомиоцитов крысы. Получение первичной культуры кардиомиоцитов крысы проводили в соответствии с методикой Степановой и соавт. [17] с некоторыми модификациями. Сердца двух/трёхдневных крыс популяции Wistar очищали от соединительной ткани, крови и сосудов, помещали в охлаждённый раствор Кребса–Рингера (25 mM NaCl, 2,5 mM KCl, 1,25 mM NaH₂PO₄, 2 mM CaCl₂, 1 mM MgCl₂, 25 mM NaHCO₃, 25 mM глюкоза, pH 7,4) и измельчали, после чего обрабатывали коллагеназой («Gibco», США) в концентрации 5 мг/мл, приготовленной на растворе Кребса–

Рингера, содержащем 50 мкМ CaCl_2 , в течение 10 мин при 37 °С. После инкубации ткань дополнительно разрушали, пипетируя смесь 30–40 раз, и после оседания крупных фрагментов ткани отбирали суспендированные клетки. Данную процедуру повторяли 4–5 раз до полного разрушения ткани и высвобождения клеток. Полученные суспензии клеток центрифугировали 10 мин при 200 g, осадки клеток ресуспендировали в среде для культивирования DMEM (модифицированная по способу Дульбекко среда Игла), содержащей 10% эмбриональной телячьей сыворотки (ЭТС, «HyClone»). Все фракции, кроме первой и второй, объединяли и повторно центрифугировали при тех же условиях для дополнительной очистки от коллагеназы. Осадок клеток ресуспендировали в культуральной среде и инкубировали в полистирольном планшете в течение 20 мин при 37 °С в атмосфере 5% CO_2 для отделения фракции примесных клеток. Суспензию неприкрепившихся клеток переносили в новый полистирольный планшет и культивировали в течение 7 дней при 37 °С в атмосфере 5% CO_2 .

Определение площади кардиомиоцитов. Измерение площади кардиомиоцитов проводили с использованием программного обеспечения ImageJ (Fiji). Указывали значение масштабной шкалы в пикселях и в мкм, после чего с использованием программы рассчитывали значения площади отдельных клеток в мкм². Для каждого снимка рассчитывали площадь 15 клеток с использованием последовательности команд Analyse-Measure, затем полученные значения использовали для расчёта среднего значения площади клетки.

Определение частоты сокращений кардиомиоцитов. Частоту сокращений кардиомиоцитов определяли, фиксируя сокращение во времени в 10 точках культуры, чтобы убедиться в равномерности и регулярности сокращений, после чего проводили пересчёт на количество ударов в минуту.

Иммуноцитохимическое окрашивание клеток. Первичную культуру кардиомиоцитов и примесных клеток промывали фосфатно-солевым буфером (ФСБ) от компонентов среды, после чего проводили фиксацию и пермеабиллизацию мембран клеток в присутствии 4% параформальдегида и 0,1% (w/v) Triton X-100 соответственно в течение 15 мин при комнатной температуре. Затем клетки промывали несколько раз ФСБ и инкубировали в присутствии 1% ЭТС в течение 30 мин для блокирования неспецифической сорбции антител. После промывки к клеткам добавляли первичные антитела, специфичные к тропонину I, в указанных производи-

телем разведениях и инкубировали в течение ночи при 4 °С. После промывки клетки инкубировали в присутствии вторичных антител, специфичных к Fc-фрагментам антител мыши и конъюгированных с флуоресцентной меткой Alexa-594, в течение часа при комнатной температуре. Инкубации с фаллоидином, конъюгированным с флуорофором Alexa-488 и ядерным красителем DAPI, в указанных производителем разведениях также проводили в течение часа при комнатной температуре. После инкубации клетки трижды промывали ФСБ. Полученные препараты визуализировали с использованием флуоресцентного инвертированного микроскопа («EVOS FL Color», США).

Протеолитическое расщепление IGFBP-4 под действием RAPP-A в культурах клеток. Протеолиз IGFBP-4 в кондиционированной среде кардиомиоцитов и примесных клеток проводили по методике Laurson et al. [18] с некоторыми модификациями. Для проведения протеолиза IGFBP-4 использовали 10-кратную субстратную смесь, приготовленную на Tris-солевом буфере (20 мМ Tris-HCl, 150 мМ NaCl, pH 7,4) и содержащую 3 мкг/мл рекомбинантного IGFBP-4 человека, 0,85 мкг/мл рекомбинантного IGF-II человека («Sigma-Aldrich») и 2 мМ CaCl_2 . После приготовления субстратную смесь инкубировали 30 мин при комнатной температуре для формирования комплекса IGFBP-4 с IGF-II, после чего добавляли в кондиционированную среду к кардиомиоцитам в лунки 24-луночного планшета (по 40 мкл в лунку) и инкубировали в термостате при 37 °С в атмосфере 5% CO_2 в течение 30 мин, 3 или 24 ч. По окончании инкубации отбирали кондиционированную среду из лунок и останавливали реакцию добавлением ЭДТА до конечной концентрации 5 мМ. В полученных образцах кондиционированной среды проводили измерение концентраций NT-IGFBP-4, CT-IGFBP-4 и BNP методом флуороиммунного анализа «сэндвич»-типа, как описано ниже. Полученные значения концентраций NT-IGFBP-4, CT-IGFBP-4 и BNP нормировали на количество клеток в каждой лунке. Для определения количества клеток культуру кардиомиоцитов в каждой лунке трипсинизировали с использованием 0,25%-ного раствора трипсин-ЭДТА и проводили подсчёт клеток в камере Горяева с использованием раствора трипанового синего.

Детекция NT-IGFBP-4, CT-IGFBP-4 и BNP методом одностадийного флуороиммунного анализа «сэндвич»-типа (ФИА). Концентрации NT-IGFBP-4 и CT-IGFBP-4 в культуральных средах определяли методом неопитоп-специфичного флуороиммунного анализа «сэндвич»-типа с использованием пар антител IBP3-IBP180Eu³⁺

(определение концентрации NT-IGFBP-4) и IBP182-IBP163Eu³⁺ (определение концентрации СТ-IGFBP-4), как описано Konev et al. [15]. Концентрацию BNP определяли аналогичным методом с использованием пары антител 24C5-AbBNP2Eu³⁺, как описано в статье Semenov et al. [19]. Для проведения ФИА антитела подложки (20 мкг/мл, 0,1 мл/лунка в ФСБ) сорбировали на поверхность лунок 96-луночного полистирольного планшета при перемешивании в течение 30 мин при комнатной температуре. Затем лунки промывали 10 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, 0,025% (v/v) Tween 20 и 0,05% NaN₃, pH 7,8 (буфер А). После этого в каждую лунку планшета вносили 0,05 мл образца, разведённого в буфере для анализа (50 mM Tris-HCl, 0,9% NaCl, 0,01% (v/v) Tween 40, 0,5% бычьего сывороточного альбумина, 0,05% NaN₃, pH 7,7) и 0,05 мл детекторных антител (4 мкг/мл), конъюгированных со стабильным хелатом европия (Eu³⁺). Планшеты инкубировали 30 мин при комнатной температуре при постоянном перемешивании. После промывания буфером А в лунки планшета вносили по 0,2 мл раствора для усиления флуоресценции и затем детектировали флуоресценцию на планшетном анализаторе Victor X («Perkin Elmer», США).

Индукция гипертрофии в культурах кардиомиоцитов под действием эндотелина-1. Перед проведением эксперимента в лунках с клетками проводили смену культуральной среды на DMEM, содержащую 1% ЭТС. В лунки с кардиомиоцита-

ми вносили водный раствор эндотелина-1 («Sigma-Aldrich») в диапазоне концентраций 20–100 нМ. В контрольные лунки добавляли воду. Инкубировали клетки с эндотелином-1 в течение 24 и 48 ч при 37 °С в атмосфере 5% CO₂. О наличии гипертрофии судили по увеличению площади поверхности кардиомиоцитов (см. раздел «Определение площади кардиомиоцитов»), инкубированных с эндотелином-1 по сравнению с контрольными кардиомиоцитами.

Статистическую обработку результатов измерений площади кардиомиоцитов и концентраций NT-IGFBP-4, СТ-IGFBP-4 и BNP в норме и при гипертрофии проводили, используя *t*-критерий Стьюдента. Данные представлены как среднее значение ± квадратичное отклонение. Различия считали достоверными при $p \leq 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

Получение первичной культуры кардиомиоцитов из неонатальных крыс и ее характеристика. Через 4 дня после выделения клеточная культура, полученная из сердец неонатальных крыс, приобретала соответствующий кардиомиоцитам фенотип (рис. 1, а) и демонстрировала сокращение с частотой ~11 ударов/мин. С 4 по 7 день культивирования кардиомиоцитов частота сокращения не менялась. Процентное содержание кардиомиоцитов в полученной культуре определяли иммуноцитохимически, проводя

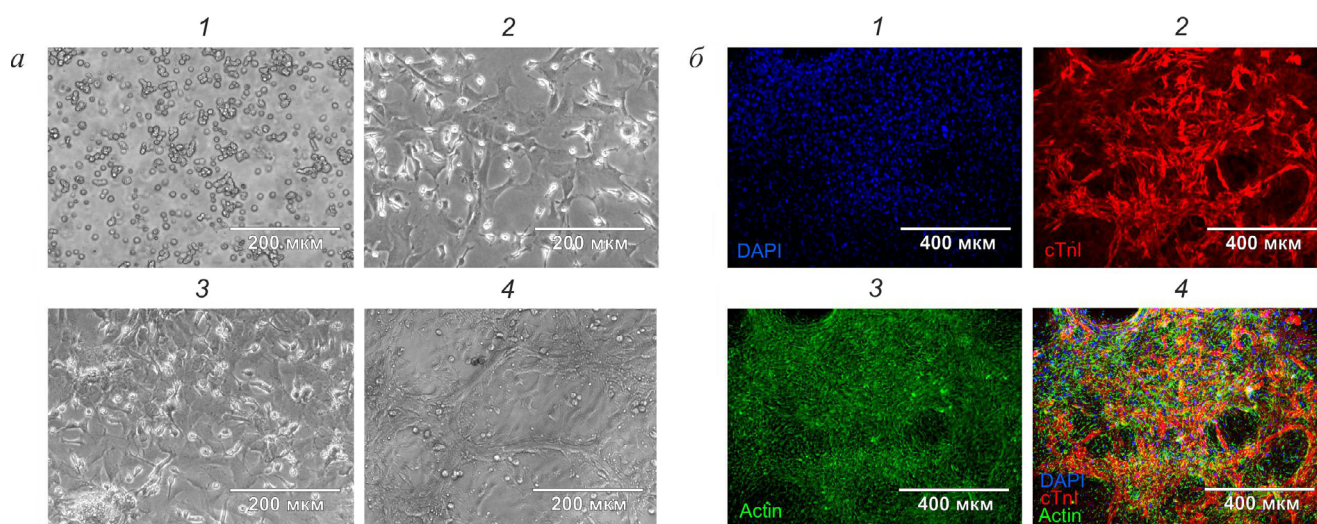


Рис. 1. Характеристика типичной первичной культуры кардиомиоцитов крысы. а – Микрофотографии кардиомиоцитов, сделанные в режиме фазового контраста в процессе культивирования культуры в определенные промежутки времени: 1 – 1 день; 2 – 4 дня; 3 – 6 дней; 4 – 7 дней. б – Иммунофлуоресцентное окрашивание полученной культуры (7 дней) с использованием: флуоресцентного ядерного красителя DAPI (1); антител, специфичных к сердечной изоформе тропонина I человека, конъюгированных с флуоресцентной меткой Alexa-594 (2); фаллоидина, конъюгированного с флуоресцентной меткой Alexa-488 (3); наложение фотографий, сделанных в трёх флуоресцентных каналах при одинаковом увеличении (4)

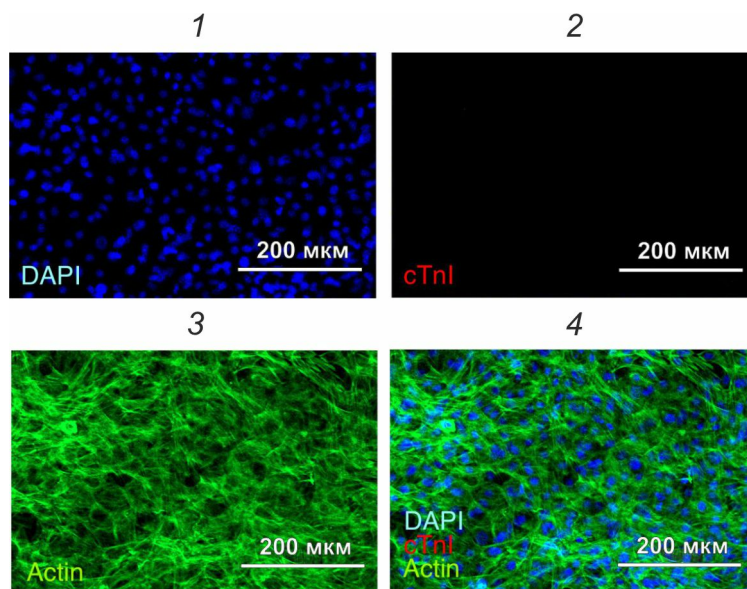


Рис. 2. Иммунофлуоресцентное окрашивание культуры примесных клеток с использованием: флуоресцентного ядерного красителя DAPI (1); антител, специфичных к сердечной изоформе тропонина I человека, конъюгированных с флуоресцентной меткой Alexa-594 (2); фаллоидина, конъюгированного с флуоресцентной меткой Alexa-488 (3); наложение фотографий, сделанных в трёх флуоресцентных каналах при одинаковом увеличении (4)

окрашивание моноклональными антителами, специфичными к сердечной изоформе тропонина I (специфическому маркёру кардиомиоцитов), и рассчитывая отношение клеток с детектированным тропонином I к общему числу клеток для каждого снимка. Количество кардиомиоцитов в полученных культурах составило 70–90% (рис. 1, б).

Остальные 10–30% клеток в полученных культурах, по всей видимости, были представлены примесными клетками, содержащимися в сердечной ткани. Для того чтобы в дальнейшем оценить суммарный вклад этих клеток в dPAPP-A-специфическую протеолитическую деградацию IGFBP-4 в сравнении с кардиомиоцитами, в ходе выделения мы также получили и охарактеризовали изолированную культуру примесных клеток, не содержащую кардиомиоциты (рис. 2). Получение культуры примесных клеток проводили, как описано в разделе «Материалы и методы». Результаты иммунофлуоресцентного окрашивания культуры примесных клеток представлены на рис. 2.

dPAPP-A-специфический протеолиз IGFBP-4 в первичной культуре кардиомиоцитов крысы. Известно, что dPAPP-A расщепляет IGFBP-4 в кондиционированной среде фибробластов [12] и фолликулярной жидкости яичника человека [20], быка, свиньи и лошади [21], а также секретируется в среду такими типами клеток, как гранулезные клетки [22], гладкомышечные

клетки сосудов [23], клетки стромы эндометрия [24], адипоциты сердечной ткани [25], клетки эндотелия коронарной артерии человека [26] и клетки-предшественники сердца человека [27]. В качестве модели для исследования протеолиза IGFBP-4 в сердечной ткани в нашей работе мы использовали первичную культуру кардиомиоцитов крысы, содержание кардиомиоцитов в которой составляло 70–90%. Протеолитическое расщепление IGFBP-4 в кондиционированной среде кардиомиоцитов и определение концентраций NT-IGFBP-4 и CT-IGFBP-4 проводили, как описано в разделе «Материалы и методы». Как видно на рис. 3, NT-IGFBP-4 (рис. 3, а) и CT-IGFBP-4 (рис. 3, б) образуются в ходе протеолиза IGFBP-4 в кондиционированной среде кардиомиоцитов.

Концентрации фрагментов IGFBP-4 в кондиционированной среде (рис. 3, кривая 2) через 1, 3 и 24 ч после начала реакции протеолиза составляли $5,3 \pm 4,2$ нг/мл, $50,1 \pm 8,1$ нг/мл и $98,3 \pm 12,2$ нг/мл (NT-IGFBP-4) и $4,9 \pm 4,2$ нг/мл, $43,1 \pm 8,3$ нг/мл и $95,9 \pm 15,4$ нг/мл (CT-IGFBP-4), т.е. концентрация фрагментов IGFBP-4 в кондиционированной среде увеличивалась во времени, в то время как в образцах стерильной культуральной среды образования фрагментов обнаружено не было (рис. 3, кривая 4). Также NT-IGFBP-4 и CT-IGFBP-4 не были обнаружены в кондиционированной среде кардиомиоцитов в нулевой момент протеолитической реак-

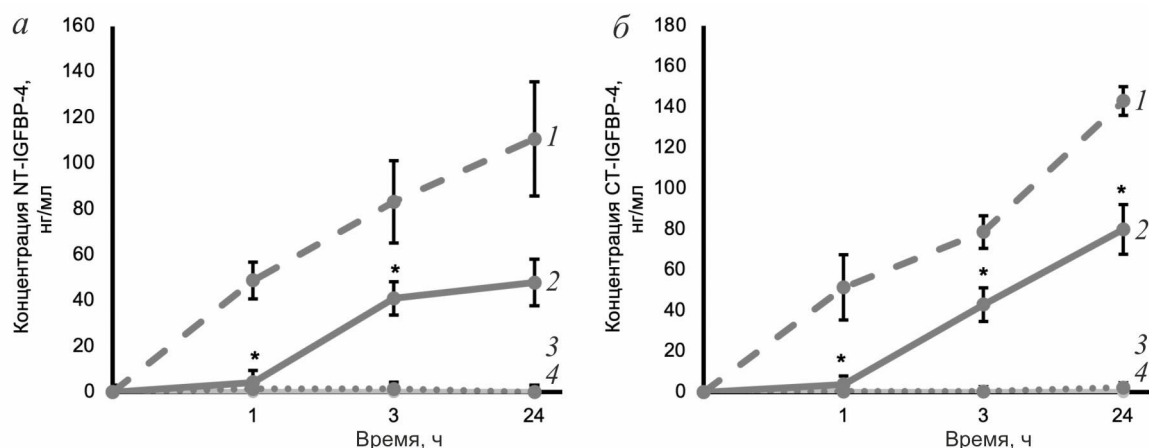


Рис. 3. Динамика образования NT-IGFBP-4 (а) и СТ-IGFBP-4 (б) в ходе протеолитической реакции IGFBP-4 в течение 1, 3 и 24 ч. Стерильная среда DMEM, проинкубированная с субстратной смесью в присутствии рекомбинантного dPAPP-A (кривая 1, пунктирная линия); кондиционированная клеточная среда, проинкубированная с субстратной смесью в присутствии первичной культуры кардиомиоцитов крысы (кривая 2, серая сплошная линия); стерильная среда DMEM проинкубированная с субстратной смесью (кривая 3, линия из точек); стерильная среда DMEM, проинкубированная аналогичные промежутки времени (кривая 4, светло-серая сплошная линия); $n = 12$, * $p < 0,05$

ции. После инкубации стерильной среды DMEM с субстратной смесью в течение аналогичных промежутков времени образования NT-IGFBP-4 и СТ-IGFBP-4 не было выявлено (рис. 3, кривая 3). При этом при проведении протеолитической реакции в стерильной среде (рис. 3, кривая 1) в присутствии 500 нг/мл добавленного экзогенно dPAPP-A концентрации NT-IGFBP-4 и СТ-IGFBP-4, определенные методом ФИА, через 1, 3 и 24 ч, были в 2 раза выше, чем при отсутствии PAPP-A, что говорит о том, что dPAPP-A проявляет протеолитические свойства в данной среде, и данная модель подходит для изучения протеолиза IGFBP-4 под действием dPAPP-A.

Однако, как уже упоминалось ранее, dPAPP-A и фрагменты IGFBP-4 обнаруживаются в культуральной среде фибробластов человека [12] и эндотелиальных клетках коронарной артерии человека [26]. Данные типы клеток широко представлены в сердечной ткани [28] и могут соочищаться при выделении культуры кардиомиоцитов из сердца, т.е. входить во фракцию примесных клеток. Следовательно, можно ожидать, что кардиофибробласты и эндотелиальные клетки, присутствующие в полученной культуре кардиомиоцитов в количестве 10–30% от общего числа клеток, потенциально могут вносить вклад в наблюдаемую нами протеолитическую деградацию IGFBP-4. Для вычисления вклада dPAPP-A, секретируемого примесными клетками, в итоговый уровень протеолиза IGFBP-4 мы измерили концентрации NT-IGFBP-4 и СТ-IGFBP-4 в кондиционированной среде изолированной культуры примесных клеток, которую

получили и охарактеризовали ранее (рис. 4), и сравнили полученные значения со значениями концентраций NT-IGFBP-4 и СТ-IGFBP-4 в кондиционированной среде культуры с 70%-ным содержанием кардиомиоцитов, специально полученной для решения этой задачи.

Как видно из представленных результатов, в случае культуры примесных клеток (рис. 4) наблюдается накопление NT-IGFBP-4 и СТ-IGFBP-4 в кондиционированной среде. Концентрации NT-IGFBP-4 и СТ-IGFBP-4 в культуре примесных клеток через 3 и 24 ч после начала протеолитической реакции составили 20 и 60 нг/мл и 5 и 50 нг/мл соответственно. В случае культуры кардиомиоцитов уровень наблюдае-

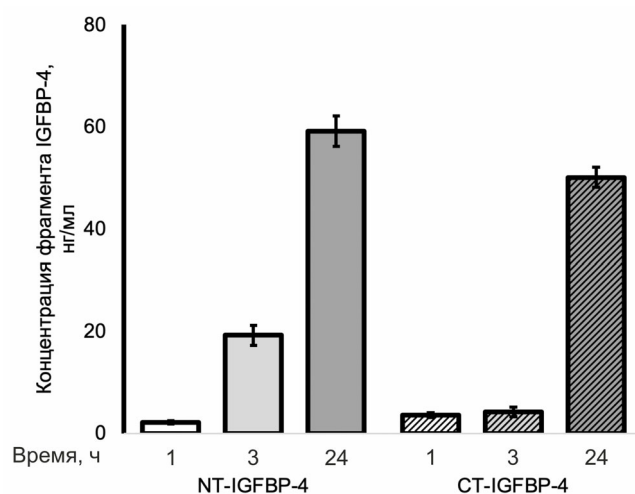


Рис. 4. Накопление NT-IGFBP-4 и СТ-IGFBP-4 в кондиционированной среде культуры примесных клеток; $n = 3$

мого нами dPAPP-A-специфичного протеолиза IGFBP-4 оказался приблизительно в 2,5–3 раза выше по сравнению с фракцией примесных клеток: концентрации NT-IGFBP-4 и CT-IGFBP-4 составляют 60 и 150 нг/мл и 20 и 110 нг/мл соответственно.

Далее, используя результаты иммунофлуоресцентного окрашивания и учитывая концентрации NT-IGFBP-4 и CT-IGFBP-4 в кондиционированной среде обеих культур, мы рассчитали вклад фракции примесных клеток в протеолитическую деградацию IGFBP-4 в полученной культуре кардиомиоцитов. В том случае, когда культура кардиомиоцитов имеет 70%-ную чистоту (содержит 30% примесных клеток), концентрации NT-IGFBP-4 и CT-IGFBP-4, которые образуются в результате секреции PAPP-A примесными клетками, будут в 3,3 раза ниже, чем в кондиционированной среде культуры, состоящей на 100% из примесных клеток. Таким образом, вклад протеолитической деградации IGFBP-4, осуществляемый dPAPP-A, секретиремого примесными клетками, в итоговые концентрации NT-IGFBP-4 и CT-IGFBP-4 во всех случаях составляет преимущественно 10–13%. Следовательно, можно ожидать, что в случае культуры кардиомиоцитов, имеющей чистоту 90%, вклад примесных клеток в итоговый уровень dPAPP-A-специфичного протеолиза IGFBP-4 будет ещё ниже и составит 3–4%. Таким образом, полученные нами данные свидетельствуют о том, что наблюдаемый нами dPAPP-A-специфичный протеолиз IGFBP-4 в основном ассоциирован с кардиомиоцитами, а не с примесными клетками.

Известно, что специфический протеолиз IGFBP-4 под действием dPAPP-A может проис-

ходить преимущественно в условиях, когда IGFBP-4 находится в комплексе с IGF-II [29, 30]. Как видно на рис. 5, проведение протеолитической реакции IGFBP-4 в присутствии IGF-II (рис. 5, а и б; кривая 1) приводит к возрастанию концентраций NT-IGFBP-4 и CT-IGFBP-4 в кондиционированной среде кардиомиоцитов в 3–4 раза по сравнению с их концентрациями, определенными после проведения протеолиза в аналогичных условиях, но при отсутствии IGF-II (рис. 5, а и б; кривая 2).

Таким образом, суммируя полученные результаты, представленные на рис. 3–5, можно заключить: 1) протеолиз IGFBP-4 происходит в кондиционированной среде первичной культуры кардиомиоцитов и преимущественно ассоциирован именно с кардиомиоцитами, а не с примесными клетками; 2) детекция NT-IGFBP-4 и CT-IGFBP-4 с использованием антител, специфичных к неоэпиту, образующемуся в результате специфического расщепления IGFBP-4 под действием dPAPP-A, а также необходимость IGF-II для реализации наблюдаемого протеолиза позволяют предположить, что протеолиз IGFBP-4 в кондиционированной среде кардиомиоцитов происходит под действием PAPP-A.

Моделирование гипертрофического ответа кардиомиоцитов крысы под действием эндотелина-1. Первичная культура кардиомиоцитов хорошо известна как *in vitro* модель для исследования механизмов гипертрофии сердечной ткани [31–33]. Одним из методов индукции гипертрофии является длительная (более 24 ч) инкубация кардиомиоцитов в присутствии эндотелина-1 в диапазоне концентраций 10–100 нМ [34–37].

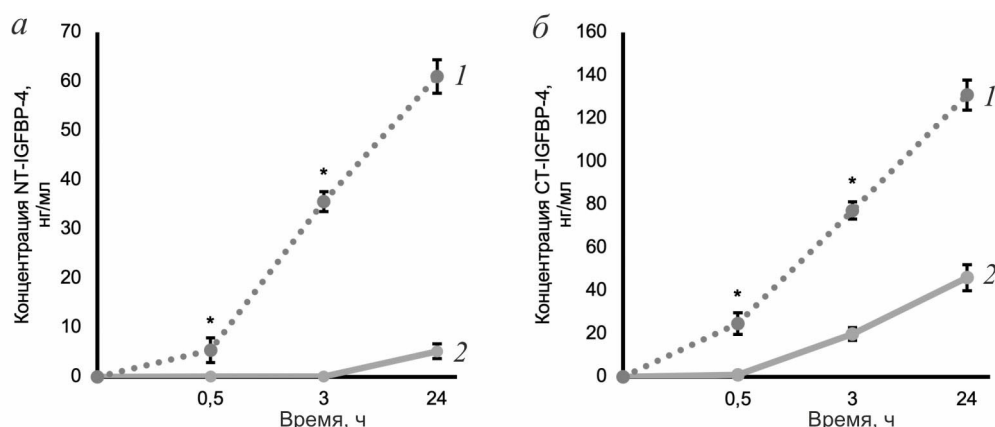


Рис. 5. Образование NT-IGFBP-4 (а) и CT-IGFBP-4 (б) в ходе протеолитического расщепления IGFBP-4 в кондиционированной среде первичной культуры кардиомиоцитов в присутствии (кривая 1, линия из точек) и при отсутствии IGF-II (кривая 2, сплошная линия). Данные представлены как среднее значение $\pm$ квадратичное отклонение; $n = 3$, $*p < 0,05$ по сравнению с контролем без IGF-II

a

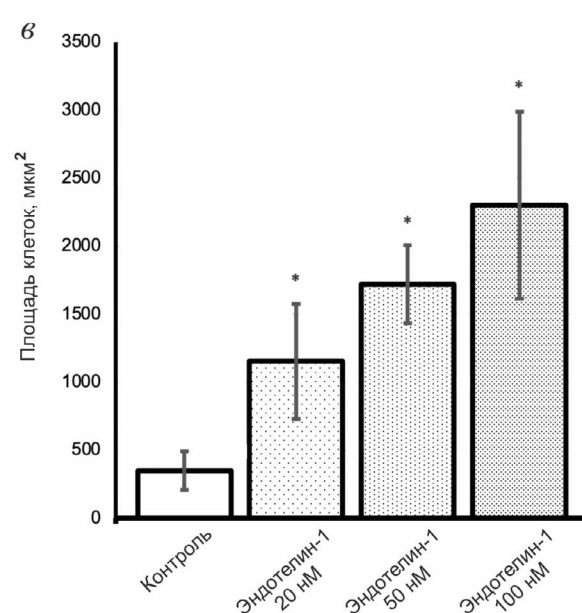
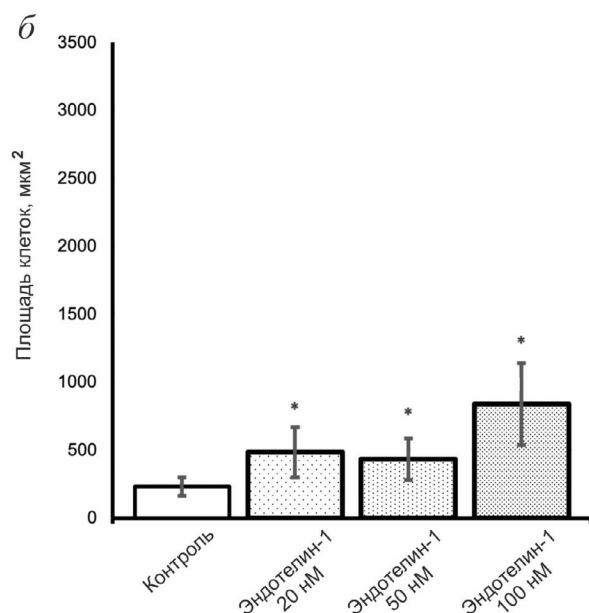
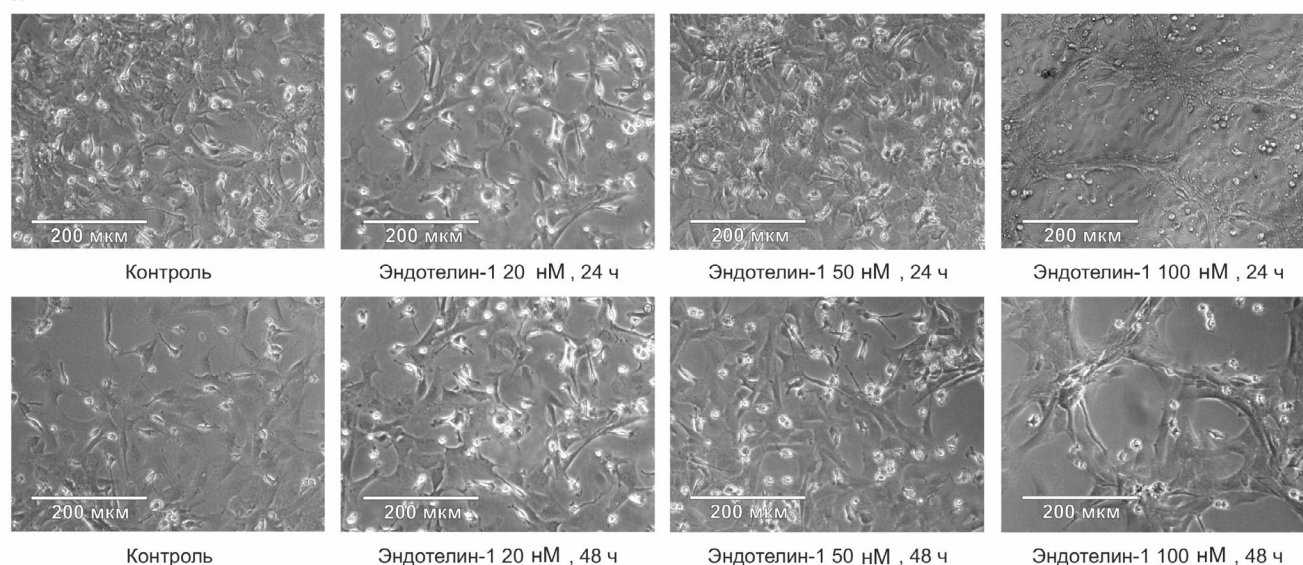


Рис. 6. Индукция гипертрофии в первичной культуре кардиомиоцитов крысы под действием эндотелина-1. *a* – Фотографии кардиомиоцитов после инкубации с различными концентрациями эндотелина-1, сделанные в режиме фазового контраста; *б* – зависимость площади кардиомиоцитов от концентрации эндотелина-1 при инкубации в течение 24 ч; *в* – зависимость площади кардиомиоцитов от концентрации эндотелина-1 при инкубации в течение 48 ч; $n = 15$, * $p < 0,05$ по сравнению с контролем без эндотелина

Как видно из результатов (рис. 6), площадь поверхности кардиомиоцитов после инкубации в культуральной среде, содержащей 20, 50 и 100 нМ эндотелина-1, в течение 24 ч (рис. 6, *б*) и 48 ч (рис. 6, *в*) инкубации увеличивается в среднем в 2, 1,8 и 4,5 раза и в 3,2, 4,4 и 6,4 раза соответственно по сравнению с площадью контрольных кардиомиоцитов (культивированных без добавления эндотелина-1).

Мы также обнаружили, что после инкубации кардиомиоцитов с эндотелином-1 в концентра-

ции 20 нМ в кондиционированной среде наблюдается повышенное по сравнению с контрольными клетками содержание маркера сердечной недостаточности – натрийуретического пептида типа В (BNP) (рис. 7).

Кардиомиоциты инкубировали 24 и 48 ч в присутствии или при отсутствии 20 нМ эндотелина-1, после чего определяли концентрацию BNP в культуральных средах методом флуориметрического анализа «сэндвич»-типа с использованием антител, специфичных к BNP. Из пред-

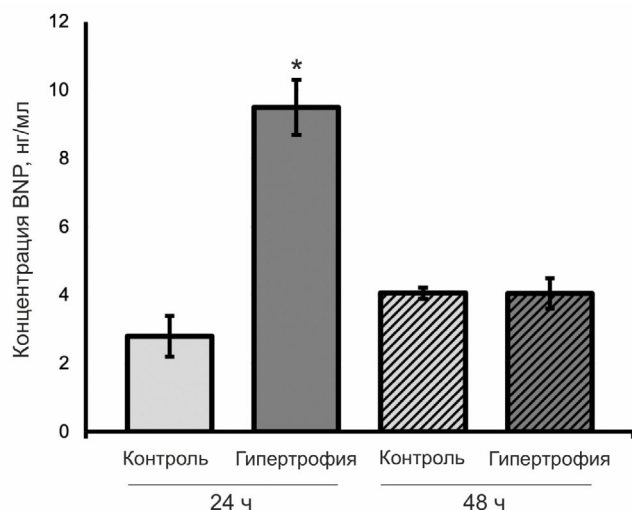


Рис. 7. Концентрация BNP в кондиционированной среде первичной культуры кардиомиоцитов после инкубации с эндотелином-1 в концентрации 20 нМ. В кондиционированную среду контрольных клеток добавляли воду; $n = 5$, * $p < 0,05$

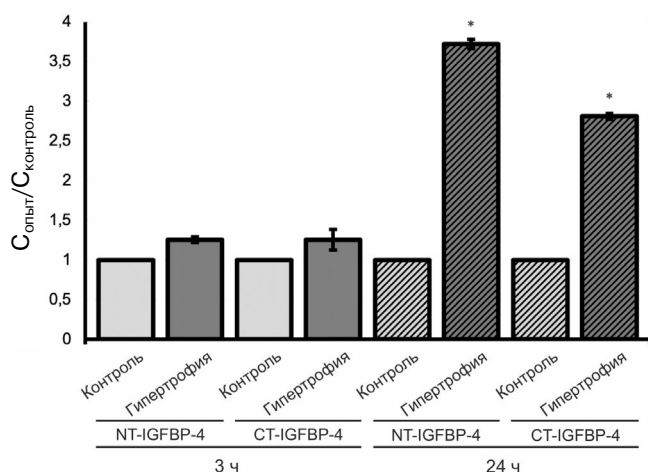


Рис. 8. Концентрация NT-IGFBP-4 и CT-IGFBP-4 в кондиционированной среде первичной культуры кардиомиоцитов крысы в норме и при гипертрофии. Отношение $C_{\text{опыт}}/C_{\text{контроль}}$ соответствует отношению концентраций фрагментов IGFBP-4, измеренных в кондиционированной среде гипертрофированных кардиомиоцитов ($C_{\text{опыт}}$) и контрольных кардиомиоцитов ($C_{\text{контроль}}$); $n = 7$, * $p < 0,05$

ставленных результатов видно, что после 24-часовой инкубации с эндотелином-1 концентрация BNP в гипертрофированной культуре в 3 раза превышает концентрацию BNP в кондиционированной среде контрольных клеток (рис. 7). Следует отметить, что инкубация кардиомиоцитов с аналогичной концентрацией эндотелина-1 в течение 48 ч не приводит к увеличению концентрации BNP в кондиционированной среде. Мы

связываем это с цитотоксическим влиянием эндотелина-1 при длительных инкубациях. Этот эффект не был напрямую нами исследован, однако при подсчёте клеток после каждого эксперимента мы наблюдали значительное уменьшение количества жизнеспособных кардиомиоцитов в культуре, инкубированной с эндотелином-1 по сравнению с контрольными клетками.

Таким образом, инкубация первичной культуры кардиомиоцитов в присутствии эндотелина-1 в концентрации 20 нМ в течение 24 ч подходит для моделирования гипертрофического ответа кардиомиоцитов, и дальнейшие исследования мы проводили при этой концентрации эндотелина-1.

Исследование протеолиза IGFBP-4 в первичной культуре кардиомиоцитов при гипертрофии. Чтобы исследовать, связано ли увеличение концентраций фрагментов IGFBP-4 с гипертрофическим ответом кардиомиоцитов, мы измерили концентрацию протеолитических фрагментов IGFBP-4 в культуре кардиомиоцитов при гипертрофии. Концентрации NT-IGFBP-4 и CT-IGFBP-4, измеренные после протеолиза IGFBP-4, проведённого в течение 3 и 24 ч в кондиционированной среде гипертрофированных кардиомиоцитов, превышали значения концентраций фрагментов в контрольных клетках в 1,2 и 3,7 раза для NT-IGFBP-4 и в 1,2 и 2,8 раза — для CT-IGFBP-4 соответственно (рис. 8).

Однако из данных литературы известно, что инкубация в течение 24–48 ч в присутствии эндотелина-1 в концентрации 10–100 нМ приводит к активации пролиферации кардиофибробластов [38]. Поскольку кардиофибробласты с

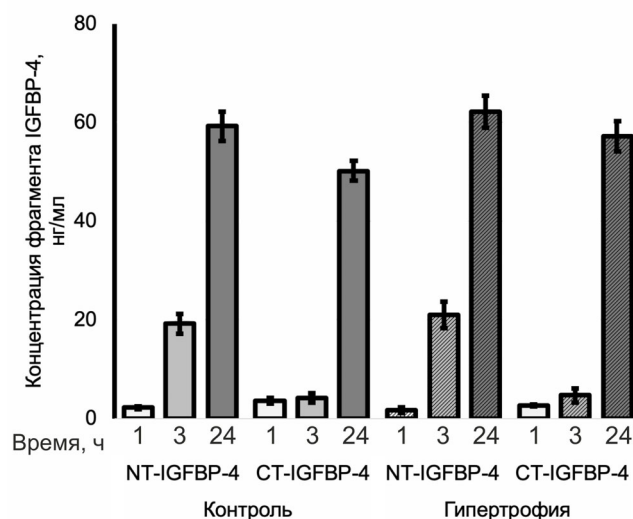


Рис. 9. Концентрация NT-IGFBP-4 и CT-IGFBP-4 в кондиционированной среде культуры примесных клеток при гипертрофии; $n = 3$

высокой вероятностью присутствуют во фракции примесных клеток, это может способствовать усилению PAPP-A-специфичной деградации IGFBP-4, не связанной с кардиомиоцитами. Для того чтобы проверить, как влияет инкубация с эндотелином-1 на количество примесных клеток, мы провели подсчёт примесных клеток до и после 24-часовой инкубации с 20 нМ эндотелином-1. Мы обнаружили, что после инкубации изолированной культуры примесных клеток с эндотелином-1 наблюдается увеличение их количества в 1,5 раза, что согласуется с литературными данными о стимулирующем эффекте эндотелина-1 на пролиферацию кардиофибробластов. Далее мы определили уровень dPAPP-A-специфичного протеолиза IGFBP-4 в кондиционированной среде до и после инкубации культуры примесных клеток с 20 нМ эндотелином-1 в течение 24 ч (рис. 9).

Из представленных результатов видно, что в случае примесной клеточной фракции инкубация с эндотелином-1 не приводила к статистически достоверному изменению уровня dPAPP-A-специфичного протеолиза IGFBP-4. Полученные результаты подтверждают тот факт, что усиление протеолитической деградации IGFBP-4 под действием dPAPP-A при гипертрофии ассоциировано именно с кардиомиоцитами, а не с примесными клетками.

Таким образом, в используемой модели при гипертрофическом ответе кардиомиоцитов крысы наблюдается увеличение уровня протеолиза IGFBP-4 по сравнению с контрольными клетками.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Исследование прогностических маркёров ССЗ и установление причин, приводящих к возрастанию их концентраций в крови при развитии различных патологических состояний, является важной задачей как с фундаментальной научной, так и с прикладной биомедицинской точек зрения. В нашей работе мы исследовали механизмы, приводящие к увеличению в крови концентраций фрагментов IGFBP-4 — прогностических маркёров развития таких ССЗ, как СН, ишемическая болезнь сердца и острый коронарный синдром [13–16], а также ассоциированных с повышенным риском смертности после перенесенного инфаркта миокарда и при острой сердечной недостаточности [39]. Настоящее исследование было посвящено установлению взаимосвязи между уровнем протеолиза IGFBP-4 под действием PAPP-A в кардиомиоцитах и их гипертрофическими изменениями, которые

сопровождает различные ССЗ. В нашей работе мы впервые продемонстрировали на модели первичной культуры кардиомиоцитов крысы, что dPAPP-A-специфичный протеолиз IGFBP-4 протекает в кондиционированной среде кардиомиоцитов. Мы также провели моделирование гипертрофического ответа кардиомиоцитов и впервые установили, что гипертрофические изменения кардиомиоцитов приводят к повышению уровня протеолиза IGFBP-4 по сравнению с контрольными негипертрофированными кардиомиоцитами.

Из литературных данных известно, что протеолиз IGFBP-4 под действием PAPP-A протекает в кондиционированной среде различных клеточных линий [12, 21–27]. Однако на сегодняшний день в литературе нет данных о том, происходит ли протеолитическая деградация IGFBP-4 под действием PAPP-A в кондиционированной среде кардиомиоцитов. В качестве модели для исследования протеолиза IGFBP-4 в кардиомиоцитах мы использовали первичную культуру кардиомиоцитов неонатальных крыс, которая широко применяется для изучения различных процессов, протекающих в миокарде [31–33, 40–42]. Несомненным преимуществом данной модельной системы является её приближённость по физиологическим свойствам к ткани сердечной мышцы. Однако использование такой культуры сопряжено с рядом сложностей, главной из которых является её гетерогенность (содержание кардиомиоцитов в ней составляет 70–90%, остальная часть клеток представлена кардиофибробластами и клетками эндотелия). Контаминация культуры кардиомиоцитов другими типами клеток сердечной ткани может вносить свой вклад в изучаемые молекулярные механизмы, влияя на исход эксперимента. Нам удалось впервые провести протеолитическое расщепление IGFBP-4 в кондиционированной среде кардиомиоцитов и детектировать NT-IGFBP-4 и CT-IGFBP-4 с использованием пар антител, специфичных к неоэпитопам, образующимся на N- и C-фрагментах в результате протеолиза IGFBP-4 под действием dPAPP-A. Из литературных данных известно, что фибробласты и эндотелиальные клетки способны секретировать dPAPP-A [12, 26], следовательно, присутствие таких типов клеток в итоговой первичной культуре кардиомиоцитов может влиять на наблюдаемую нами протеолитическую деградацию IGFBP-4. В связи с этим мы оценили вклад суммарной фракции примесных клеток в dPAPP-A-специфичную деградацию IGFBP-4, наблюдаемую нами в первичной культуре кардиомиоцитов, который составил примерно 10–13% от общего уровня итогового про-

теолиза IGFBP-4 в случае культуры кардиомиоцитов 70%-ной чистоты. В случае, когда чистота культуры кардиомиоцитов достигала 90%, можно предположить, что вклад суммарной фракции примесных клеток в dPAPP-A-специфичную деградацию IGFBP-4 будет составлять 3–4%. Таким образом, мы впервые продемонстрировали, что PAPP-A-специфичный протеолиз IGFBP-4 протекает в первичной культуре неонатальных кардиомиоцитов крысы, и он ассоциирован преимущественно с кардиомиоцитами, а не с примесными клетками. Интересным фактом является то, что динамика накопления NT-IGFBP-4 и CT-IGFBP-4 в кондиционированных средах кардиомиоцитов и примесных клеток различается. Вероятно, это связано с тем, что состав кондиционированных сред в случае обеих культур, которые представлены данными типами клеток, также может быть разным. Кондиционированные среды кардиомиоцитов и примесных клеток могут содержать компоненты (например, различные протеазы), которые могут по-разному влиять на стабильность NT-IGFBP-4 и CT-IGFBP-4 (особенно при длительных инкубациях) и, как следствие, на их детекцию с использованием ФИА «сэндвич»-типа. Мы также обнаружили, что для реализации протеолиза IGFBP-4 в кондиционированной среде кардиомиоцитов необходимо присутствие IGF-II, что согласуется с данными литературы [29, 30]. Таким образом, мы впервые показали возможность протекания dPAPP-A-специфичного протеолиза IGFBP-4 в первичной культуре кардиомиоцитов крысы в норме и доказали, что наблюдаемая нами PAPP-A-специфичная деградация IGFBP-4 ассоциирована именно с кардиомиоцитами, а не примесными клетками, что является новыми данными, не представленными в литературе. Основываясь на литературных данных [4, 7, 27], можно предположить, что расщепление IGFBP-4 под действием dPAPP-A будет приводить к разрушению комплекса IGFBP-4 с IGF, высвобождению IGF и активации в миокарде таких процессов, как пролиферация, миграция и клеточный рост. Регенеративные свойства IGF хорошо изучены и описаны для широкого спектра клеточных линий и активно используются для терапии различных заболеваний [43–45]. Следовательно, по аналогии с предыдущими исследованиями можно ожидать, что высвобождение IGF в результате dPAPP-A-зависимого протеолиза IGFBP-4 может быть важным механизмом для поддержания жизнеспособности кардиомиоцитов в норме.

В значительном количестве исследований было показано, что экспрессия dPAPP-A и повышенный уровень протеолиза IGFBP-4 ассо-

циированы с риском развития таких ССЗ, как ИБС и ОКС, а также риском смертности у пациентов после перенесенного инфаркта миокарда и при острой СН [13–16, 39], однако механизмы, лежащие в основе этих явлений, не исследованы. В этой связи важно было изучить возможные причины увеличения уровня протеолиза IGFBP-4 при ССЗ. В настоящем исследовании мы предположили, что одним из факторов, способствующих увеличению уровня протеолиза IGFBP-4, может быть гипертрофическое изменение сердечной мышцы, выражающееся в увеличении размеров кардиомиоцитов и ускорении в них белкового синтеза в ответ на физиологические или патологические стимулы. В нашей работе нам удалось смоделировать гипертрофический ответ на первичной культуре кардиомиоцитов крысы с использованием эндотелина-1. Данный подход хорошо описан в ряде исследований [35–37]. После 24-часовой инкубации с 20 нМ эндотелином-1 кардиомиоциты существенно увеличивались в размерах и демонстрировали значительное увеличение секреции маркера гипертрофии BNP, что согласуется с данными, описанными в литературе [36, 37]. Измерив концентрации NT-IGFBP-4 и CT-IGFBP-4 в кондиционированной среде кардиомиоцитов после индукции гипертрофии, мы обнаружили, что уровень протеолиза IGFBP-4 в кондиционированной среде гипертрофированной культуры в несколько раз превышает таковой в контрольных негипертрофированных кардиомиоцитах. При этом в условиях индукции гипертрофии (инкубация с 20 нМ эндотелином-1 в течение 24 ч) в культуре кардиомиоцитов хоть и наблюдается увеличение общего количества примесных клеток в 1,5 раза, усиления PAPP-A-специфичного протеолиза IGFBP-4 при этом не происходит. Таким образом, повышение уровня PAPP-A-специфичного протеолиза IGFBP-4 при гипертрофии связано исключительно с гипертрофическими изменениями кардиомиоцитов, а не с воздействием эндотелина-1 на примесные клетки, содержащиеся в используемой культуре. Эти данные впервые позволяют обозначить взаимосвязь между возрастанием концентраций NT-IGFBP-4 и CT-IGFBP-4 и гипертрофическими изменениями кардиомиоцитов, которые, как упоминалось выше, сопровождают многие ССЗ и проявляют функцию dPAPP-A в миокарде в норме и при его гипертрофических изменениях. По всей видимости, усиление dPAPP-A-зависимого протеолиза IGFBP-4 при гипертрофии будет приводить к повышенной по сравнению с нормой активации IGF. Данные о функциях IGF при патологиях миокарда достаточно противоречивы. С одной стороны, в ряде

исследований подробно описаны кардиопротекторные свойства IGF при различных сердечно-сосудистых патологиях, в том числе и при гипертрофии [46–49]. В 2009 г. Vinciguerra et al. [46] продемонстрировали, что гиперэкспрессия IGF-I в неонатальных кардиомиоцитах, переведённых в гипертрофированное состояние, повышает экспрессию кардиопротекторных генов (генов, экспрессия которых ассоциирована с низкой вероятностью возникновения ССЗ), таких, как гены адипонектина, разобщающего белка 1 (UCP-1) и металлотионеина 2. В 2018 г. Yeves et al. [47] продемонстрировали, что IGF-1 обладает кардиопротекторным действием на модели спонтанно гипертензивных крыс. В исследованиях, проведённых Sui et al. [48] и Lin et al. [49], гиперэкспрессия IGF-II и IGF-I соответственно улучшала функцию сердца после инфаркта миокарда у мышей. С другой стороны, в ряде исследований, напротив, показано, что IGF является индуктором патологической гипертрофии кардиомиоцитов [50–53], т.е. можно предположить, что его высвобождение в результате dPAPP-A-специфичного протеолиза IGFBP-4 при гипертрофии будет приводить к ещё большему развитию гипертрофии. Таким образом, обнаруженное нами усиление dPAPP-A-зависимого протеолиза и, как следствие, возможное высвобождение IGF при гипертрофических изменениях кардиомиоцитов может, с одной стороны, представлять собой потенциальный механизм для компенсации негативных воздействий на клеточные процессы, вызванные гипертрофией, а с другой стороны, напротив, усиливать гипертрофические изменения. Очевидно, что данная проблема требует дальнейшего изучения.

Таким образом, результаты, полученные в настоящей работе, свидетельствуют о протекании процессов dPAPP-A-зависимого протеолиза IGFBP-4 в кардиомиоцитах в норме и их активизации в гипертрофированной ткани. Во-первых, это позволяет предположить, что в сердечной ткани в норме биодоступность IGF зави-

сит от экспрессии и ферментативной активности PAPP-A, что может играть роль в регуляции жизнеспособности кардиомиоцитов. Во-вторых, усиление dPAPP-A-зависимого протеолиза IGFBP-4 и, как следствие, высвобождения IGF при гипертрофии может быть как механизмом для компенсации негативных воздействий на клеточные процессы, вызванные гипертрофическими изменениями, так и стимулировать эти изменения. И, наконец, результаты данной работы позволяют установить взаимосвязь между увеличением уровня протеолиза IGFBP-4 под действием dPAPP-A и гипертрофическими изменениями кардиомиоцитов, сопровождающимися некоторыми ССЗ, которая раньше не была исследована, и частично проясняют роль dPAPP-A в миокарде в норме и при его патологических изменениях. Активация dPAPP-A-зависимого протеолитического расщепления IGFBP-4 при гипертрофии кардиомиоцитов открывает возможности для исследования не изученных ранее механизмов развития различных ССЗ.

Благодарности. Авторы выражают искреннюю признательность д.б.н. профессору Н.Б. Гусеву и В.Е. Адашеву за ценные замечания и комментарии, которые позволили существенно улучшить рукопись.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Соблюдение этических норм. Все применимые международные, национальные и/или институциональные принципы ухода и использования животных были соблюдены. В частности, все эксперименты с животными проводили с соблюдением этических норм, согласно «Правилам проведения работ с использованием экспериментальных животных», утвержденным директивой Евросоюза 2010/63/EU. Эксперименты были одобрены Комиссией по биоэтике МГУ имени М.В. Ломоносова. Настоящая статья не содержит описания каких-либо исследований с участием людей в качестве объектов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Bhatnagar, P., Wickramasinghe, K., Williams, J., Rayner, M., and Townsend, N. (2015) The epidemiology of cardiovascular disease in the UK 2014, *Heart*, **101**, 1182–1189, doi: 10.1136/heartjnl-2015-307516.
2. Rame, J. E., and Dries, D. L. (2007) Heart failure and cardiac hypertrophy, *Curr. Treat. Options Cardiovasc. Med.*, **9**, 289–301, doi: 10.1007/s11936-007-0024-3.
3. Shimizu, I., and Minamino, T. (2016) Physiological and pathological cardiac hypertrophy, *J. Mol. Cell Cardiol.*, **97**, 245–262, doi: 10.1016/j.jmcc.2016.06.001.
4. Hjortebjerg, R. (2018) IGFBP-4 and PAPP-A in normal physiology and disease, *Growth Horm. IGF Res.*, **41**, 7–22, doi: 10.1016/j.ghir.2018.05.002.
5. Lin, T. M., Halbert, S. P., and Spellacy, W. N. (1974) Measurement of pregnancy-associated plasma proteins during human gestation, *J. Clin. Invest.*, **54**, 576–582, doi: 10.1172/JCI107794.
6. Overgaard, M. T., Sorensen, E. S., Stachowiak, D., Boldt, H. B., Kristensen, L., Sottrup-Jensen, L., and Oxvig, C. (2003) Complex of pregnancy-associated plasma protein A

- and the proform of eosinophil major basic protein. Disulfide structure and carbohydrate attachment, *J. Biol. Chem.*, **278**, 2106-2117, doi: 10.1074/jbc.M208777200.
7. Oxvig, C. (2015) The role of PAPP-A in the IGF system: location, location, location, *J. Cell. Commun. Signal.*, **9**, 177-187, doi: 10.1007/s12079-015-0259-9.
 8. Monget, P., Mazerbourg, S., Delpuech, T., Maurel, M. C., Manière, S., et al. (2003) Pregnancy-associated plasma protein-A is involved in insulin-like growth factor binding protein-2 (IGFBP-2) proteolytic degradation in bovine and porcine preovulatory follicles: identification of cleavage site and characterization of IGFBP-2 degradation, *Biol. Reprod.*, **68**, 77-86, doi: 10.1095/biolreprod.102.007609.
 9. Byun, D., Mohan, S., Yoo, M., Sexton, C., Baylink, D. J., and Qin, X. (2001) Pregnancy-associated plasma protein-A accounts for the insulin-like growth factor (IGF)-binding protein-4 (IGFBP-4) proteolytic activity in human pregnancy serum and enhances the mitogenic activity of IGF by degrading IGFBP-4 *in vitro*, *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, **86**, 847-854, doi: 10.1210/jcem.86.2.7223.
 10. Gyrupe, C., and Oxvig, C. (2007) Quantitative analysis of insulin-like growth factor-modulated proteolysis of insulin-like growth factor binding protein-4 and -5 by pregnancy-associated plasma protein-A, *Biochemistry*, **46**, 1972-1980, doi: 10.1021/bi062229i.
 11. Lindsay, C. R., and Evans, T. J. (2008) The insulin-like growth factor system and its receptors: a potential novel anticancer target, *Biologics*, **2**, 855-864, doi: 10.2147/btt.s3841.
 12. Lawrence, J. B., Oxvig, C., Overgaard, M. T., Sottrup-Jensen, L., Gleich, G. J., et al. (1999) The insulin-like growth factor (IGF)-dependent IGF binding protein-4 protease secreted by human fibroblasts is pregnancy-associated plasma protein-A, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **96**, 3149-3153, doi: 10.1073/pnas.96.6.3149.
 13. Bayes-Genis, A., Conover, C. A., Overgaard, M. T., Bailey, K. R., Christiansen, M., et al. (2001) Pregnancy-associated plasma protein A as a marker of acute coronary syndromes, *N. Engl. J. Med.*, **345**, 1022-1029, doi: 10.1056/NEJMoa003147.
 14. Postnikov, A. B., Smolyanova, T. I., Kharitonov, A. V., Serebryanaya, D. V., Kozlovsky, S. V., et al. (2012) N-terminal and C-terminal fragments of IGFBP-4 as novel biomarkers for short-term risk assessment of major adverse cardiac events in patients presenting with ischemia, *Clin. Biochem.*, **45**, 519-524, doi: 10.1016/j.clinbiochem.2011.12.030.
 15. Hjortebjerg, R., Tarnow, L., Jorsal, A., Parving, H.-H., Rossing, P., Bjerre, M., and Frystyk, J. (2015) IGFBP-4 fragments as markers of cardiovascular mortality in type 1 diabetes patients with and without nephropathy, *J. Clin. Endocrin. Metab.*, **100**, 3032-3040, doi: 10.1210/jc.2015-2196.
 16. Konev, A. A., Kharitonov, A. V., Rozov, F. N., Altshuler, E. P., Serebryanaya, D. V., et al. (2020) CT-IGFBP-4 as a novel prognostic biomarker in acute heart failure, *ESC Heart Fail.*, **7**, 434-444, doi: 10.1002/ehf2.12590.
 17. Степанова О. В., Чадин А.В., Куликова Т.Г., Масенко В.П., Терещенко С.Н. (2012) Роль Rho-ассоциированной киназы в формировании миофибрилл и сократимости кардиомиоцитов, *Кардиологический вестник*, **7**, 10-14.
 18. Laursen, L. S., Overgaard, M. T., Søe, R., Boldt, H. B., Sottrup-Jensen, L., et al. (2001) Pregnancy-associated plasma protein-A (PAPP-A) cleaves insulin-like growth factor binding protein (IGFBP)-5 independent of IGF: implications for the mechanism of IGFBP-4 proteolysis by PAPP-A, *FEBS Lett.*, **504**, 36-40, doi: 10.1016/S0014-5793(01)02760-0.
 19. Semenov, A. G., Tamm, N. N., Apple, F. S., Schulz, K. M., Love, S. A., et al. (2017) Searching for a BNP standard: glycosylated proBNP as a common calibrator enables improved comparability of commercial BNP immunoassays, *Clin. Biochem.*, **50**, 181-185, doi: 10.1016/j.clinbiochem.2016.11.003.
 20. Conover, C. A., Oxvig, C., Overgaard, M. T., Christiansen, M., and Giudice, L. C. (1999) Evidence that the insulin-like growth factor binding protein-4 protease in human ovarian follicular fluid is pregnancy associated plasma protein-A, *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, **84**, 4742-4745, doi: 10.1210/jcem.84.12.6342.
 21. Mazerbourg, S., Overgaard, M. T., Oxvig, C., Christiansen, M., Conover, C. A., et al. (2001) Pregnancy-associated plasma protein-A (PAPP-A) in ovine, bovine, porcine, and equine ovarian follicles: involvement in IGF binding protein-4 proteolytic degradation and mRNA expression during follicular development, *Endocrinology*, **142**, 5243-5253, doi: 10.1210/endo.142.12.8517.
 22. Conover, C. A., Faessen, G. F., Ilg, K. E., Chandrasekhar, Y. A., Christiansen, M., et al. (2001) Pregnancy-associated plasma protein-A is the insulin-like growth factor binding protein-4 protease secreted by human ovarian granulosa cells and is a marker of dominant follicle selection and the corpus luteum, *Endocrinology*, **142**, 2155, doi: 10.1210/endo.142.5.8286.
 23. Bayes-Genis, A., Schwartz, R. S., Lewis, D. A., Overgaard, M. T., Christiansen, M., et al. (2001) Insulin-like growth factor binding protein-4 protease produced by smooth muscle cells increases in the coronary artery after angioplasty, *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.*, **21**, 335-341, doi: 10.1161/01.atv.21.3.335.
 24. Giudice, L. C., Conover, C. A., Bale, L., Faessen, G. H., Ilg, K., et al. (2002) Identification and regulation of the IGFBP-4 protease and its physiological inhibitor in human trophoblasts and endometrial stroma: evidence for paracrine regulation of IGF-II bioavailability in the placental bed during human implantation, *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, **87**, 2359-2366, doi: 10.1210/jcem.87.5.8448.
 25. Conover, C. A., Bale, L. K., Frye, R. L., and Schaff, H. V. (2019) Cellular characterization of human epicardial adipose tissue: highly expressed PAPP-A regulates insulin-like growth factor I signaling in human cardiomyocytes, *Physiol. Rep.*, **7**, doi: 10.14814/phy2.14006.
 26. Conover, C. A., Harrington, S. C., Bale, L. K. (2008) Differential regulation of pregnancy associated plasma protein-A in human coronary artery endothelial cells and smooth muscle cells, *Growth Horm. IGF Res.*, **18**, 213-220, doi: 10.1016/j.ghir.2007.09.001.
 27. D'Elia, P., Ionta, V., Chimenti, I., Angelini, F., Miraldi, F., et al. (2013) Analysis of pregnancy-associated plasma protein A production in human adult cardiac progenitor cells, *BioMed Res. Int.*, **2013**, 190178, doi: 10.1155/2013/190178.
 28. Banerjee, I., Fuseler, J. W., Price, R. L., Borg, T. K., and Baudino, T. A. (2007) Determination of cell types and

- numbers during cardiac development in the neonatal and adult rat and mouse, *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.*, **293**, H1883-H1891, doi: 10.1152/ajpheart.00514.2007.
29. Laursen, L. S., Kjaer-Sorensen, K., Andersen, M. H., and Oxvig, C. (2007) Regulation of insulin-like growth factor (IGF) bioactivity by sequential proteolytic cleavage of IGF binding protein-4 and -5, *Mol. Endocrinol.*, **21**, 1246-1257, doi: 10.1210/me.2006-0522.
 30. Laursen, L. S., Overgaard, M. T., Nielsen, C. G., Boldt, H. B., Hopmann, K. H., et al. (2002) Substrate specificity of the metalloproteinase pregnancy-associated plasma protein-A (PAPP-A) assessed by mutagenesis and analysis of synthetic peptides: substrate residues distant from the scissile bond are critical for proteolysis, *Biochem. J.*, **367**, 31-40, doi: 10.1042/BJ20020831.
 31. Ryall, K. A., Saucerman, J. J. (2012) Automated imaging reveals a concentration dependent delay in reversibility of cardiac myocyte hypertrophy, *J. Mol. Cell. Cardiol.*, **53**, 282-290, doi: 10.1016/j.yjmcc.2012.04.016.
 32. Archer, C. R., Robinson, E. L., Drawnel, F. M., and Roderick, H. L. (2017) Endothelin-1 promotes hypertrophic remodelling of cardiac myocytes by activating sustained signalling and transcription downstream of endothelin type A receptors, *Cell Signal.*, **36**, 240-254, doi: 10.1016/j.cellsig.2017.04.010.
 33. Jen, H. L., Yin, W. H., Chen, J. W., and Lin, S. J. (2017) Endothelin-1-induced cell hypertrophy in cardiomyocytes is improved by fenofibrate: possible roles of adiponectin, *J. Atheroscler. Thromb.*, **24**, 508-517, doi: 10.5551/jat.36368.
 34. Higazi, D. R., Fearnley, C. J., Drawnel, F. M., Talasila, A., Corps, E. M., et al. (2009) Ca^{2+} release is a nexus for hypertrophic signaling in cardiac myocytes, *Mol. Cell*, **33**, 472-482, doi: 10.1016/j.molcel.2009.02.005.
 35. Yue, T. L., Gu, J. L., Wang, C., Reith, A. D., Lee, J. C., et al. (2000) Extracellular signal-regulated kinase plays an essential role in hypertrophic agonists, endothelin-1 and phenylephrine-induced cardiomyocyte hypertrophy, *J. Biol. Chem.*, **275**, 37895-37901, doi: 10.1074/jbc.M007037200.
 36. Yamazaki, T., Komuro, I., Kudoh, S., Zou, Y., Shiojima, I., et al. (1996) Endothelin-1 is involved in mechanical stress-induced cardiomyocyte hypertrophy, *J. Biol. Chem.*, **271**, 3221-3228, doi: 10.1074/jbc.271.6.3221.
 37. Nakahashi, T., Fukuo, K., Inoue, T., Morimoto, S., Hata, S., et al. (1995) Endothelin-1 enhances nitric oxide-induced cytotoxicity in vascular smooth muscle, *Hypertension*, **25**, 744-747, doi: 10.1161/01.hyp.25.4.744.
 38. Piacentini, L., Gray, M., Honbo, N. Y., Chentoufi, J., Bergman, M., Karliner, J. S. (2000) Endothelin-1 stimulates cardiac fibroblast proliferation through activation of protein kinase C, *J. Mol. Cell Cardiol.*, **32**, 565-576, doi: 10.1006/jmcc.2000.1109.
 39. Hjortebjerg, R., Lindberg, S., Pedersen, S., Mogelvang, R., Jensen, J. S., et al. (2017) Insulin-like growth factor binding protein 4 fragments provide incremental prognostic information on cardiovascular events in patients with ST-segment elevation myocardial infarction, *J. Am. Heart Assoc.*, **6**, doi: 10.1161/JAHA.116.005358.
 40. Makkos, A., Szántai, Á., Pálóczi, J., Pipis, J., Kiss, B., et al. (2020) A Comorbidity model of myocardial ischemia/reperfusion injury and hypercholesterolemia in rat cardiac myocyte cultures, *Front. Physiol.*, **10**, 1564, doi: 10.3389/fphys.2019.01564.
 41. Ariyasinghe, N. R., Lyra-Leite, D. M., and McCain, M. L. (2018) Engineering cardiac microphysiological systems to model pathological extracellular matrix remodeling, *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.*, **315**, H771-H789, doi: 10.1152/ajpheart.00110.2018.
 42. Belostotskaya, G. B., and Golovanova, T. A. (2014) Characterization of contracting cardiomyocyte colonies in the primary culture of neonatal rat myocardial cells: a model of *in vitro* cardiomyogenesis, *Cell Cycle*, **13**, 910-918, doi: 10.4161/cc.27768.
 43. Higashi, Y., Gautam, S., Delafontaine, P., and Sukhanov, S. (2019) IGF-1 and cardiovascular disease, *Growth Horm. IGF Res.*, **45**, 6-16, doi: 10.1016/j.ghir.2019.01.002.
 44. Mohamed-Ali, V., and Pinkney, J. (2002) Therapeutic potential of insulin-like growth factor-1 in patients with diabetes mellitus, *Treat. Endocrinol.*, **1**, 399-410, doi: 10.2165/00024677-200201060-00005.
 45. Sádaba, M. C., Martín-Estal, I., Puche, J. E., and Castilla-Cortázar, I. (2016) Insulin-like growth factor 1 (IGF-1) therapy: mitochondrial dysfunction and diseases, *Biochim. Biophys. Acta*, **1862**, 1267-1278, doi: 10.1016/j.bbadis.2016.03.010.
 46. Vinciguerra, M., Santini, M. P., Claycomb, W. C., Ladurner, A. G., and Rosenthal, N. (2009) Local IGF-1 isoform protects cardiomyocytes from hypertrophic and oxidative stresses via SirT1 activity, *Aging (Albany NY)*, **2**, 43-62, doi: 10.18632/aging.100107.
 47. Yeves, A. M., Burgos, J. I., Medina, A. J., Villa-Abrille, M. C., and Ennis, I. L. (2018) Cardioprotective role of IGF-1 in the hypertrophied myocardium of the spontaneously hypertensive rats: a key effect on NHE-1 activity, *Acta Physiol. (Oxf)*, **224**, doi: 10.1111/apha.13092.
 48. Sui, Y., Zhang, W., Tang, T., Gao, L., Cao, T., et al. (2020) Insulin-like growth factor-II overexpression accelerates parthenogenetic stem cell differentiation into cardiomyocytes and improves cardiac function after acute myocardial infarction in mice, *Stem Cell Res. Ther.*, **11**, 86, doi: 10.1186/s13287-020-1575-4.
 49. Lin, M., Liu, X., Zheng, H., Huang, X., Wu, Y., et al. (2020) IGF-1 enhances BMSC viability, migration, and anti-apoptosis in myocardial infarction via secreted frizzled-related protein 2 pathway, *Stem Cell Res. Ther.*, **11**, 22, doi: 10.1186/s13287-019-1544-y.
 50. Adachi, S., Ito, H., Akimoto, H., Tanaka, M., Fujisaki, H., et al. (1994) Insulin-like growth factor-II induces hypertrophy with increased expression of muscle specific genes in cultured rat cardiomyocytes, *J. Mol. Cell Cardiol.*, **26**, 789-795, doi: 10.1006/jmcc.1994.1096.
 51. Carrasco, L., Cea, P., Rocco, P., Peña-Oyarzún, D., Rivera-Mejias, P., et al. (2014) Role of heterotrimeric G protein and calcium in cardiomyocyte hypertrophy induced by IGF-1, *J. Cell Biochem.*, doi: 10.1002/jcb.24712.
 52. Ito, H., Hiroe, M., Hirata, Y., Tsujino, M., Adachi, S., et al. (1993) Insulin-like growth factor-I induces hypertrophy with enhanced expression of muscle specific genes in cultured rat cardiomyocytes, *Circulation*, **87**, doi: 10.1161/01.cir.87.5.1715.
 53. Huang, C. Y., Hao, L. Y., and Buetow, D. E. (2002) Insulin-like growth factor-II induces hypertrophy of adult cardiomyocytes via two alternative pathways, *Cell. Biol. Int.*, **26**, 737-739, doi: 10.1006/cbir.2002.0919.

IGFBP-4 PROTEOLYSIS BY PAPP-A IN A PRIMARY CULTURE OF RAT NEONATAL CARDIOMYOCYTES IN NORMAL AND HYPERTROPHIC CONDITIONS

D. V. Serebryanaya^{1*}, D. A. Adasheva¹, A. A. Konev², M. M. Artemieva³,
I. A. Katrukha^{1,2}, A. B. Postnikov^{1,2}, N. A. Medvedeva³, and A. G. Katrukha^{1,2}

¹ Department of Biochemistry, Faculty of Biology, Lomonosov Moscow State University,
119234 Moscow, Russia; E-mail: dariaserebryanaya@gmail.com

² HyTest Ltd, 20520 Turku, Finland

³ Department of Human and Animal Physiology, Faculty of Biology,
Lomonosov Moscow State University, 119234 Moscow, Russia

Cardiovascular disease (CVD) is one of the leading causes of death and disability worldwide. Pregnancy-associated plasma protein-A (PAPP-A) is a matrix metalloprotease localized on the cell surface. One of the substrates that PAPP-A cleaves is IGFBP-4 (insulin-like growth factor binding protein-4), a member of the family of proteins that bind IGF (insulin-like growth factor). Proteolysis of IGFBP-4 by PAPP-A occurs at a specific site, results in formation of two proteolytic fragments – N-terminal (NT-IGFBP-4) and C-terminal (CT-IGFBP-4) – and leads to the release of IGF, which activates various cellular processes including migration, proliferation, and cell growth. An increased levels of proteolytic IGFBP-4 fragments correlate with the development of complications and the risk of death of patients with such CVD as coronary heart disease, acute coronary syndrome, and heart failure. However, there is no direct evidence of the PAPP-A-specific proteolysis of IGFBP-4 in cardiac tissue in normal and pathological conditions. In the present study, using a model of a primary culture of rat neonatal cardiomyocytes, we have demonstrated that (i) proteolysis of IGFBP-4 by PAPP-A occurs in the conditioned medium of cardiomyocytes, (ii) an increase of PAPP-A-specific IGFBP-4 proteolysis is observed when cardiomyocytes are transferred to a hypertrophic state. Thus, it can be assumed that the enhancement of IGFBP-4 cleavage and hypertrophic changes in cardiomyocytes accompanying CVD are interrelated, and PAPP-A appears to be the one of the activators of IGF-dependent processes in normal and hypertrophic cardiomyocytes.

Keywords: cardiovascular diseases, heart failure, cardiomyocytes, primary culture, proteolysis, PAPP-A, IGFBP-4, hypertrophy, endothelin-1

УДК 577.12

РОЛЬ ГЛУТАТИОНПЕРОКСИДАЗ И ПЕРОКСИРЕДОКСИНОВ ПРИ СВОБОДНОРАДИКАЛЬНЫХ ПАТОЛОГИЯХ

Обзор

© 2021 М.Г. Шарапов^{1*}, С.В. Гудков^{2,3,4}, В.З. Ланкин⁵, В.И. Новоселов¹

¹ Институт биофизики клетки ФИЦ ПНЦБИ РАН, 142290 Пущино, Московская обл., Россия;
электронная почта: sharapov.mars@gmail.com

² Институт общей физики им. А.М. Прохорова РАН, 119991 Москва, Россия

³ Нижегородский государственный университет им. Н.И. Лобачевского,
Институт биологии и биомедицины, 603022 Нижний Новгород, Россия

⁴ Всероссийский научно-исследовательский институт фитопатологии, 143050 Большие Вяземы, Россия

⁵ ФГБУ «НМИЦ кардиологии» Минздрава России, 121552 Москва, Россия

Поступила в редакцию 27.05.2021

После доработки 19.09.2021

Принята к публикации 19.09.2021

В обзоре рассмотрен патогенез заболеваний, сопряжённых с развитием окислительного стресса, таких как: атеросклероз, диабет и лучевая болезнь. Обсуждаются возможности терапевтического использования низкомолекулярных природных и синтетических антиоксидантов для коррекции свободнорадикальных патологий. Основное внимание в обзоре уделено роли двух филогенетически близких семейств гидропероксид-восстанавливающих антиоксидантных ферментов: пероксиредоксинов и глутатионпероксидаз. Обсуждается роль этих ферментов в противодействии окислительному стрессу, а также рассматривается их участие в предупреждении свободнорадикальных патологий. Представлены примеры успешного применения экзогенных рекомбинантных ферментов-антиоксидантов в качестве терапевтических агентов при лечении патологических состояний, связанных со свободнорадикальными процессами. Обсуждаются перспективы дальнейших исследований экзогенных ферментов-антиоксидантов, а также способы улучшения их терапевтических свойств.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: активные формы кислорода, дикарбонилы, лучевая болезнь, атеросклероз, диабет, пероксиредоксины, глутатионпероксидазы.

DOI: 10.31857/S0320972521110038

СВОБОДНОРАДИКАЛЬНЫЕ ПАТОЛОГИИ

В настоящее время общепринято, что многие заболевания связаны с нарушением окислительно-восстановительного гомеостаза, в частности, с активацией свободнорадикальных процессов в тканях. К патологиям такого рода можно отнести: лучевую болезнь, сердечно-сосудистые заболевания (гипертония, инсульт, инфаркт), диабет, бронхолегочные патологии, злокачественные новообразования, нейродегенеративные болезни и т.д. [1, 2]. Для всех указанных патологий характерны следующие признаки: 1) увеличение концентрации в клетках и тканях свободных радикалов (СР), активных форм кислорода (АФК) и активных форм азота (АФА, которые также обозначаются как РФА – реактивные формы азота); 2) повышенный уровень содержания продуктов свободнорадикального окисления биомолекул; 3) интенсификация собственной биолюминесценции тканей и клеток; 4) уменьшение содержания в клетках и тканях тушителей (скавенджеров) радикалов и антиоксидантов (включая снижение активности антиоксидантных ферментов); 5) наличие характерных клинических синдромов (снижение фертильности, хрупкость сосудов, ослабление реакции на внешние раздражители, вялость, сниженная гемолитическая устойчивость эритроцитов, преобладание катаболических процессов над анаболическими, преждевременное старение и т.п.); 6) возможность моделирования

Принятые сокращения: АФА – активные формы азота; АФК – активные формы кислорода; ЛНП – липопротеины низкой плотности; МДА – малоновый диальдегид; ПОЛ – перекисное окисление липидов; СР – свободный радикал; СНО – клетки яичника китайского хомячка; GPx – глутатионпероксидаза; LOOH – липогидропероксид; NO[•] – оксид азота; Prx (Prdx) – пероксиредоксин; RCS – активные карбонильные соединения; SOD – супероксиддисмутаза.

* Адресат для корреспонденции.

СР-патологии за счёт индукции генерации СР, АФК/АФА в биологической системе; 7) при СР-патологии выраженный профилактический или лечебный эффекты оказывают препараты антиоксидантного действия. Таким образом, основным признаком свободнорадикальной патологии является нарушение регуляции СР-процессов в клетке, а именно: дисбаланс в системах генерации и утилизации АФК/АФА [3].

Окислительный стресс. Окислительный стресс — нарушение окислительно-восстановительного гомеостаза в биологических системах, в результате которого уровень образующихся окислителей (в первую очередь — АФК) превосходит возможности антиоксидантной системы. Образующиеся в ходе окислительного стресса АФК способны модифицировать все важнейшие макромолекулы (нуклеиновые кислоты, белки и липиды), что приводит к нарушению их структуры и функции и в конечном счёте — гибели клетки [4]. Окислительный стресс сопровождается образованием не только АФК, но и некоторых других «побочных» продуктов СР-окисления, таких как: нитрозилы (АФА) и карбонилы, которые, в свою очередь, при превышении предельной концентрации вызывают развитие нитрозивного и карбонильного стресса соответственно [5]. Таким образом, окислительный стресс можно считать триггером каскада патологических процессов и связующим звеном карбонильного и нитрозивного стрессов.

Карбонильный стресс. Карбонильный стресс представляет собой острое или хроническое увеличение количества активных карбонильных соединений (*reactive carbonyl species* — RCS), ведущее к повреждению/гибели клетки. Природные RCS представлены широким спектром соединений, которые содержат одну или несколько карбонильных групп. На сегодняшний день идентифицировано более двух десятков RCS, участвующих в развитии карбонильного стресса. К наиболее известным RCS относятся: α -, β -ненасыщенные альдегиды (акролеин, кротоновый альдегид), диальдегиды (малоновый диальдегид (МДА), глиоксаль) и кето-альдегиды (метилглиоксаль, рибозон, глюкозон, 3-дезоксиглюкозон). Эндогенные RCS образуются в качестве промежуточных продуктов в ферментативных процессах гликолиза, окисления аминокислот в результате гликирования (сахароаминная конденсация или реакция Майяра) и липидной пероксидации. Следует отметить, что дикарбонилы (такие как малоновый диальдегид) образуются в качестве вторичных продуктов окисления, при окислительной деструкции липогидропероксидов (LOOH) — первичных молекулярных продуктов СР-окисления полиеновых ли-

пидов [5]. Таким образом, окислительный стресс с неизбежностью переходит в карбонильный стресс. По сравнению с АФК карбонильные соединения относительно стабильны. Отсутствие заряда на молекуле RCS и относительно большое время жизни (часы) позволяют им диффундировать через клеточную мембрану и атаковать мишени далеко от места продукции. RCS обладают высокой реакционной способностью, атакуя в биологических макромолекулах аминогруппы, гуанидины, тиолы, имидазолы, гидроксильные группы, пуриновые и пиримидиновые основания. Воздействие RCS приводит к необратимым изменениям в структуре белков, нуклеиновых кислот и фосфолипидов, вызывая нарушение их функции в клетке [5].

Карбонильные соединения, по аналогии с АФК, играют двойную роль в клетке: в норме они участвуют в сигнальных и защитных процессах, а при повышенном уровне приводят к необратимым повреждениям [6]. Например, нейтрофилы (с участием миелопероксидазы) продуцируют ненасыщенные альдегиды, такие как гликолевый альдегид, 2-гидроксипропаналь и акролеин, которые подавляют рост патогенных микроорганизмов [7]. Метилглиоксаль может подавлять рост злокачественных клеток и ряда патогенных бактерий [8]. В клетках существует специализированная система катаболизма RCS, включающая следующие классы ферментов: альдегиддегидрогеназы, альдегидредуктазы и глутатион-S-трансферазы. Вероятно, наибольшее значение во внутриклеточной нейтрализации альдегидов имеет процесс их ферментативной конъюгации с глутатионом в глутатион-S-трансферазной реакции. Однако экстремальное накопление RCS (возникающее при длительном карбонильном стрессе), превышающее возможности «антикарбонильной» защиты, приводит к цитотоксическим и генотоксическим эффектам и является причиной развития множества патологических состояний, таких как сахарный диабет, атеросклероз, сердечно-сосудистые и нейродегенеративные заболевания, хроническая обструктивная болезнь лёгких и др. [5, 6].

Нитрозивный стресс. Нитрозивный и окислительный стресс тесно связаны, и их разделение может быть достаточно условным. Образующиеся в ходе окислительного стресса АФК реагируют с оксидом азота ($\text{NO}^{\bullet}$) с образованием АФА. По аналогии с АФК превышение порогового уровня АФА приводит к повреждениям клетки и развитию нитрозивного стресса.

В биологических системах $\text{NO}^{\bullet}$ образуется из аминокислоты L-аргинина в результате реакции ($\text{L-аргинин} + \text{NADPH}_2 + \text{O}_2 \rightarrow \text{NO}^{\bullet} +$

+ L-цитруллин), которую катализируют ферменты NO-синтазы [9]. У млекопитающих известно 3 изоформы NO-синтаз (2 конститутивных и 1 индуцибельная), которые отличаются распределением в тканях/клетках, особенностями активации и ингибирования. Конститутивные изоферменты называют по типу ткани, в которой они впервые были обнаружены: нейрональная NO-синтаза (nNOS) и эндотелиальная NO-синтаза (eNOS). nNOS содержится во многих тканях, но в большем количестве она представлена в тканях центральной и периферической нервной системы [9]. Изофермент eNOS присутствует преимущественно в клетках эндотелия кровеносных сосудов. Конститутивные nNOS и eNOS присутствуют в цитоплазме клеток, их активность зависит от уровня кальция в цитоплазме. В ответ на стимуляцию конститутивные nNOS и eNOS синтезируют небольшое количество NO[•] (пикомоли). Индуцибельная iNOS в нормальных условиях практически не экспрессируется и обнаруживается только после стимуляции провоспалительными цитокинами (IL-1, TNF α , INF γ и др.) или в условиях окислительного стресса. В отличие от конститутивных изоформ iNOS продуцирует NO[•] на 3 порядка больше (наноли), и её активность не зависит от ионов Ca²⁺ [9].

NO[•] не имеет заряда, однако легко окисляется или восстанавливается с образованием NO⁺ и NO⁻ соответственно. NO хорошо растворим в воде (при 20 °C растворимость 46 мл в 1 литре воды), его молекулы легко диффундируют в биологических средах. Радиус диффузии свободного NO (вне комплекса) около 0,1 мм. Среднее время жизни NO[•] в биологических тканях 5–6 с, в физиологическом растворе – 6–30 с, в деоксигенированной воде NO[•] сохраняется в течение нескольких суток. Кроме того, NO[•] образует стабильные комплексы с гемоглобином и сывороточным альбумином и таким образом может транспортироваться в организме, причём время существования таких комплексов в организме млекопитающих может достигать десятков минут [10, 11]. Повреждающее действие NO[•] во многом зависит от образования таких его метаболитов, как: диоксида (NO₂) и триоксида азота (N₂O₃), нитрита (NO₂⁻), нитрата (NO₃⁻) и пероксинитрита (ONOO⁻). Продукция высоких концентраций NO[•] (продуцируемая iNOS) в условиях окислительного стресса приводит к образованию высокотоксичного пероксинитрита (O₂⁻ + NO[•] → ONOO⁻). Период полураспада пероксинитрита короткий (~10–20 мс), но достаточен для пересечения биологических мембран, диффузии от одного до двух диаметров клеток и обеспечения взаимодействия с наиболее важными биомоле-

кулами. Пероксинитрит способен окислять липиды, белки (преимущественно остатки Cys, Met и Tyr) и нуклеиновые кислоты (атакуя как основания, так и сахаро-фосфатный остов, что приводит к одноцепочечным разрывам). Кинетические исследования показали, что пероксинитрит окисляет молекулы посредством двух механизмов. Во-первых, пероксинитрит и его протонированная форма – пероксиазотистая кислота (ONOOH), время полураспада которой около 1 с [12], напрямую окисляют молекулы посредством одно- или двухэлектронного окисления. Второй механизм опосредован образованием высокореактивных радикалов [13]. Пероксинитрит может образовывать гидроксильный радикал (HO[•]) и радикал диоксида азота (NO₂[•]) при гомолитическом разложении пероксиазотистой кислоты (ONOO⁻ + H⁺ → ONOOH → HO[•] + NO₂[•]). Однако образование HO[•] по этому механизму, вероятно, играет лишь незначительную роль *in vivo* из-за особенно быстрой реакции пероксинитрита с диоксидом углерода (CO₂). Прямая реакция пероксинитрита с CO₂ даёт нестабильный продукт нитрозопероксикарбонат (ONOOOCO₂), который быстро распадается на CO₃⁻ (карбонатный радикал) и NO₂[•]. Поскольку содержание углекислого газа в клетках составляет около 1 мМ (примерно в 10 000 раз больше, чем количество ионов водорода), образование карбонатных радикалов происходит *in vivo* с большей вероятностью, чем гидроксильного радикала из ONOOH. Карбонатный радикал более селективен, чем гидроксильный радикал, но инициирует многие повреждающие реакции, обычно приписываемые гидроксильному радикалу в биологической литературе, и, возможно, более значим как биологический окислитель [10].

В норме пероксинитрит образуется макрофагами (с участием iNOS и NAD(P)H-оксидаз) и участвует в антимикробной и противоопухолевой активности иммунной системы [14]. В настоящее время только для пероксиредоксинов и селен-содержащих глутатионпероксидаз показана способность нейтрализовать пероксинитрит [15].

Таким образом, окислительный, карбонильный и нитрозивный стрессы тесно взаимосвязаны, так или иначе участвуя в стимуляции некроза и апоптоза клеток. По-видимому, в реальных условиях процессы окисления, карбонилирования и нитрозилирования протекают одновременно.

ЛУЧЕВАЯ БОЛЕЗНЬ

Лучевая болезнь является наиболее известной и хорошо изученной свободнорадикальной

патологией. Под лучевой болезнью понимают определенный комплекс проявлений поражающего действия ионизирующих излучений на организм в дозе свыше 1 Гр. Симптоматика лучевой болезни зависит от нескольких факторов: вида ионизирующего излучения (рентгеновское излучение, γ -излучение, β -излучение, α -частицы и т.д.), локализации облучаемого участка тела (общее/тотальное или местное), локализации источника излучения (внешнее или инкорпорированное), равномерности облучения (равномерное или неравномерное) и времени облучения (однократное, повторное, пролонгированное, хроническое облучение) [16, 17]. В 1954 г. Gerschman et al. [18] предположили, что токсическое действие кислорода и радиоактивного излучения имеют общий механизм действия, который обусловлен образованием свободнорадикальных молекул. Позже исследование механизмов лучевой болезни явилось первым доказательством патофизиологического эффекта свободных радикалов *in vivo* [19]. В настоящее время угроза лучевой болезни сохраняется на объектах, связанных с техногенными источниками ионизирующих излучений (АЭС, ускорители и т.п.) и при лучевой терапии рака (при облучении опухолей могут поражаться соседние здоровые ткани пациента).

Механизм действия ионизирующего излучения. Ионизирующее излучение — это потоки фотонов, элементарных частиц или осколков деления атомов, способных ионизировать вещество. Ионизация сопровождается превращением нейтральных атомов или молекул в ионы или радикалы (рис. 1).

Ионизирующее излучение имеет прямое и не прямое воздействие на живые организмы. Прямое воздействие включает повреждение биологических молекул за счёт непосредственного контакта с квантом или частицей ионизирующего излучения. Непрямое воздействие ионизирующего излучения связано с образованием в клетке продуктов радиолиза воды (СР, АФК) и различных вторичных продуктов СР-окисления (гидропероксиды, нитрозилы, дикарбонилы и др.). На 100 электрон-вольт поглощённой энергии ионизирующего излучения в водной среде в среднем образуется: 2,4 гидроксильных радикала $\text{HO}^\bullet$, 2,8 сольватированных электронов, 0,4 атома водорода, 0,8 молекул H_2O_2 и других соединений [20]. Примечательно, что помимо генерирования СР и АФК, вызванного ионизирующим излучением (экзогенный источник), после облучения наблюдается рост эндогенных АФК (преимущественно митохондриальных), который связан с нарушением функции электрон-транспортной цепи митохондрий (утечка

электронов на кислород и генерация супероксидного анион-радикала $\text{O}_2^{\bullet-}$) и активацией ряда оксидаз: NAD(P)H-оксидаз (NOX), моноаминоксидаз (MAO), ксантиноксидаз (ХО), циклооксигеназ (COX), миелопероксидазы (МРО), NO-синтаз (NOS) и др. Рост уровня СР и АФК/АФА (вызванный как экзогенными, так и эндогенными факторами) приводит к развитию окислительного стресса в облучённых тканях. Развитие окислительного стресса сопровождается массовой гибелью активно делящихся клеток (особенно клеток костного мозга, половых желёз, эпителия кишечника и бронхов), причём это может быть как программируемая гибель (апоптоз, пироптоз), так и некроз в зависимости от дозы облучения [21].

При действии ионизирующей радиации скорость образования АФК и вторичных продуктов СР-окисления зачастую значительно превышает способность живых клеток к их элиминации, что приводит к массовому повреждению нуклеиновых кислот, белков и липидов. Повреждение биомакромолекул является одной из основных причин пострадиационной гибели. На практике для предотвращения пагубных последствий действия ионизирующей радиации используют радиозащитные препараты. По способу применения и механизму действия можно выделить три основных класса радиозащитных соединений: 1) соединения, предотвращающие радиационное поражение — радиопротекторы (применяются до облучения); 2) соединения, стимулирующие пострадиационное восстановление — радиомитигаторы (применяются после облучения на ранних стадиях до клинических проявлений острого лучевого поражения); 3) терапевтические соединения, которые применяются после проявления первых клинических признаков острой лучевой болезни. К 1-му классу можно отнести низкомолекулярные антиоксиданты (полифенолы, некоторые витамины, сульфгидрильные соединения и т.п.), ферменты-антиоксиданты, индукторы синтеза антиоксидантов, соединения, вызывающие гипоксию и т.д. Ко 2-му и 3-му классам относятся большое количество соединений, влияющих на пострадиационное восстановление: стимуляторы гемопоэза, иммуномодуляторы и т.д. (преимущественно цитокины, гормоны) [22]. Радиозащитные соединения представлены достаточно гетерогенной группой соединений, которые отличаются по структуре, механизму действия и эффективности. Более подробно с основными классами радиозащитных соединений можно ознакомиться в обзорных работах [23–25]. Также следует отметить, что наиболее чувствительны к воздействию ионизирующего излучения актив-

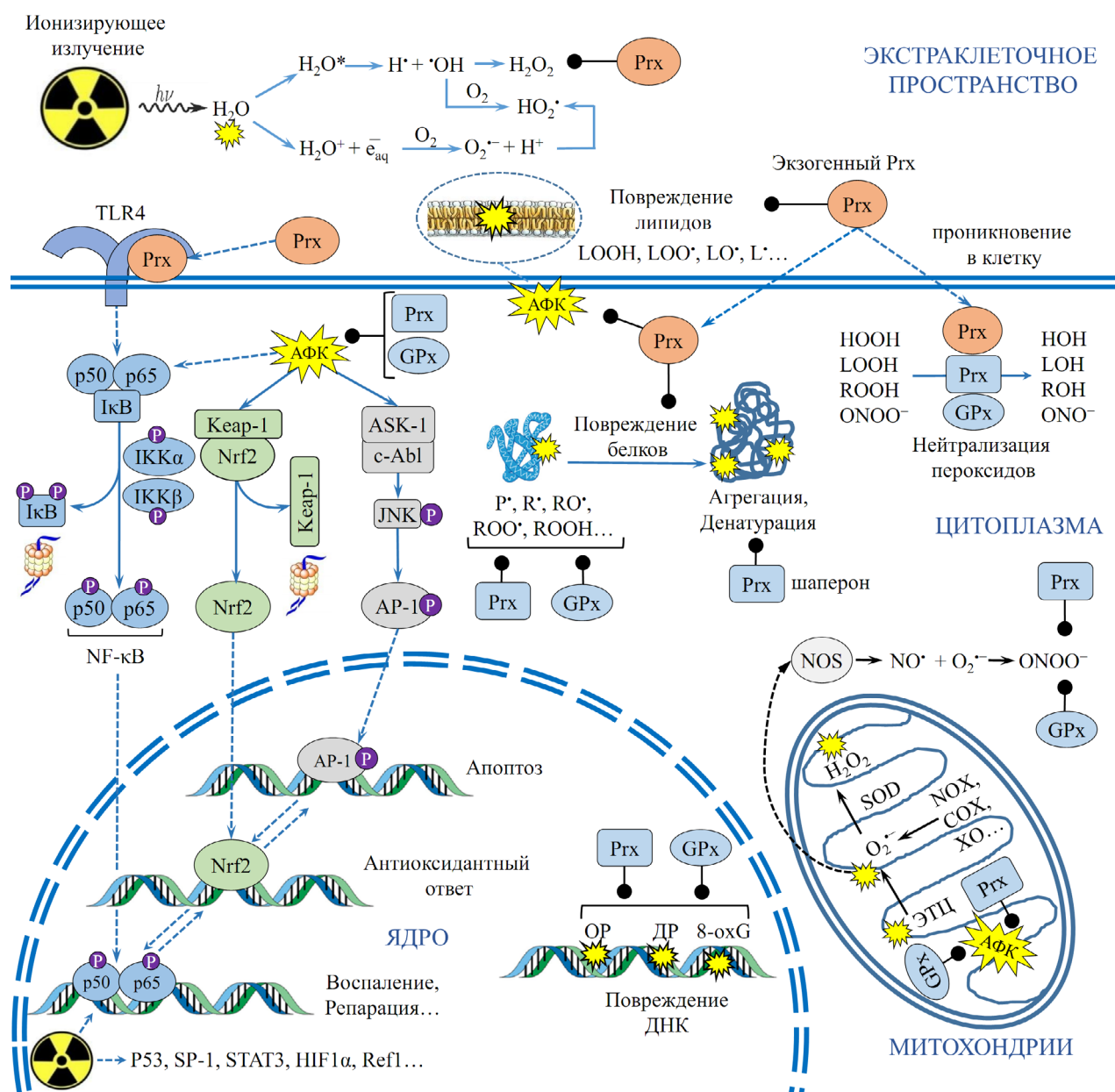


Рис. 1. Механизм действия ионизирующего излучения: прямое (ионизация макромолекул) и не прямое воздействие (генерация АФК). Радиозащитная роль пероксиерексидоксинов — Prx (эндогенных и экзогенных) и глутатионпероксидаз — GPx, которые представлены во всех компартментах клетки, осуществляется через подавление свободнорадикальных реакций (отмечено линией с точкой). Стимулирующий эффект отмечен стрелкой. Опосредованный эффект (стимуляция сигнального каскада, пересечение плазматической мембраны) отмечен пунктирной стрелкой. Представлена реакция радиолитического разложения воды, а также основные продукты радиолитического разложения органических молекул: липидные радикалы ($LOO\cdot$, $LO\cdot$, $L\cdot$), алкильные радикалы ($R\cdot$), алкоксильные радикалы ($RO\cdot$), гидропероксильные радикалы ($ROO\cdot$) и радикалы белков ($P\cdot$). Основные субстраты GPx и Prx: липогидропероксиды ($LOOH$), алкилгидропероксиды ($ROOH$), пероксид водорода (H_2O_2), пероксинитрит ($ONOO^-$). В условиях окислительного стресса 2-Cys Prx (Prx1–4) проявляют шаперонную активность, которая препятствует денатурации и агрегации белков. Повреждения ДНК: OP — одноцепочечные разрывы, DP — двуцепочечные разрывы, 8-oxG — 8-оксо-гуанин. ЭТЦ — электрон-транспортная цепь митохондрий. NAD(P)H-оксидазы (NOX), циклооксигеназы (COX), ксантиноксидазы (XO), NO-синтазы (NOS). Отмечены основные сигнальные пути клетки (TLR4/NF- κ B, Keap-1/Nrf2, ASK-1/AP-1), которые активируются при действии ионизирующего излучения и на которые влияют Prx и GPx.

но делящиеся клетки (эпителиальные, стволовые и эмбриональные), поэтому именно этот тип клеток особенно нуждается в радиозащите. В настоящее время разработка новых эффектив-

ных радиозащитных препаратов, направленных в первую очередь на сохранение этих типов тканей, остаётся важной и актуальной задачей. При этом особый интерес вызывает направление по

созданию радиопротекторов на основе ферментов-антиоксидантов [22], т.к. они отличаются низкой токсичностью и высокой эффективностью (см. далее).

Роль глутатионпероксидаз в радиозащитном ответе. В ответ на действие ионизирующего излучения и рост уровня АФК в клетке происходит адаптивная индукция синтеза ферментов-антиоксидантов. В частности, в клетках яичника китайского хомячка (СНО) после облучения наблюдается мощная индукция экспрессии генов супероксиддисмутаза (Mn-SOD, Cu/Zn-SOD) и глутатионпероксидаз (GPx). Суперэкспрессия указанных генов (достигаемая трансфекцией клеток экспрессирующими векторами с соответствующими генами) приводит к росту радиорезистентности клеток. Так, после облучения рентгеновскими лучами дозой 10 Гр выживаемость трансфицированных клеток СНО (с суперэкспрессией GPx) выросла на 40% по сравнению с исходными клетками [26]. Кроме того, в экспериментах с клетками СНО AA8 было обнаружено, что внесение соединений селена в культуральную среду приводило к существенному росту (в 4 раза) активности GPx, увеличению радиорезистентности клеток и снижению уровня радиационно-индуцированных мутаций [27, 28]. В то же время в других экспериментах было показано, что рост экспрессии GPx в клетках лимфобластомы человека (Sup-T1) и китайского хомячка (СНО AA8) приводит к увеличению активности этого фермента в 8 и 30 раз соответственно, но радиорезистентность при этом меняется незначительно [29]. Снижение уровня эндогенных глутатионпероксидаз до 17% (вызванное диетой с дефицитом селена) и глутатиона до 3–4% (вызванное комбинацией ингибиторов бутионинсульфоксимида и диэтилмалеата) снижает радиорезистентность клеток почек мыши примерно в 1,4 раза [28, 30].

Таким образом, глутатионпероксидазы, несомненно, играют важную роль в радиорезистентности клеток животных, которая в первую очередь связана с их антиоксидантной активностью. Для GPx показана высокая пероксидазная активность и наиболее эффективный механизм катализа среди пероксидаз (особенно для селен-содержащих GPx), позволяющий восстанавливать пероксид водорода или органические гидропероксиды до воды или соответствующих спиртов (рис. 1), в широком диапазоне концентраций [31]. Суперэкспрессия GPx позволяет эффективно элиминировать возникшие после облучения гидропероксиды и зачастую приводит к росту радиорезистентности клеток, что особенно характерно для различных форм раковых клеток [32]. Например, в радиорезистентных

клетках глиобластомы человека U251 активность GPx примерно в 4 раза выше, чем в исходных глиальных клетках [33]. Тем не менее роль глутатионпероксидаз в канцерогенезе неоднозначна, т.к. для некоторых изоформ (GPx1, GPx3, GPx4) показана онкосупрессорная, а для других (GPx2) онкогенная роль [32].

Роль пероксиредоксинов в радиозащитном ответе. Высокая радиозащитная способность семейства пероксиредоксинов была показана в серии экспериментов на животных и клеточных моделях. Установлено, что при воздействии рентгеновского излучения на кожу крыс происходит рост уровня пероксиредоксинов в клетках [34]. Рентгеновское облучение семенников мыши приводит к многократному усилению экспрессии генов *PRDX1* и *PRDX2* [35]. Кроме того, было показано, что у облучённых мышей значительно возрастает уровень Prx1 и Prx2 в мозгу [36], а в печени и селезёнке значительно возрастает уровень Prx6 [37].

Было обнаружено, что многие линии раковых клеток, обладающие высокой устойчивостью к действию ионизирующего излучения, имеют высокий уровень экспрессии пероксиредоксинов. Например, установлена ведущая роль Prx2 в радиоустойчивости клеток рака прямой кишки (HCT116, Caco-2, T84 и LoVo) и молочной железы (MCF+FIR3) человека [38, 39]. При агрессивной радиорезистентной форме рака мозга (глиобластоме) наблюдается высокий уровень экспрессии *PRDX4*. Значительное повышение уровня Prx6 обнаружено при различных формах рака (мозга, лёгких, молочной железы и т.д.), многие из которых обладают высокой радиоустойчивостью [40].

В экспериментах *in vitro* и *in vivo* было показано, что подавление экспрессии генов *PRDX1–6* в раковых клетках приводило к потере их радиорезистентности [38, 41–45], что позволяет рассматривать их в качестве потенциальных мишеней при радиотерапии рака [46]. Так, подавление экспрессии *PRDX2* существенно снижало устойчивость раковых клеток Caco-2 и MCF+FIR3 к действию радиации [38, 39]. Нокдаун *PRDX4* в раковых клетках приводит к повышению чувствительности клеток к действию ионизирующего излучения, подавлению роста и метастазирования опухолей [47]. Нокдаун *PRDX6* подавляет рост клеток (A549 и NCI-H460) и стимулирует апоптоз [48], а нокдаун *PRDX6* в клетках эмбриональных фибробластов мыши 3T3 снижает их устойчивость к действию рентгеновского излучения на 40–50% [49].

Радиозащитное действие эндогенных пероксиредоксинов реализуется благодаря их способности восстанавливать широкий спектр неорга-

нических и органических пероксидов, а также их участию в сигнально-регуляторных путях клетки, опосредованных гидропероксидами и через образование межмолекулярных дисульфидных связей с регуляторными белками [40]. Кроме того, в условиях окислительного стресса 2-Cys пероксиредоксины (Prx1–4) проявляют шаперонную активность, которая препятствует инактивации и агрегации белков, тем самым сохраняя жизненно важные функции клетки [40].

СВОБОДНОРАДИКАЛЬНЫЕ ПАТОЛОГИИ СЕРДЕЧНО-СОСУДИСТОЙ СИСТЕМЫ

Болезни системы кровообращения являются главной причиной смертности от неинфекционных болезней в различных странах. В России её показатели составляют в среднем 55% от общей смертности, при этом в 90% случаев причиной являются ишемическая болезнь сердца (ИБС) и инсульт мозга. Известно, что как с морфологической, так и с патогенетической точки зрения решающую роль в формировании ИБС и инсульта играет атеросклероз. К настоящему моменту накоплены многочисленные данные, указывающие на ведущую роль процесса перекисного окисления липидов (ПОЛ) в инициации и развитии сердечно-сосудистых заболеваний атеросклеротического генеза [50].

Атеросклероз. Атеросклероз — хроническое заболевание артерий, сопровождающееся образованием атероматозных бляшек на стенке сосудов, суживающих их просветы и способствующих тромбообразованиям и нарушениям кровотока. Предположение о том, что свободнорадикальные процессы играют важную роль в патогенезе атеросклероза были высказаны ещё в конце 50-х годов прошлого века, тем не менее конкретные данные, подтверждающие увеличение содержания первичных молекулярных продуктов СР-окисления (гидропероксидов) в сосудистой стенке при атерогенезе, были получены лишь через два десятилетия [50, 51]. В настоящее время общепринято, что атеросклероз является свободнорадикальной патологией [52]. Было показано, что активация СР-процессов после тотального облучения мышей рентгеновским излучением приводит к образованию в сосудах бляшек, подобных атеросклеротическим [53]. Применение антиоксидантов в экспериментальных моделях предотвращало образование атеросклеротических бляшек и снижало риск возникновения заболевания [52]. Одним из ведущих факторов, играющих важную роль в этиологии и патогенезе атеросклероза, является накопление окисленных липопротеинов низкой

плотности (ЛНП). Гиперлипидемия, сопровождающая развитие атеросклероза, создает условия для значительного увеличения содержания субстрата окисления — полиеновых липидов в крови, что неизбежно должно приводить к увеличению скорости их СР-окисления [50, 51]. В работах, выполненных в Кардиологическом центре РАМН, впервые было показано, что в крови и атеросклеротически поврежденной стенке сосудов больных атеросклерозом обнаруживается существенное увеличение содержания молекулярных продуктов СР-окисления — липогидропероксидов, преимущественно 13-гидропероксилинолеата [51]. При детальном анализе методом ВЭЖХ на колонке с хиральной фазой по соотношению стереоизомеров удалось установить, что выявляемые при атеросклерозе LOOH в тканях образуются исключительно в результате неферментативного ПОЛ [50, 51]. Одновременно у больных атеросклерозом было обнаружено снижение активности утилизирующего LOOH фермента — эритроцитарной Se-содержащей глутатионпероксидазы (GPx), причём в повреждённой при атеросклерозе стенке сосудов также наблюдали уменьшение активности GPx и Cu/Zn-супероксиддисмутазы (Cu/Zn-SOD), прогрессирующее с нарастанием степени атеросклеротического повреждения [5]. Было показано, что у больных атеросклерозом ЛНП значительно более окислены, чем частицы ЛНП практически здоровых людей [50]. Окисление ЛНП в плазме крови может происходить как путём многоступенчатой активации различных оксидаз (NAD(P)H-оксидазы, ксантиноксидазы, NO-синтазы, липоксигеназы и миелопероксидазы), так и за счёт автоокисления при катализе ионами металлов переменной валентности на фоне снижения антиоксидантной защиты. Известно, что СР-окисление углеводов протекает двухстадийно, причём на первой стадии образуются первичные молекулярные продукты СР-окисления — нестойкие гидропероксиды, которые подвергаются дальнейшей окислительной деструкции с образованием карбонильных соединений. Таким образом, окислительный стресс при атерогенезе, характеризующийся резким увеличением содержания LOOH в тканях, неизбежно переходит в карбонильный стресс, сопровождающийся накоплением вторичных продуктов ПОЛ, таких как гидроксиноненали и МДА [5]. Альдегидные группы МДА способны легко реагировать с аминокгруппами биополимеров (включая нуклеиновые кислоты), вследствие чего МДА может проявлять свойства природного мутагена. МДА также может вызывать модификацию белков, образуя внутри- и межмолекулярные сшивки в их моле-

кулах. В частности, было показано, что МДА способен модифицировать аполипопротеин В-100 частиц ЛНП [5]. Окислительно модифицированные частицы ЛНП, взаимодействуя со скавенджер-рецепторами макрофагов стенки сосудов, эффективно захватываются этими клетками и накапливаются в их липидных вакуолях. Вследствие этого макрофаги превращаются в так называемые «пенистые клетки», образуя липидные кластеры (зоны липоидоза) — первичные предатеросклеротические повреждения стенки сосудов. Было установлено, что ферментативное окисление полиеновых ацилов фосфолипидов наружного слоя частиц ЛНП не вызывает увеличения скорости захвата ЛНП культивируемыми макрофагами, тогда как МДА-модифицированные ЛНП поглощаются этими клетками с экстремально высокой эффективностью. Из этого следует, что ведущую роль в атерогенном повреждении стенки сосудов играют не окисленные ЛНП (обогащенные LOOH-производными фосфолипидов в наружном слое частиц), а частицы ЛНП, включающие МДА-модифицированный апопротеин В-100 [54]. Кроме того, в последние годы стало понятно, что окисленные ЛНП (по всей видимости, карбонил-модифицированные ЛНП) играют важную роль в развитии дисфункции эндотелия [55]. Скавенджер-рецептор эндотелиоцитов LOX-1 может взаимодействовать с частицами окислительно-модифицированных ЛНП, и этот комплекс вызывает экспрессию NAD(P)H-оксидазы, которая генерирует $O_2^{\cdot -}$, вызывая повреждение эндотелиальных клеток, выстилающих внутреннюю поверхность сосудов. Следовательно, начальные стадии дисфункции эндотелия сосудов — процесса, играющего ведущую роль в атерогенезе, напрямую зависят от образования окислительно-модифицированных ЛНП. Следует отметить, что широкое использование в последние годы антиатерогенных холестерин-снижающих препаратов из класса ингибиторов β -гидрокси- β -метилглутарил-коэнзим А редуктазы (статинов) вызывает необходимость дополнительной защиты ЛНП от окисления [19]. Статины ингибируют не только биосинтез холестерина, но и синтез коэнзима Q, восстановленная форма которого защищает наружный фосфолипидный монослой частиц ЛНП от окисления, таким образом, при терапии статинами защита частиц ЛНП от окисления должна быть ослаблена. Увеличение окисляемости ЛНП при терапии статинами было подтверждено нами экспериментально [19], причём дотации коэнзима Q или синтетического фенольного антиоксиданта пробуккола полностью нивелировали негативное действие статинов по индукции СР-окисления

ЛНП *in vivo* [19]. Коэнзим Q, следовательно, играет ведущую роль в защите частиц ЛНП от СР-окисления, причём восстановление образующихся семихинонных радикалов обеспечивается при их взаимодействии с аскорбатом, присутствующим в плазме крови в высокой концентрации [50]. Эта система биорегенерации настолько эффективна, что для обеспечения защиты ЛНП от окисления достаточно присутствия всего нескольких молекул коэнзима Q на частицу липопротеина. Поскольку биорегенерация фенолов осуществляется неферментативно, очевидно, что эта система может участвовать также и в регенерации синтетических фенольных антиоксидантов. Действительно, показано, что в присутствии аскорбиновой кислоты происходит эффективное восстановление радикалов синтетического антиоксиданта пробуккола *in vitro* и *in vivo* [56]. Необходимо подчеркнуть, что, хотя витамин E транспортируется в организме частицами ЛНП, он не участвует в защите ЛНП от окисления, поскольку витамин E (как и другие жирорастворимые витамины) переносится в гидрофобном ядре частицы и не может восстанавливать гидропероксильные радикалы ($ROO^{\cdot}$), образующиеся в полиеновых ацилах фосфолипидов, т.к. окисленные ацилы вследствие увеличения полярности «выдвигаются» в водную фазу [57]. Отсутствие влияния высоких доз введённого витамина E на окисляемость частиц ЛНП *in vivo* подтверждена нами экспериментально [58]. Таким образом, исследования по использованию антиоксидантов (преимущественно витамина E) при атеросклерозе, исходившие из правильной установки о необходимости подавления окислительной модификации ЛНП, не могли увенчаться успехом, и разочарование в результатах этих исследований вполне понятно, поскольку проекты по использованию антиоксидантов были весьма трудоёмкими и затратными [41]. На основании вышеизложенного можно утверждать, что перспективы использования низкомолекулярных фенольных антиоксидантов (включая синтетические) в кардиологии далеко не исчерпаны, однако будущие исследования в этой области должны опираться на теоретические знания об окислительном метаболизме биофенолов в организме.

В конечном итоге $O_2^{\cdot -}$ -зависимое повреждение эндотелиоцитов провоцирует стимуляцию апоптоза и гибель клеток эндотелия, что, в свою очередь, облегчает проникновение окислительно-модифицированных ЛНП в стенку сосудов, вызывая их предатерогенное (липоидозное) повреждение [55]. Таким образом, можно утверждать, что развитие окислительного и последующего карбонильного стресса при атерогенезе

приводит к нарушению сбалансированности процессов образования и утилизации физиологически активных липогидропероксидов и является ключевым фактором, вызывающим предатерогенные повреждения стенки сосудов и последующее формирование атеросклеротических бляшек (рис. 2) [59].

Роль глутатионпероксидаз в атеросклерозе. Известно, что основную функцию по нейтрализации липогидропероксидов, являющихся пусковым механизмом атерогенеза, выполняют два семейства пероксидаз: глутатионпероксидазы и пероксиредоксины. Среди глутатионпероксидаз наиболее изученной в отношении атерогенеза является широко распространенная изоформа GPx1. Нарушение экспрессии гена *GPx1* провоцирует повышенную восприимчивость эндотелиоцитов к окислительным агентам. У мышей, нокаутных по *ApoE* и *GPx1*, ускорился процесс

атеросклеротического поражения, в то время как у трансгенных животных с повышенной экспрессией *GPx1* наблюдали улучшение состояния эндотелия [60]. Следует отметить, что активность GPx (как и большинства других ферментов) может ингибироваться дикарбонилами, образующимися в ходе ПОЛ. Дикарбонилы, образуя межмолекулярные сшивки в белках, приводят к конформационным изменениям, что негативно влияет на активность ферментов [61].

Роль пероксиредоксинов в атеросклерозе. Вероятно, пероксиредоксины играют ключевую роль в ферментативной антиоксидантной защите эндотелиоцитов, на что указывает их высокий уровень экспрессии, на порядки превосходящий уровень экспрессии других ферментов-антиоксидантов [62]. Показано, что дефицит Prx1 приводит к развитию воспалительных процессов, а также к повреждению сосудов и росту

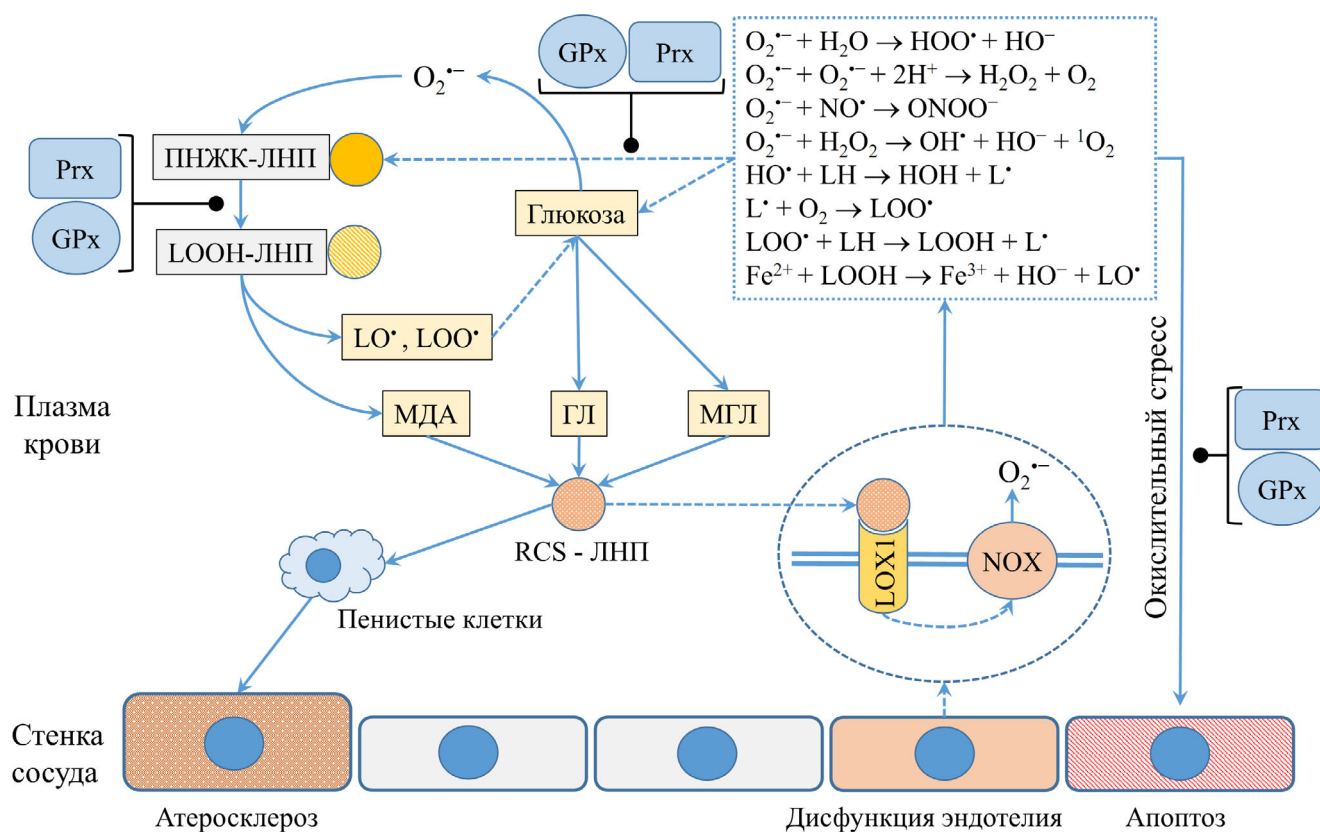


Рис. 2. Механизм развития атеросклероза, роль пероксиредоксинов (Prx) и глутатионпероксидаз (GPx) в этом процессе. Подавление свободнорадикальных реакций под действием Prx и GPx отмечено линией с точкой. Стимулирующий эффект отмечен обычной стрелкой, опосредованный эффект отмечен пунктирной стрелкой. LOX-1 (lectin-type oxidized LDL receptor 1) — рецептор окисленных липопротеинов низкой плотности; NOX — NAD(P)H-оксидаза; ПНЖК — полиненасыщенные жирные кислоты; ЛНП — липопротеины низкой плотности; МДА — малоновый диальдегид; ГЛ — глиоксаль; МГЛ — метилглиоксаль; RCS-ЛНП — карбонил-модифицированные ЛНП. Представлены основные продукты окисления в плазме крови при атеросклерозе под действием супероксидного анион-радикала: гидроксильный радикал (HO•), липоалкильный радикалы (L•), липоксильный радикалы (LO•), липопероксильный радикалы (LOO•) и липогидропероксиды (LOOH), пероксид водорода H₂O₂, пероксинитрит (ONOO⁻). GPx и Prx осуществляют восстановление H₂O₂, ONOO⁻ и LOOH, тем самым препятствуя развитию окислительного стресса и прогрессированию атеросклероза

тромбообразований [63]. Мыши, нокаутированные по генам *PRDX1* и *ApoE*, имеют более обширные атеросклеротические поражения сосудов, нежели мыши, нокаутированные только по одному гену — *ApoE* [63]. Кроме того, нокаут *PRDX1* приводит к развитию дефектов гладкомышечных клеток сосудов (VSMC) [64]. Недостаток Prx2 также усугубляет атеросклероз у мышей, нокаутных по *ApoE* [65]. Экстраклеточная форма Prx4 связывается с поверхностью эндотелиальных клеток (через гепарансульфат) и обеспечивает защиту клеток от внеклеточных АФК. Суперэкспрессия человеческого *PRDX4* у трансгенных мышей, нокаутных по *ApoE*^{-/-}, значительно подавляет развитие атеросклероза, препятствует развитию воспаления, окислительного стресса и некротической гибели клеток [66]. Мыши, нокаутные по гену *PRDX6*, имеют значительно большее количество атеросклеротических поражений аорты, чем мыши дикого типа [67, 68]. Таким образом, многие экспериментальные данные указывают на важную антиатерогенную роль Prx1–6 в клетках эндотелия [69]. Следует также отметить, что пероксиредоксины (как и в случае глутатионпероксидаз) ингибируются низкомолекулярными дикарбонилами [70]. Очевидно, что подавление активности Prx1–6 ослабляет антиоксидантную защиту эндотелиальных клеток, способствуя прогрессированию окислительного стресса и дальнейшему повреждению эндотелия, приводящему к его дисфункции.

Диабет. Диабет — это системное заболевание, связанное с нарушением в обмене углеводов. Диабет 1-го типа (инсулин-зависимый диабет) связан с деструкцией β -клеток островков Лангерганса, что влечёт за собой недостаточную секрецию инсулина. Диабет 2-го типа (инсулин-независимый диабет) связан с изменением чувствительности клеток к инсулину. Одним из признаков диабета является кетоз и/или ацидоз. В свою очередь, и кетоз, и большая часть случаев развития ацидоза связаны с развитием окислительного стресса [71].

При дефиците инсулина развивается гипергликемия. При гипергликемии существенно повышается концентрация свободной глюкозы в крови и тканях, что приводит к более интенсивному гликированию белков, в первую очередь гемоглобина, альбуминов, коллагена, кристаллинов и апопротеина ЛНП. К наиболее распространённым конечным продуктам гликирования относятся карбоксиметиллизин, карбоксиэтиллизин и аргпиримидин [72]. При взаимодействии продуктов гликирования с рецепторами увеличивается продукция провоспалительных цитокинов (TNF α , IL-1, IL-6, молекул ад-

гезии, факторов роста), которые нарушают функцию эндотелия сосудов.

Кроме того, интенсивное гликирование белков приводит к активации ряда оксидаз (NAD(P)H-оксидазы, глюкооксидазы), в результате чего возрастает продукция СР, АФК и АФА в клетке. На модели аллоксанового диабета, основанной на повышенном генерировании $O_2^{\cdot-}$ в β -клетках поджелудочной железы, было установлено, что гипoinsулинемия и гипергликемия у животных в этих условиях непосредственно связаны со свободнорадикальным повреждением и снижением активности Cu/Zn-SOD и GPx. В связи с этим показательно, что у морских свинок (в отличие от крыс, резистентных к действию аллоксана) активность Cu/Zn-SOD и GPx в поджелудочной железе в несколько раз выше, чем у крыс. Вместе с тем индукция синтеза Cu/Zn-SOD и GPx в β -клетках поджелудочной железы крыс делает этих животных резистентными к действию аллоксана, подобно морским свинкам [73]. Рост уровня окислительных процессов, подавление активности антиоксидантных ферментов, приводит к развитию окислительного стресса, который снижает эффективность сигнально-регуляторной функции инсулина, что способствует ещё большему росту уровня глюкозы в крови. При диабете наблюдается увеличение окислительной модификации ЛНП, что происходит вследствие соокисления глюкозы с полиеновыми липидами, которое сопровождается образованием $O_2^{\cdot-}$ и липидных радикалов. Кроме того, у больных диабетом происходит увеличение окислительной деструкции молекул ДНК, характеризующееся уменьшением длины теломера в ядерных клетках крови с одновременным увеличением уровня конечного продукта окислительного катаболизма ДНК — 8-гидроксигуанина, в крови и моче, что сопряжено со вторичной индукцией окислительного стресса у этих больных [59].

Активация окислительных процессов приводит к интенсификации ПОЛ и автоокислению сахаров, что способствует росту уровня дикарбониллов (МДА, глиоксаль и метилглиоксаль) и развитию карбонильного стресса. Диабетическая гипергликемия сопровождается интенсификацией автоокисления глюкозы, в результате чего образуется дикарбонил — глиоксаль (гомолог МДА). Активация гликолиза при гипергликемии приводит к накоплению триозофосфатов, при ферментативном превращении которых образуется изомер МДА — метилглиоксаль [74]. Кроме того, свободные радикалы, образующиеся при разложении органических гидропероксидов могут индуцировать неферментативное образование метилглиоксала при ради-

кальной атаке промежуточных продуктов гликолиза — фосфорилированных производных глюкозы [75]. У больных сахарным диабетом 2-го типа обнаруживается значительное увеличение глиоксала и метилглиоксала в плазме крови. Эти дикарбонилы, подобно МДА, могут вызывать модификацию апопротеина В-100 ЛНП, которая опознаётся скавенджер-рецепторами макрофагов и тем самым индуцирует накопление ЛНП в стенке сосудов с последующим развитием липидозных повреждений. Метформин, применяемый сегодня при терапии сахарного диабета 2-го типа, позволяет существенно снизить уровень окисления и карбонильной модификации ЛНП [5]. Метформин относится к бигуанидам, т.е. его структура включает две гуанидиновых группы ($\text{H}_2\text{N}(\text{NH})\text{C}-\text{HN}-\text{C}(\text{NH})\text{NH}_2$), которые «охотно» атакуются глиоксалем/метилглиоксалем с образованием гуанидин-дикарбонильных продуктов, благодаря чему концентрация свободных карбонил в крови снижается.

Известно, что МДА, глиоксаль и метилглиоксаль легко проникают через мембрану клеток и способны ингибировать внутриклеточные антиоксидантные ферменты. Примечательно, что глиоксаль и метилглиоксаль, накапливающиеся при диабетической гипергликемии, являются более эффективными ингибиторами большинства антиоксидантных ферментов по сравнению с МДА [75]. Интересно, что несмотря на структурное сходство МДА, глиоксаль и метилглиоксаль оказывают разное влияние на физико-химические характеристики белков. Например, метилглиоксаль в большей степени, чем глиоксаль и другие карбонильные соединения, влияет на кинетические параметры катализируемой GPx реакции восстановления пероксида водорода. Было показано, что при взаимодействии аминокислот и белков с метилглиоксалем образуется супероксидный радикал и другие СР-интермедиаты, которые могут усиливать модифицирующее действие метилглиоксала. Повидимому, основное ингибирующее действие дикарбонил в ферменты связано с модификацией структуры белков. В результате взаимодействия дикарбонил в аминокислотными группами белков (реакция Майяра) образуются межмолекулярные сшивки, меняющие конформацию и нативную структуру ферментов. Благодаря этим свойствам активные карбонильные соединения (RCS) по сравнению с гидропероксидами являются более сильными модификаторами. Было показано, что у больных сахарным диабетом 2-го типа наблюдается резкое падение активности эритроцитарных антиоксидантных ферментов: каталазы, Cu/Zn-SOD и GPx [76], причём при терапии с использованием метфор-

мина активность эритроцитарной Cu/Zn-SOD значительно возрастала [77].

Роль глутатионпероксидазы в диабете. Несомненно, глутатионпероксидазы являются важнейшими антиоксидантами, однако их роль в диабете неоднозначна. Например, нокаут GPx1 у мышей вызывает диабетоподобный фенотип 1-го типа, в то время как его суперэкспрессия приводит к фенотипу диабета 2-го типа [78]. В другом исследовании было показано, что повышенный уровень GPx1 препятствует патологическому ремоделингу левого желудочка, вызванному диабетом [79]. Недостаток GPx3 ассоциирован с ростом уровня пероксидов в крови и снижением сигнальной функции инсулина [78]. У трансгенных мышей с суперэкспрессией GPx4 (в 2–3 раза выше нормы) наблюдался рост устойчивости β -клеток к длительным повышениям уровня свободных жирных кислот в крови, вызывающим поражение поджелудочной железы [80].

Роль пероксиредоксинов в диабете. Совсем недавно было показано, что Prx1 является важнейшим антиоксидантным ферментом β -клеток поджелудочной железы. Нокаут гена *PRDX1* с помощью короткой интерферирующей РНК (siRNA) или ингибирование фермента Prx1 с помощью коноидина А увеличивало чувствительность β -клеток к действию H_2O_2 и пероксинитрита. Напротив, суперэкспрессия *PRDX1* увеличивала резистентность β -клеток крыс к окислительному стрессу [81]. Суперэкспрессия *PRDX4* также увеличивала выживаемость β -клеток у трансгенных мышей, нормализовала морфофункциональное состояние поджелудочной железы в ответ на действие стрептозотцина, часто используемого для моделирования диабета у животных [82]. У нокаутных по гену *PRDX6* мышей развивался фенотип, сходный с ранней стадией диабета, вызванный как сниженной глюкозозависимой секрецией инсулина, так и повышенной инсулинорезистентностью. Нарушение сигнализации инсулина у таких мутантных животных приводило к снижению поглощения глюкозы мышцами, наблюдались морфологические и ультраструктурные изменения островков Лангерганса, печени, а также рост ПОЛ и уровня провоспалительных цитокинов в тканях [83].

Общность диабета и атеросклероза. Нарушения углеводного обмена при диабете могут стимулировать развитие карбонильного стресса и интенсификацию атерогенной модификации ЛНП. Это объясняет известный факт прогрессирования атеросклероза при наличии диабета, причём, в соответствии с полученными нами данными, можно высказать гипотезу о едином молекулярном механизме повреждения

стенки сосудов при атеросклерозе и сахарном диабете с участием карбонил-модифицированных ЛНП. Следовательно, молекулярный механизм повреждения стенки сосудов при атеросклерозе и сахарном диабете сходен и состоит в увеличении окислительной модификации ЛНП, вызванной низкомолекулярными карбонильными продуктами СР-окисления липидов при атеросклерозе или автоокисления молекул глюкозы при сахарном диабете (рис. 2). Таким образом, выдвигаемая нами гипотеза удовлетворительно объясняет возможность индукции атерогенеза при диабете, а также тот факт, что наличие диабета сильно увеличивает риск возникновения атеросклероза [74].

Приведённые данные позволяют полагать, что образование окислительно-модифицированных ЛНП является ключевым фактором атерогенеза и дисфункции эндотелия — процессов, играющих ключевую роль в развитии атеросклероза и диабета. Антиоксидантная терапия, как способ противодействия развитию окислительного стресса у диабетических пациентов, была предложена более десяти лет назад. Однако опыт показывает, что классические антиоксиданты (типа витаминов Е и С) недостаточно эффективны для нейтрализации окислительных процессов у больных диабетом [71]. Очевидно, что необходимо применение препаратов, способных нейтрализовать не только окислительный, но и карбонильный стресс.

ПРИМЕНЕНИЕ ЭКЗОГЕННЫХ ФЕРМЕНТОВ-АНТИОКСИДАНТОВ ПРИ СВОБОДНОРАДИКАЛЬНЫХ ПАТОЛОГИЯХ

Вышеописанные свободнорадикальные патологии, несмотря на различия в клинических проявлениях, имеют общий механизм инициации — активация СР-процессов и последующее развитие окислительного стресса. После понимания механизмов развития окислительного стресса, начиная с 50-х годов XX века начались активные работы по созданию препаратов антиоксидантного действия. На сегодняшний день изучено несколько тысяч соединений как природного, так и синтетического происхождения, обладающих антиоксидантной активностью [24, 25, 84]. Низкомолекулярные препараты антиоксидантного действия широко используются в современной медицине. Однако они не всегда эффективны, что связано с их быстрой инактивацией, т.к. прореагировав с АФК, они зачастую необратимо окисляются и исключаются из пула антиоксидантов. Такие свойства низкомолекулярных антиоксидантов требуют их применения

в высоких концентрациях, что также не всегда возможно из-за проявления токсичных свойств в этих дозах [25, 84, 85]. Более того, некоторые из низкомолекулярных антиоксидантов (например, аскорбиновая кислота) в определённых условиях (гипероксия, присутствие ионов металлов переменной валентности и т.д.) могут проявлять прооксидантную функцию или же, прореагировав с первичными радикалами, превратиться во вторичный радикал. Ферменты лишены такого недостатка, например, одна молекула каталазы способна восстановить несколько миллионов молекул H_2O_2 за 1 мин, не теряя своих каталитических свойств. Кроме того, ферменты не обладают цитотоксичностью, как большинство низкомолекулярных соединений (особенно синтетического происхождения) [25, 84, 85]. В этой связи создание терапевтических препаратов антиоксидантного действия на основе ферментов представляется перспективным направлением. Ранее мы рассматривали основные типы ферментов-антиоксидантов в организме млекопитающих: супероксиддисмутаза (SOD), каталаза (CAT), тиоредоксины (Trx), глутатионпероксидазы (GPx), глутатион-S-трансферазы (GST), пероксиредоксины (Prx) и др. [86]. Мы отмечали, что восстановление гидропероксидов с участием ферментов-пероксидаз может играть ключевую роль в предотвращении окислительного стресса, поскольку гидропероксиды (H_2O_2 , ROOH) при их разложении (гомолизе) служат основными источниками активных свободных радикалов ($HO^\bullet$, $RO^\bullet$), способных инициировать/продолжить цепное СР-окисление биомолекул, тем самым усиливая окислительный стресс [86]. В настоящее время с практической точки зрения наибольший интерес вызывают супероксиддисмутаза (восстанавливающие супероксидный анион-радикал: $2O_2^{\cdot -} + 2H^+ \rightarrow H_2O_2 + O_2$), а также каталаза (восстанавливающая пероксид водорода: $2H_2O_2 \rightarrow 2H_2O + O_2$) и другие пероксидазы, способные восстанавливать органические и неорганические гидропероксиды ($ROOH + 2R'SH \rightarrow ROH + R'SSR' + H_2O$) [86].

Супероксиддисмутаза и её производные. После открытия McCord и Fridovich [87] в 1969 г. нового класса ферментов — супероксиддисмутаза, и понимания их важной антиоксидантной функции, начались работы по их использованию в качестве антиоксидантных агентов. Уже спустя 5 лет после открытия SOD была проведена первая работа, посвящённая исследованию радиозащитных свойств Cu/Zn-SOD из эритроцитов быка. Внутривенное введение супероксиддисмутаза (Mn-SOD, Cu/Zn-SOD) до воздействия радиации уменьшает уровень радиационных

повреждений геномной ДНК, защищает клетки костного мозга, снижает степень поражения слизистых и способствует росту выживаемости животных [25]. Внутривентральное введение мышам рекомбинантной Mn-SOD человека (в дозе 0,08 мг/кг) защищает животных от летальных доз радиации. Более того, рекомбинантная Mn-SOD защищает нормальные клетки от радиации, но радиосенсибилизирует раковые, что может найти применение в лучевой терапии рака [88]. Подкожное введение рекомбинантной Mn-SOD эффективно защищает клетки мозга от действия гамма-излучения и потока нейтронов, имитирующих уровни излучения, которым могут подвергаться космонавты во время длительных миссий в дальний космос. Нейропротекторный эффект рекомбинантной Mn-SOD, помимо антиоксидантного действия, обусловлен активацией сфингомиелиназы (SMase) [89]. Кроме того, была показана нефропротекторная активность рекомбинантной Mn-SOD человека на животной модели острого почечного поражения, что проявлялось в сохранении их нормального морфофункционального состояния [90]. Рекомбинантная Cu/Zn-содержащая супероксиддисмутаза человека (SOD3), применяется в настоящее время в качестве лекарственного препарата (глазных капель и раствора для инфузий) при открытоугольной глаукоме, аденовирусном поражении глаз и вторичных кератопатиях, а также в комплексной профилактике развития интраоперационных осложнений при эндопротезировании крупных суставов. Применение рекомбинантной SOD3 человека подавляет СР-процессы, окисление белков и липидов, нормализует окислительно-восстановительный статус тканей и предупреждает гибель клеток [91].

Несмотря на важную антиоксидантную роль супероксиддисмутаза, у этих ферментов есть существенное ограничение, связанное с тем, что они нейтрализуют только супероксидный анион-радикал, тогда как в общем пуле АФК/АФА при окислительном стрессе значительная часть представлена гидропероксидами, которые супероксиддисмутаза не способна нейтрализовать. Это побудило исследователей модифицировать SOD с целью расширения её субстратной специфичности путём химической сшивки SOD с пероксидазами. Например, были получены конъюгаты Cu/Zn-SOD дрожжей и Mn-SOD *Escherichia coli* с каталазой быка, которые сохраняли как пероксидазную, так и супероксиддисмутазную активности [92]. Были получены химические конъюгаты супероксиддисмутаза и каталазы из печени быка, которые обладали высокой терапевтической активностью [93]. Известно,

что химическая сшивка белков происходит случайным образом, что может приводить к экранированию активных центров ферментов и снижению их активности; для решения этой проблемы были получены химерные рекомбинантные белки. Например, был получен химерный фермент (Mn-SOD–VHb), совмещающий в себе человеческую Mn-SOD и бактериальный гемоглобин (VHb) грамотрицательных аэробных бактерий рода *Vitreoscilla* [95]; химерный рекомбинантный белок, совмещающий в себе человеческую глутатионпероксидазу GPx-1 и супероксиддисмутаза SOD термофильного глубоководного червя *Alvinella pompejana* [96]; а также рекомбинантный химерный белок PSH, состоящий из Prx6 человека и Mn-SOD *E. coli* [95]. Благодаря широкой субстратной специфичности химерные антиоксидантные ферменты демонстрируют высокий терапевтический потенциал, что делает их весьма привлекательными в практическом применении.

Пероксиредоксины и их производные. Ранее мы отмечали важную роль пероксиредоксинов в нейтрализации окислительного стресса при различных СР-патологиях. Мы предположили, что применение экзогенных пероксиредоксинов позволит существенно скорректировать течение болезней, связанных с окислительным стрессом. Проведено исследование радиозащитного действия рекомбинантных пероксиредоксинов (Prx1, Prx2, Prx6 и химерного белка PSH) на модели тотального облучения мышей сублетальными и летальными дозами (5–11 Гр) рентгеновского излучения. Внутривенное введение животным рекомбинантных пероксиредоксинов и их модифицированных форм незадолго до облучения существенно снижает костномозговой (лейкопения и тромбопения) и кишечный (поражение слизистой) синдромы острой лучевой болезни [97, 98]. Фактор изменения дозы для рекомбинантных пероксиредоксинов равен примерно 1,3–1,4, что является хорошим показателем для природных субстанций [22, 98–101]. Важно отметить, что радиозащитный эффект проявляла даже мутантная форма пероксиредоксина, не обладающая пероксидазной активностью (Prx6-C47S), что обусловлено сигнально-регуляторной функцией белка. Показано, что радиозащитный эффект пероксиредоксинов может быть опосредован стимуляцией Toll-подобного рецептора 4 (TLR4) и активацией NF-κB, фосфорилированного по Ser536 [49], что приводит к реализации антиапоптотического эффекта. Кроме того, было показано, что экзогенный Prx6 может проникать в клетки 3Т3 (по-видимому, благодаря фосфолипазной активности iPLA2), тем самым повышая их антиоксидант-

ный статус и непосредственно оказывая влияние на сигнально-регуляторные пути клетки [49]. На рис. 1 представлены основные сигнальные пути клетки (TLR4/NF- κ B, ASK-1/AP-1, KEAP-1/Nrf2), в которые может быть вовлечён экзогенный Prx6. Следует отметить, что эти сигнальные каскады тесно связаны друг с другом. Несмотря на то что транскрипционные факторы NF- κ B, Nrf2 и AP-1 регулируют различные процессы клетки и их активация приводит к разным последствиям, они зачастую активируются одними и теми же стимулами. Во многих исследованиях было показано, что эти транскрипционные факторы могут как взаимно подавлять, так и активировать друг друга [102]. Например, экспрессия многих генов требует одновременного присутствия AP-1 и NF- κ B [103]. По-видимому, в зависимости от физиологического состояния клетки и уровня внутриклеточных СР-повреждений, клетка определяет, какой из сигнальных путей будет преобладать. Причём в этом процессе важную роль играют пероксиредоксины в качестве редокс-переключателей [40]. Введение экзогенного Prx6 корректирует окислительно-восстановительный статус клетки, а также направляет её по сигнально-регуляторному пути, опосредованному NF- κ B, что в комплексе приводит к подавлению апоптоза и выживанию клетки в условиях окислительного стресса [49].

Совсем недавно нами были проведены эксперименты по исследованию противодиабетического действия пероксиредоксинов на мышах (модель аллоксан-индуцированного диабета) и β -клетках инсулиномы крысы (модель гипергликемии) [104, 105]. Было установлено, что введение рекомбинантного Prx6 вызывает снижение уровня АФК и защищает β -клетки RIN-m5F от гипергликемии, снижая их гибель по сравнению с контролем в несколько раз. Более того, экзогенный Prx6 стимулирует секрецию инсулина β -клетками, что, вероятно, обусловлено регуляцией активности сигнального каскада NF- κ B, в частности, через активацию фосфорилирования RelA/p65 по Ser536 (по аналогии с TLR4-опосредованным радиозащитным действием Prx6). Было показано, что экзогенный Prx6 предотвращает гипергликемию, снижает уровень смертности, восстанавливает нормальный профиль цитокинов в плазме крови, подавляет апоптоз клеток селезёнки и снижает разрушение β -клеток в островках Лангерганса у мышей с тяжёлой формой диабета, индуцированного аллоксаном [104, 105].

Кроме того, внутривенное введение пероксиредоксинов и их модифицированных форм перед ишемически-реперфузионным пораже-

нием сердца [106, 107], кишечника [108, 109] и почек [110, 111] увеличивает выживаемость животных, подавляет окислительные процессы и способствует сохранению морфофункционального состояния ишемизированных тканей на стадии реперфузии. Помимо нейтрализации гидропероксидов, экзогенные пероксиредоксины вызывают индукцию экспрессии NO-синтаз (eNOS, iNOS) в ишемизированных тканях и последующий рост уровня NO в крови, что приводит к вазодилатации сосудов, подавлению тромбообразования и быстрой нормализации микроциркуляции кровотока при ишемии-реперфузии [108, 109].

Перспективы применения ферментов-антиоксидантов. Основными недостатками препаратов на основе ферментов-антиоксидантов является их ограниченная биодоступность и недостаточная стабильность. В настоящее время с помощью генно-инженерных и биохимических методов активно ведутся работы по устранению этих проблем. Например, инкапсуляция ферментов в наночастицы, гидрогели или липосомы позволяет увеличить время их действия, а также защитить белки от деградации [112]. Помимо инкапсуляции, эффективным способом доставки ферментов является их сорбция на поверхности наночастиц, которые сами могут служить терапевтическими агентами [113]. Например, сорбция каталазы и Cu/Zn-SOD на поверхности наночастиц диоксида церия (CeO_2) позволила получить частицы с большим антиоксидантным потенциалом, чем при использовании ферментов по отдельности [114]. Стабилизация ферментов и пролонгирование времени их действия (циркуляции в организме) достигается благодаря конъюгированию ферментов с полиэтиленгликолем (ПЭГ) или сахарами (галактозой или маннозой). Было показано, что конъюгирование каталазы с ПЭГ практически не оказывает влияния на её активность, но при этом увеличивает время её выведения из кровотока (спустя 60 мин после введения модифицированной каталазы её уровень в крови примерно в 2 раза выше, чем исходного фермента) и в 3–4 раза увеличивает устойчивость конъюгата к действию протеаз, что позволяет достичь большего терапевтического эффекта [115].

Эффективность терапевтического действия антиоксидантного фермента зависит от его способности достигать места образования СР или АФК/АФА и длительности его нахождения в этом месте. Иммобилизация супероксиддисмутазы и каталазы на суперпарамагнитных наночастицах оксида железа (SPION) размером около 400 нм, последующее введение в организм и удержание с помощью внешнего магнитного

поля в зоне поражения позволяет значительно повысить терапевтическую активность этих антиоксидантных ферментов. Конъюгация SOD и каталазы с частицами SPION незначительно влияет на ферментативную активность, что позволяет надеяться на возможность применения подобного подхода для широкого спектра ферментов [116].

Для адресной доставки антиоксидантных ферментов также используется генно-инженерный подход, позволяющий получать ферменты с PTD-пептидами (PTD – protein transduction domain), которые обеспечивают проникновение белка через плазматическую мембрану клетки. Например, таким образом были получены PTD-модифицированные пероксиредоксины [117, 118]. Следует отметить, что некоторые пероксиредоксины способны проникать в клетки без PTD-пептидов. Нами было обнаружено, что введение рекомбинантного Prx6 в культуру

клеток эмбриональных фибробластов 3T3 приводит к частичному проникновению белка в клетки [49]. Таким образом, благодаря своим уникальным антиоксидантным и сигнально-регуляторным свойствам Prx6 является перспективным объектом исследования при разработке препаратов на основе ферментов-антиоксидантов.

Финансирование. Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (гранты №№ 19-04-00080 и 20-34-70037).

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

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

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Ланкин В. З., Тихазе А. К. (2016) Важная роль свободнорадикальных процессов в этиологии и патогенезе атеросклероза и сахарного диабета, *Кардиология*, **56**, 97-105.
2. Forman, H. J., Zhang, H. (2021) Targeting oxidative stress in disease: promise and limitations of antioxidant therapy, *Nat. Rev. Drug Discov.*, **20**, 689-709, doi: 10.1038/s41573-021-00233-1.
3. Sies, H., Berndt, C., and Jones, D. P. (2017) Oxidative stress, *Annu. Rev. Biochem.*, **86**, 715-748, doi: 10.1146/annurev-biochem-061516-045037.
4. Sies, H., and Jones, D. P. (2020) Reactive oxygen species (ROS) as pleiotropic physiological signalling agents, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, **21**, 363-383, doi: 10.1038/s41580-020-0230-3.
5. Lankin, V. Z., Tikhaze, A. K., Kapel'ko, V. I., Shepel'kova, G. S., Shumaev, K. B., et al. (2007) Mechanisms of oxidative modification of low density lipoproteins under conditions of oxidative and carbonyl stress, *Biochemistry (Moscow)*, **72**, 1081-1090, doi: 10.1134/s0006297907100069.
6. Altomare, A., Baron, G., Gianazza, E., Banfi, C., Carini, M., and Aldini, G. (2021) Lipid peroxidation derived reactive carbonyl species in free and conjugated forms as an index of lipid peroxidation: limits and perspectives, *Redox Biol.*, **42**, 101899, doi: 10.1016/j.redox.2021.101899.
7. Anderson, M. M., Hazen, S. L., Hsu, F. F., Heinecke, J. W. (1997) Human neutrophils employ the myeloperoxidase-hydrogen peroxide-chloride system to convert hydroxy-amino acids into glycolaldehyde, 2-hydroxypropanal, and acrolein: a mechanism for the generation of highly reactive α -hydroxy and α,β -unsaturated aldehydes by phagocytes at sites of inflammation, *J. Clin. Invest.*, **99**, 424-432, doi: 10.1172/JCI119176.
8. Talukdar, D., Chaudhuri, B. S., Ray, M., and Ray, S. (2009) Critical evaluation of toxic versus beneficial effects of methylglyoxal, *Biochemistry (Moscow)*, **74**, 1059-1069, doi: 10.1134/s0006297909100010.
9. Król, M., Kepinska, M. (2020) Human nitric oxide synthase – its functions, polymorphisms, and inhibitors in the context of inflammation, diabetes and cardiovascular diseases, *Int. J. Mol. Sci.*, **22**, 56, doi: 10.3390/ijms22010056.
10. Augusto, O., Bonini, M. G., Amanso, A. M., Linares, E., Santos, C. C. X., and De Menezes, S. L. (2002) Nitrogen dioxide and carbonate radical anion: two emerging radicals in biology, *Free Radic. Biol. Med.*, **32**, 841-859, doi: 10.1016/s0891-5849(02)00786-4.
11. Aicardo, A., Martinez, D. M., Campolo, N., Bartsaghi, S., and Radi, R. (2016) Biochemistry of nitric oxide and peroxynitrite: sources, targets and biological implications, *Biochem. Oxid. Stress*, 49-77, doi: 10.1007/978-3-319-45865-6_5.
12. Gupta, D., Harish, B., Kissner, R., and Koppenol, W. H. (2009) Peroxynitrate is formed rapidly during decomposition of peroxynitrite at neutral pH, *Dalt. Trans.*, **29**, 5730-5736, doi: 10.1039/b905535e.
13. Phaniendra, A., Jestadi, D. B., and Periyasamy, L. (2015) Free radicals: properties, sources, targets, and their implication in various diseases, *Ind. J. Clin. Biochem.*, **30**, 11-26, doi: 10.1007/s12291-014-0446-0.
14. Xue, Q., Yan, Y., Zhang, R., and Xiong, H. (2018) Regulation of iNOS on immune cells and its role in diseases, *Int. J. Mol. Sci.*, **19**, 3805, doi: 10.3390/ijms19123805.
15. Radi, R. (2013) Peroxynitrite, a stealthy biological oxidant, *J. Biol. Chem.*, **288**, 26464-26472, doi: 10.1074/jbc.R113.472936.
16. Ярмоненко С. П., Вайнсон А. А. (2004) *Радиобиология человека и животных*, Высшая школа, Москва.
17. Mu, H., Sun, J., Li, L., Yin, J., Hu, N., et al. (2018) Ionizing radiation exposure: hazards, prevention, and biomarker screening, *Environ. Sci. Pollut. Res. Int.*, **25**, 15294-15306, doi: 10.1007/s11356-018-2097-9.
18. Gerschman, R., Gilbert, D. L., Nye, S. W., Dwyer, P., and Fenn, W. O. (1954) Oxygen poisoning and X-irradiation: a mechanism in common, *Science*, **119**, 623-626, doi: 10.1126/science.119.3097.623.
19. Bernheim, F. (1963) Biochemical implications of pro-oxidants and antioxidants, *Radiat. Res.*, **Suppl 3**, 17-32.
20. Ward, J.F. (1988) DNA damage produced by ionizing radiation in mammalian cells: identities, mechanisms of for-

- mation, and reparability, *Prog. Nucleic Acid Res. Mol. Biol.*, **35**, 95-125, doi: 10.1016/s0079-6603(08)60611-x.
21. Dong, S., Lyu, X., Yuan, S., Wang, S., Li, W., et al. (2020) Oxidative stress: a critical hint in ionizing radiation induced pyroptosis, *Radiat. Med. Prot.*, **1**, 179-185, doi: 10.1016/j.radmp.2020.10.001.
 22. Sharapov, M. G., Novoselov, V. I., and Gudkov, S. V. (2019) Radioprotective role of peroxiredoxin 6, *Antioxidants (Basel)*, **8**, 15, doi: 10.3390/antiox8010015.
 23. Vasin, M. V., and Ushakov, I. B. (2020) Radiomodulators as agents of biological protection against oxidative stress under the influence of ionizing radiation, *Biol. Bull. Rev.*, **10**, 251-265, doi: 10.1134/S2079086420040106.
 24. Legeza, V. I., Grebenyuk, A. N., and Drachev, I. S. (2019) Radiomitigators: classification, pharmacological properties, and application prospects, *Biol. Bull.*, **46**, 1625-1632, doi: 10.1134/S1062359019120045.
 25. Gudkov, S. V., Popova, N. R., and Bruskov, V. I. (2015) Radioprotective substances: history, trends and prospects, *Biophysics*, **60**, 659-667, doi: 10.1134/S0006350915040120.
 26. Sun, J., Chen, Y., Li, M., and Ge, Z. (1998) Role of antioxidant enzymes on ionizing radiation resistance, *Free Radic. Biol. Med.*, **24**, 586-593, doi: 10.1016/s0891-5849(97)00291-8.
 27. Diamond, A. M., Murray, J. L., Dale, P., Tritz, R., Sandstrom, P. A., and Grdina, D. J. (1995) Effects of selenium on glutathione peroxidase activity and radioprotection in mammalian cells, *Radiat. Oncol. Invest.*, **3**, 383-386.
 28. Verma, P., Kunwar, A., Arai, K., Iwaoka, M., and Priyadarsini, K. I. (2018) Mechanism of radioprotection by dihydroxy-1-selenolane (DHS): effect of fatty acid conjugation and role of glutathione peroxidase (GPx), *Biochimie*, **144**, 122-133, doi: 10.1016/j.biochi.2017.10.021.
 29. Mansur, D. B., Kataoka, Y., Grdina, D. J., Diamond, A. M. (2001) Radiosensitivity of mammalian cell lines engineered to overexpress cytosolic glutathione peroxidase, *Radiat. Res.*, **155**, 536-542, doi: 10.1667/0033-7587(2001)155[0536:romcle]2.0.co;2.
 30. Stevens, G. N., Joiner, M. C., Joiner, B., Johns, H., and Stratford, M. R. (1989) Role of glutathione peroxidase in the radiation response of mouse kidney, *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.*, **16**, 1213-1217, doi: 10.1016/0360-3016(89)90286-1.
 31. Toppo, S., Flohé, L., Ursini, F., Vanin, S., and Maiorino, M. (2009) Catalytic mechanisms and specificities of glutathione peroxidases: variations of a basic scheme, *Biochim. Biophys. Acta Gen. Subj.*, **1790**, 1486-1500, doi: 10.1016/j.bbagen.2009.04.007.
 32. Jiao, Y., Wang, Y., Guo, S., and Wang, G. (2017) Glutathione peroxidases as oncotargets, *Oncotarget*, **8**, 80093-80102, doi: 10.18632/oncotarget.20278.
 33. Lee, H. C., Kim, D. W., Jung, K. Y., Park, I. C., Park, M. J., et al. (2004) Increased expression of antioxidant enzymes in radioresistant variant from U251 human glioblastoma cell line, *Int. J. Mol. Med.*, **13**, 883-887.
 34. Zhang, S., Wang, W., Gu, Q., Xue, J., Cao, H., et al. (2014) Protein and miRNA profiling of radiation-induced skin injury in rats: the protective role of peroxiredoxin-6 against ionizing radiation, *Free Radic. Biol. Med.*, **69**, 96-107, doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2014.01.019.
 35. Lee, K., Park, J. S., Kim, Y. J., Soo Lee, Y., Sook Hwang, T., et al. (2002) Differential expression of Prx I and II in mouse testis and their up-regulation by radiation, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **296**, 337-342, doi: 10.1016/s0006-291x(02)00801-x.
 36. Miura, Y., Kano, M., Yamada, M., Nishine, T., Urano, S., et al. (2007) Proteomic study on X-irradiation-responsive proteins and ageing: search for responsible proteins for radiation adaptive response, *J. Biochem.*, **142**, 145-155, doi: 10.1093/jb/mvml118.
 37. An, J. H., Seong, J. S., Proteomics, R., and Radiosusceptibility, A. (2006) Proteomics analysis of apoptosis-regulating proteins in tissues with different radiosensitivity, *J. Radiat. Res.*, **47**, 147-155, doi: 10.1269/jrr.47.147.
 38. Cerda, M.B., Lloyd, R., Batalla, M., Giannoni, F., Casal, M., and Policastro, L. (2017) Silencing peroxiredoxin-2 sensitizes human colorectal cancer cells to ionizing radiation and oxaliplatin, *Cancer Lett.*, **388**, 312-319, doi: 10.1016/j.canlet.2016.12.009.
 39. Diaz, A.J.G., Tamae, D., Yen, Y., Li, J., and Wang, T. (2013) Enhanced radiation response in radioresistant MCF-7 cells by targeting peroxiredoxin II, *Breast Cancer Targets Ther.*, **5**, 87-101, doi: 10.2147/BCTT.S51378.
 40. Sharapov, M. G., and Novoselov, V. I. (2019) Catalytic and signaling role of peroxiredoxins in carcinogenesis, *Biochemistry (Moscow)*, **84**, 79-100, doi: 10.1134/S0006297919020019.
 41. Chen, M.-F., Keng, P. C., Shau, H., Wu, C.-T., Hu, Y.-C., et al. (2006) Inhibition of lung tumor growth and augmentation of radiosensitivity by decreasing peroxiredoxin I expression, *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.*, **64**, 581-591, doi: 10.1016/j.ijrobp.2005.10.012.
 42. Li, G., Xie, B., Li, X., Chen, Y., Xu, Y., et al. (2015) Downregulation of peroxiredoxin-I by β -elemene enhances the radiosensitivity of lung adenocarcinoma xenografts, *Oncol. Rep.*, **33**, 1427-1433, doi: 10.3892/or.2015.3732.
 43. Kwee, J. K. (2014) A paradoxical chemoresistance and tumor suppressive role of antioxidant in solid cancer cells: a strange case of Dr. Jekyll and Mr. Hyde, *Biomed Res. Int.*, **2014**, 209845, doi: 10.1155/2014/209845.
 44. Song, I.-S., Kim, H.-K., Jeong, S.-H., Lee, S.-R., Kim, N., et al. (2011) Mitochondrial peroxiredoxin III is a potential target for cancer therapy, *Int. J. Mol. Sci.*, **12**, 7163-7185, doi: 10.3390/ijms12107163.
 45. Chen, W. C., McBride, W. H., Iwamoto, K. S., Barber, C. L., Wang, C. C., et al. (2002) Induction of radioprotective peroxiredoxin-I by ionizing irradiation, *J. Neurosci. Res.*, **70**, 794-798, doi: 10.1002/jnr.10435.
 46. Zhang, B., Wang, Y., and Su, Y. (2009) Peroxiredoxins, a novel target in cancer radiotherapy, *Cancer Lett.*, **286**, 154-160, doi: 10.1016/j.canlet.2009.04.043.
 47. Jia, W., Chen, P., and Cheng, Y. (2019) PRDX4 and its roles in various cancers, *Technol. Cancer Res. Treat.*, **18**, 1533033819864313, doi: 10.1177/1533033819864313.
 48. Ho, J. N., Lee, S. B., Lee, S. S., Yoon, S. H., Kang, G. Y., et al. (2010) Phospholipase A2 activity of peroxiredoxin 6 promotes invasion and metastasis of lung cancer cells, *Mol. Cancer Ther.*, **9**, 825-832, doi: 10.1158/1535-7163.MCT-09-0904.
 49. Sharapov, M. G., Glushkova, O. V., Parfenyuk, S. B., Gudkov, S. V., Lunin, S. M., and Novoselova, E. G. (2021) The role of TLR4/NF- κ B signaling in the radioprotective effects of exogenous Prdx6, *Arch. Biochem. Biophys.*, **702**, 108830, doi: 10.1016/j.abb.2021.108830.
 50. Lankin, V. Z., and Tikhaze, A. K. (2016) Role of oxidative stress in the genesis of atherosclerosis and diabetes mellitus: a personal look back on 50 years of research, *Curr. Aging Sci.*, **10**, 18-25, doi: 10.2174/1874609809666160926142640.
 51. Lankin, V. Z., Tikhaze, A. K. (2003) *Free Radicals, Nitric Oxide, and Inflammation: Molecular, Biochemical, and Clinical Aspects*, IOS Press, NATO Science Series, Amsterdam.
 52. Mushenkova, N. V., Bezsonov, E. E., Orekhova, V. A., Popkova, T. V., Starodubova, A. V., and Orekhov, A. N. (2021) Recognition of oxidized lipids by macrophages and

- its role in atherosclerosis development, *Biomedicines*, **9**, 915, doi: 10.3390/biomedicines9080915.
53. Tribble, D. L., Barcellos-Hoff, M. H., Chu, B. M., and Gong, E. L. (1999) Ionizing radiation accelerates aortic lesion formation in fat-fed mice via SOD-inhibitable processes, *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.*, **19**, 1387-1392, doi: 10.1161/01.atv.19.6.1387.
 54. Lankin, V. Z., Tikhaze, A. K., and Kumskova, E. M. (2012) Macrophages actively accumulate malonyldialdehyde-modified but not enzymatically oxidized low density lipoprotein, *Mol. Cell. Biochem.*, **365**, 93-98, doi: 10.1007/s11010-012-1247-5.
 55. Chistiakov, D. A., Orekhov, A. N., and Bobryshev, Y. V. (2016) LOX-1-mediated effects on vascular cells in atherosclerosis, *Cell. Physiol. Biochem.*, **38**, 1851-1859, doi: 10.1159/000443123.
 56. Shumaev, K. B., Ruuge, E. K., Dmitrovsky, A. A., Bykhovsky V. Ya., and Kukharchuk, V. V. (1997) Effect of lipid peroxidation products and antioxidants on the formation of probucol radical in low density lipoproteins, *Biochemistry (Moscow)*, **62**, 657-660.
 57. Lankin, V. Z., Tikhaze, A. K., and Osis, Y. G. (2002) Modeling the cascade of enzymatic reactions in liposomes including successive free radical peroxidation, reduction, and hydrolysis of phospholipid polyenoic acyls for studying the effect of these processes on the structural-dynamic parameters of the membranes, *Biochemistry (Moscow)*, **67**, 566-574, doi: 10.1023/a:1015502429453.
 58. Lankin, V. Z., Tikhaze, A. K., Kukharchuk, V. V., Kononova, G. G., Pisarenko, O. I., et al. (2003) Antioxidants decreases the intensification of low density lipoprotein in vivo peroxidation during therapy with statins, *Mol. Cell. Biochem.*, **249**, 129-140.
 59. Lankin, V. Z., Tikhaze, A. K., Kononova, G. G., Odinokova, O. A., Doroshchuk, N. A., and Chazova, I. E. (2018) Oxidative and carbonyl stress as a factors of the modification of proteins and DNA destruction in diabetes, *Ter. Arkh.*, **90**, 46-50, doi: 10.26442/terarkh201890104-50.
 60. Sena, C. M., Pereira, A. M., and Seica, R. (2013) Endothelial dysfunction – a major mediator of diabetic vascular disease, *Biochim. Biophys. Acta Mol. Basis Dis.*, **1832**, 2216-2231, doi: 10.1016/j.bbdis.2013.08.006.
 61. Lankin, V. Z., Shumaev, K. B., Tikhaze, A. K., and Kurganov, B. I. (2017) Influence of dicarbonyls on kinetic characteristics of glutathione peroxidase, *Dokl. Biochem. Biophys.*, **475**, 287-290, doi: 10.1134/S1607672917040123.
 62. Sharapov, M. G., Goncharov, R. G., Gordeeva, A. E., Novoselov, V. I., Antonova, O. A., et al. (2016) Enzymatic antioxidant system of endotheliocytes, *Dokl. Biochem. Biophys.*, **471**, 410-412, doi: 10.1134/S1607672916060090.
 63. Kisucka, J., Chauhan, A. K., Patten, I. S., Yesilaltay, A., Neumann, C., et al. (2008) Peroxiredoxin1 prevents excessive endothelial activation and early atherosclerosis, *Circ. Res.*, **103**, 598-605, doi: 10.1161/CIRCRESA.108.174870.
 64. Ihida-Stansbury, K., Ames, J., Chokshi, M., Aiad, N., Sanyal, S., et al. (2015) Role played by Prx1-dependent extracellular matrix properties in vascular smooth muscle development in embryonic lungs, *Pulm. Circ.*, **5**, 382-397, doi: 10.1086/681272.
 65. Park, J.-G., Yoo, J.-Y., Jeong, S.-J., Choi, J.-H., Lee, M.-R., et al. (2011) Peroxiredoxin 2 deficiency exacerbates atherosclerosis in apolipoprotein E-deficient mice, *Circ. Res.*, **109**, 739-749, doi: 10.1161/CIRCRESA.111.245530.
 66. Jeong, S. J., Park, J. G., and Oh, G. T. (2021) Peroxiredoxins as potential targets for cardiovascular disease, *Antioxidants (Basel)*, **10**, 1244, doi: 10.3390/antiox10081244.
 67. Wang, X., Phelan, S. A., Forsman-Semb, K., Taylor, E. F., Petros, C., et al. (2003) Mice with targeted mutation of peroxiredoxin 6 develop normally but are susceptible to oxidative stress, *J. Biol. Chem.*, **278**, 25179-25190, doi: 10.1074/jbc.M302706200.
 68. Wang, X., Phelan, S. A., Petros, C., Taylor, E. F., Ledinski, G., et al. (2004) Peroxiredoxin 6 deficiency and atherosclerosis susceptibility in mice: significance of genetic background for assessing atherosclerosis, *Atherosclerosis*, **177**, 61-70, doi: 10.1016/j.atherosclerosis.2004.06.007.
 69. Burillo, E., Jorge, I., Martínez-López, D., Camafeita, E., Blanco-Colio, L. M., et al. (2016) Quantitative HDL proteomics identifies peroxiredoxin-6 as a biomarker of human abdominal aortic aneurysm, *Sci. Rep.*, **6**, 38477, doi: 10.1038/srep38477.
 70. Lankin, V. Z., Sharapov, M. G., Goncharov, R. G., Tikhaze, A. K., and Novoselov, V. I. (2019) Natural dicarbonyls inhibit peroxidase activity of peroxiredoxins, *Dokl. Biochem. Biophys.*, **485**, 132-134, doi: 10.1134/S1607672919020157.
 71. Maruhashi, T., and Higashi, Y. (2021) Pathophysiological Association between diabetes mellitus and endothelial dysfunction, *Antioxidants (Basel)*, **10**, 1306, doi: 10.3390/antiox10081306.
 72. Vladimirov, Y. A., and Proskurnina, E. V. (2009) Free radicals and cell chemiluminescence, *Biochemistry (Moscow)*, **74**, 1545-1566, doi: 10.1134/s0006297909130082.
 73. Lankin, V. Z., Antonovsky, V. L., and Tikhaze, A. K. (2004) Regulation of free radical lipoperoxidation and organic peroxides metabolism during normal station and pathologies, in *Peroxides at the Beginning of the Third Millennium*, Nova Sci. Publ., p. 85-111.
 74. Lankin, V., Kononova, G., Tikhaze, A., Shumaev, K., Kumskova, E., and Viigimaa, M. (2014) The initiation of free radical peroxidation of low-density lipoproteins by glucose and its metabolite methylglyoxal: a common molecular mechanism of vascular wall injury in atherosclerosis and diabetes, *Mol. Cell. Biochem.*, **395**, 241252, doi: 10.1007/s11010-014-2131-2.
 75. Lankin, V. Z., Shadyro, O. I., Shumaev, K. B., Shumaev, K. B., Tikhaze, A. K., and Sladkova, A. A. (2019) Non-enzymatic methylglyoxal formation from glucose metabolites and generation of superoxide anion radical during methylglyoxal-dependent cross-links reaction, *J. Antioxid. Act.*, **1**, 33-45, doi: 10.14302/issn.2471-2140.jaa-19-2997.
 76. Lankin, V. Z., Kononova, G. G., Tikhaze, A. K., Shumaev, K. B., Belova Kumskova, E. M., et al. (2016) Aldehyde inhibition of antioxidant enzymes in the blood of diabetic patients, *J. Diabetes*, **8**, 398-404, doi: 10.1111/1753-0407.12309.
 77. Oberley, L. W. (1988) Free radicals and diabetes, *Free Radic. Biol. Med.*, **5**, 113-124, doi: 10.1016/0891-5849(88)90036-6.
 78. Huang, J. Q., Zhou, J. C., Wu, Y. Y., Ren, F. Z., and Lei, X. G. (2018) Role of glutathione peroxidase 1 in glucose and lipid metabolism-related diseases, *Free Radic. Biol. Med.*, **127**, 108-115, doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2018.05.077.
 79. Matsushima, S., Kinugawa, S., Ide, T., Matsusaka, H., Inoue, N., et al. (2006) Overexpression of glutathione peroxidase attenuates myocardial remodeling and preserves diastolic function in diabetic heart, *Am. J. Physiol. Hear. Circ. Physiol.*, **291**, 2237-2245, doi: 10.1152/ajpheart.00427.2006.
 80. Koulajian, K., Iovic, A., Ye, K., Desai, T., Shah, A., et al. (2013) Overexpression of glutathione peroxidase 4 prevents β -cell dysfunction induced by prolonged elevation of lipids in vivo, *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.*, **305**, 254-262, doi: 10.1152/ajpendo.00481.2012.

81. Stancill, J. S., Happ, J. T., Broniowska, K. A., Hogg, N., and Corbett, J. A. (2020) Peroxiredoxin 1 plays a primary role in protecting pancreatic β -cells from hydrogen peroxide and peroxynitrite, *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.*, **318**, R1004-R1013, doi: 10.1152/ajpregu.00011.2020.
82. Ding, Y., Yamada, S., Wang, K. Y., Shimajiri, S., Guo, X., et al. (2010) Overexpression of peroxiredoxin 4 protects against high-dose streptozotocin-induced diabetes by suppressing oxidative stress and cytokines in transgenic mice, *Antioxidants Redox Signal.*, **13**, 1477-1490, doi: 10.1089/ars.2010.3137.
83. Pacifici, F., Arriga, R., Sorice, G. P., Capuani, B., Scioli, M. G., et al. (2014) Peroxiredoxin 6, a novel player in the pathogenesis of diabetes, *Diabetes*, **63**, 3210-3220, doi: 10.2337/db14-0144.
84. Меньшикова Е. Б., Ланкин В. З., Зенков Н. К., Бондарь И. А., Круговых Н. Ф., Труфакин В. А. (2006) *Окислительный стресс. Проксиданты и антиоксиданты*, Слово, Москва, с. 556.
85. Vasin, M. V., and Ushakov, I. B. (2019) Potential ways to increase body resistance to damaging action of ionizing radiation with radiomitigators, *Biol. Bull. Rev.*, **9**, 503-519, doi: 10.1134/S2079086419060082
86. Sharapov, M. G., Gudkov, S. V., and Lankin, V. Z. (2021) Hydroperoxide-reducing enzymes in the regulation of free-radical processes, *Biochemistry (Moscow)*, **86**, 1256-1274, doi: 10.1134/S0006297921100084.
87. McCord, J. M., and Fridovich, I. (1969) Superoxide dismutase. An enzymic function for erythrocyte (hemocuprein), *J. Biol. Chem.*, **244**, 6049-6055, doi: 10.1016/S0021-9258(18)63504-5.
88. Borrelli, A., Schiattarella, A., Mancini, R., Morrica, B., Cerciello, V., et al. (2009) A recombinant MnSOD is radioprotective for normal cells and radiosensitizing for tumor cells, *Free Radic. Biol. Med.*, **46**, 110-116, doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2008.
89. Cataldi, S., Borrelli, A., Ceccarini, M. R., Nakashidze, I., Codini, M., et al. (2019) Neutral sphingomyelinase modulation in the protective/preventive role of rMnSOD from radiation-induced damage in the brain, *Int. J. Mol. Sci.*, **20**, 5431, doi: 10.3390/ijms20215431.
90. Pisani, A., Sabbatini, M., Riccio, E., Rossano, R., Andreucci, M., et al. (2014) Effect of a recombinant manganese superoxide dismutase on prevention of contrast-induced acute kidney injury, *Clin. Exp. Nephrol.*, **18**, 424-431, doi: 10.1007/s10157-013-0828-2.
91. Жариков А. А., Терехов О. В., Пасов В. В. (2013) Лечение больных с поздними лучевыми повреждениями органов малого таза с применением препарата рексол, *Онкология*, **5**, 26-30.
92. Guo Dong Mao, Thomas, P. D., Lopaschuk, G. D., and Poznansky, M. J. (1993) Superoxide dismutase (SOD)-catalase conjugates. Role of hydrogen peroxide and the Fenton reaction in SOD toxicity, *J. Biol. Chem.*, **268**, 416-420.
93. Maksimenko, A. V. (2016) Widening and elaboration of consecutive research into therapeutic antioxidant enzyme derivatives. Oxidative medicine and cellular longevity, **2016**, 3075695, doi: 10.1155/2016/3075695.
94. Isarankura-Na-Ayudhya, C., Yainoy, S., Tantimongcolwat, T., Bülow, L., and Prachayasittikul, V. (2010) Engineering of a novel chimera of superoxide dismutase and Vitreoscilla Hemoglobin for rapid detoxification of reactive oxygen species, *J. Biosci. Bioeng.*, **110**, 633-637, doi: 10.1016/j.jbiosc.2010.07.001.
95. Guan, T., Song, J., Wang, Y., Guo, L., Yuan, L., et al. (2017) Expression and characterization of recombinant bifunctional enzymes with glutathione peroxidase and superoxide dismutase activities, *Free Radic. Biol. Med.*, **110**, 188-195, doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2017.06.005.
96. Sharapov, M. G., Novoselov, V. I., Ravin, and V. K. (2016) Construction of a fusion enzyme exhibiting superoxide dismutase and peroxidase activity, *Biochemistry (Moscow)*, **81**, 420-427, doi: 10.1134/S0006297916040131.
97. Sharapov, M. G., Gudkov, S. V., Gordeeva, A. E., Karp, O. E., Ivanov, V. E., et al. (2016) Peroxiredoxin 6 is a natural radioprotector, *Dokl. Biochem. Biophys.*, **467**, 110-112, doi: 10.1134/S1607672916020095.
98. Sharapov, M. G., Novoselov, V. I., Fesenko, E. E., Bruskov, V. I., and Gudkov, S. V. (2017) The role of peroxiredoxin 6 in neutralization of X-ray mediated oxidative stress: effects on gene expression, preservation of radiosensitive tissues and postradiation survival of animals, *Free Radic. Res.*, **51**, 148-166, doi: 10.1080/10715762.2017.1289377.
99. Sharapov, M. G., Novoselov, V. I., Samygina, V. R., Konarev, P. V., Molochkov, A. V., et al. (2020) A chimeric recombinant protein with peroxidase and superoxide dismutase activities: physico-chemical characterization and applicability to neutralize oxidative stress caused by ionizing radiation, *Biochem. Eng. J.*, **159**, 107603, doi: 10.1016/j.bej.2020.107603.
100. Sharapov, M. G., and Gudkov, S. V. (2021) Peroxiredoxin 1 – Multifunctional antioxidant enzyme, protects from oxidative damages and increases the survival rate of mice exposed to total body irradiation, *Arch. Biochem. Biophys.*, **697**, 108671, doi: 10.1016/j.abb.2020.108671.
101. Sharapov, M. G., Novoselov, V. I., Penkov, N. V., Fesenko, E. E., Vedunova, M. V., et al. (2019) Protective and adaptive role of peroxiredoxin 2 (Prx2) in neutralization of oxidative stress induced by ionizing radiation, *Free Radic. Biol. Med.*, **134**, 76-86, doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2018.12.032.
102. Hellweg, C. E., Spitta, L. F., Henschenmacher, B., Diegeler, S., and Baumstark-Khan, C. (2016) Transcription factors in the cellular response to charged particle exposure, *Front. Oncol.*, **6**, 61, doi: 10.3389/fonc.2016.00061
103. Ji, Z., He, L., Regev, A., and Struhl, K. (2019) Inflammatory regulatory network mediated by the joint action of NF- κ B, STAT3, and AP-1 factors is involved in many human cancers, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **116**, 9453-9462, doi: 10.1073/pnas.1821068116
104. Novoselova, E. G., Glushkova, O. V., Lunin, S. M., Khrenov, M. O., Parfenyuk, S. B., et al. (2020) Peroxiredoxin 6 attenuates alloxan-induced type 1 diabetes mellitus in mice and cytokine-induced cytotoxicity in RIN-m5F Beta cells, *J. Diabetes Res.*, **2020**, 7523892, doi: 10.1155/2020/7523892.
105. Novoselova, E. G., Glushkova, O. V., Parfenyuk, S. B., Khrenov, M. O., Lunin, S. M., et al. (2019) Protective effect of peroxiredoxin 6 against toxic effects of glucose and cytokines in pancreatic RIN-m5F β -cells, *Biochemistry (Moscow)*, **84**, 637-643, doi: 10.1134/S0006297919060063.
106. Karaduleva, E. V., Mubarakshina, E. K., Sharapov, M. G., Volkova, A. E., Pimenov, O. Y., et al. (2016) Cardioprotective effect of modified peroxiredoxins in retrograde perfusion of isolated rat heart under conditions of oxidative stress, *Bull. Exp. Biol. Med.*, **160**, 639-642, doi: 10.1007/s10517-016-3237-1.
107. Grudin, N. V., Bogdanov, V. K., Sharapov, M. G., Bunenkov, N. S., Mozheiko, N. P., et al. (2020) Use of peroxiredoxin for preconditioning of heterotopic heart transplantation in a rat, *Vestn. Transplantologii i Iskusstv. Organov*, **22**, 132-136, doi: 10.15825/1995-1191-2020-2-158-164.
108. Sharapov, M. G., Gordeeva, A. E., Goncharov, R. G., Tikhonova, I. V., Ravin, V. K., et al. (2017) The effect of

- exogenous peroxiredoxin 6 on the state of mesenteric vessels and the small intestine in ischemia–reperfusion injury, *Biophysics*, **62**, 998–1008, doi: 10.1134/S0006350917060239.
109. Gordeeva, A. E., Temnov, A. A., Charnagalov, A. A., Sharapov, M. G., Fesenko, E. E., and Novoselov, V. I. (2015) Protective effect of peroxiredoxin 6 in ischemia/reperfusion-induced damage of small intestine, *Dig. Dis. Sci.*, **60**, 3610–3619, doi: 10.1007/s10620-015-3809-3.
 110. Goncharov, R. G., Rogov, K. A., Temnov, A. A., Novoselov, V. I., and Sharapov, M. G. (2019) Protective role of exogenous recombinant peroxiredoxin 6 under ischemia-reperfusion injury of kidney, *Cell Tissue Res.*, **378**, 319–332, doi: 10.1007/s00441-019-03073-z.
 111. Sharapov, M. G., Goncharov, R. G., Filkov, G. I., Trofimenko, A. V., Boyarintsev, V. V., and Novoselov, V. I. (2020) Comparative study of protective action of exogenous 2-cys peroxiredoxins (Prx1 and Prx2) under renal ischemia-reperfusion injury, *Antioxidants (Basel)*, **9**, 680, doi: 10.3390/antiox9080680.
 112. Li, Z., Wang, F., Roy, S., Sen, C. K., and Guan, J. (2009) Injectable, highly flexible, and thermosensitive hydrogels capable of delivering superoxide dismutase, *Biomacromolecules*, **10**, 3306–3316, doi: 10.1021/bm900900e.
 113. Guryev, E. L., Volodina, N. O., Shilyagina, N. Y., Gudkov, S. V., Balalaeva, I. V., et al. (2018) Radioactive (90Y) upconversion nanoparticles conjugated with recombinant targeted toxin for synergistic nanotheranostics of cancer, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **115**, 9690–9695, doi: 10.1073/pnas.1809258115.
 114. Gil, D., Rodriguez, J., Ward, B., Vertegel, A., Ivanov, V., and Reukov, V. (2017) Antioxidant activity of SOD and catalase conjugated with nanocrystalline ceria, *Bioengineering (Basel)*, **4**, 18, doi: 10.3390/bioengineering4010018.
 115. Simone, E. A., Dziubla, T. D., Arguiri, E., Vardon, V., Shuvaev, V. V., et al. (2009) Loading PEG-catalase into filamentous and spherical polymer nanocarriers, *Pharm. Res.*, **26**, 250–260, doi: 10.1007/s11095-008-9744-7.
 116. Lacramioara, L., Diaconu, A., Butnaru, M., and Verestiuc, L. (2016) Biocompatible SPIONs with superoxide dismutase/catalase immobilized for cardiovascular applications, *IFMBE Proc.*, **55**, 323–326, doi: 10.1007/978-981-287-736-9_78.
 117. Novoselov, V. I., Ravin, V. K., Sharapov, M. G., Sofin, A. D., Kukushkin, N. I., and Fesenko, E. E. (2011) Modified peroxiredoxins as prototypes of drugs with powerful antioxidant action, *Biophysics*, **56**, 836–842, doi: 10.1134/S0006350911050137.
 118. Chhunchha, B., Kubo, E., Kompella, U. B., and Singh, D. P. (2021) Engineered sumoylation-deficient prdx6 mutant protein-loaded nanoparticles provide increased cellular defense and prevent lens opacity, *Antioxidants (Basel)*, **10**, 1245, doi: 10.3390/antiox10081245.

THE ROLE OF GLUTATHIONE PEROXIDASES AND PEROXYREDOXINS IN FREE-RADICAL PATHOLOGIES

Review

M. G. Sharapov^{1*}, S. V. Gudkov^{2,3,4}, V. Z. Lankin⁵, and V. I. Novoselov¹

¹ Institute of Cell Biophysics, Federal Research Center PSCBI RAS, 142290 Pushchino, Moscow region, Russia; E-mail: sharapov.mars@gmail.com

² Institute of General Physics named after A.M. Prokhorov Russian Academy of Sciences, 119991 Moscow, Russia

³ Institute of Biology and Biomedicine, Lobachevsky State University of Nizhni Novgorod, 603022 Nizhny Novgorod, Russia

⁴ All-Russian Research Institute of Phytopathology, 143050 Bolshiye Vyazemy, Russia

⁵ FGBU “National Medical Research Center of Cardiology” of the Ministry of Health of Russia; 121552 Moscow, Russia

In a review of the development of modern concepts of the molecular mechanisms of free radical pathologies. The pathogenesis of some socially significant diseases associated with the development of oxidative stress, such as atherosclerosis, diabetes and radiation sickness, is considered. The possibilities of the therapeutic use of low molecular weight natural and synthetic antioxidants for the correction of free radical pathologies are discussed. The main focus of the review is the role of two phylogenetically close families of hydroperoxide-reducing antioxidant enzymes: peroxiredoxins and glutathione peroxidases. The role of these enzymes in counteracting oxidative stress is discussed. Examples of the use of exogenous recombinant antioxidant enzymes as therapeutic agents in the treatment of pathological conditions associated with free radical processes are presented. Further studies of exogenous enzymes – antioxidants, as well as ways to improve their therapeutic properties are discussed.

Keywords: reactive oxygen species, dicarbonyls, peroxiredoxins, glutathione peroxidases, radiation sickness, atherosclerosis, diabetes

РОЛЬ ТРАНСКРИПЦИОННОГО ФАКТОРА STAT3 В ПАТОГЕНЕЗЕ БРОНХИАЛЬНОЙ АСТМЫ

Обзор

© 2021 А.А. Никольский, И.П. Шиловский*, Е.Д. Барвинская,
А.В. Корнеев, М.С. Сундукова, М.Р. Хаитов

ФГБУ «ГНЦ Институт иммунологии» ФМБА России, 115522 Москва, Россия;
электронная почта: ip.shilovsky@nrcii.ru

Поступила в редакцию 01.04.2021

После доработки 21.09.2021

Принята к публикации 12.10.2021

Бронхиальная астма — это гетерогенное хроническое воспалительное заболевание дыхательных путей. Исследования молекулярных и клеточных механизмов бронхиальной астмы позволили установить, что в её патогенез вовлечён широкий спектр клеток иммунной системы (Т- и В-клетки, эозинофилы, нейтрофилы, макрофаги и пр.), а также структурных клеток (эпителиальные и эндотелиальные). Эти клетки активируются в ответ на внешние стимулы (бактерии, вирусы, аллергены и прочие поллютанты) и продуцируют провоспалительные факторы (цитокины, хемокины, металлопротеиназы и пр.), что в итоге приводит к запуску патологических процессов в лёгких. Известно, что в активацию клеток вовлечены гены, кодирующие транскрипционные факторы семейства STAT (STAT — signal transducer and activator of transcription), которое насчитывает 7 представителей. Недавние исследования показали, что фактор транскрипции STAT3 играет важную роль в активации вышеуказанных клеток и тем самым вносит вклад в развитие астмы. В исследованиях на животных селективное ингибирование STAT3 значительно уменьшает выраженность воспаления в лёгких, что свидетельствует о его перспективности как терапевтической мишени. В данном обзоре мы описываем механизмы активации STAT3 и его роль в поляризации Th2/Th17-клеток и M2-макрофагов в дисфункции эндотелиальных клеток, что в итоге приводит к формированию проявлений бронхиальной астмы: инфильтрации лёгких эозинофилами и нейтрофилами, гиперреактивности бронхов и ремоделированию респираторного тракта.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: бронхиальная астма, STAT3, JAK, Т-хелперы, сигнальный путь.

DOI: 10.31857/S032097252111004X

ВВЕДЕНИЕ

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

Принятые сокращения: БА — бронхиальная астма; БАЛ — бронхоальвеолярный лаваж; ЛПС — липополисахарид; DBD — ДНК-связывающий домен; G-CSF — гранулоцитарно-макрофагальный колониестимулирующий фактор; ICAM-1 — межклеточная молекула адгезии 1; IL — интерлейкин; JAK — янус-киназа; NF-κB — ядерный фактор каппа-би; SOCS — супрессор сигнальных белков цитокинов; STAT — преобразователь сигнала и активатор транскрипции; Th — Т-хелперы; TNF — фактор некроза опухоли; VCAM-1 — васкулярная молекула клеточной адгезии 1.

* Адресат для корреспонденции.

Рост распространённости БА, по всей видимости, связан с недостаточностью существующих способов терапии. В то же время создание новых способов лечения невозможно без раскрытия молекулярных и клеточных механизмов патогенеза. Согласно современным представлениям, в патогенез БА вовлечены как иммунные (Т-клетки, В-клетки, эозинофилы, нейтрофилы, и пр.) [4], так и не иммунные клетки (эпителиальные и эндотелиальные клетки, фибробласты) [5], которые, активируясь, продуцируют широкий спектр провоспалительных факторов. В процесс активации клеток вовлечено 7 факторов транскрипции семейства STAT. Об участии STAT6 в запуске Th2-опосредованного воспаления лёгких при БА опубликовано много работ [6], тогда как о роли другого представителя — STAT3 — в патогенезе БА имеется значительно меньше информации. Тем не менее накапливаются экспериментальные доказательства того, что именно STAT3 участвует в развитии тяжёлой БА, которая зачастую

не поддаётся стандартному лечению кортикостероидами. Установлено, что STAT3 вовлечён в активацию Т-хелперов (Th2- и Th17-клеток) и макрофагов, а также он способствует усилению инфильтрации лёгких нейтрофилами и эозинофилами за счёт повышения экспрессии молекул адгезии и их представленности на поверхности эндотелиальных клеток [7]. Поэтому мы считаем важным обобщить роль именно данного фактора транскрипции в развитии воспалительной патологии лёгких. В данном обзоре мы описываем механизмы активации STAT3 и его роль в поляризации Th2/Th17-клеток и M2-макрофагов в дисфункции эндотелиальных клеток, что в итоге приводит к развитию БА.

ОТКРЫТИЕ И СТРУКТУРНЫЕ ОСОБЕННОСТИ STAT3

STAT3 был открыт более 20 лет назад как фактор, активируемый интерлейкином-6 (IL-6 — interleukin-6), который играет решающую роль в стимуляции медиаторов врождённого иммунитета в печени. Этот фактор был отнесён к семейству факторов STAT на основании структурного родства и схожести биологических функций и обозначен как STAT3. Активация STAT3 происходит в ответ на стимуляцию клеток различными цитокинами и факторами роста (например, IL-6, онкостатин М, IL-11, G-CSF, EGF) [8].

В структуре STAT3 выделяют 6 доменов: 1) спиральный N-концевой домен (ND), который способствует связыванию с ДНК и регулирует транслокацию в ядро; 2) двойной альфа-спиральный домен (CCD), обеспечивающий взаимодействие с другими регуляторными белками; 3) центральный ДНК-связывающий домен (DBD), который необходим для связывания с ДНК; 4) линкерный домен (LD), влияющий на стабильность связывания с ДНК; 5) консервативный домен SH2, который необходим для образования гомодимеров; 6) C-концевой домен трансактивации (TAD) с консервативным остатком тирозина в положении 705 (Tyr705) и сайтом фосфорилирования серина в положении 727 (Ser727) [9].

У STAT3 были идентифицированы различные изоформы (STAT3 α , STAT3 β , STAT3 γ и STAT3 δ), которые, как считается, определяют его плеiotропные биологические функции [10]. STAT3 α опосредует провоспалительный ответ цитокина IL-6, тогда как STAT3 β подавляет синтез провоспалительных цитокинов (IL-6 и TNF- α (tumor necrosis factor — фактор некроза

опухоли)) и активирует экспрессию некоторых противовоспалительных генов [11].

МОЛЕКУЛЯРНЫЕ МЕХАНИЗМЫ АКТИВАЦИИ STAT3

Обычно белки STAT локализованы в цитоплазме и неактивны, однако под действием некоторых стимулов происходит их активация. Согласно современным представлениям, после взаимодействия определенных цитокинов и факторов роста со своими рецепторами на поверхности клеток происходит фосфорилирование янускиназ (JAK). JAK — это группа рецептор-ассоциированных цитоплазматических тирозинкиназ [12]. На сегодняшний день идентифицированы четыре члена семейства JAK: JAK1, JAK2, JAK3 и TYK2.

Активированные JAK (в частности JAK2), в свою очередь, фосфорилируют STAT3 по остаткам тирозина и серина (Tyr705 и Ser727). Это событие вызывает димеризацию двух молекул STAT3 путём взаимодействия между доменами SH2. Активные димеры STAT3 транслоцируются в ядро, где связываются с молекулами ДНК в регуляторных областях своих генов-мишеней и тем самым активируют их транскрипцию (рис. 1) [9]. Показано, что нефосфорилированные белки STAT также могут перемещаться в ядро клеток. Нефосфорилированный STAT3 обеспечивает внутриклеточную передачу сигнала от рецепторов цитокинов с помощью взаимодействия с ядерным фактором каппа-би (NF- κ B), перемещаясь в ядро, он активирует экспрессию генов: *RANTES*, *IL-6*, *IL-8*, *MET* и *MRAS*, которые не отвечают на фосфорилированную форму STAT3 [13]. Таким образом, STAT3 регулирует экспрессию генов двумя разными механизмами: 1) путём образования димеров между двумя фосфорилированными формами; 2) за счёт увеличения концентрации нефосфорилированной формы и её взаимодействия с NF- κ B.

Экспериментально установлено, что цитокин IL-6, фактор ингибирования лейкемии (LIF), онкостатин М (OSM), нейропоэтин (NP), кардиотропин-1 (CT-1) и цилиарный нейротрофический фактор (CNTF) являются активаторами сигнального пути JAK2/STAT3 [12]. Провоспалительные цитокины семейства IL-6 связываются со своими рецепторами и активируют фосфорилирование JAK2 и STAT3, что приводит к димеризации последнего [14]. Димеры, перемещаясь в ядро, запускают экспрессию определённых генов, что в итоге приводит к развитию воспаления [15].

Внутриклеточные сигналы от другого цитокина — IL-10, реализуются также с участием JAK/STAT3. IL-10 представляет собой иммуномодулирующий цитокин, который обладает противовоспалительной активностью. Его сигнальный путь хорошо охарактеризован для макрофагов и Т-лимфоцитов. Передача сигналов от IL-10 осуществляется через рецептор, который состоит из двух цепей IL-10R1 и IL-10R2. Образование комплекса IL-10R1/IL-10/IL-10R2 приводит к фосфорилированию JAK1, которая фосфорилирует фактор STAT3. Фосфорилированный гомодимер STAT3 перемещается в ядро и активирует транскрипцию генов: фактор роста эндотелия сосудов-A (VEGF-A, Vascular endo-thelial growth factor), фактор роста фибробластов-2, плацентарный фактор роста и др. [16]. В отличие от сигнального пути IL-6/JAK2/STAT3, путь IL-10/JAK1/STAT3 реализует противовоспалительные функции. Вероятно, это связано с разной длительностью активации STAT3 в ответ на IL-6 и IL-10. Экспериментально показано, что длительная активация STAT3 в дендритных клетках под действием IL-10 индуцирует иной профиль экспрессии генов в сравнении с кратковременной активацией. При этом кратковременная активация STAT3 интерлейкином-10 запускала в клетках провоспалительный сигнал аналогично активации IL-6 [17].

Помимо путей активации STAT3, существуют механизмы его негативной регуляции. Негативными регуляторами, предотвращающими фосфорилирование STAT3, являются протеин-тирозинфосфатазы (PTP), различные белковые ингибиторы и супрессор передачи сигналов цитокинов (SOCS3). Ферменты PTP напрямую дефосфорилируют активированный STAT3 либо JAK2 [18]. Фактор PIAS3 (protein inhibitor of activated STAT3 — белковый ингибитор активированного STAT3) ингибирует связывание димера STAT3 с ДНК, в конечном итоге блокируя транскрипцию соответствующих генов [19]. Белок SOCS3 считается главным регулятором сигнального пути JAK2/STAT3. Он связывается с комплексом рецептор/JAK, тем самым нарушая способность киназы фосфорилировать STAT3 [20]. Несмотря на то что провоспалительный цитокин IL-6 и противовоспалительный цитокин IL-10 сходным образом активируют сигнальный путь JAK/STAT3, SOCS3 ингибирует эффекты IL-6, но не IL-10. Это связано с тем, что SOCS3 взаимодействует с цепью рецептора IL-6 (gp130), а не цепью рецептора IL-10 (IL-10R) [21]. Таким образом, существование механизмов дефосфорилирования STAT3 (в том числе за счёт SOCS3) обеспечивает нечувстви-

тельность клеток к цитокинам и, по-видимому, необходимо для подавления чрезмерного воспаления.

БИОЛОГИЧЕСКАЯ РОЛЬ STAT3

STAT3 вовлечён в широкий спектр биологических процессов. В частности, он регулирует дифференцировку гранулоцитов в костном мозге [22]. STAT3 активируется в ответ на гранулоцитарно-макрофагальный колониестимулирующий фактор (G-CSF), что приводит к формированию нейтрофилов из клеток-предшественников. Нокаут гена, кодирующего STAT3 у мышей, нарушает процесс дифференцировки нейтрофилов, несмотря на введение им рекомбинантного G-CSF [22].

STAT3 участвует в антибактериальной защите организма. В частности, он отвечает за синтез антимикробных факторов, выделяемых нейтрофилами, а также за хемотракцию этих клеток. Антибактериальные свойства нейтрофилов и макрофагов, выделенных из мышей, нокаутных по гену *stat3*, значительно ослаблены [23].

Кроме того, STAT3 участвует в канцерогенезе. Многими исследованиями была продемонстрирована про-онкогенная роль STAT3; он способствует пролиферации опухолевых клеток, поддерживает их жизнеспособность, а также провоцирует канцерогенез за счёт активации воспаления [24]. Однако появляются данные о его способности супрессировать рост некоторых видов опухолей [25, 26]. Такие противоположные биологические функции объясняются либо различной ролью STAT3 в разных типах клеток, либо различной функцией альтернативных изоформ STAT3 (прежде всего STAT3 α и STAT3 β). Противоречивой роли STAT3 в онкогенезе посвящён ряд современных обзоров [27, 28].

STAT3 также играет значительную роль в развитии аутоиммунных заболеваний, таких как ревматоидный артрит, рассеянный склероз, псориаз и пр. [24]. Идентифицированы мутации в гене *STAT3* человека, которые ассоциированы с развитием аутоиммунных патологий [29]. Эти мутации усиливают функцию STAT3 за счёт повышения его способности связываться с участками хромосомной ДНК, что в итоге приводит к увеличенной экспрессии провоспалительных факторов и к снижению активности Treg-клеток путём подавления FOXP3 [29].

В мировой научной литературе подробно описана провоспалительная роль STAT3. Данный фактор участвует в воспалении, ассоциированном с канцерогенезом и развитием аутоиммунных патологий [30, 31], а также в воспале-

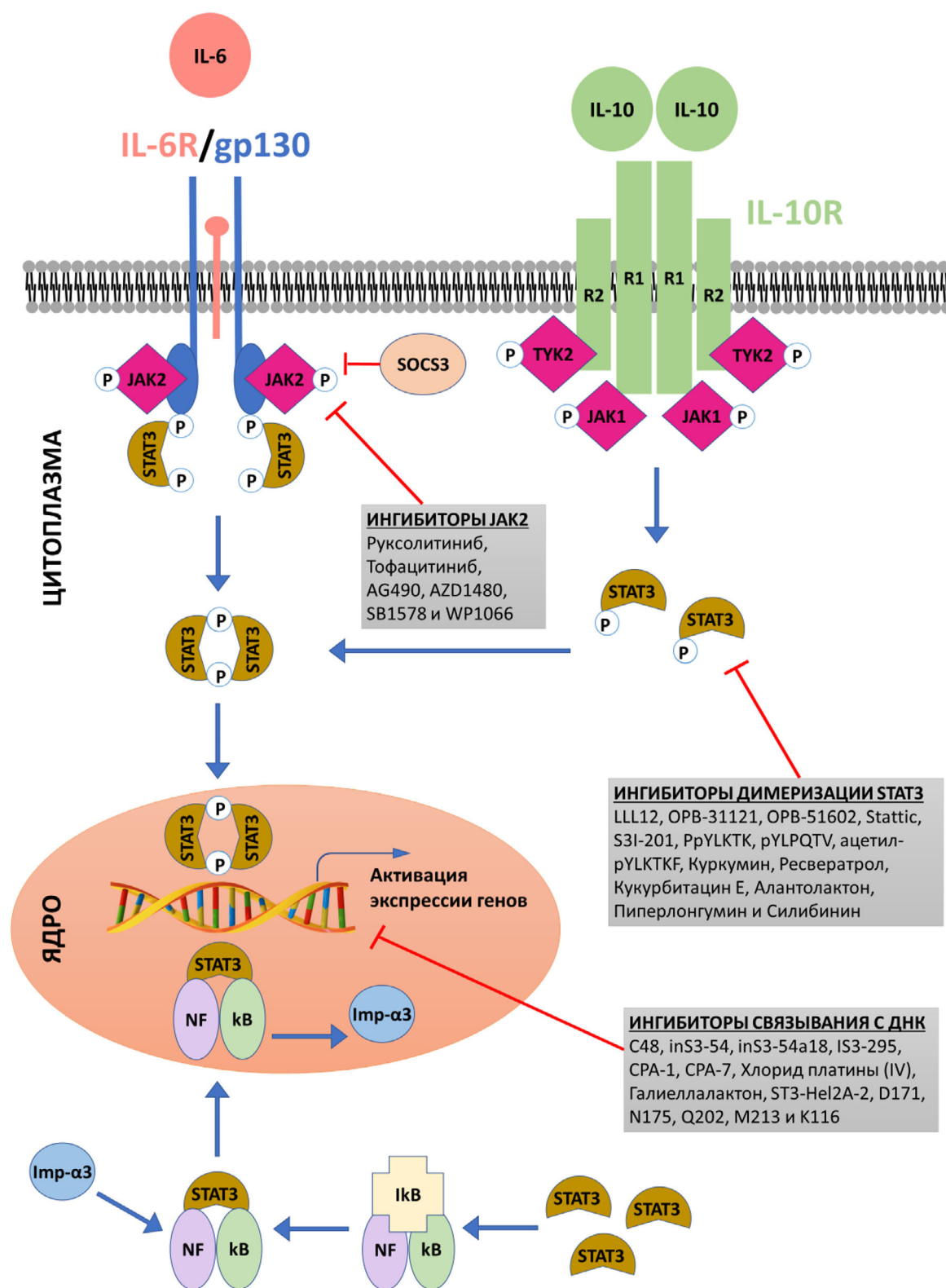


Рис. 1. Молекулярные механизмы активации и ингибирования STAT3. STAT3 регулирует экспрессию генов двумя разными механизмами: 1) JAK/STAT3-путь протекает с образованием его димеров между двумя фосфорилированными формами; 2) за счёт увеличения концентрации нефосфорилированной формы STAT3 может происходить его взаимодействие с фактором NF-κB с последующим проникновением в ядро при участии белка транспортера — Импортину-α3 (Imp-α3). В ядре сформированный комплекс нефосфорилированного STAT3 и фактора NF-κB также способен регулировать активность генов. В серых блоках указаны ингибиторы STAT3, нацеленные на разные этапы сигнального пути JAK/STAT3

нии лёгких при бронхиальной астме [32] и воспалении желудочно-кишечного тракта [33]. Однако фактору STAT3 присущи также противовоспалительные свойства, которые в основном реализуются в фагоцитах и не иммунных клетках. В макрофагах STAT3 супрессирует воспалительные сигналы от TLR-рецепторов. Макрофаги, нейтрофилы и дендритные клетки мышей с инактивированным геном *stat3* продуцируют повышенное количество провоспалительных цитокинов (TNF- α , IL-6, IL-12 и IFN γ) в ответ на активацию TLR4-рецепторов. Также эти клетки утрачивают способность реагировать на противовоспалительный сигнал цитокина IL-10 [34, 35].

STAT3 участвует в дифференцировке В-клеток из популяции клеток-предшественников; нокаут соответствующего гена у мышей приводит к уменьшению их количества в различных тканях и органах животных. Также этот фактор участвует в формировании плазматических клеток, продуцирующих IgG. В этом процессе главную роль играет IL-21, продуцируемый Tfh-клетками (T follicular helper cells, фолликулярные Т-хелперы), который активирует STAT3 в В-клетках и тем самым запускает экспрессию факторов созревания последних, что в итоге приводит к продукции IgG-антител [36]. STAT3 также играет роль в IL-35-опосредованной индукции В-регуляторных клеток (Breg), секретирующих IL-10 и IL-35. В свою очередь, Breg участвуют в подавлении воспаления при аутоиммунных патологиях [37].

STAT3 участвует в поляризации CD4⁺ Т-клеток; он активируется в ответ на IL-6 и способствует формированию Th17-клеток, продуцирующих IL-17A и IL-17F, что подтверждено исследованиями на мышах, нокаутных по гену *stat3* [38]. Роль STAT3 в поляризации Th-клеток подробно описана ниже.

Таким образом, STAT3 вовлечён в широкий спектр биологических процессов: гранулоцитопоз, дифференцировка Т- и В-клеток, антибактериальная защита, канцерогенез и развитие аутоиммунных патологий. Несмотря на то что многие биологические функции STAT3 известны давно, регулярно появляются данные о его новых биологических свойствах, например, о его противовоспалительных функциях в фагоцитах и антипролиферативных свойствах в отдельных видах опухолей.

РОЛЬ STAT3 В ВОСПАЛЕНИИ ЛЁГКИХ

Длительное время считалось, что бронхиальная астма развивается исключительно по Th2-

зависимому механизму, однако недавние успехи в области молекулярной иммунологии привели к необходимости пересмотра представлений о её патогенезе [39]. К настоящему времени БА рассматривается как гетерогенное заболевание, включающее в себя несколько фенотипов. Наиболее распространённый фенотип — атопическая БА, которая протекает преимущественно по Th2-зависимому механизму и сопровождается эозинофильным воспалением лёгких. Пациенты с такой астмой хорошо поддаются традиционному лечению кортикостероидами [40, 41]. Менее распространённый фенотип заболевания — нейтрофильная БА. У таких пациентов болезнь протекает тяжело, а воспаление лёгких связано с инфильтрацией лёгких другими провоспалительными клетками — нейтрофилами. Пациенты с нейтрофильной БА плохо поддаются лечению кортикостероидами [42].

STAT3 в поляризации Th-клеток. Исследования показали ведущую роль Th17-клеток в патогенезе нейтрофильного воспаления при БА [43]. В то же время STAT3 необходим для поляризации Th17-клеток, которые образуются из наивных CD4⁺ Т-клеток под влиянием комбинации цитокинов (TGF- β , IL-23, IL-6) (рис. 2). Данные цитокины активируют STAT3, который запускает экспрессию фактора ROR γ t, специфичного для Th17-клеток [44, 45]. В свою очередь, Th17-клетки секретируют цитокины IL-17A, IL-17F, IL-21 и IL-22, которые приводят к развитию проявлений БА: нейтрофильному воспалению лёгких, гиперсекреции слизи и ремоделированию респираторного тракта [4]. Примечательно, что секретируемый IL-17A способен дополнительно активировать фосфорилирование STAT3 в Th0-клетках, приводя к усилению IL-6/STAT3-сигнального пути. Это в конечном итоге ведёт к усилению поляризации и пролиферации Th17-клеток, и, как следствие, к усугублению воспаления в лёгких по причине увеличенной продукции провоспалительных Th17-цитокинов [46]. Кроме того, секретируемый IL-17A ингибирует транскрипционный фактор FOXP3 в клетках, являющихся предшественниками Treg, что подавляет дифференцировку последних. Учитывая противовоспалительный потенциал Treg-клеток, уменьшение их количества также приводит к усилению воспаления [47]. При этом фактор SOCS3 негативно регулирует фосфорилирование STAT3 и тем самым супрессирует поляризацию Th17-клеток, сдвигая иммунный ответ в сторону Th1- и Th2-клеток [48]. Это подтверждается результатами исследований на мышах с индуцированной аллергической БА. У таких мышей повышена экспрессия Th2-цитокинов в лёгких, при этом экспрессия STAT3 и

IL-6 снижены, а SOCS3 — увеличена. Подавление активности SOCS3 в лёгких молекулами мРНК увеличивало экспрессию STAT3 и IL-6. Эти данные свидетельствуют об отсутствии значимого вклада сигнального пути IL-6/STAT3 в развитие Th2-опосредованного аллергического воспаления лёгких; по всей видимости, IL-4/STAT6-путь в данном случае является преобладающим [49]. При этом в опубликованной работе авторами не указывается к каким физиологическим последствиям приводила супрессия SOCS3. Ещё одним коллективом авторов осуществлён нокаут гена *Socs3* в миелоидных клетках мышей. У таких мышей увеличивалась экспрессия STAT3 и развивалось более выраженное воспаление лёгких в ответ на введение липополисахарида (ЛПС) в сравнении с мышами дикого типа [50].

Также незначительную роль IL-6/STAT3-пути в развитии Th2-зависимой БА демонстрирует исследование с использованием мышей, нокаутных по гену *Il6*. Вопреки ожиданиям нокаут этого провоспалительного цитокина приводил не к уменьшению, а к усилению воспаления лёгких после индукции БА в сравнении с мышами дикого типа. При этом, несмотря на полное отсутствие IL-6, у мышей происходила активация STAT3 по TGF- β -зависимому механизму [51].

В то же время IL-6/STAT3-сигнальный путь играет значительную роль в Th17-зависимом воспалении лёгких при БА, поскольку IL-6 необходим для пролиферации Th17-клеток, а фактор STAT3 индуцирует продукцию этими клетками провоспалительных цитокинов IL-17A, IL-17F, IL-21 и IL-22 [44, 45]. Это подтверждается тем, что нокаут гена *stat3* у мышей приводит к практически полному отсутствию Th17-клеток в лимфоузлах и продукции IL-17A лимфоцитами [52].

Тем не менее, согласно новым данным, STAT3 вовлечён не только в формирование Th17-, но и Th2-иммунного ответа. Известно, что в поляризации Th2-клеток ключевую роль играет STAT6. Однако STAT3 усиливает взаимодействие фактора STAT6 с генными локусами, и тем самым активирует гены, необходимые для дифференцировки Th2-клеток [53]. Была создана линия мышей с нокаутом гена *stat3* в Т-клетках. Такие мыши не развивали Th17-иммунный ответ на аллерген, при этом чрезмерно активировался Th1-ответ, что выражалось в уменьшении числа Th17-клеток и одновременном увеличении Th1-клеток в лимфатических узлах и в лёгких. При этом количество Th2-клеток после нокаута *stat3* уменьшалось в лимфоузлах, но не в бронхоальвеолярном лаваже (БАЛ). Это можно объяснить тем, что STAT3 необходим для на-

чальной стадии дифференциации Th2-клеток, которая происходит в лимфоузлах [52]. В работе Gavino et al. [32] эти данные были подтверждены. Мышам вводили селективный ингибитор STAT3 — C188-9, на фоне развития аллергического воспаления лёгких, что приводило к подавлению патологии: уменьшению степени ремоделирования бронхов, снижению воспаления и количества провоспалительных цитокинов в лёгких, включая IL-4, IL-5, IL-13 и IL-17A. Эти данные показывают, что инактивация STAT3 нивелирует как Th17-, так и Th2-иммунный ответ в лёгких. Учитывая гетерогенность механизмов БА, блокирование двух иммунных ответов одновременно является более перспективным подходом к терапии.

В другом исследовании мышам на фоне развития экспериментальной БА интраназально вводили IL-27 — цитокин, который активирует Th1-клетки и подавляет активность Th2- и Th17-клеток [54]. Примечательно, что, несмотря на активацию STAT3, цитокин IL-27 супрессировал Th17-иммунный ответ [54]. Данное противоречие объясняется тем, что IL-27 подавляет факторы ROR γ и ROR α по STAT1-зависимому механизму, которые необходимы для поляризации Th17-клеток [55].

Таким образом, IL-6/STAT3-сигнальный путь играет большое значение в Th17-опосредованном нейтрофильном воспалении лёгких при БА. В то же время этот путь не вносит существенного вклада в формирование Th2-опосредованной эозинофильной БА.

Роль STAT3 в поляризации макрофагов M2-фенотипа. Макрофаги обильно представлены в лёгких и, соответственно, вовлечены в различные патологические процессы в респираторном тракте, включая БА. Согласно современным представлениям, макрофаги — это гетерогенная популяция клеток с широким спектром биологических функций. Выделяют несколько субтипов этих клеток, наиболее изученными из которых являются классически активированные макрофаги M1-фенотипа и альтернативно активированные макрофаги M2-фенотипа. В отличие от M1-макрофагов, формирующихся под действием IFN γ , макрофаги M2-фенотипа образуются после стимуляции цитокинами IL-4 и IL-13 [56].

Показана взаимосвязь количества M2-макрофагов в образцах БАЛ с тяжестью астмы [57]. Другие исследователи считают, что эти клетки не играют решающей роли в развитии БА, т.к. делеция IL-4R α (необходимого для M2-поляризации) в макрофагах не влияет на течение заболевания, а повышенное количество M2-клеток у пациентов с астмой является следстви-

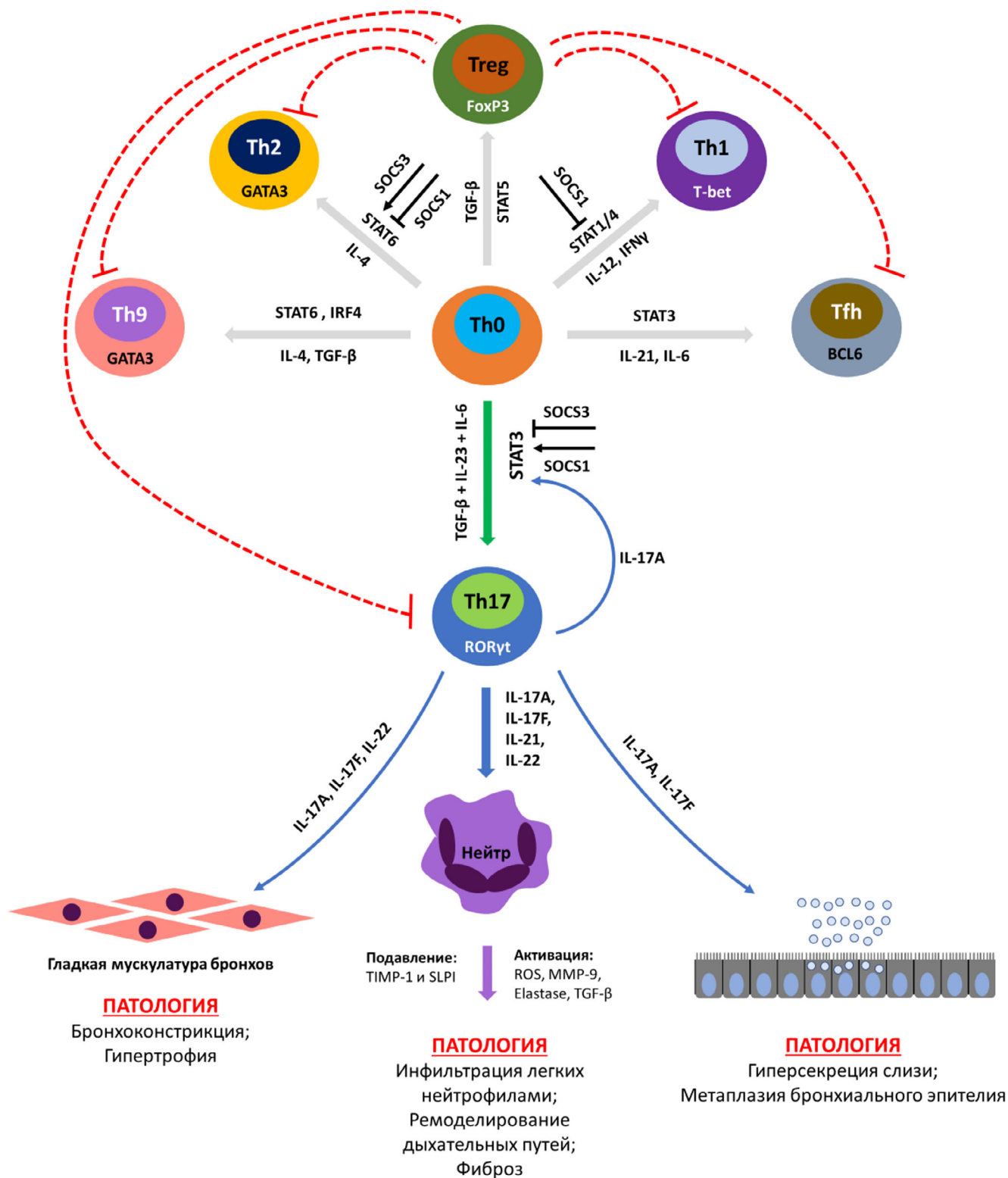


Рис. 2. Роль факторов STAT в поляризации Th-клеток. В зависимости от активности того или иного белка STAT дифференцировка и пролиферация Th0-клеток будет осуществляться в различных направлениях. STAT3 индуцирует поляризацию Th17-клеток, что приводит к таким патологическим проявлениям в лёгких, как бронхоконстрикция, инфильтрация лёгких нейтрофилами, гиперсекреция слизи. TIMP1 – тканевой ингибитор металлопротеиназ-1; SLPI – секреторный ингибитор протеиназы лейкоцитов; ROS – активные формы кислорода; MMP-9 – матриксная металлопротеиназа 9; TGF- β – трансформирующий фактор роста бета; IFN γ – интерферон гамма; IL – интерлейкин; STAT – преобразователь сигнала и активатор транскрипции; SOCS – супрессор сигнальных белков цитокинов; IRF4 – регуляторный фактор интерферона 4

ем активации у них Th2-цитокинов [58]. Тем не менее проведённые исследования указывают на способность M2-макрофагов усиливать такие проявления астмы, как аллергическое воспаление, гиперреактивность бронхов и ремоделирование респираторного тракта за счёт отложения коллагена [59]. Более детально роль M2-макрофагов в патогенезе астмы рассмотрена в современных обзорах [60, 61].

Установлено, что STAT3 является важным детерминантом поляризации альтернативно активированных макрофагов M2-фенотипа [16]. Были созданы мыши с селективным нокаутом гена *stat3* в миелоидных клетках (моноциты, гранулоциты и макрофаги). Продemonстрировано, что макрофаги с инактивированным *stat3* утрачивают способность отвечать на стимуляцию IL-10 и экспрессировать маркёры M2-фенотипа (гены *Arg1* и *Cd163*) [16].

Исследования Zhao et al. [62] показали, что инактивация STAT3 селективным ингибитором LLL12 уменьшает воспаление в лёгких, индуцированное ЛПС. Наоборот, гиперактивация STAT3 у мышей, нокаутных по гену *Socs3*, приводит к усилению патологии. По мнению авторов, одну из главных патогенетических функций при остром респираторном дистресс-синдроме и синдроме острого повреждения лёгких играют макрофаги. Последующие исследования подтвердили это предположение. Было установлено, что активация STAT3 в макрофагах приводит к повышению продукции ими металлопротеаз MMP2 и MMP9, которые вовлечены в повреждение тканей лёгких. В частности, металлопротеазы разрушают белки межклеточного контакта в эпителии и эндотелии, белки базальной мембраны респираторного эпителия [63]. В своей работе Liang et al. [64] выявили взаимосвязь между экспрессией IL-33, фосфорилированием STAT3 и экспрессией металлопротеаз MMP2 и MMP9. Авторы показали, что культивирование макрофагов с IL-33 запускало фосфорилирование STAT3 и продукцию ими металлопротеаз. Наоборот, инактивация STAT3 молекулами миРНК приводила к утрате способности макрофагов продуцировать MMP2 и MMP9 в ответ на IL-33.

STAT3 вовлечён в процессы ремоделирования при БА не только посредством активации M2-макрофагов, но и фибробластов. Активация IL-33/ST2-сигнального пути приводит к фосфорилированию STAT3 в фибробластах и повышению продукции ими факторов фиброза (например, коллагена-1). Блокирование IL-33/ST2-сигнального пути с помощью моноклональных антител уменьшает степень ремоделирования бронхов [65].

Ещё в одном исследовании показано, что фибробласты лёгких в ответ на стимуляцию цитокином TNF- α или IL-1 β индуцировали продукцию CXCL10 (C-X-C motif chemokine ligand 10, хемокиновый лиганд 10 с C-X-C-мотивом), что было опосредовано фактором STAT3. В свою очередь, хемокиновый лиганд CXCL10, секретируемый активированными фибробластами, играет решающую роль в обеспечении поляризации M1-фенотипа альвеолярных макрофагов. Таким образом, фактор STAT3 задействован ещё и в поляризации альвеолярных макрофагов [66].

Роль STAT3 в эндотелиальных и эпителиальных клетках. Эндотелиальные клетки играют важную роль в миграции провоспалительных клеток из системного кровотока в лёгкие при развитии БА. В этом процессе большое значение играют молекулы адгезии эндотелия ICAM-1 (межклеточная молекула адгезии 1) и VCAM-1 (васкулярная молекула клеточной адгезии 1). Нокаут гена, кодирующего ICAM-1, или его нейтрализация моноклональными антителами существенно (более чем в 2 раза) уменьшает инфильтрацию лёгких нейтрофилами у мышей на фоне ингаляции ЛПС [67]. При нормальных условиях ICAM-1 и VCAM-1 экспрессируются на поверхности эндотелия в небольшом количестве, однако при патологических изменениях (воздействие активных форм кислорода или провоспалительных цитокинов (IL-6, TNF- α и др.)) их количество существенно увеличивается. Решающее значение в увеличении количества молекул адгезии играет STAT3, т.к. нокаунт соответствующего гена в эндотелиальных клетках приводил к утрате их способности усиливать экспрессию ICAM-1 и VCAM-1 в ответ на IL-6 [7]. Эти данные свидетельствуют о том, что STAT3, активируя молекулы адгезии ICAM-1 и VCAM-1 на поверхности эндотелиальных клеток, способствуют инфильтрации лёгких провоспалительными клетками (преимущественно гранулоцитами) при развитии БА.

Респираторный эпителий является первой линией защиты от аэроаллергенов и прочих поллютантов и, соответственно, эпителиальные клетки играют значимую роль в индукции и поддержании воспаления дыхательных путей. В одном исследовании делеция STAT3 в респираторном эпителии приводила к значительному уменьшению признаков воспаления у мышей после индукции БА. Также при нокауте *stat3* в клетках респираторного тракта происходило уменьшение числа провоспалительных клеток в лёгких и снижение уровня хемокинов в БАЛ. Эти результаты демонстрируют провоспалительную роль STAT3 в эпителиальных клетках дыхательных путей [68].

STAT3 КАК ТЕРАПЕВТИЧЕСКАЯ МИШЕНЬ

Приведённые данные свидетельствуют о том, что STAT3 может стать новой терапевтической мишенью для разработки противоастмати-

ческих препаратов. Можно выделить две стратегии ингибирования STAT3: не прямое ингибирование, когда блокируются молекулы необходимые для фосфорилирования STAT3 (например, JAK2), и прямое ингибирование функциональных доменов STAT3 (таблица).

Исследования эффектов ингибирования STAT3 на моделях воспаления лёгких

Ингибитор	Мишень	Механизм действия	Биологические эффекты	Ссылка
Малые молекулы в качестве не прямых ингибиторов STAT3				
Руксолитиниб	JAK1/2	препятствие фосфорилированию	снижение процентного содержания эозинофилов и нейтрофилов в БАЛ в 3 раза; уменьшение концентрации IL-17A в БАЛ в 2 раза; уменьшение доли Th17-клеток в ткани лёгких в 1,5 раза	[69]
Тофацитиниб	JAK3		снижение доли эозинофилов в БАЛ на 20%	[70]
AZD1480	JAK1/2		снижение уровня общего белка, TNF- α , IL-1 β , IL-6 в БАЛ почти в 2 раза	[72]
WP1066	JAK2	препятствие фосфорилированию	снижение сопротивляемости дыхательных путей в 2 раза	[73]
AG490			уменьшение гиперреактивности бронхов в 1,8 раза; снижение степени перибронхиальной инфильтрации провоспалительными клетками	[71]
Нарингенин	SOCS3	неизвестно	снижение степени воспаления лёгких; уменьшение гиперреактивности бронхов и ремоделирования дыхательных путей; снижение уровня цитокинов (IL-4 и IL-13) в БАЛ в 2 раза	[74]
Малые молекулы в качестве прямых ингибиторов STAT3				
LLL12	SH2	препятствие фосфорилированию	подавление экспрессии генов провоспалительных цитокинов (IL-1, IL-6, TNF- α) в БАЛ и сыворотке крови	[62]
Прямые ингибиторы STAT3 на основе природных соединений				
Куркумин	SH2	препятствие фосфорилированию	снижение общего количества клеток БАЛ в 1,8 раза; уменьшение степени общего воспаления дыхательных путей	[78]
Алантактон		неизвестно	уменьшение доли эозинофилов в БАЛ на 60%; подавление секреции муцина в дыхательных путях	[82]
Пиперлонгумин			снижение уровня сывороточного IgE на 70%; уменьшение метаплазии бокаловидных клеток в 2 раза	[83]
Силибинин			снижение уровня TNF- α , IL-1 β и Th2-цитокинов (IL-4, IL-5, IL-13) в БАЛ в 1,5 раза; уменьшение доли эозинофилов в БАЛ почти в 5 раз	[84]
Галиеллалактон	DBD	ингибирование ДНК-связывающей активности	улучшение гиперреактивности дыхательных путей в 1,5 раза; снижение доли эозинофилов в БАЛ в 2 раза	[87]

Было разработано несколько низкомолекулярных ингибиторов JAK2, включая руксолитиниб, тофацитиниб, AG490, AZD1480 и WP1066. Эти ингибиторы подавляют сигнальный путь JAK2/STAT3, ингибируя непосредственно JAK2.

Ингибиторы руксолитиниб и тофацитиниб обеспечивали снижение числа нейтрофилов и эозинофилов в лёгких мышей с индуцированной БА, а также снижение количества Th17-клеток и концентрации IL-17A в БАЛ [69, 70]. Применение ингибитора AG490 уменьшало воспаление дыхательных путей и гиперреактивность бронхов у мышей с индуцированной БА [71]. Введение мышам AZD1480 – ингибитора JAK2, заметно уменьшало степень повреждения лёгких у мышей при экспериментальной БА [72]. Ингибирование STAT3 с помощью WP1066 подавляет клеточное старение и приводит к усилению регуляции альфа-актина гладких мышц и коллагена первого типа в эпителии дыхательных путей у мышей [73]. Показано, что небольшая гетероциклическая молекула нарингенин может индуцировать экспрессию гена *Socs3* в эндотелиальных клетках сосудов, что приводит к ингибированию STAT3 [15]. Экспериментальная терапия нарингенином приводила у мышей к значительному снижению степени воспаления лёгких, уменьшению гиперреактивности бронхов, и ремоделированию дыхательных путей [74].

Несмотря на благоприятные физиологические эффекты, общим недостатком вышеописанных ингибиторов является их низкая селективность, т.к. они ингибируют не только JAK2, но и другие киназы. Таким образом, стратегия непосредственного ингибирования STAT3 с помощью ингибиторов JAK2 сопряжена с низкой специфичностью.

При прямом ингибировании STAT3 чаще всего мишенью выступает домен SH2 [75]. Ингибирование домена SH2 приводит к нарушению не только активации и димеризации STAT3, но также и последующей ядерной транслокации и индукции экспрессии генов, регулируемых STAT3. Низкомолекулярный ингибитор LLL12 непосредственно контактирует с сайтом фосфорилирования pTyr705 фактора STAT3, что нарушает димеризацию STAT3 и последующее связывание с ДНК. Терапия LLL12 подавляла ЛПС-индуцированное воспаление лёгких у мышей, что сопровождалось снижением активации STAT3 и ингибированием инфильтрации макрофагов и воспалительных клеток в БАЛ, а также снижала экспрессию провоспалительных генов в БАЛ и сыворотке крови [62].

Другая группа ингибиторов, нацеленных на SH2-домен STAT3, представляет собой производные природных соединений. Куркумин,

природное соединение из растений, таких как куркума (*Curcuma longa*), обладает множеством биологических свойств, включая способность ингибировать фосфорилирование STAT3 [76, 77]. В одном из исследований куркумин оказывал эффект, снижающий общий приток клеток в БАЛ у мышей с индуцированной БА, а также уменьшал общий уровень воспаления дыхательных путей [78]. Алантолактон, пиперлонгумин и силибинин также связываются с SH2-доменом STAT3 и ингибируют его активность [79–81]. Применение этих агентов значительно подавляло рекрутирование провоспалительных клеток в дыхательные пути, а также снижало продукцию провоспалительных цитокинов в БАЛ [82–84]. Однако большинство этих ингибиторов не являются STAT3-специфическими, поскольку они способны связывать домены SH2 многих белков семейства STAT [10].

Домен DBD является важной областью связывания между белком STAT3 и ДНК. Этот домен индуцирует экспрессию генов-мишеней посредством связывания STAT3 с промоторами. Галиеллалактон – природный продукт, который был идентифицирован как ингибитор ДНК-связывающей активности STAT3 [85, 86]. Он значительно подавлял основные проявления экспериментальной астмы у мышей, такие как: гиперреактивность дыхательных путей, эозинофилия лёгких и гиперпродукция слизи [87].

Существуют и многие другие ингибиторы STAT3 (SB1578, трицин, флавоон, pYLPQTV, ацетил-pYLKTKF, STA-21, OPB-31121, OPB-51602, Stattic, S3I-201 и его аналоги, C48, inS3-54 и его аналоги, IS3-295, CPA-1, CPA-7, хлорид платины (IV), ST3-Hel2A-2 и K116) [9], однако информация об их роли в воспалении лёгких отсутствует.

Учитывая тот факт, что пациенты с нейтрофильной БА плохо поддаются традиционному лечению кортикостероидами, к потенциальным преимуществам анти-STAT3-терапии следует отнести возможность уменьшения нейтрофильного воспаления лёгких. Данный тип воспаления формируется по Th17-зависимому механизму, в котором фактор STAT3 играет значимую роль.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Фактор STAT3 описан более 20 лет назад. За это время показано, что он вовлечён в широкий спектр биологических процессов (гранулоцитопоз, дифференцировка Т- и В-клеток, антибактериальная защита, канцерогенез и развитие аутоиммунных патологий). В данном обзоре

мы описываем механизмы активации STAT3 и его роль в воспалении лёгких при БА.

Бронхиальная астма — это хроническое заболевание дыхательных путей, в патогенез которого вовлечён широкий спектр клеток и провоспалительных факторов. Изначально механизм воспаления лёгких при БА рассматривали как исключительно Th2-зависимый процесс, в котором решающую роль играют Th2-клетки, активируемые по IL-4/STAT6-сигнальному пути. Однако накапливаются данные об участии фактора STAT3 в развитии тяжёлой БА, которая зачастую не поддаётся стандартному лечению кортикостероидами.

Исследования показали ведущую роль Th17-клеток в патогенезе нейтрофильного воспаления при БА. В то же время IL-6/STAT3-сигнальный путь играет большое значение в поляризации Th17-клеток, поскольку IL-6 необходим для пролиферации Th17-клеток, а фактор STAT3 индуцирует продукцию этими клетками провоспалительных цитокинов IL-17A, IL-17F, IL-21 и IL-22. Кроме того, STAT3 является важным детерминантом поляризации альтернативно активированных макрофагов M2-фенотипа, которые усиливают такие проявления БА, как аллергическое воспаление, гиперреактивность и ремоделирование респираторного тракта за счёт отложения коллагена вокруг бронхов. Активация STAT3 в эндотелиальных клетках приводит к увеличению экспрессии на их поверхности

молекул адгезии (ICAM-1 и VCAM-1), которые способствуют рекрутированию провоспалительных клеток (нейтрофилов и эозинофилов) в ткань лёгких, где последние оказывают своё повреждающее действие.

Вышеописанное позволяет полагать, что фактор STAT3 может стать новой терапевтической мишенью для разработки противовоспалительных препаратов. Данный фактор является внутриклеточным, потому разработка терапевтических моноклональных антител для его нейтрализации нецелесообразна. Тем не менее в литературе описаны ингибиторы STAT3 на основе низкомолекулярных соединений. Обобщая опыт применения этих ингибиторов на моделях воспаления лёгких *in vivo*, можно заключить, что инактивация STAT3 оказывает благоприятный противовоспалительный эффект, что свидетельствует о перспективности данного подхода.

Финансирование. Исследование выполнено при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (грант № 20-34-90151).

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. GINA Committee (2020) Global Initiative for Asthma. Global Strategy for Asthma Management and Prevention: 2020, URL: https://ginasthma.org/wp-content/uploads/2020/04/GINA-2020-Appendix_final-wms.pdf.
2. Soriano, J. B., Abajobir, A. A., Abate, K. H., Abera, S. F., Agrawal, A., et al. (2017) Global, regional, and national deaths, prevalence, disability-adjusted life years, and years lived with disability for chronic obstructive pulmonary disease and asthma, 1990-2015: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2015, *Lancet Respir. Med.*, **5**, 691-706, doi: 10.1016/S2213-2600(17)30293-X.
3. Avdeev, S. N., Nenasheva, N. M., Zhudnikov, K. V., Petrakovskaya, V. A., and Izyumova, G. V. (2018) Prevalence, morbidity, phenotypes and other characteristics of severe bronchial asthma in Russian Federation, *Pulmonologiya*, **28**, 341-358, doi: 10.18093/0869-0189-2018-28-3-341-358.
4. Shilovskiy, I. P., Nikolskii, A. A., Kurbacheva, O. M., and Khaitov, M. R. (2020) Modern view of neutrophilic asthma molecular mechanisms and therapy, *Biochemistry (Moscow)*, **85**, 854-868, doi: 10.1134/S0006297920080027.
5. Khaitov, M. R., Gaisina, A. R., Shilovskiy, I. P., Smirnov, V. V., Ramenskaia, G. V., et al. (2018) The role of interleukin-33 in pathogenesis of bronchial asthma. New experimental data, *Biochemistry (Moscow)*, **83**, 13-25, doi: 10.1134/S0006297918010029.
6. Foster, P. S., Maltby, S., Rosenberg, H. F., Tay, H. L., Hogan, S. P., et al. (2017) Modeling Th2 responses and airway inflammation to understand fundamental mechanisms regulating the pathogenesis of asthma, *Immunol. Rev.*, **278**, 20-40, doi: 10.1111/imr.12549.
7. Wei, Z., Jiang, W., Wang, H., Li, H., Tang, B., et al. (2018) The IL-6/STAT3 pathway regulates adhesion molecules and cytoskeleton of endothelial cells in thromboangiitis obliterans, *Cell. Signal.*, **44**, 118-126, doi: 10.1016/j.cellsig.2018.01.015.
8. Hillmer, E. J., Zhang, H., Li, H. S., and Watowich, S. S. (2016) STAT3 signaling in immunity, *Cytokine Growth Factor Rev.*, **31**, 1-15, doi: 10.1016/j.cytogfr.2016.05.001.
9. Chen, Q., Lv, J., Yang, W., Xu, B., Wang, Z., et al. (2019) Targeted inhibition of STAT3 as a potential treatment strategy for atherosclerosis, *Theranostics*, **9**, 6424-6442, doi: 10.7150/thno.35528.
10. Szlag, M., Piaszyk-Borychowska, A., Plens-Galaska, M., Wesoly, J., and Bluysen, H. A. R. (2016) Targeted inhibition of STATs and IRFs as a potential treatment strategy in cardiovascular disease, *Oncotarget*, **7**, 48788-48812, doi: 10.18632/oncotarget.9195.
11. Marino, F., Orecchia, V., Regis, G., Musteanu, M., Tassone, B., et al. (2014) STAT3 β controls inflammatory responses and early tumor onset in skin and colon experimental cancer models, *Am. J. Cancer Res.*, **4**, 484-494.
12. Brosius, F. C., Tuttle, K. R., and Kretzler, M. (2016) JAK inhibition in the treatment of diabetic kidney disease, *Diabetologia*, **59**, 1624-1627, doi: 10.1007/s00125-016-4021-5.

13. Yang, J., Liao, X., Agarwal, M. K., Barnes, L., Auron, P. E., and Stark, G. R. (2007) Unphosphorylated STAT3 accumulates in response to IL-6 and activates transcription by binding to NF κ B, *Genes Dev.*, **21**, 1396-1408, doi: 10.1101/gad.1553707.
14. Gjurich, B., Taghavi-Moghadam, P., Ley, K., and Galkina, E. (2014) L-selectin deficiency decreases aortic B1a and Breg subsets and promotes atherosclerosis, *Thromb. Haemost.*, **112**, 803-811, doi: 10.1160/TH13-10-0865.
15. Wijek, J., Dunlop, J., Mackay, S. P., and Yarwood, S. J. (2013) Flavanoids induce expression of the suppressor of cytokine signalling 3 (SOCS3) gene and suppress IL-6-activated signal transducer and activator of transcription 3 (STAT3) activation in vascular endothelial cells, *Biochem. J.*, **454**, 283-293, doi: 10.1042/BJ20130481.
16. Nakamura, R., Sene, A., Santeford, A., Gdoura, A., Kubota, S., et al. (2015) IL10-driven STAT3 signalling in senescent macrophages promotes pathological eye angiogenesis, *Nat. Commun.*, **6**, 1-14, doi: 10.1038/ncomms8847.
17. Braun, D. A., Fribourg, M., and Sealfon, S. C. (2013) Cytokine response is determined by duration of receptor and signal transducers and activators of transcription 3 (STAT3) activation, *J. Biol. Chem.*, **288**, 2986-2993, doi: 10.1074/jbc.M112.386573.
18. Kim, D. J., Tremblay, M. L., and DiGiovanni, J. (2010) Protein tyrosine phosphatases, TC-PTP, SHP1, and SHP2, cooperate in rapid dephosphorylation of Stat3 in keratinocytes following UVB irradiation, *PLoS One*, **5**, 1-11, doi: 10.1371/journal.pone.0010290.
19. Chung, C. D., Liao, J., Liu, B., Rao, X., Jay, P., et al. (1997) Specific inhibition of Stat3 signal transduction by PIAS3, *Science*, **278**, 1803-1805, doi: 10.1126/science.278.5344.1803.
20. Kershaw, N. J., Murphy, J. M., Liao, N. P. D., Varghese, L. N., Laktyushin, A., et al. (2013) SOCS3 binds specific receptor-JAK complexes to control cytokine signaling by direct kinase inhibition, *Nat. Struct. Mol. Biol.*, **20**, 469-476, doi: 10.1038/nsmb.2519.
21. Babon, J. J., Kershaw, N. J., Murphy, J. M., Varghese, L. N., Laktyushin, A., et al. (2012) Suppression of cytokine signaling by SOCS3: characterization of the mode of inhibition and the basis of its specificity, *Immunity*, **36**, 239-250, doi: 10.1016/j.immuni.2011.12.015.
22. Nguyen-Jackson, H., Panopoulos, A. D., Zhang, H., Li, H. S., and Watowich, S. S. (2010) STAT3 controls the neutrophil migratory response to CXCR2 ligands by direct activation of G-CSF-induced CXCR2 expression and via modulation of CXCR2 signal transduction, *Blood*, **115**, 3354-3363, doi: 10.1182/blood-2009-08-240317.
23. Matsukawa, A., Takeda, K., Kudo, S., Maeda, T., Kagayama, M., and Akira, S. (2003) Aberrant inflammation and lethality to septic peritonitis in mice lacking STAT3 in macrophages and neutrophils, *J. Immunol.*, **171**, 6198-6205, doi: 10.4049/jimmunol.171.11.6198.
24. Gharibi, T., Babaloo, Z., Hosseini, A., Abdollahpour-Alitappeh, M., Hashemi, V., et al. (2020) Targeting STAT3 in cancer and autoimmune diseases, *Eur. J. Pharmacol.*, **878**, 173107, doi: 10.1016/j.ejphar.2020.173107.
25. Niu, G., Heller, R., Catlett-Falcone, R., Coppola, D., Jaroszeski, M., et al. (1999) Gene therapy with dominant-negative Stat3 suppresses growth of the murine melanoma B16 tumor *in vivo*, *Cancer Res.*, **59**, 5059-5063.
26. Pencik, J., Schleiderer, M., Gruber, W., Unger, C., Walker, S. M., et al. (2015) STAT3 regulated ARF expression suppresses prostate cancer metastasis, *Nat. Commun.*, **6**, 1-14, doi: 10.1038/ncomms8736.
27. Mohrherr, J., Uras, I. Z., Moll, H. P., and Casanova, E. (2020) STAT3: versatile functions in non-small cell lung cancer, *Cancers*, **12**, 1107, doi: 10.3390/cancers12051107.
28. Tolomeo, M., and Cascio, A. (2021) The multifaced role of STAT3 in cancer and its implication for anticancer therapy, *Int. J. Mol. Sci.*, **22**, 603, doi: 10.3390/ijms22020603.
29. Milner, J. D., Vogel, T. P., Forbes, L., Ma, C. A., Stray-Pedersen, A., et al. (2015) Early-onset lymphoproliferation and autoimmunity caused by germline STAT3 gain-of-function mutations, *Blood*, **125**, 591-599, doi: 10.1182/blood-2014-09-602763.
30. Lu, H. C., Kim, S., Steelman, A. J., Tracy, K., Zhou, B., et al. (2020) STAT3 signaling in myeloid cells promotes pathogenic myelin-specific T cell differentiation and autoimmune demyelination, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **117**, 5430-5441, doi: 10.1073/pnas.1913997117.
31. Qi, H., Yang, Z., Dai, C., Wang, R., Ke, X., et al. (2020) STAT3 activates MSK1-mediated histone H3 phosphorylation to promote NFAT signaling in gastric carcinogenesis, *Oncogenesis*, **9**, 1-16, doi: 10.1038/s41389-020-0195-2.
32. Gavino, A. C., Nahmod, K., Bharadwaj, U., Makedonas, G., and Tweardy, D. J. (2016) STAT3 inhibition prevents lung inflammation, remodeling, and accumulation of Th2 and Th17 cells in a murine asthma model, *Allergy Eur. J. Allergy Clin. Immunol.*, **71**, 1684-1692, doi: 10.1111/all.12937.
33. Serrano, C., Galán, S., Rubio, J. F., Candelario-Martínez, A., Montes-Gómez, A. E., et al. (2019) Compartmentalized response of IL-6/STAT3 signaling in the colonic mucosa mediates colitis development, *J. Immunol.*, **202**, 1239-1249, doi: 10.4049/jimmunol.1801060.
34. Melillo, J. A., Song, L., Bhagat, G., Blazquez, A. B., Plumlee, C. R., et al. (2010) Dendritic cell (DC)-specific targeting reveals Stat3 as a negative regulator of DC function, *J. Immunol.*, **184**, 2638-2645, doi: 10.4049/jimmunol.0902960.
35. Qin, H., Holdbrooks, A. T., Liu, Y., Reynolds, S. L., Yanagisawa, L. L., and Benveniste, E. N. (2012) SOCS3 deficiency promotes M1 macrophage polarization and inflammation, *J. Immunol.*, **189**, 3439-3448, doi: 10.4049/jimmunol.1201168.
36. Diehl, S. A., Schmidlin, H., Nagasawa, M., Blom, B., and Spits, H. (2012) IL-6 Triggers IL-21 production by human CD4⁺ T cells to drive STAT3-dependent plasma cell differentiation in B cells, *Immunol. Cell Biol.*, **90**, 802-811, doi: 10.1038/icb.2012.17.
37. Wang, R.-X., Yu, C.-R., Dambuza, I. M., Mahdi, R. M., Dolinska, M. B., et al. (2014) Interleukin-35 induces regulatory B cells that suppress autoimmune disease, *Nat. Med.*, **20**, 633-641, doi: 10.1038/nm.3554.
38. Liu, X., Lee, Y. S., Yu, C.-R., and Egwuagu, C. E. (2008) Loss of STAT3 in CD4⁺ T cells prevents development of experimental autoimmune diseases, *J. Immunol.*, **180**, 6070-6076, doi: 10.4049/jimmunol.180.9.6070.
39. Grayson, M. H., Feldman, S., Prince, B. T., Patel, P. J., Matsui, E. C., and Apter, A. J. (2018) Advances in asthma in 2017: mechanisms, biologics, and genetics, *J. Allergy Clin. Immunol.*, **142**, 1423-1436, doi: 10.1016/j.jaci.2018.08.033.
40. Wenzel, S. E. (2012) Asthma phenotypes: the evolution from clinical to molecular approaches, *Nat. Med.*, **18**, 716-725, doi: 10.1038/nm.2678.
41. Kuruvilla, M. E., Lee, F. E. H., and Lee, G. B. (2019) Understanding asthma phenotypes, endotypes, and mechanisms of disease, *Clin. Rev. Allergy Immunol.*, **56**, 219-233, doi: 10.1007/s12016-018-8712-1.
42. Ray, A., and Kolls, J. K. (2017) Neutrophilic inflammation in asthma and association with disease severity, *Trends Immunol.*, **38**, 942-954, doi: 10.1016/j.it.2017.07.003.
43. Newcomb, D. C., and Peebles, R. S. (2013) Th17-mediated inflammation in asthma, *Curr. Opin. Immunol.*, **25**, 755-760, doi: 10.1016/j.coi.2013.08.002.

44. Chaudhry, A., Rudra, D., Treuting, P., Samstein, R. M., Liang, Y., et al. (2009) CD4⁺ regulatory T cells control Th17 responses in a STAT3-dependent manner, *Science*, **326**, 986-991, doi: 10.1126/science.1172702.
45. Halwani, R., Sultana, A., Vazquez-Tello, A., Jamhawi, A., Al-Masri, A. A., and Al-Muhsen, S. (2017) Th-17 regulatory cytokines IL-21, IL-23, and IL-6 enhance neutrophil production of IL-17 cytokines during asthma, *J. Asthma*, **54**, 893-904, doi: 10.1080/02770903.2017.1283696.
46. Ruwanpura, S. M., McLeod, L., Brooks, G. D., Bozinovski, S., Vlahos, R., et al. (2014) IL-6/Stat3-driven pulmonary inflammation, but not emphysema, is dependent on interleukin-17A in mice, *Respirology*, **19**, 419-427, doi: 10.1111/resp.12243.
47. Cervilha, D. A. B., Ito, J. T., Lourenço, J. D., Olivo, C. R., Saraiva-Romanholo, B. M., et al. (2019) The Th17/Treg cytokine imbalance in chronic obstructive pulmonary disease exacerbation in an animal model of cigarette smoke exposure and lipopolysaccharide challenge association, *Sci. Rep.*, **9**, 1921, doi: 10.1038/s41598-019-38600-z.
48. Chen, M., Zhao, J., Ali, I. H. A., Marry, S., Augustine, J., et al. (2018) Cytokine signaling protein 3 deficiency in myeloid cells promotes retinal degeneration and angiogenesis through arginase-1 up-regulation in experimental autoimmune uveoretinitis, *Am. J. Pathol.*, **188**, 1007-1020, doi: 10.1016/j.ajpath.2017.12.021.
49. Paul, B., Mishra, V., Chaudhury, B., Awasthi, A., Das, A. B., et al. (2009) Status of STAT3 in an ovalbumin-induced mouse model of asthma: analysis of the role of SOCS3 and IL-6, *Int. Arch. Allergy Immunol.*, **148**, 99-108, doi: 10.1159/000155740.
50. Jiang, Z., Chen, Z., Li, L., Zhou, W., and Zhu, L. (2017) Lack of SOCS3 increases LPS-induced murine acute lung injury through modulation of Ly6C(+) macrophages, *Respir. Res.*, **18**, 1-14, doi: 10.1186/s12931-017-0707-6.
51. Schmit, T., Ghosh, S., Mathur, R. K., Barnhardt, T., Ambigapathy, G., et al. (2020) IL-6 deficiency exacerbates allergic asthma and abrogates the protective effect of allergic inflammation against *Streptococcus pneumoniae* pathogenesis, *J. Immunol.*, **205**, 469-479, doi: 10.4049/jimmunol.1900755.
52. Lim, H., Cho, M., Choi, G., Na, H., and Chung, Y. (2015) Dynamic control of Th2 cell responses by STAT3 during allergic lung inflammation in mice, *Int. Immunopharmacol.*, **28**, 846-853, doi: 10.1016/j.intimp.2015.03.051.
53. Stritesky, G. L., Muthukrishnan, R., Sehra, S., Goswami, R., Pham, D., et al. (2011) The transcription factor STAT3 is required for T helper 2 cell development, *Immunity*, **34**, 39-49, doi: 10.1016/j.immuni.2010.12.013.
54. Lu, D., Lu, J., Ji, X., Ji, Y., Zhang, Z., et al. (2020) IL-27 suppresses airway inflammation, hyperresponsiveness and remodeling via the STAT1 and STAT3 pathways in mice with allergic asthma, *Int. J. Mol. Med.*, **46**, 641-652, doi: 10.3892/ijmm.2020.4622.
55. Diveu, C., McGeachy, M. J., Boniface, K., Stumhofer, J. S., Sathe, M., et al. (2009) IL-27 blocks ROR γ c expression to inhibit lineage commitment of Th17 cells, *J. Immunol.*, **182**, 5748-5756, doi: 10.4049/jimmunol.0801162.
56. Sharma, N., Akkoyunlu, M., and Rabin, R. L. (2018) Macrophages – common culprit in obesity and asthma, *Allergy*, **73**, 1196-1205, doi: 10.1111/all.13369.
57. Girodet, P.-O., Nguyen, D., Mancini, J. D., Hundal, M., Zhou, X., et al. (2016) Alternative macrophage activation is increased in asthma, *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.*, **55**, 467-475, doi: 10.1165/rcmb.2015-0295OC.
58. Nieuwenhuizen, N. E., Kirstein, F., Jayakumar, J., Emedi, B., Hurdal, R., et al. (2012) Allergic airway disease is unaffected by the absence of IL-4R α -dependent alternatively activated macrophages, *J. Allergy Clin. Immunol.*, **130**, 743-750, doi: 10.1016/j.jaci.2012.03.011.
59. Ford, A. Q., Dasgupta, P., Mikhailenko, I., Smith, E. M. P., Noben-Trauth, N., and Keegan, A. D. (2012) Adoptive transfer of IL-4R α ⁺ macrophages is sufficient to enhance eosinophilic inflammation in a mouse model of allergic lung inflammation, *BMC Immunol.*, **13**, 1-17, doi: 10.1186/1471-2172-13-6.
60. Abdelaziz, M. H., Abdelwahab, S. F., Wan, J., Cai, W., Huixuan, W., et al. (2020) Alternatively activated macrophages; a double-edged sword in allergic asthma, *J. Transl. Med.*, **18**, 1-12, doi: 10.1186/s12967-020-02251-w.
61. Saradna, A., Do, D. C., Kumar, S., Fu, Q.-L., and Gao, P. (2018) Macrophage polarization and allergic asthma, *Transl. Res.*, **191**, 1-14, doi: 10.1016/j.trsl.2017.09.002.
62. Zhao, J., Yu, H., Liu, Y., Gibson, S. A., Yan, Z., et al. (2016) Protective effect of suppressing STAT3 activity in LPS-induced acute lung injury, *Am. J. Physiol. Cell. Mol. Physiol.*, **311**, 868-880, doi: 10.1152/ajplung.00281.2016.
63. Solun, B., and Shoenfeld, Y. (2020) Inhibition of metalloproteinases in therapy for severe lung injury due to COVID-19, *Med. Drug Discov.*, **7**, 100052, doi: 10.1016/j.medidd.2020.100052.
64. Liang, Y., Yang, N., Pan, G., Jin, B., Wang, S., and Ji, W. (2018) Elevated IL-33 promotes expression of MMP2 and MMP9 via activating STAT3 in alveolar macrophages during LPS-induced acute lung injury, *Cell. Mol. Biol. Lett.*, **23**, 1-13, doi: 10.1186/s11658-018-0117-x.
65. Zhang, Y., Li, S., Huang, S., Cao, L., Liu, T., et al. (2019) IL33/ST2 contributes to airway remodeling via p-JNK MAPK/STAT3 signaling pathway in OVA-induced allergic airway inflammation in mice, *Exp. Lung Res.*, **45**, 65-75, doi: 10.1080/01902148.2019.1611972.
66. Tsai, C. F., Chen, J. H., and Yeh, W. L. (2019) Pulmonary fibroblasts-secreted CXCL10 polarizes alveolar macrophages under pro-inflammatory stimuli, *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, **380**, 114698, doi: 10.1016/j.taap.2019.114698.
67. Basit, A., Reutershan, J., Morris, M. A., Solga, M., Rose, C. E., and Ley, K. (2006) ICAM-1 and LFA-1 play critical roles in LPS-induced neutrophil recruitment into the alveolar space, *Am. J. Physiol. Cell. Mol. Physiol.*, **291**, 200-207, doi: 10.1152/ajplung.00346.2005.
68. Simeone-Penney, M. C., Severgnini, M., Tu, P., Homer, R. J., et al. (2007) Airway epithelial STAT3 is required for allergic inflammation in a murine model of asthma, *J. Immunol.*, **178**, 6191-6199, doi: 10.4049/jimmunol.178.10.6191.
69. Li, R. F., and Wang, G. F. (2018) JAK/STAT5 signaling pathway inhibitor ruxolitinib reduces airway inflammation of neutrophilic asthma in mice model, *Eur. Rev. Med. Pharmacol. Sci.*, **22**, 835-843, doi: 10.26355/eurrev_201802_14320.
70. Younis, U. S., Vallor, E., Addison, K. J., Ledford, J. G., and Myrdal, P. B. (2019) Preformulation and evaluation of Tofacitinib as a therapeutic treatment for asthma, *AAPS PharmSciTech*, **20**, 1-23, doi: 10.1208/s12249-019-1377-0.
71. Huang, X. P., Qin, C. Y., and Gao, Y. M. (2021) miR-135a inhibits airway inflammatory response in asthmatic mice via regulating JAK/STAT signaling pathway, *Brazilian J. Med. Biol. Res.*, **54**, 1-10, doi: 10.1590/1414-431X202010023.
72. Liu, Q., Xie, W., Wang, Y., Chen, S., Han, J., et al. (2019) JAK2/STAT1-mediated HMGB1 translocation increases inflammation and cell death in a ventilator-induced lung injury model, *Lab. Invest.*, **99**, 1810-1821, doi: 10.1038/s41374-019-0308-8.

73. Wu, J., Dong, F., Wang, R. A., Wang, J., Zhao, J., et al. (2013) Central role of cellular senescence in TSLP-induced airway remodeling in asthma, *PLoS One*, **8**, 1-12, doi: 10.1371/journal.pone.0077795.
74. Shi, Y., Tan, Y., Mao, S., and Gu, W. (2014) Naringenin inhibits allergen-induced airway remodeling in a murine model of asthma, *Mol. Med. Rep.*, **9**, 1204-1208, doi: 10.3892/mmr.2014.1940.
75. Morlacchi, P., Robertson, F. M., Klostergaard, J., and McMurray, J. S. (2014) Targeting SH2 domains in breast cancer, *Fut. Med. Chem.*, **6**, 1909-1926, doi: 10.4155/fmc.14.120.
76. Liu, Y., Wang, X., Zeng, S., Zhang, X., Zhao, J., et al. (2018) The natural polyphenol curcumin induces apoptosis by suppressing STAT3 signaling in esophageal squamous cell carcinoma, *J. Exp. Clin. Cancer Res.*, **37**, 1-12, doi: 10.1186/s13046-018-0959-0.
77. Alexandrow, M. G., Song, L. J., Altiok, S., Gray, J., Haura, E. B., and Kumar, N. B. (2012) Curcumin: a novel Stat3 pathway inhibitor for chemoprevention of lung cancer, *Eur. J. Cancer Prev.*, **21**, 407-412, doi: 10.1097/CEJ.0b013e32834ef194.
78. Chong, L., Zhang, W., Nie, Y., Yu, G., Liu, L., et al. (2014) Protective effect of Curcumin on acute airway inflammation of allergic asthma in mice through Notch1-GATA3 signaling pathway, *Inflammation*, **37**, 1476-1485, doi: 10.1007/s10753-014-9873-6.
79. Bosch-Barrera, J., and Menendez, J. A. (2015) Silibinin and STAT3: a natural way of targeting transcription factors for cancer therapy, *Cancer Treat. Rev.*, **41**, 540-546, doi: 10.1016/j.ctrv.2015.04.008.
80. Bharadwaj, U., Eckols, T. K., Kolosov, M., Kasembeli, M. M., Adam, A., et al. (2015) Drug-repositioning screening identified piperlongumine as a direct STAT3 inhibitor with potent activity against breast cancer, *Oncogene*, **34**, 1341-1353, doi: 10.1038/onc.2014.72.
81. Ahmad, B., Gamallat, Y., Su, P., Husain, A., Rehman, A. U., et al. (2021) Alantolactone induces apoptosis in THP-1 cells through STAT3, survivin inhibition, and intrinsic apoptosis pathway, *Chem. Biol. Drug Des.*, **97**, 266-272, doi: 10.1111/cbdd.13778.
82. Lee, B. K., Park, S. J., Nam, S. Y., Kang, S., Hwang, J., et al. (2018) Anti-allergic effects of sesquiterpene lactones from *Saussurea costus* (Falc.) Lipsch. determined using *in vivo* and *in vitro* experiments, *J. Ethnopharmacol.*, **213**, 256-261, doi: 10.1016/j.jep.2017.11.018.
83. Lu, C., Zhang, B., Xu, T., Zhang, W., Bai, B., et al. (2019) Piperlongumine reduces ovalbumin-induced asthma and airway inflammation by regulating nuclear factor- κ B activation, *Int. J. Mol. Med.*, **44**, 1855-1865, doi: 10.3892/ijmm.2019.4322.
84. Choi, Y. H., Jin, G. Y., Guo, H. S., Piao, H. M., Li, L., et al. (2012) Silibinin attenuates allergic airway inflammation in mice, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **427**, 450-455, doi: 10.1016/j.bbrc.2012.07.112.
85. Don-Doncow, N., Escobar, Z., Johansson, M., Kjellström, S., Garcia, V., et al. (2014) Galiellalactone is a direct inhibitor of the transcription factor STAT3 in prostate cancer cells, *J. Biol. Chem.*, **289**, 15969-15978, doi: 10.1074/jbc.M114.564252.
86. Weidler, M., Rether, J., Anke, T., and Erkel, G. (2000) Inhibition of interleukin-6 signaling by galiellalactone, *FEBS Lett.*, **484**, 1-6, doi: 10.1016/s0014-5793(00)02115-3.
87. Hausding, M., Tepe, M., Übel, C., Lehr, H. A., Röhrig, B., et al. (2011) Induction of tolerogenic lung CD4⁺ T cells by local treatment with a pSTAT-3 and pSTAT-5 inhibitor ameliorated experimental allergic asthma, *Int. Immunol.*, **23**, 1-15, doi: 10.1093/intimm/dxq451.

THE ROLE OF TRANSCRIPTION FACTOR STAT3 IN THE PATHOGENESIS OF BRONCHIAL ASTHMA

Review

**A. A. Nikolskii, I. P. Shilovskiy*, E. D. Barvinskaia,
A. V. Korneev, M. S. Sundukova, and M. R. Khaitov**

NRC Institute of Immunology FMBA of Russia; 115522 Moscow, Russia; E-mail: ip.shilovsky@nrcii.ru

Bronchial asthma is a heterogeneous chronic inflammatory disease of the airways. Studies of the molecular and cellular mechanisms of bronchial asthma have made it possible to establish that a wide range of cells of the immune system (T- and B-cells, eosinophils, neutrophils, macrophages, etc.), as well as structural cells (epithelial and endothelial) are involved in its pathogenesis. These cells are activated in response to external stimuli (bacteria, viruses, allergens and other pollutants) and produce pro-inflammatory factors (cytokines, chemokines, metalloproteinases, etc.), which ultimately leads to the launch of pathological processes in the lungs. It is known that genes encoding transcription factors of the STAT family (STAT - signal transducer and activator of transcription), of which there are 7 representatives, are involved in cell activation. Recent studies have shown that the transcription factor STAT3 plays an important role in the activation of the above cells, and thus contributes to the development of asthma. In animal studies, selective inhibition of STAT3 significantly reduces the severity of inflammation in the lungs, which indicates its promising potential as a therapeutic target. In this review, we describe the mechanisms of STAT3 activation and its role in the polarization of Th2/Th17 cells and M2 macrophages, in the dysfunction of endothelial cells, which ultimately leads to the formation of manifestations of bronchial asthma: neutrophils and eosinophils infiltration into the lungs, bronchial hyperreactivity and remodeling of the respiratory tract.

Keywords: bronchial asthma, STAT3, JAK, T-helpers, signaling pathway

УДК 581.184.1

РОЛЬ ДВИЖЕНИЙ ЗЕМЛИ В ОРИЕНТАЦИИ РАСТЕНИЙ – ПЛАНЕТАРНЫЙ МЕХАНИЗМ

Обзор

© 2021 А.М. Оловников

*Институт биохимической физики им. Н.М. Эмануэля РАН, 119334 Москва, Россия;
электронная почта: olovnikov@gmail.com*

Поступила в редакцию 06.10.2021

После доработки 06.10.2021

Принята к публикации 07.10.2021

Согласно предлагаемой теории, богатые крахмалом частицы (статолиды), перемещаясь по инерции в сенсорных клетках (статоцитах) корней и стеблей, помогают растению преобразовывать движения Земли в сигналы, необходимые для восприятия растением его ориентации относительно вектора силы тяжести. Движения Земли отличаются постоянной вариабельностью, что, в частности, относится к так называемым полярным движениям и колебаниям оси вращения планеты. Статолиды в каждый данный момент движутся в цитоплазматической жидкости статоцитов по инерции под действием движений Земли, сохраняя траекторию, заданную предыдущим движением колеблющейся планеты. В отличие от статолитов стенки статоцита перемещаются в пространстве вместе со всем растением и с Землёй в строгом соответствии с текущим направлением движения оси планеты. Это приводит к неизбежному столкновению статолитов с клеточной стенкой/мембраной. Цитоплазматическая жидкость, как субстанция не способная сохранять форму, не препятствует инерциальному движению статолитов, ударяющих в стенку статоцита как в цель. Ударяясь о мембрану, статолиты вызывают в месте удара высвобождение ионов и других факторов, которые в дальнейшем участвуют в гравитропном процессе. Давление статолитного осадка на дно статоцита и позиция этого осадка не относятся к базовыми факторам гравитропизма.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: гравитропизм растений, перцепция ориентации растений, переориентация, закон синуса, статоциты, статолиты, грависенсинг, движения Земли.

DOI: 10.31857/S0320972521110051

ВВЕДЕНИЕ

Гравитропизм или геотропизм растений – это реакция, которая направляет рост растений параллельно вектору силы тяжести. Ярким проявлением гравитропного роста растений является их универсальная способность восстанавливать ориентацию органов после принудительной переориентации растения. Особый интерес в гравитропизме представляет его самая ранняя стадия, «перцепция ориентации», т.е. механизм распознавания растением своего положения относительно вектора гравитации. Обычно считается, что эффект вызван гравитационным притяжением к Земле особых амилопластов, наполненных крахмалом, также известных как статолиты. Хотя гравитация является одним из наиболее важных факторов окружающей среды, с которыми сталкивается растение, его способность ориентироваться относительно вектора гравитации, по-видимому, не контролируется притяжением статолитов к Земле, поскольку действие слишком слабое. В отличие от принятой парадигмы гравитропизма растений здесь

выдвигается идея, согласно которой растения практикуют особый механизм восприятия ориентации, использующий особенности движения Земли в космосе.

Гравитропизм растений широко изучается с 19 века [1], и его наиболее популярным объяснением стала статолитная теория [2–5], согласно которой богатые крахмалом пластиды, или статолиты, будучи тяжелее цитоплазмы, оседают на дно чувствительных клеток (статоцитов), а затем запускают рост с асимметричным изгибом, который восстанавливает правильную ориентацию растения.

Несмотря на прогресс в этой области, самая ранняя фаза гравитропизма растений, т.е. восприятие растениями своей ориентации, остаётся неясной по сей день [6]; последующие стадии гравитропизма успешно расшифровываются, но самая первая стадия остаётся неуловимой. Между тем есть свидетельства того, что растения обнаруживают изменение своей ориентации за доли секунды, и поэтому можно предположить, что растение сначала должно выполнить восприятие ориентации, и только затем оно пере-

ходит к асимметричному распределению факторов роста, которые позволяют выполнять ростовые изгибы органов как проявление положительного (рост корней вниз) и отрицательного (рост побегов вверх) гравитропизма. Здесь обосновывается, что на первой стадии гравитропизма растениям было бы выгодно использовать особый механизм, основанный на колебательных движениях Земли и непрерывных сдвигах её оси вращения. Притяжение компонентов растений к центру Земли играет роль только на последующих стадиях гравитропизма.

СОСТОЯНИЕ ПРОБЛЕМЫ И ПЛАНЕТАРНЫЙ МЕХАНИЗМ

Современные объяснения гравиперцепции растений. В ходе долгой истории изучения гравитропизма растений [4, 7] было установлено, что ранние фазы этого процесса связаны с ролью амилопластных статолитов, которые осаждаются в эндодермальных клетках побегов и клетках колумеллы корней, хотя механизм их функционирования оставался неизвестным, несмотря на обилие экспериментов [8].

Теория Cholodny–Went об асимметричном распределении фитогормона ауксина как необходимой предпосылки для тропического изгиба органов растений остаётся объединяющей концепцией после 100 лет исследований [9, 10], но открытие асимметрии в распределении гормонов роста, ионов и других факторов в ответ на переориентацию растений не прояснили суть инициирующего события — как растение «узнаёт» о своём положении в пространстве?

Современные теории гравитропизма растений основаны на парадигме, согласно которой процесс начинается с гравитационного притяжения сенсорных частиц, таких как статолиты, к Земле. Некоторое время конкурировали две модели гравиперцепции, известные как давление крахмальных статолитов и давление протопласта. Однако предположение о том, что клеточный протопласт работает вместо статолитов [4, 11], не может объяснить следование переориентированных растений правилу синуса [12] и имеет в основном исторический интерес. Следует также подчеркнуть, что «нестатолитные» теории разделяют со статолитной теорией сложность распознавания слабых сигналов [13].

Согласно классической теории крахмальных статолитов, механочувствительная система статолита распознаёт, что растение оказалось переориентированным, только чувствуя тяжесть богатых крахмалом амилопластов, осевших на дно клетки [13–15]. Осадок амилопластов далее пе-

ренаправляет транспортирование гормона ауксина к нижнему краю органа растения, что приводит к дифференциальному росту верхнего и нижнего флангов, при этом корень изгибается вниз, а стебель — вверх [5].

Гравитропная реакция побегов у покрытосеменных зависит от угла наклона, от направления силы тяжести. Согласно «гипотезе датчика положения», устройство, которое определяет положение амилопластов в статолитах, обнаруживает также наклон побегов благодаря наклону осадка амилопластов, тогда как механочувствительные каналы не участвуют в ощущении силы тяжести, действующей на амилопласты [16–19]. Предполагается, что осадок амилопластов из-за своего положения и взаимодействия с факторами роста распределяет их асимметрично. «Гипотеза датчика положения» не может ответить на ключевой вопрос, касающийся восприятия ориентации — почему статолиты за доли секунды после переориентации способны отвечать поступлением ионов кальция, что документировано многими наблюдениями [8, 20].

Также предполагалось, что статолиты снабжены лигандами, которые химически взаимодействуют с рецепторами мембраны [21]. Этот вариант устраняет проблему идентификации полезного сигнала на фоне механических помех, но данные о снижении эффекта гравитропизма у мутантов с дефицитом крахмала остаются не полностью объяснёнными.

Уместно подчеркнуть, что различный химический состав статолитов, таких как крахмал у высших растений, тяжёлые кристаллы сульфата бария в зелёной водоросли *Chara* и кристаллы белка в некоторых грибах [22, 23], по-видимому, противоречат роли осадка статолитов как универсального компонента, регулирующего распределение ростовых веществ. Имеющиеся данные, скорее, говорят о том, что статолиты используются как универсальный ударный инструмент.

Некоторые эффекты не согласуются с моделями гравитропизма. Известен ряд эффектов, не соответствующих ни классической модели богатых крахмалом статолитов, ни её модификациям. В частности, известно [24, 25], что: 1) самый короткий стимул, необходимый для ответа, может составлять не более 7 с, а с учётом ширины клетки статолита для осаждения амилопласта должно потребоваться несколько минут для достижения нижней части клетки; 2) безкрахмальные статолиты более лёгкие и не осаждаются, но эти мутанты всё ещё способны ощущать переориентацию, хотя и с большим разбросом ответов у побегов; 3) амилопласты вместе с актиновыми филаментами совершают скачкооб-

разные движения, не способствующие образованию осадка. Присутствие крахмала и осаждение пластид не было необходимым для гравитропного ответа корней у безкрахмального мутанта *Arabidopsis* [26]. Между тем почти все теории гравитропизма основаны именно на отложении статолитов в виде единого осадка с его предполагаемой способностью растягивать мембрану или регулировать факторы роста [18, 17].

Восприятие растением своего положения в пространстве — предпосылка для гравитропного роста. Как растение может воспринимать правильность своего положения, как обнаруживает изменение своей ориентации, если, например, растение расположить горизонтально? Это относится и к любому прорастающему семени, которому ещё только предстоит послать стебли вверх, а корни — вниз. Начальная и самая загадочная стадия гравитропизма растений здесь обозначена термином «перцепция ориентации» вместо менее точных терминов — гравиперцепции или грависенсинга, поскольку они подразумевают недоказанное и, возможно, ошибочное объяснение.

Можно предположить, что в целях перцепции ориентации растения обратились к колебаниям оси вращения Земли, а не к притяжению растений к центру Земли, которое ожидается с точки зрения гравиперцепции и грависенсинга. Роль притяжения растительных компонентов к центру Земли важна, но только на этапах, следующих за восприятием ориентации. Растения могли использовать колебания оси планеты как фактор, предположительно влияющий на динамику статолитов. Статолиты водорослей и грибов, несмотря на их различный состав, по-видимому, могли функционировать по тому же универсальному принципу, что и у высших растений. Всем им важно выполнять восприятие ориентации, и у всех мог бы работать общий механизм.

Роль изменений ориентации оси вращения Земли для ориентации растений. Из геофизических и астрономических исследований известно, что ось вращения Земли претерпевает изменения в своей ориентации. Для вращения и ориентации Земли характерны неравномерные движения. Среди них — полярные движения, т.е. колебание оси вращения Земли вокруг оси её фигуры, и колебания оси вращения Земли (нута́ции). Происхождение нутаций связано со многими факторами, включая, в частности, внешние гравитационные моменты в отношении Земли, создаваемые Луной, Солнцем и в меньшей степени — планетами. Эти эффекты вызывают обмен угловым моментом между ре-

зервуарами орбитального и вращательного движений [27, 28].

Земля примерно имеет форму эллипсоида, сплюсненного на полюсах; сплюснутость Земли, в свою очередь, контролирует, помимо астрономической прецессии-нута́ции, также нута́ционные и колебательные движения, проявляющиеся как внутренние вращательные нормальные моды, присущие системе Земли [29–31].

Изменения ориентации земной оси в космосе связаны также с существованием внутри Земли покачивающегося твёрдого внутреннего ядра. На ориентацию оси влияют различные процессы, включая массовую циркуляцию атмосферы и океана, мантийную конвекцию, механизмы связи на границах раздела жидкого внешнего ядра и твёрдого внутреннего ядра, резонансные эффекты структур нута́ции свободного ядра и т.д. [32]. Из-за всего этого объединённые силы, действующие на Землю, производят постоянные небольшие изменения как в ориентации оси вращения Земли, так и в скорости её вращения.

Изучение движений Земли внесло большой вклад в геофизику и астрономию, но растения, вероятно, также «знают», как извлечь из них пользу. И они могли сделать это, используя предложенный механизм.

Планетарный механизм как инициатор восприятия растением своей ориентации. Предлагается теория, согласно которой при переориентации растения, т.е. при изменении его положения относительно вектора силы тяжести, статолиты ударяются о мембрану/стенку статоцита. Столкновение статолитов со стенкой возникает из-за механизма, функционирование которого зависит от Земли как планеты, движущейся в соответствии с её гравитационными взаимодействиями, а также от инерционного движения статолитов в цитоплазматической жидкости. Регулярные и нерегулярные движения планеты являются основной причиной инерционных движений статолитов, бомбардирующих мембрану/стенку статоцита как только растение меняет своё положение, т.е. ориентацию в пространстве. Стенки статоцитов движутся вместе с планетой Земля, а статолиты, находясь в цитоплазматической жидкости, обладают способностью, перемещаясь по инерции, сохранять то направление движения, которое планета имела в предыдущий момент. В отличие от статолитов клеточные стенки, как и всё растение, перемещаются в пространстве вместе с планетой в строгом соответствии с текущим движением Земли. Т.е. статолиты должны какое-то время двигаться по инерции в цитоплазматической жидкости независимо от движения статоцита в

целом. Эта относительная независимость движений клеточной стенки и статолита неизбежно приводит к столкновению статолитов с каким-либо сектором стенки. Какой именно сектор подвергнется бомбардировке статолитами, зависит от угла наклона статолита, как части органа растения, относительно вертикали.

Таким образом, предлагаемый механизм, который можно обозначить как планетарный механизм, функционирует за счёт инерционных движений частиц, которые генерируются движениями Земли в космическом пространстве. Этот механизм был бы невозможен, если бы движение Земли было строго равномерным. Биофизический стимул в виде бомбардировки стенки статолита любыми статолитами независимо от их химической природы служит первопричиной «перцепции ориентации». Столкновения вызывают активацию ионных каналов механочувствительной мембраны, что приводит к локальному проникновению ионов кальция в статолиты, а также к локальному высвобождению переносчиков ауксина и других факторов, «отслаивающихся» от мембраны и участвующих в последующем гравитропном росте. Успешному процессу перцепции способствует увеличение массы статолитов, поэтому они наполнены крахмалом у высших растений и сульфатом бария — у водорослей.

В экспериментах можно было бы заменить амилопласты в статолите инертными частицами и получить предположительно такой же результат в тесте на накопление ионов кальция после переориентации. Принудительное растворение искусственных статолитов сразу после акта перцепции ориентации не должно препятствовать последующему гравитропному росту. Это показало бы, что статолиты играют ключевую роль в первом акте, а не в последующих актах гравитропизма. Наблюдаемое осаждение статолитов — простой побочный эффект их присутствия в клетке. Что касается броуновского движения и других обычных помех, они не могут противостоять эффекту, вызванному движениями планеты.

Что касается сектора статолита, в который ударили статолиты, то он в дальнейшем служит источником позиционной информации, т.е. его топография играет роль так называемой уставки. Именно в этом секторе инициируется мгновенный ответ в виде локального появления ионов кальция, проходящих через активированные механочувствительные каналы мембраны. Затем, т.е. после акта перцепции ориентации, развивается каскад сигнальных событий, в котором асимметричное распределение ауксина играет центральную роль, столетие назад предусмотренное теорией Cholodny–Went [9, 33, 34].

Скачкообразные движения статолитов, инициированные цитоскелетом, по-видимому, важны для их участия в планетарном механизме. Эволюционное приобретение тяжёлых амилопластов могло просто улучшить способность растений к зависимой от ударов перцепции ориентации, которая у них могла быть ещё до возникновения специализированных статолитов. Кстати, в клетках, чувствительных к гравитации, скачки наблюдаются не только в поведении амилопластов, но и других органелл [35, 36]. Выходя на сушу, предки высших цветковых растений, по-видимому, уже использовали статолиты в работе планетарного механизма, но последующий каскад гравитропных процессов ещё не был достаточно эффективным. Это предположение согласуется с наблюдениями, согласно которым амилопласты в корнях папоротников и ликофитов обнаруживают случайную локализацию в клетках корней, и эти организмы демонстрируют медленную, рудиментарную гравитропную реакцию корней [37].

Мгновенная реакция растений с помощью ионов кальция на переориентацию. Было показано, что время предъявления (самый короткий стимул, необходимый для ответа на переориентацию, т.е. на изменение позиции растения относительно вектора силы тяжести) может составлять менее одной секунды, тогда как амилопласту требуется несколько минут, чтобы осесть на дно клетки [24]. Это прямо указывает на то, что приток ионов Ca^{2+} из клеточного окружения в цитоплазму статолитов запускается не образованием осадка, а каким-то другим механизмом, который действует мгновенно, т.е. так же, как и должен работать планетарный механизм. Когда эффекты увеличения концентрации ионов Ca^{2+} в определённых структурах проростков *Arabidopsis* были проанализированы при различных значениях силы тяжести в сочетании с быстрым переключением проростков между гипергравитацией и микрогравитацией (в наземных исследованиях и в параболических полётах), оказалось, что проростки обладают очень быстрым механизмом восприятия, который линейно преобразует широкий диапазон гравитационных изменений (0,5–2 g) в сигналы Ca^{2+} в субсекундном масштабе времени [38, 39]. В таких условиях способность статолитов по инерции перемещаться в цитоплазматической жидкости относительно стенки/мембраны статолита могла проявляться в полной мере. Предложенный механизм может работать как на земле, так и в космосе, но искусственное изменение веса должно повлиять на последующие стадии гравитропизма растений.

Обнаружение верха и низа у растений выполняется только после перцепции ориентации. Вос-

приятие растением своей ориентации создаёт ключевую предпосылку для последующих событий гравитропизма. На этой стадии активируются механочувствительные ионные каналы из-за столкновений мембраны со статолитами. Активированные ионные каналы, пропускающие ионы, способны регулировать осмотическое давление [40]. Повышение осмотического давления в статоцитах и окружающей ткани, возникающее после акта перцепции ориентации, приводит к локальному накоплению жидкости с факторами роста (переносчиками PIN, ауксином и др.). Затем эта жидкость стекает вниз, и только теперь гравитация Земли оказывается важной для гравитропизма растений. Только на этом этапе корень «узнаёт», где находится «низ», а ствол получает информацию о «верхе».

Высвобождение ионов в ответ на переориентацию растений задокументировано как самое раннее и кратковременное повышение концентрации ионов Ca^{2+} , за которым следуют другие события [39]. Механочувствительная плазматическая мембрана статоцитов армирована переносчиками ауксина, организованными в кластеры [33]. Вероятно, помимо кальциевого ответа статоцитов, PIN и некоторые другие факторы могут локально высвобождаться из мембраны в ответ на её бомбардировку статолитами. Таким образом, биофизический процесс столкновения статолитов с мембраной/стенкой запускает все последующие биохимические и клеточные события гравитропизма.

Среда микрогравитации даёт возможность свести на нет любое давление, прикладываемое статолитами, однако физического контакта статолитов с мембраной в условиях микрогравитации достаточно для генерации высвобождения ионов кальция [21]. Хотя планетарный механизм может функционировать в условиях микрогравитации, нисходящий поток факторов роста, высвобождаемых после воздействия статолитов, может быть затруднён, и поэтому конечный результат может быть изменён. Однако статолиты, перемещающиеся в цитоплазматической жидкости по инерции, даже в условиях микрогравитации обладают способностью ударять в мембрану/стенку статоцитов; это всегда происходит, когда ориентация растения меняется по сравнению с предыдущим положением. Сила инерции пропорциональна массе тела, поэтому, например амилопласты, богатые крахмалом, более эффективны, чем более лёгкие, не содержащие крахмала, амилопласты мутантов.

Таким образом, инициирующим событием в восприятии ориентации не только в царстве растений, но и у грибов является механическое напряжение, оказываемое воздействиемстато-

литов на клеточную стенку вследствие работы планетарного механизма. Гравитропный рост — процесс вторичный по отношению к восприятию ориентации. Согласно предлагаемой теории гравитропизма растений, статолиты не играют той роли, которую им приписывали последние сто лет. Восстановление растением нарушенной ориентации достигается только за счёт движений Земли, заставляющих статолиты бомбардировать стенки статоцитов. Здесь отрицается значение веса осадка амилопластов в активации мембраны, также отрицается значение положения осевшего осадка как инициатора гравитропизма. Без столкновений статолитов с клеточной стенкой, обеспечиваемых планетой, гравитропизм растений был бы невозможен из-за помех, перекрывающих слабый сигнал.

Шумы при гравитропизме растений. Внутриклеточная активность (шум) затрудняет идентификацию первичного гравитационного сигнала [13, 41]. В поисках ответа на самый сложный вопрос о гравитропизме растений, т.е. как слабый сигнал мог бы быть обнаружен, дискриминирован и усилен в естественном шумном окружении, предполагали, что сам шум может играть некоторую роль в восприятии слабых сигналов при возможном участии электрических процессов, стохастического резонанса и др. [13]. Известно, что нормальные флуктуации напряжения покоя мембраны намного больше, чем может вызвать осадок статолитов [42]. Staves [11] сформулировал вопрос, применимый к большинству теорий растительного гравитропизма, включая и доминирующую теорию крахмальных статолитов: возможно ли, чтобы небольшое векторное давление, вызванное гравитацией, воспринималось на фоне гораздо большего тургорного давления (отношение сигнала к шуму примерно $1 : 10^5$)? Предлагаемый здесь ответ на этот вопрос состоит в том, что растения с помощью Земли и статолитов могут преодолевать все обычные помехи: от броуновского движения до осмотического давления.

Однако одного этого недостаточно. Что ещё растения должны были сделать в эволюции, чтобы избавиться от любых помех, связанных с первой стадией гравитропизма? Самый простой и эффективный метод устранения влияния всех препон — это снижение порога чувствительности к ним. Поэтому механизм восприятия был оставлен чувствительным лишь к физическому стимулу более сильному, чем все обычные шумы, и это решило проблему.

Закон синуса и гравитропизм растений. Как установил в 19 веке Sachs [43], стебель растения, помещённый, например, горизонтально, демонстрирует наиболее сильный ответ в виде изгиба.

Ответ постепенно уменьшается по мере приближения оси стебля к вертикали [43, 44]. Это наблюдение известно как так называемый «закон синуса», согласно которому гравитропный отклик изменяется линейно с синусом угла наклона между осью органа растения и вертикалью. Например, гравитропная реакция колеоптилей кукурузы и риса во время ранней, но значительной части формирования кривизны напрямую связана с начальным углом стимуляции, т.е. реакция побега, наклонённого под углом от вертикали, меняется линейно с изменением синуса угла наклона [45]. Также было показано, что изменение ориентации проростков *Arabidopsis* относительно вектора силы тяжести (наклон образцов) может увеличивать их цитоплазматические концентрации кальция [46, 39]. Существование этого эффекта со столетней историей [44, 16], несомненно, нуждается в объяснении.

На основе позиционной информации, полученной во время удара статолитов по мембране, органы растения развиваются под определёнными углами в соответствии с заданными гравитропными углами [47]. Такой метод позволяет органам растений реагировать на небольшие отклонения от вертикали, и это альтернативно гипотезе, рассматривавшей позицию амилопластного осадка как датчика угла наклона [18].

Белковые факторы, например PIN, которые потенциально могут отсоединяться от мембраны и высвобождаться из неё, когда статолиты ударяют в стенку, должны, по-видимому, локализоваться в статочитах неравномерно. Известно, что белки PIN опосредуют асимметричное распределение ауксина в тканях [33]. Локализация PIN в удлинённых статочитах ствола могла бы в эволюции способствовать вертикальному росту. Предположим, что PIN в стебле локализуется преимущественно на торцах клеток цилиндрической формы. При вертикальном росте стебля статолиты в его цилиндрических статочитах, двигаясь по инерции в плоскости вращения Земли, будут сталкиваться в основном с боковыми стенками, относительно свободными от PIN. Увеличение угла отклонения стебля от вектора силы тяжести, по-видимому, должно увеличивать количество белков PIN, которые «отслаиваются» от сектора мембраны, бомбардируемого статолитами. В соответствии с этим гравитропный отклик стебля будет линейно меняться в соответствии с синусом угла наклона растения, и самый сильный отклик в виде наибольшего изгиба, как и наблюдал Sachs [43], окажется, если стебель положить горизонтально.

Растения на дежурстве своей ориентации. Инициирование гравитропизма планетарным механизмом позволяет растениям быть относи-

тельно независимыми от их переориентации, вызванной различными факторами. Корень, встречаясь с камнем в почве и меняя направление роста, вынужден заново определять, где находятся верх и низ. Растения также преодолевают дестабилизирующие эффекты роста при удлинении и сгибании под действием собственного веса. При этом важна динамика статолитов и направление их ударов в клеточную стенку, задающее угол гравитропной уставки. Статолиты не должны лежать в виде осадка, и здесь им на помощь приходит цитоскелет. Известно, что большинство амилопластов постоянно демонстрируют динамические скачкообразные движения в статочитах стеблей высших растений [6, 35, 48]. Нити актина способны принудительно встряхивать статолиты, чтобы они не лежали бесполезным грузом. Только суспендированные в жидкости статолиты могут использоваться в планетарном механизме для восприятия растением его ориентации. По-видимому, именно по этой причине скачкообразные движения статолитов, иначе кажущиеся загадочными, поддерживаются в статочитах.

Аномально толстые пучки актина, окружающие амилопласты, мешают гравитропизму, тогда как разрушение таких пучков восстанавливает и скачкообразную динамику амилопластов, и нормальный гравитропизм [8, 36, 49, 50]. В клетках, которые отвечают за перцепцию ориентации, например в статочитах корневого чехлика, ядро прикреплено актиновыми филаментами к периферии клетки близко к плазматической мембране [51]. Такая адаптация освобождает пространство для беспрепятственного движения статолитов в цитоплазме, что благоприятно для работы планетарного механизма.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Для Земли характерно колебание оси вращения планеты вокруг оси фигуры, а также колебания оси вращения планеты (нутации). Постоянные небольшие изменения ориентации оси вращения Земли не могут не влиять на физиологию её обитателей. Возможные эффекты, связанные с этим, не ограничиваются растениями и грибами. Процессы, в которых движения планет и, соответственно, планетарный механизм могут влиять на организм, также могут быть важны для животных, которые могли использовать этот механизм в своих специфических структурах, которые отличаются от структур растений. У животных порог возможной чувствительности к непрерывным изменениям ориентации земной оси должен был быть эволюционно скор-

ректирован, чтобы не мешать нормальному поведению. Планетарный механизм может влиять на их развитие, биоритмы и другие виды деятельности, и это фактически даёт начало новой области исследований, но анализ соответствующего направления выходит за рамки настоящего сообщения.

Гравитропизм растений, старая и фундаментальная биологическая проблема, остаётся не вполне объяснённой, несмотря на более чем 200-летнюю историю изучения [21, 52]. В работе сформулировано положение, согласно которому статолиты, чувствительные клетки растений, используют изменения ориентации оси вращения Земли для инициации процесса гравитропизма. С помощью статолитов и планетарного механизма растения получают возможность использовать энергию движений планеты для генерации сигнала, запускающего перцепцию ориентации растительных органов в простран-

стве. Применение растениями предлагаемого механизма позволяет обойти проблему обнаружения слабого сигнала на фоне таких помех, как броуновское движение и тургор. Без рассмотренной в этой работе процедуры события гравитропизма в мире растений и грибов были бы невозможны. Может ли предложенная концепция принести практическую пользу в растениеводстве или она послужит только расширению чистого знания в биологии? Будущее ответит на этот вопрос.

Конфликт интересов. Автор заявляет об отсутствии конфликта интересов в финансовой или иной сфере.

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

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Darwin, C., and Darwin, F. (1880) *The Power of Movement in Plants*, John Murray, London.
2. Haberlandt, G. (1914) *Physiological plant anatomy*, Macmillan and Company.
3. Sack, F. D. (1991) Plant gravity sensing, *Int. Rev. Cytol.*, **127**, 193-252.
4. Kiss J. Z. (2000) Mechanisms of the early phases of plant gravitropism, *Crit. Rev. Plant Sci.*, **19**, 551-573, doi: 10.1080/07352680091139295.
5. Nakamura, M., Nishimura, T., and Morita, M. T. (2019) Gravity sensing and signal conversion in plant gravitropism, *J. Exp. Botany*, **70**, 3495-3506, doi: 10.1093/jxb/erz158.
6. Abe, Y., Meguriya, K., Matsuzaki, T., Sugiyama, T., Yoshikawa, H. Y., et al. (2020) Micromanipulation of amyloplasts with optical tweezers in *Arabidopsis* stems, *Plant Biotechnol.*, **37**, 405-415, doi: 10.5511/plantbiotechnology.20.1201a.
7. Fukaki, H., Wsocka-Diller, J., Kato, T., Fujisawa, H., Benfey, P. N., and Tasaka, M. (1998) Genetic evidence that the endodermis is essential for shoot gravitropism in *Arabidopsis thaliana*, *Plant J.*, **14**, 425-430.
8. Takahashi, K., Takahashi, H., Furuichi, T., Toyota, M., Furutani-Seiki, M., et al. (2021) Gravity sensing in plant and animal cells, *NPJ Microgravity*, **7**, 2, doi: 10.1038/s41526-020-00130-8.
9. Muthert, L., Izzo, L. G., van Zanten, M., and Aronne, G. (2020) Root tropisms: investigations on earth and in space to unravel plant growth direction, *Front. Plant Sci.*, **10**, 1807, doi: 10.3389/fpls.2019.01807.
10. Morita, M. T., and Tasaka, M. (2004) Gravity sensing and signaling, *Curr. Opin. Plant Biol.*, **7**, 712-718, doi: 10.1016/j.pbi.2004.09.001.
11. Staves M. P. (1997) Cytoplasmic streaming and gravity sensing in *Chara* internodal cells, *Planta*, **203** (Suppl 1), S79-S84, doi: 10.1007/pl00008119.
12. Perbal, G., and Perbal, P. (1976) Geoperception in the lentil root cap, *Physiol. Plant.*, **37**, 42-48.
13. Kondrachuk, A. V. (2001) Theoretical considerations of plant gravisensing. Advances in space research: the official journal of the Committee on Space Research (COSPAR), **27**, 907-914, doi: 10.1016/s0273-1177(01)00187-9.
14. Tatsumi, H., Furuichi, T., Nakano, M., Toyota, M., Hayakawa, K., et al. (2014) Mechanosensitive channels are activated by stress in the actin stress fibres, and could be involved in gravity sensing in plants, *Plant Biol. (Stuttgart)*, **16** (Suppl. 1), 18-22, doi: 10.1111/plb.12095.
15. Guharay, F., and Sachs, F. (1984) Stretch-activated single ion channel currents in tissue-cultured embryonic chick skeletal muscle, *J. Physiol.*, **352**, 685.
16. Leverrier, N., Pouliquen, O., and Forterre, Y. (2021) An integrative model of plant gravitropism linking statoliths position and auxin transport, *Front. Plant Sci.*, **12**, 651928, doi: 10.3389/fpls.2021.651928.
17. Chauvet, H., Pouliquen, O., Forterre, Y., Legué, V., and Moulia, B. (2016) Inclination not force is sensed by plants during shoot gravitropism, *Sci. Rep.*, **6**, 35431, doi: 10.1038/srep35431.
18. Pouliquen, O., Forterre, Y., Bérut, A., Chauvet, H., Bizet, F., et al. (2017) A new scenario for gravity detection in plants: the position sensor hypothesis, *Phys. Biol.*, **14**, 035005, doi: 10.1088/1478-3975/aa6876.
19. Bérut, A., Chauvet, H., Legué, V., Moulia, B., Pouliquen, O., and Forterre, Y. (2018) Gravisensors in plant cells behave like an active granular liquid, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **115**, 5123, doi: 10.1073/pnas.1801895115.
20. Perbal, G., and Driss-Ecole, D. (2003) Mechanotransduction in gravisensing cells, *Trends Plant Sci.*, **8**, 498-504, doi: 10.1016/j.tplants.2003.09.005.
21. Richter, P., Strauch, S. M., and Lebert, M. (2019) Disproof of the starch-amyloplast hypothesis? *Trends Plant Sci.*, **24**, 291-293, doi: 10.1016/j.tplants.2019.02.008.
22. Häder, D. P., Braun, M., Grimm, D., and Hemmersbach, R. (2017) Gravisensors in eukaryotes-a

- comparison of case studies on the cellular level, *NPJ Microgravity*, **3**, 13, doi: 10.1038/s41526-017-0018-8.
23. Limbach, C., Hauslage, J., Schäfer, C. and Braun, M. (2005) How to activate a plant gravireceptor. Early mechanisms of gravity sensing studied in characean rhizoids during parabolic flights, *Plant Physiol.*, **139**, 1030-1040, doi: 10.1104/pp.105.068106.
 24. Meroz, Y., and Bastien, R. (2014) Stochastic processes in gravitropism, *Front. Plant Sci.*, **5**, 674, doi: 10.3389/fpls.2014.00674.
 25. Morita, M. T. (2010) Directional gravity sensing in gravitropism, *Annu. Rev. Plant Biol.*, **61**, 705-720, doi: 10.1146/annurev.arplant.043008.092042.
 26. Caspar, T., and Pickard, B. G. (1989) Gravitropism in a starchless mutant of *Arabidopsis*: implications for the starch-statolith theory of gravity sensing, *Planta*, **177**, 185-197.
 27. Dehant, V., Laguerre, R., Rekier, J., Rivoldini, A., Triana, S. A., et al. (2017) Understanding the effects of the core on the nutation of the Earth, *Geodesy Geodynamics*, **8**, 389-395.
 28. Zajdel, R., Sośnica, K., Bury, G., Dach, R., Prange, L., and Kazmierski, K. (2021) Sub-daily polar motion from GPS, GLONASS, and Galileo, *J. Geodesy*, **95**, 1-27.
 29. Dehant, V., Triana, S. A., Rekier, J., Trinh, A., Zhu, P., et al. (2020) Progress in understanding nutations, Astrometry, Earth Rotation, and Reference Systems in the GAIA era, 233-236, URL: https://scholar.google.ru/scholar?hl=en&as_sdt=0%2C5&q=2020+Progress+in+understanding+nutations+dehant&btnG=.
 30. Dehant, V., and Mathews, P. M. (2015) *Precession, Nutation, and Wobble of the Earth*, Cambridge University Press, 536 p.
 31. Chao, B. F. (2017) Dynamics of the inner core wobble under mantle-inner core gravitational interactions, *J. Geophys. Res. Solid Earth*, **122**, 7437-7448, doi: 10.1002/2017JB014405.
 32. Zhu, P., Triana, S. A., Rekier, J., Trinh, A., and Dehant, V. (2021) Quantification of corrections for the main lunisolar nutation components and analysis of the free core nutation from VLBI-observed nutation residuals, *J. Geodesy*, **95**, 1-15.
 33. Konstantinova, N., Korbei, B., and Luschig, C. (2021) Auxin and root gravitropism: addressing basic cellular processes by exploiting a defined growth response, *Int. J. Mol. Sci.*, **22**, 2749, doi: 10.3390/ijms22052749.
 34. Jiao, Z., Du, H., Chen, S., Huang, W., and Ge, L. (2021) LAZY gene family in plant gravitropism, *Front. Plant Sci.*, **11**, 606241, doi: 10.3389/fpls.2020.606241.
 35. Sack, F. D., Suyemoto, M. M., and Leopold, A. C. (1986) Amyloplast sedimentation and organelle saltation in living corn columella cells, *Am. J. Bot.*, **73**, 1692-1698.
 36. Nakamura, M., Toyota, M., Tasaka, M., and Morita, M. T. (2015) Live cell imaging of cytoskeletal and organelle dynamics in gravity-sensing cells in plant gravitropism, *Methods Mol. Biol.*, **1309**, 57-69, doi: 10.1007/978-1-4939-2697-8_6.
 37. Zhang, Y., Xiao, G., Wang, X., Zhang, X., and Friml, J. (2019) Evolution of fast root gravitropism in seed plants, *Nat. Commun.*, **10**, 3480, doi: 10.1038/s41467-019-11471-8.
 38. Toyota, M., Furuichi, T., Sokabe, M., and Tatsumi, H. (2013) Analyses of a gravistimulation-specific Ca^{2+} signature in *Arabidopsis* using parabolic flights, *Plant Physiol.*, **163**, 543-554, doi: 10.1104/pp.113.223313.
 39. Nakano, M., Furuichi, T., Sokabe, M., Iida, H., and Tatsumi, H. (2021) The gravistimulation-induced very slow Ca^{2+} increase in *Arabidopsis* seedlings requires MCA1, a Ca^{2+} -permeable mechanosensitive channel, *Sci. Rep.*, **11**, 227, doi: 10.1038/s41598-020-80733-z.
 40. Oikawa, T., Ishimaru, Y., Munemasa, S., Takeuchi, Y., Washiyama, K., et al. (2018) Ion channels regulate nyctinastic leaf opening in *Samanea saman*, *Curr. Biol.*, **28**, 2230-2238.e7, doi: 10.1016/j.cub.2018.05.042.
 41. Hasenstein, K. H. (2009) Plant responses to gravity-insights and extrapolations from ground studies, *Gravitational Space Res.*, **22** (Issue 2), URL: <https://go.gale.com/ps/i.do?p=AONE&u=anon~babadflb&id=GALEJ348311756&v=2.1&it=r&sid=googleScholar&asid=b061b220>.
 42. Wolfe, J., and Steponkus, P. L. (1981) The stress-strain relation of the plasma membrane of isolated plant protoplasts, *Biochim. Biophys. Acta*, **643**, 663-668.
 43. Sachs, J. (1887) *Lectures on the Physiology of Plants*, Clarendon Press, Oxford, doi: 10.5962/bhl.title.54852.
 44. Dumais, J. (2013) Beyond the sine law of plant gravitropism, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **110**, 391-392.
 45. Iino, M., Tarui, Y., and Uematsu, C. (1996) Gravitropism of maize and rice coleoptiles: dependence on the stimulation angle, *Plant Cell Environ.*, **19**, 1160-1168.
 46. Toyota, M., Furuichi, T., Tatsumi, H., and Sokabe, M. (2008) Cytoplasmic calcium increases in response to changes in the gravity vector in hypocotyls and petioles of *Arabidopsis* seedlings, *Plant Physiol.*, **146**, 505-514, doi: 10.1104/pp.107.106450.
 47. Digby, J., and Firn, R. D. (1995) The gravitropic set-point angle (GSA): the identification of an important developmentally controlled variable governing plant architecture, *Plant Cell Environ.*, **18**, 1434-1440, doi: 10.1111/j.1365-3040.1995.tb00205.x.
 48. Saito, C., Morita, M. T., Kato, T., and Tasaka, M. (2005) Amyloplasts and vacuolar membrane dynamics in the living graviperceptive cell of the *Arabidopsis* inflorescence stem, *Plant Cell*, **17**, 548-558, doi: 10.1105/tpc.104.026138.
 49. Nakamura, M., Toyota, M., Tasaka, M., and Morita, M. T. (2011) An *Arabidopsis* E3 ligase, SHOOT GRAVITROPISM9, modulates the interaction between statoliths and F-actin in gravity sensing, *Plant Cell*, **23**, 1830-1848.
 50. Zou, J. J., Zheng, Z. Y., Xue, S., Li, H. H., Wang, Y. R., and Le, J. (2016) The role of *Arabidopsis* Actin-Related Protein 3 in amyloplast sedimentation and polar auxin transport in root gravitropism, *J. Exp. Botany*, **67**, 5325-5337, doi: 10.1093/jxb/erw294.
 51. Baluska, F., Kreibbaum, A., Vitha, S., Parker, J. S., Barlow, P. W., and Sievers, A. (1997) Central root cap cells are depleted of endoplasmic microtubules and actin microfilament bundles: implications for their role as gravity-sensing statocytes, *Protoplasma*, **196**, 212-223, doi: 10.1007/BF01279569.
 52. Knight, T. A. (1806) On the direction of the radicle and germin during the vegetation of seeds, *Philos. Trans. R. Soc. Lond.*, **96**, 108-120.

ROLE OF THE EARTH'S MOTIONS IN PLANT ORIENTATION – PLANETARY MECHANISM

Review

A. M. Olovnikov

*Emanuel Institute of Biochemical Physics of Russian Academy of Sciences,
119334 Moscow, Russia; E-mail: olovnikov@gmail.com*

According to the proposed theory, the starch-rich particles (statoliths) help the plant to convert the signals from Earth's motions into the signals necessary for the plant to perceive its orientation relative to the gravity vector while moving freely because of inertia in the sensory cells (statocytes) of roots and stems. Motions of the Earth are never constant, which, in particular, refers to the so-called polar motions and oscillations of the planet's rotation axis. Statoliths at any given moment move in the cytoplasmic liquid of statocytes due to inertial motion initiated by the action of the Earth's movements, maintaining the trajectory set by the previous movement of the oscillating planet. Unlike statoliths, the walls of a statocyte move in space along with the entire plant and with the Earth, in strict accordance with the current direction of motion of the planet's axis. This leads to the inevitable collision of statoliths with the statocytic wall/membrane. Cytoplasmic liquid, as a substance that is not able to maintain its shape, does not interfere with the inertial motions of the statoliths and collision with the wall of the statocyte. By striking the membrane, statoliths cause the release of ions and other factors at the impact site, which further participate in the gravitropic process. Pressure of the sediment of statoliths at the bottom of the statocyte, as well as position of this sediment, are not the defining factors of gravitropism.

Keywords: plant gravitropism, perception of orientation, reorientation, sine law, statocytes, statoliths, gravisensing, the Earth's movements

ПАРАМЕТРЫ МИКРООКРУЖЕНИЯ ОПУХОЛИ ОПРЕДЕЛЯЮТ ЭФФЕКТИВНОСТЬ АНТИ-PD-1/PD-L1-ТЕРАПИИ

Обзор

© 2021 Л.А. Таширева*, Д.Т. Муравьева, Н.О. Попова,
В.Е. Гольдберг, С.В. Вторушин, В.М. Перельмутер

Томский национальный исследовательский медицинский центр РАН, НИИ онкологии,
634050 Томск, Россия; электронная почта: tashireva@oncology.tomsk.ru

Поступила в редакцию 21.06.2021

После доработки 13.10.2021

Принята к публикации 13.10.2021

Безусловно, одним из самым перспективных подходов к лечению онкологических заболеваний является создание патогенетически обоснованных терапевтических препаратов. На вопрос о том, что выбрать в качестве мишени для воздействия пытаются ответить исследователи всего мира и в целом довольно успешно. Удостоенное Нобелевской премии открытие механизмов регуляции активности клеток иммунной системы посредством молекул контрольных точек, а также обнаружение способности клеток опухоли использовать данные механизмы для подавления иммунных реакций стало толчком для развития современной иммунотерапии, и теперь в рутинную практику химиотерапевтов входят такие препараты, как ингибиторы иммунных контрольных точек, в частности, PD-1/PD-L1. Однако применение подобных препаратов позволяет продлить жизнь пациента, но, к сожалению, не излечить заболевание вовсе. Определенный вклад в это вносит гетерогенность опухолевых клеток и клеток микроокружения, но основные причины могут крыться в сложных взаимоотношениях опухоли и микроокружения, которые подчас настолько пластичны, что могут меняться, подстраиваясь под вновь возникающие условия. Основной характеристикой микроокружения опухоли является тип протекающей иммуновоспалительной реакции (ИВР), а поскольку ингибиторы иммунных контрольных точек воздействуют на клетки, формирующие ИВР, очевидно, что результаты терапии, в том числе гиперпрогрессия заболевания, могут быть связаны с этим исходным параметром. Представленный обзор раскрывает суть взаимодействия опухоли и её микроокружения в ходе терапии PD-1/PD-L1-ингибиторами.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: PD-1/PD-L1-ингибиторы, микроокружение опухоли, эффективность иммунотерапии, гиперпрогрессия.

DOI: 10.31857/S0320972521110063

ВВЕДЕНИЕ

PD-L1 (B7-H1) и PD-L2 (B7-DC) являются гликопротеинами клеточной поверхности и принадлежат к костимулирующему семейству молекул B7 [1]. Единственным структурным различием между молекулами PD-L1 и PD-L2 является наличие щели в 14 аминокислот в домене IgV PD-L2 [1]. Функциональным различием

является способность PD-L1 в отличие от PD-L2 связываться с CD80 [2].

Конститутивная экспрессия PD-L1 была показана на моноцитах периферической крови и иммунореактивных макрофагах печени, миндалин и лёгких [3]. Позже молекула PD-L1 была обнаружена на поверхности дендритных клеток и клеток эндотелия [4], в частности, эндотелиальных клеток сердца, а также Т-лимфоцитов, В-лимфоцитов, β -клеток поджелудочной железы и глиальных клеток [5]. Экспрессия PD-L2 более характерна для антигенпрезентирующих клеток (активированных макрофагов и дендритных клеток) [6]. При этом стоит отметить, что в тканях некоторых органов (молочная железа, прямая кишка, почки, мочевого пузыря, скелетная мускулатура, лёгкие) в норме экспрессия данных молекул не встречается [3]. В обзоре Singh et al. [7] представлены данные об индукции экспрессии PD-L1 при различных заболе-

Принятые сокращения: ГПЗ – гиперпрогрессия заболевания; ИВР – иммуновоспалительные реакции; ЛПС – липополисахарид; НМРЛ – немелкоклеточный рак лёгкого; РМЖ – рак молочной железы; CTLA-4 – цитотоксический белок 4, ассоциированный с Т-лимфоцитами (cytotoxic T-lymphocyte-associated protein 4); IL – интерлейкин; NF- κ B – ядерный фактор каппа-Би; NK-клетки – естественные (натуральные) киллеры; PD-1 – рецептор программируемой гибели клетки; PD-L1 – лиганд программируемой гибели клетки; TIL – опухоль-инфильтрирующие лимфоциты; TNF- α – фактор некроза опухолей.

* Адресат для корреспонденции.

ваниях, таких как инфаркт миокарда, астма, энцефаломиелит, и инфекциях, вызванных различными патогенами.

Общим рецептором для PD-L1 и PD-L2 является PD-1 (CD279), который относится к семейству молекул CD28, а свои функции реализует за счёт ITIM- и ITSM-мотивов, локализованных в цитоплазматической части молекулы [8]. ITIM-мотив белка PD-1 ингибирует фосфорилирование по тирозину и блокирует проведение сигнала от Т-клеточного рецептора. Ещё одной молекулой из этого семейства является цитотоксический белок 4, ассоциированный с Т-лимфоцитами (CTLA-4), появляющийся на активированных Т-лимфоцитах через 24–48 часов после активации. Молекулы CTLA-4 с высокой аффинностью связывают CD80 и CD86, конкурируя с CD28 (костимулирующим лигандом Т-лимфоцитов). Оба описанных рецептора являются рецепторами «истощения», появляющимися на активированных Т-клетках и подавляющими их ответы [8]. Тем не менее функции путей PD-1/PD-L1 и CTLA-4 в противоопухолевых иммунных ответах в значительной степени различны. CTLA-4 функционирует на ранней стадии Т-клеточного иммунного ответа в основном в лимфатических узлах, тогда как PD-1 функционирует на поздней стадии Т-клеточного иммунного ответа, прежде всего в периферических тканях [9]. В настоящий момент установлено наличие экспрессии PD-1 на активированных Т-лимфоцитах [4], В-клетках, клетках миелоидного ряда [10], NK-клетках (естественные киллеры) [11] и Т-фолликулярных хелперных лимфоцитах [12].

Взаимодействие PD-L1 и PD-L2 с их рецептором PD-1 запускает апоптоз и ингибирует пролиферацию клеток, а также клеточную адгезию, что в конечном итоге приводит к гибели клетки [6]. В опухоли возможна реализация данного физиологического механизма подавления реакции иммунной системы. На сегодняшний день разработаны подходы и терапевтические препараты, направленные на выключение ингибиторной функции PD-L1 и PD-L2 [13], что должно приводить к реактивации иммунного ответа в опухоли.

ЭКСПРЕССИЯ PD-L1 И PD-L2 ПРИ ОПУХОЛЕВОМ ПРОЦЕССЕ

Многие солидные опухоли, включая ренальную карциному, немелкоклеточный рак лёгкого (НМРЛ), карциному яичников, колоректальный рак [14] и меланому [3], экспрессируют PD-L1 и PD-L2. Выраженная экспрессия PD-L2

встречается на опухолевых клетках при некоторых В-клеточных лимфомах, включая первичные медиастинальные и фолликулярные лимфомы, а также лимфому Ходжкина [6]. Стоит отметить, что некоторые исследования показали наличие экспрессии PD-L2 в различных опухолях при отсутствии экспрессии PD-L1. При почечноклеточном раке, меланоме, метастатическом уротелиальном раке и НМРЛ экспрессия PD-L2 коррелировала с экспрессией PD-L1 [6].

Интересной находкой оказалась экспрессия PD-L2 на эндотелиальных клетках внутри опухолевого узла, так как имеется высокий потенциал взаимодействия данного лиганда с PD-1 на Т-лимфоцитах, мигрирующих в опухолевую ткань из сосудистой сети [6]. Стоит отметить, что распределение PD-1⁺ опухоль-инфильтрирующих лимфоцитов (TIL) очень вариабельное и зависит от гистотипа опухоли. Так, например, данные клетки полностью отсутствовали в воспалительном инфильтрате внекостной миксоидной хондросаркомы, а при тройном негативном раке молочной железы (РМЖ), раке мочевого пузыря, толстой кишки, НМРЛ, раке эндометрия и яичника от 70 до 100% лимфоцитов имели фенотип PD-1⁺ [4].

В исследованиях, которые оценивали одновременную экспрессию PD-L1 в опухолевых клетках и PD-1 на TIL, данный феномен наблюдался при раке почки (33%), раке яичника (36%), НМРЛ (43%), тройном негативном РМЖ (45%), дедифференцированных липосарcomaх (50%), раке мочевого пузыря (55%), злокачественной меланоме (58%), раке эндометрия (79%), но редко встречались в других типах рака, например, 5% при раке предстательной железы, 8% при раке печени, 9% при раке поджелудочной железы и 13% при люминальных формах РМЖ [4].

Очевидно, что экспрессировать PD-L1 в ткани опухоли могут не только опухолевые клетки. В некоторых клинических исследованиях экспрессия PD-L1 в инфильтрирующих иммунных клетках была более частой и, как полагают, может являться более сильным предсказательным фактором ответа на лечение, чем экспрессия PD-L1 только на опухолевых клетках [15]. Уровень экспрессии PD-L1 на опухолевых и иммунных клетках не всегда одинаков в разных типах опухолей. Экспрессия PD-L1 на иммунных клетках является показанием для терапии при карциноме молочной железы и уротелиальной карциноме. Напротив, экспрессия PD-L1 на опухолевых клетках является предсказательным фактором ответа при НМРЛ и колоректальной карциноме [16]. Стоит отметить, что пороги экспрессии PD-L1 как на опухолевых, так и на

иммунных клетках варьируют при различных типах рака. Более того, показано, что относительная прогностическая значимость PD-L1 и тип клеток, на которых определяется его экспрессия, в некоторой степени зависит и от назначаемого препарата [16]. В виду всех технических сложностей (различных клонов антител и валидированных платформ) в определении экспрессии PD-L1 его прогностическое значение на клетках опухоли всё же остаётся спорным [10]. Частота объективного ответа при терапии анти-PD-L1-препаратами у пациентов с PD-L1-отрицательными солидными опухолями варьировала от 0 до 33%. Кроме того, частота объективного ответа для пациентов с меланомой, карциномой почки, мочевого пузыря и яичников не показала значительных различий между PD-L1-отрицательными и PD-L1-положительными опухолями [17]. Данные наблюдения могут быть объяснены внутриопухолевой гетерогенностью и динамическим изменением экспрессии PD-L1 как в ходе лечения, так и при прогрессировании рака.

Одним из показаний к назначению терапии ингибиторами иммунных контрольных точек является высокая мутационная нагрузка в опухоли. Косвенно об этом может говорить уровень TIL. В обзоре Teng et al. [18] представлена модель меланомы, в которой опухоли разделены на четыре типа по сочетанию экспрессии PD-L1 и наличию TIL. Авторы полагают, что только Тип I (PD-L1⁺TIL⁺)-опухолей (около 38%) с наибольшей вероятностью будет отвечать на блокаду PD-1/PD-L1. Тип III (PD-L1⁺TIL⁻)-опухолей, несмотря на наличие мишеней для воздействия, демонстрирует устойчивость к терапии ингибиторами иммунных контрольных точек. Но существуют работы, показывающие, что в «холодных» опухолях (не имеющих высоких уровней TIL) терапия оказывается эффективной. Так, Emens et al. [19] продемонстрировали уровень ответа равный 24% у метастатических больных РМЖ с «холодными» опухолями, получавших атезолизумаб.

Это указывает на необходимость учёта молекулярных взаимодействий, выходящих за рамки PD-1/PD-L1 и общей оценки TIL.

ТИП ИММУНОВОСПАЛИТЕЛЬНОЙ РЕАКЦИИ В ОПУХОЛИ

Тип иммунновоспалительной реакции (ИВР), развёртывающейся в опухоли, является результатом многосложных событий, таких как мутационная нагрузка опухоли, инфицированность опухоли патогенами, разрушение опухолевых

клеток и других. В итоге в микроокружении опухоли можно наблюдать широкое разнообразие и различные композиции иммунных клеток, которые и определяют тип ИВР. Известно, что тип ИВР определяет цитокиновый спектр микроокружения опухоли, который может быть более важен, чем возможные клеточные эффекты. Принципиально важно различать два типа ИВР – Th1-подобный и Th2-подобный [20]. Считается, что первый, Th1-подобный тип ИВР, сопряжён с благоприятным течением злокачественного процесса, в то время как второй, Th2-подобный тип ИВР, ассоциирован с неблагоприятным исходом [21].

Исходя из этого, воздействие ингибиторов иммунных контрольных точек на опухоли, в которых протекает Th1-подобный тип ИВР, потенциально может быть эффективным. Так, для метастатической формы РМЖ инфильтрация CD8⁺ Т-лимфоцитами была предсказательным фактором лучшей общей выживаемости при применении атезолизумаба в исследовании IMpassion130 [22]. Однако данные других работ показывают, что CD8⁺ Т-клетки, располагающиеся среди опухолевых клеток многоклеточных структур карциномы, но не стромальные CD8⁺ Т-клетки, являются потенциальным негативным прогностическим признаком, связанным с более короткой выживаемостью без прогрессирования у больных РМЖ [23]. Это может быть сопряжено с тем, что функцию эффекторных цитотоксических лимфоцитов в опухоли могут супрессировать Т-регуляторные лимфоциты. И действительно, существуют факты, что сниженная экспрессия молекулы HLA класса I и снижение количества гранзим В-положительных CD8⁺ Т-клеток наблюдаются в областях опухоли, где совместно локализуются FOXP3⁺ Т-регуляторные лимфоциты и тучные клетки, при этом такие особенности связаны с устойчивостью к лечению анти-PD-1-препаратами [24].

Некоторые авторы считают, что сам факт экспрессии в опухоли PD-L1 является маркером предсуществующего Th1-подобного типа ИВР [25]. Однако для того, чтобы иметь основания рассуждать подобным образом, нужно обратиться к современным знаниям о регуляции экспрессии PD-L1 и PD-L2.

Было обнаружено, что ряд воспалительных цитокинов индуцируют экспрессию PD-L1. Среди этих факторов есть цитокины как Th1-подобного (IFN- γ , TNF- α , IL-10), так и Th2-подобного (IL-27, IL-4) типа ИВР. Также к цитокинам, потенцирующим экспрессию PD-L1, относят IL-17 и IL-2 [26, 27]. В экспериментах *in vitro* экспрессию PD-L1 на В-лимфоцитах индуцирует воздействие anti-IgM, липополисахара-

рида (ЛПС) и anti-CD40, на Т-клетках — стимуляция anti-CD3, на макрофагах — anti-CD40, ЛПС, IFN- γ и гранулоцитарно-макрофагальный колониестимулирующий фактор, на дендритных клетках — anti-CD40, IFN- γ , IL-4 и IL-12 [28]. В отличие от PD-L1, PD-L2 реже экспрессируется на покоеющихся клетках и сложнее индуцируется на Т- и В-лимфоцитах. Для индукции экспрессии PD-L2 на макрофагах используют IL-4 и IFN- γ , а на дендритных клетках — anti-CD40, ЛПС, IFN- γ и гранулоцитарно-макрофагальный колониестимулирующий фактор, IL-4 и IL-12. Известно, что IL-4 индуцирует PD-L2 в большей степени, чем IFN- γ , в то время как IFN- γ , а не IL-4, индуцирует экспрессию PD-L1 на макрофагах [29]. Данное наблюдение может говорить о том, что PD-L1 и PD-L2 по-разному вовлекаются в Th1- и Th2-иммунные ответы.

Описаны механизмы генетической регуляции экспрессии PD-L1. Ген *PD-L1* расположен на коротком плече 9 хромосомы (9p24.1). Показано, что амплификация данной области тесно связана с увеличением уровня экспрессии PD-L1 в широком спектре видов рака [30]. Кроме того, обнаружено, что изменение числа копий гена *PD-L1*, возникающих в различных типах опухолей, непосредственно приводит к повышению экспрессии PD-L1 [31]. Внутриклеточные онкогенные вариации, такие как потеря PTEN и воздействие цитокинов, производных TIL, способствуют усилению экспрессии PD-L1 [32].

Было обнаружено, что ряд транскрипционных факторов регулируют активацию транскрипции гена *PD-L1*. Эти факторы транскрипции включают MYC, STAT3, NF- κ B, AP1. Кроме того, индуцируемый гипоксией фактор 1 α (HIF-1 α) является ещё одним важным фактором, который имеет клиническое значение в регуляции экспрессии PD-L1 в опухолевых клетках [33]. Связывание HIF-1 α с проксимальным промотором *PD-L1* стимулирует транскрипцию *PD-L1*. Таким образом, сверхэкспрессия HIF-1 α вызывает повышение уровней PD-L1 [34].

Таким образом, наличие экспрессии PD-L1 не всегда правомочно использовать в качестве маркера противоопухолевого иммуногенеза. Более того, описанные выше факты дают основания полагать, что терапевтическое ингибирование взаимодействия PD-1/PD-L1 в некоторых случаях может привести к реактивации проопухолевого иммунного ответа, чем можно объяснить не соответствующую ожиданиям эффективность иммунотерапии ингибиторами контрольных точек.

Интересными представляются данные, говорящие о том, что взаимодействие PD-L1 и PD-1

изменяет цитокиновый профиль клеток. Существуют работы, показывающие, что связывание PD-L1 и PD-1 может вызвать экспрессию IL-10 [35]. В других работах отмечается, что взаимодействие PD-L1 и PD-1 сопровождается подавлением экспрессии цитокинов клетками, несущими рецептор PD-1. Так, связывание PD-L1 и PD-1 на активированных CD8⁺ Т-клетках ингибирует секрецию IL-12, IL-10 и IFN- γ [36, 37]. В инфильтрирующих опухоль дендритных клетках активация PD-1 ингибирует индуцированную NF- κ B, продукцию TNF- α и IL-6 [38]. Отличительной функцией PD-L2, но не PD-L1, является прямое активирующее действие на дендритные клетки, что приводит к экспрессии IL-12. Однако одномоментное присутствие на поверхности клетки PD-L1 может нивелировать активирующий эффект PD-L2 из-за конкурентного связывания с рецептором PD-1 [10]. Данные сведения говорят о том, что тип ИВР в опухоли может меняться при реализации механизма ингибирования иммунных контрольных точек.

То же самое может происходить и в ходе самой терапии. Работ, показывающих, каким образом проведение иммунотерапии изменяет репертуар клеток в микроокружении опухоли, не много. Однако у больных метастатическим РМЖ показано, что проведение терапии атезолизумабом приводит к повышению уровня PD-L1-экспрессирующих TIL [19]. На модели ксенотрансплантата, полученного от больного НМРЛ, продемонстрировано, что «дремлющие» TIL могут быть активированы после блокады PD-1 [39]. Имеются данные о том, что в PD-1-негативных НК-клетках или в НК-клетках, предварительно обработанных антителом против PD-1, продукция литических молекул, таких как перфорины и гранзимы, снижается [40]. Более того, есть сведения о том, что PD-1⁺ НК-клетки (а именно они и являются подавленными через экспрессию PD-L1 в опухоли) демонстрируют более слабую базовую способность секретировать INF- γ , гранзим В и перфорин [41]. Также сообщается, что инфильтрирующие опухоль дендритные клетки и моноциты высвобождают цитокин Th2-подобного типа ИВР IL-10 после воздействия анти-PD-1-ингибиторами [42]. Описанные факты являются ещё одним объяснением сниженной эффективности терапии ингибиторами иммунных контрольных точек.

В некоторых работах оценено изменение фенотипического состава лимфоцитов крови в ходе иммунотерапии. Так, существуют работы, в которых оценивалось изменение соотношения фенотипов лимфоцитов в крови больных мета-

статической формой меланомы в ходе терапии PD-L1-ингибиторами. Было показано, что после одного курса лечения происходило увеличение активированных субпопуляций CD4⁺ и CD8⁺ Т-клеток памяти, а также активированных Th1-лимфоцитов и Т-фолликулярных хелперов типа 1. При этом изменения доли В-лимфоцитов, NK-клеток или дендритных клеток выявлено не было [43]. Было обнаружено, что блокада PD-1 смещает индуцированную антигенном клеточную реактивность клеток крови в сторону провоспалительного ответа Th1/Th17, о чём свидетельствует усиленная продукция IFN- γ , IL-2, TNF- α , IL-6 и IL-17 и снижение выработки Th2-цитокинов, таких как IL-5 и IL-13 [44]. Существуют данные о том, что блокада PD-L2 приводит к восстановлению пролиферации Th1-лимфоцитов и секреции IL-2, TNF- α и IFN- γ [45].

Однако даже в условиях присутствия в опухоли Th1-подобной ИВР, терапия ингибиторами PD-1/PD-L1 может быть неэффективна. Приводить к этому может несостоятельность иммунного ответа. Уместно упомянуть работу, в которой показано, что высокая плотность инфильтрирующих опухоль клеток с фенотипом PD-1⁺CD38^{hi}CD8⁺ у пациентов с меланомой связана с устойчивостью к анти-PD-1-терапии. Более того, статус прайминга CD8⁺ Т-лимфоцитов являлся основным фактором терапевтической устойчивости к анти-PD-1-препаратам. Блокада PD-1 в непримированных или субоптимально примированных CD8⁺ Т-лимфоцитах вызывала резистентность за счёт индукции PD-1⁺CD38^{hi}CD8⁺ [46].

Эта информация позволяет предполагать, что при Th2-подобном типе ИВР, как и при «повреждённом» Th1-подобном типе ИВР, можно ожидать отсутствие эффекта от применения ингибиторов иммунных контрольных точек либо гиперпрогрессию заболевания.

ГИПЕРПРОГРЕССИЯ НА ФОНЕ ТЕРАПИИ ИНГИБИТОРАМИ ИММУННЫХ КОНТРОЛЬНЫХ ТОЧЕК

Первым описанным случаем гиперпрогрессии заболевания (ГПЗ) на фоне терапии ингибиторами иммунных контрольных точек стал пример лечения пациента с аденокарциномой лёгких стадии IIb [47]. Champiat et al. [48] впервые показали, что частота встречаемости ГПЗ составляла 9% у пациентов после терапии анти-PD-1/PD-L1 в фазе I клинических испытаний.

Доля случаев с ГПЗ на фоне терапии ингибиторами иммунных контрольных точек в зависимости от используемых алгоритмических методов и типа опухоли колеблется от 4 до 29% (таблица).

Однако частота, критерии определения, факторы риска и механизмы гиперпрогрессии остаются в значительной степени неизвестными. Механизмы, лежащие в основе этого феномена, в настоящее время активно изучаются. Так, в исследовании, включающем 152 пациента с НМРЛ, среди которых 25% имели гиперпрогрессию на фоне иммунотерапии, была продемонстрирована прямая корреляция данного феномена с наличием в опухоли МРО⁺ миело-

Исследования, демонстрирующие случаи гиперпрогрессии заболевания (ГПЗ) на фоне терапии ингибиторами иммунных контрольных точек

Тип опухоли	Число пациентов, включенных в исследование	Используемый ингибитор иммунных контрольных точек	Пациенты, имевшие ГПЗ	Ссылка
НМРЛ	89	ниволумаб	10%	[49]
Преимущественно меланома, НМРЛ, рак почки, толстого кишечника, уротелиальная карцинома	218	монотерапия PD-L1-ингибиторами	9%	[48]
НМРЛ	406	ниволумаб, пембролизумаб, атезолизумаб, дурвалумаб	13,8%	[50]
Меланома, НМРЛ, рак почки, толстого кишечника, уротелиальная карцинома	155	CTLA-4 и PD-L1-ингибиторы	4%	[51]
Плоскоклеточная карцинома головы и шеи	34	PD-(L)1-ингибиторы	29%	[52]
НМРЛ	263	PD-(L)1-ингибиторы	20,9%	[53]

НМРЛ — немелкоклеточный рак лёгкого, CTLA-4 — cytotoxic T-lymphocyte-associated protein 4.

идных клеток и обратная зависимость от уровня экспрессии белка PD-L1 опухолевыми клетками. Кроме того, только у пациентов, демонстрирующих ГПЗ, отмечалось присутствие CD163⁺CD33⁺PD-L1⁺ M2-макрофагов [54], уровень M1-макрофагов при этом не был ассоциирован с ГПЗ.

Kamada et al. [55] наблюдали ГПЗ на фоне иммунотерапии анти-PD-1-антителами у 10% пациентов, страдающих раком желудка. Авторы показали, что PD-1 был гиперэкспрессирован в опухолевых клетках пациентов, у которых развилась ГПЗ на фоне применения ингибиторов иммунных контрольных точек. Исследование популяционного состава иммунного инфильтрата данной группы пациентов показало, что ткань опухоли была обогащена Ki67-положительными Т-регуляторными лимфоцитами. Дальнейшие исследования на мышах показали, что в ходе терапии ингибиторами иммунных контрольных точек количество и активность Т-регуляторных лимфоцитов увеличивается, что усиливает их иммуносупрессорную функцию [55].

Осуществляются попытки идентифицировать маркёры ГПЗ в крови пациентов. Так, было показано, что эффективность терапии на основе блокады PD-1/PD-L1 связана с уровнем циркулирующих высокодифференцированных CD28⁺CD27⁺CD4⁺ Т-клеток (Т-helper differentiated – THD-клетки). Повышение уровня CD28⁺CD4⁺ Т-лимфоцитов в периферической крови в течение первого цикла терапии ингибиторами иммунных контрольных точек является ранним дифференциальным признаком ГПЗ у больных НМРЛ [56].

Kim et al. [57] продемонстрировали, что не только клинические факторы, включая курение, низкую экспрессию PD-L1 и множественные метастазы, но также меньшее количество CD8⁺/PD-1⁺ TIL и большее количество M2-макрофагов в микроокружении опухоли в значительной степени связаны с возникновением ГПЗ у пациентов с распространённым или метастатическим НМРЛ, получавших иммунотерапию.

Как было обнаружено в доклинических исследованиях, иммунотерапия, направленная на PD-1, может стимулировать инфильтрирующие опухоль дендритные клетки к секреции IL-10, активирующего PD-1 через STAT3-путь на дендритных клетках, тем самым создавая порочный круг [42]. Кроме того, ингибирование PD-1 увеличивает экспрессию рецептора IL-10, регулируя опухолеспецифические CD8⁺ Т-клетки в периферической крови пациентов с меланомой [58]. Известно, что IL-10 препятствует презентации антигена и костимулирующим сиг-

налам, что подавляет антигенспецифические Т-клеточные ответы [59, 60].

Известно, что PD-L1 запускает активацию NLRP3 путём репрессии STAT3, который является фактором транскрипции, участвующим в цитотоксичности IFN- γ [61]. У пациентов, несущих мутации во внутрицитоплазматическом домене PD-L1, количество инфламмасом может увеличиваться за счёт активации PD-L1 после секреции IFN- γ в ответ на терапию ингибиторами иммунных контрольных точек, что в конечном итоге приводит к ГПЗ. Интересно, что мутационный анализ, проведённый в опухолях после лечения пембролизумабом, выявил наличие миссенс-мутаций в генах, участвующих в негативной регуляции активации NLRP3 и пути инфламмасы [62].

Описаны эксперименты, демонстрирующие, что ингибирование PD-L1 приводит к появлению регуляторного фенотипа (экспрессии FoxP3) в Th1-лимфоцитах [63].

У некоторых пациентов с меланомой лечение антителом против PD-1 (ниволумабом) увеличивало системные уровни IL-6, что было связано с плохим клиническим ответом. Эта индуцированная блоком PD-L1 гиперэкспрессия IL-6 была воспроизведена на модели мышей с меланомой. Авторы показали, что блокада PD-L1 побуждает PD-1⁺-макрофаги продуцировать IL-6 в микроокружении опухоли [64].

Совсем незначительное внимание уделяется прогностической значимости роли лимфоцитов врождённой иммунной системы, в то время как частота встречаемости данной популяции лимфоцитов достигает 80%, а доля от остальных лимфоцитов – 5–40%. При этом есть данные о том, что взаимодействие PD-L1 и PD-1 между ILC2s и CD4⁺ Т-лимфоцитами не приводит к ингибированию Т-клеточного ответа, но PD-L1-экспрессирующие ILC2s стимулируют повышение экспрессии GATA3 и продукцию IL-13 Th2-лимфоцитами [65]. Продemonстрировано увеличение субпопуляции ILC3s после иммунотерапии против PD-1 [62].

Всё описанное может являться причиной случаев гиперпрогрессии заболевания на фоне терапии ингибиторами иммунных контрольных точек, когда снятие ингибирующего влияния PD-L1 приводит к реактивации проопухолевых свойств микроокружения, а именно стимулирует развитие ИВР Th2-подобного типа.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Выделяют четыре варианта исхода иммунотерапии, доля каждого из которых равна око-

ло 25%: клинический ответ, стабилизация заболевания, прогрессия и ГПЗ. Данный факт свидетельствует о необходимости проводить тщательный поиск дополнительных критериев для назначения терапии, а впоследствии — скрининг для выявления когорты пациентов, для кого анти-PD-1/PD-L1-терапия окажется наиболее эффективной. ГПЗ на фоне терапии является неожиданным феноменом в эпоху бурного развития иммунотерапии. Появляется всё больше ретроспективных свидетельств того, что это связано с параметрами микроокружения. Несомненно, что микроокружение опухоли, формируемое различными субпопуляциями Т-клеток, играет сложную роль в развитии опухоли и её ответе на терапию. Эффективность или неэффективность терапии ингибиторами иммунных контрольных точек можно объяснить с позиций знаний о предсуществующих в микроокружении опухоли типов ИВР. Возможны два основных гипотетических варианта соотношения экспрессии PD-L1 и типа ИВР. Первый, когда экспрессия PD-L1 сопряжена с ИВР Th1-подобного типа. В данной ситуации разумно ожидать благоприятный исход терапии. Второй ва-

риант — это сочетание экспрессии PD-L1 с ИВР Th2-подобного типа. Данный сценарий является потенциально неблагоприятным, поскольку снятие ингибирующего эффекта PD-L1 приведёт к активации проопухолевого типа ИВР и неэффективности терапии, а при самом неблагоприятном течении будет наблюдаться ГПЗ.

Усилия по поиску дополнительных маркёров, например признаков предсуществующей ИВР Th2-подобного типа, которые помогут выявить пациентов, имеющих риск гиперпрогрессии после начала терапии ингибиторами иммунных контрольных точек, имеют жизненно важное значение.

Финансирование. Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда (грант № 20-75-10033).

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. Zak, K. M., Grudnik, P., Magiera, K., Dömling, A., Dubin, G., and Holak, T. A. (2017) Structural Biology of the Immune Checkpoint Receptor PD-1 and Its Ligands PD-L1/PD-L2, *Structure*, **25**, 1163-1174, doi: 10.1016/j.str.2017.06.011.
2. Butte, M. J., Keir, M. E., Phamduy, T. B., Sharpe, A. H., and Freeman, G. J. (2007) Programmed death-1 ligand 1 interacts specifically with the B7-1 costimulatory molecule to inhibit T cell responses, *Immunity*, **27**, 111-122, doi: 10.1016/j.immuni.2007.05.016.
3. Dong, H., Strome, S. E., Salomao, D. R., Tamura, H., Hirano, F., et al. (2002) Tumor-associated B7-H1 promotes T-cell apoptosis: a potential mechanism of immune evasion, *Nature medicine*, **8**, 793-800, doi: 10.1038/nm730.
4. Gatalica, Z., Snyder, C., Maney, T., Ghazalpour, A., Holterman, D. A., et al. (2014) Programmed cell death 1 (PD-1) and its ligand (PD-L1) in common cancers and their correlation with molecular cancer type, *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prevention*, **23**, 2965-2970, doi: 10.1158/1055-9965.EPI-14-0654.
5. Bardhan, K., Anagnostou, T., and Boussiotis, V. A. (2016) The PD1:PD-L1/2 pathway from discovery to clinical implementation, *Front. Immunol.*, **7**, 500, doi: 10.3389/fimmu.2016.00550.
6. Yearley, J. H., Gibson, C., Yu, N., Moon, C., Murphy, E., et al. (2017) PD-L2 expression in human tumors: relevance to anti-PD-1 therapy in cancer, *Clin. Cancer Res.*, **23**, 3158-3167, doi: 10.1158/1078-0432.CCR-16-1761.
7. Singh, A.K., Stock, P., Akbari, O. (2011) Role of PD-L1 and PD-L2 in allergic diseases and asthma, *Allergy*, **66**, 155-162.
8. Ghosh, C., Luong, G., and Sun, Y. (2021) A snapshot of the PD-1/PD-L1 pathway, *J. Cancer*, **12**, 2735-2746, doi: 10.7150/jca.57334.
9. Buchbinder, E. I., and Desai, A. (2016) CTLA-4 and PD-1 pathways: similarities, differences, and implications of their inhibition, *Am. J. Clin. Oncol.*, **39**, 98-106, doi: 10.1097/COC.000000000000239.
10. Ghiotto, M., Gauthier, L., Serriari, N., Pastor, S., Truneh, A., et al. (2010) PD-L1 and PD-L2 differ in their molecular mechanisms of interaction with PD-1, *Int. Immunol.*, **22**, 651-660, doi: 10.1093/intimm/dxq049.
11. Arrieta, O., Montes-Servín, E., Hernandez-Martinez, J.-M., Cardona, A. F., Casas-Ruiz, E., et al. (2017) Expression of PD-1/PD-L1 and PD-L2 in peripheral T-cells from non-small cell lung cancer patients, *Oncotarget*, **8**, 101994-102005, doi: 10.18632/oncotarget.22025.
12. Zhu, S., Lin, J., Qiao, G., Wang, X., and Xu, Y. (2016) Tim-3 identifies exhausted follicular helper T cells in breast cancer patients, *Immunobiology*, **221**, 986-993, doi: 10.1016/j.imbio.2016.04.005.
13. Sharma, P., Siddiqui, B. A., Anandhan, S., Yadav, S. S., Subudhi, S. K., et al. (2021) The next decade of immune checkpoint therapy, *Cancer Discov.*, **11**, 838-857, doi: 10.1158/2159-8290.CD-20-1680.
14. Patel, S. P., and Kurzrock, R. (2015) PD-L1 expression as a predictive biomarker in cancer immunotherapy, *Mol. Cancer Ther.*, **14**, 847-856, doi: 10.1158/1535-7163.MCT-14-0983.
15. Powles, T., Eder, J. P., Fine, G. D., Braiteh, F. S., Liorot, Y., et al. (2014) MPDL3280A (anti-PD-L1) treat-

- ment leads to clinical activity in metastatic bladder cancer, *Nature*, **515**, doi: 10.1038/nature13904.
16. Ai, L., Chen, J., Yan, H., He, Q., Luo, P., et al. (2020) Research status and outlook of PD-1/PD-L1 inhibitors for cancer therapy, *Drug Des. Devel. Ther.*, **14**, 3625-3649, doi: 10.2147/DDDT.S267433.
 17. Teng, F., Meng, X., Kong, L., and Yu, J. (2018) Progress and challenges of predictive biomarkers of anti PD-1/PD-L1 immunotherapy: a systematic review, *Cancer Lett.*, **414**, 166-173, doi: 10.1016/j.canlet.2017.11.014.
 18. Teng, M. W., Ngiow, S. F., Ribas, A., and Smyth, M. J. (2015) Classifying cancers based on T-cell Infiltration and PD-L1, *Cancer Res.*, **75**, 2139-2145, doi: 10.1158/0008-5472.CAN-15-0255.
 19. Emens, L. A., Cruz, C., Eder, J. P., Braiteh, F., Chung, C., et al. (2019) Long-term clinical outcomes and biomarker analyses of atezolizumab therapy for patients with metastatic triple-negative breast cancer: a phase 1 study, *JAMA Oncol.*, **5**, 74-82, doi: 10.1001/jamaoncol.2018.4224.
 20. Tashireva, L. A., Perelmutter, V. M., Denisov, E. V., Savelieva, O. E., et al. (2017) Types of immune-inflammatory responses as a reflection of cell-cell interactions under conditions of tissue regeneration and tumor growth, *Biochemistry (Moscow)*, **82**, 542-555, doi: 10.1134/S0006297917050029.
 21. Перельмутер В. М., Таширева Л. А., Манских В. Н., Денисов Е. В., Савельева О. Е., и др. (2017) Иммuno-воспалительные реакции в микроокружении гетерогенны, пластичны, определяют противоопухолевый эффект или агрессивное поведение опухоли, *Журнал общей биологии*, **78**, 15-36.
 22. Emens, L., Loi, S., Rugo, H., Schneeweiss, A., Diéras, V., et al. (2019) Abstract GS1-04: IMpassion130: Efficacy in immune biomarker subgroups from the global, randomized, double-blind, placebo-controlled, phase III study of atezolizumab + nab-paclitaxel in patients with treatment-naïve, locally advanced or metastatic triple-negative breast cancer, *Cancer Res.*, **79**, doi: 10.1158/1538-7445.SABCS18-GS1-04.
 23. Catacchio, I., Silvestris, N., Scarpi, E., Schirosi, L., Scattone, A., and Mangia, A. (2019) Intratumoral, rather than stromal, CD8⁺ T cells could be a potential negative prognostic marker in invasive breast cancer patients, *Transl. Oncol.*, **12**, 585-595, doi: 10.1016/j.tranon.2018.12.005.
 24. Somasundaram, R., Connelly, T., Choi, R., Choi, H., Samarkina, A., et al. (2021) Tumor-infiltrating mast cells are associated with resistance to anti-PD-1 therapy, *Nat. Commun.*, **12**, 1-14, doi: 10.1038/s41467-020-20600-7.
 25. Abiko, K., Matsumura, N., Hamanishi, J., Horikawa, N., Murakami, R., et al. (2015) IFN- γ from lymphocytes induces PD-L1 expression and promotes progression of ovarian cancer, *Br. J. Cancer*, **112**, 1501-1509.
 26. Sun, C., Mezzadra, R., and Schumacher, T. N. (2018) Regulation and function of the PD-L1 checkpoint, *Immunity*, **48**, 434-452, doi: 10.1016/j.immuni.2018.03.014.
 27. Shi, Y. (2018) Regulatory mechanisms of PD-L1 expression in cancer cells, *Cancer Immunol. Immunother.*, **67**, 1481-1489, doi: 10.1007/s00262-018-2226-9.
 28. Yamazaki, T., Akiba, H., Iwai, H., Matsuda, H., Aoki, M., et al. (2002) Expression of programmed death 1 ligands by murine T cells and APC, *J. Immunol.*, **169**, 5538-5545, doi: 10.4049/jimmunol.169.10.5538.
 29. Loke, P., and Allison, J. P. (2003) PD-L1 and PD-L2 are differentially regulated by Th1 and Th2 cells, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **100**, 5336-5341.
 30. Wang, X., Teng, F., Kong, L., and Yu, J. (2016) PD-L1 expression in human cancers and its association with clinical outcomes, *Onco Targets Ther.*, **9**, 5023-5039, doi: 10.2147/OTTS.S105862.
 31. Budczies, J., Bockmayr, M., Denkert, C., Klauschen, F., Gröschel, S., et al. (2016) Pan-cancer analysis of copy number changes in programmed death-ligand 1 (PD-L1, CD274)-associations with gene expression, mutational load, and survival, *Genes Chromosomes Cancer*, **55**, 626-639, doi: 10.1002/gcc.22365.
 32. Mittendorf, E. A., Phillips, A. V., Meric-Bernstam, F., Qiao, N., Wu, Y., et al. (2014) PD-L1 expression in triple-negative breast cancer, *Cancer Immunol. Res.*, **2**, 361-370, doi: 10.1158/2326-6066.CIR-13-0127.
 33. Noman, M. Z., Desantis, G., Janji, B., Hasmim, M., Karray, S., et al. (2014) PD-L1 is a novel direct target of HIF-1 α , and its blockade under hypoxia enhanced MDSC-mediated T cell activation, *J. Exp. Med.*, **211**, 781-790, doi: 10.1084/jem.20131916.
 34. Shehade, H., Oldenhove, G., and Moser, M. (2014) Hypoxia in the intestine or solid tumors: a beneficial or deleterious alarm signal, *Eur. J. Immunol.*, **44**, 2550-2557, doi: 10.1002/eji.201444719.
 35. Dong, H., Zhu, G., Tamada, K., and Chen, L. (1999) B7-1, a third member of the B7 family, co-stimulates T-cell proliferation and interleukin-10 secretion, *Nat. Med.*, **5**, 1365-1369, doi: 10.1038/70932.
 36. Carter, L., Fouser, L. A., Jussif, J., Fitz, L., Deng, B., et al. (2002) PD-1:PD-L inhibitory pathway affects both CD4⁺ and CD8⁺ T cells and is overcome by IL-2, *Eur. J. Immunol.*, **32**, 634-643, doi: 10.1002/1521-4141(200203)32:3<634::AID-IMMU634>3.0.CO;2-9.
 37. Freeman, G. J., Long, A. J., Iwai, Y., Bourque, K., Chernova, T., et al. (2000) Engagement of the PD-1 immunoinhibitory receptor by a novel B7 family member leads to negative regulation of lymphocyte activation, *J. Exp. Med.*, **192**, 1027-1034, doi: 10.1084/jem.192.7.1027.
 38. Karyampudi, L., Lamichhane, P., Krempski, J., Kalli, K. R., Behrens, M. D., et al. (2016) PD-1 blunts the function of ovarian tumor-infiltrating dendritic cells by inactivating NF- κ B, *Cancer Res.*, **76**, 239-250, doi: 10.1158/0008-5472.CAN-15-0748.
 39. Gettinger, S. N., Choi, J., Mani, N., Sanmamed, M. F., Datar, I., et al. (2018) A dormant TIL phenotype defines non-small cell lung carcinomas sensitive to immune checkpoint blockers, *Nat. Commun.*, **9**, 1-15, doi: 10.1038/s41467-018-05032-8.
 40. Solaymani-Mohammadi, S., Lakhdari, O., Minev, I., Shenouda, S., Frey, B. F., et al. (2016) Lack of the programmed death-1 receptor renders host susceptible to enteric microbial infection through impairing the production of the mucosal natural killer cell effector molecules, *J. Leukoc. Biol.*, **99**, 2-9, doi: 10.1189/jlb.4A0115-003RR.
 41. Niu, C., Li, M., Zhu, S., Chen, Y., Zhou, L., et al. (2020) PD-1-positive Natural Killer Cells have a weaker antitumor function than that of PD-1-negative Natural Killer Cells in lung cancer, *Int. Med. Sci.*, **17**, 1964-1973, doi: 10.7150/ijms.47701.
 42. Lamichhane, P., Karyampudi, L., Shreeder, B., Krempski, J., Bahr, D., et al. (2017) IL10 release upon

- PD-1 blockade sustains immunosuppression in ovarian cancer, *Cancer Res.*, **77**, 6667-6678, doi: 10.1158/0008-5472.CAN-17-0740.
43. Yamaguchi, K., Mishima, K., Ohmura, H., Hanamura, F., Ito, M., et al. (2018) Activation of central/effector memory T cells and Th1 polarization in malignant melanoma patients treated with anti-PD-1 antibody, *Cancer Sci.*, **109**, 3032-3042, doi: 10.1111/cas.13758.
44. Dulos, J., Carven, G. J., van Boxtel, S. J., Evers, S., Driessen-Engels, L. J., et al. (2012) PD-1 blockade augments Th1 and Th17 and suppresses Th2 responses in peripheral blood from patients with prostate and advanced melanoma cancer, *J. Immunother.*, **35**, 169-178, doi: 10.1097/CJI.0b013e318247a4e7.
45. Tavukcuoglu, E., Horzum, U., Yilmaz, K. B., and Esendagli, G. (2020) PD-L2⁺ wound zone macrophage-like cells display M1/M2-mixed activation and restrain the effector Th1 responses, *Immunol. Cell Biol.*, **98**, 152-164, doi: 10.1111/imcb.12310.
46. Verma, V., Shrimali, R. K., Ahmad, S., Dai, W., Wang, H., et al. (2019) PD-1 blockade in subprimed CD8 cells induces dysfunctional PD-1⁺CD38hi cells and anti-PD-1 resistance, *Nat. Immunol.*, **20**, 1231-1243, doi: 10.1038/s41590-019-0441-y.
47. Chubachi, S., Yasuda, H., Irie, H., Fukunaga, K., Naoki, K., et al. (2016) A case of non-small cell lung cancer with possible "disease flare" on nivolumab treatment, *Case Rep.*, **2016**, 1-3, doi: 10.1155/2016/1075641.
48. Champiat, S., Derle, L., Ammari, S., Massard, C., Hollebecque, A., et al. (2017) Hyperprogressive disease is a new pattern of progression in cancer patients treated by anti-PD-1/PD-L1, *Clin. Cancer Res.*, **23**, 1920-1928, doi: 10.1158/1078-0432.CCR-16-1741.
49. Lahmar, J., Mezquita, L., Koscielny, S., Facchinetti, F., Bluthgen, M. V., et al. (2016) Immune checkpoint inhibitors (IC) induce paradoxical progression in a subset of non-small cell lung cancer (NSCLC), *Ann. Oncol.*, **27**, vi423, doi: 10.1093/annonc/mdw383.22
50. Ferrara, R., Mezquita, L., Texier, M., Lahmar, J., Audigier-Valette, C., et al. (2018) Hyperprogressive disease in patients with advanced non-small cell lung cancer treated with PD-1/PD-L1 inhibitors or with single-agent chemotherapy, *JAMA Oncol.*, **4**, 1543-1552, doi: 10.1001/jamaoncol.2018.3676.
51. Kato, S., Goodman, A., Walavalkar, V., Barkauskas, D. A., Sharabi, A., and Kurzrock, R. (2017) Hyperprogressors after Immunotherapy: analysis of genomic alterations associated with accelerated growth rate, *Clin. Cancer Res.*, **15**, 4242-4250, doi: 10.1158/1078-0432.CCR-16-3133.
52. Saâda-Bouazid, E., Defaucheux, C., Karabajakian, A., Coloma, V. P., Servois, V., et al. (2017) Hyperprogression during anti-PD-1/PD-L1 therapy in patients with recurrent and/or metastatic head and neck squamous cell carcinoma, *Ann. Oncol.*, **28**, 1605-1611, doi: 10.1093/annonc/mdx178.
53. Kim, C. G., Kim, K. H., Pyo, K. H., Xin, C. F., Hong, M. H., et al. (2019) Hyperprogressive disease during PD-1/PD-L1 blockade in patients with non-small-cell lung cancer, *Ann. Oncol.*, **30**, 1104-1113, doi: 10.1093/annonc/mdz123.
54. Lo Russo, G., Moro, M., Sommariva, M., Cancila, V., Boeri, M., et al. (2019) Antibody-fc/FcR interaction on macrophages as a mechanism for hyperprogressive disease in non-small cell lung cancer subsequent to PD-1/PD-L1 blockade, *Clin. Cancer Res.*, **25**, 989-999, doi: 10.1158/1078-0432.CCR-18-1390.
55. Kamada, T., Togashi, Y., Tay, C., Ha, D., Sasaki, A., et al. (2019) PD-1⁺ regulatory T cells amplified by PD-1 blockade promote hyperprogression of cancer, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **116**, 9999-10008, doi: 10.1073/pnas.1822001116.
56. Arasanz, H., Zuazo, M., Bocanegra, A., Gato, M., Martínez-Aguillo, M., et al. (2020) Early detection of hyperprogressive disease in non-small cell lung cancer by monitoring of systemic T cell dynamics, *Cancers (Basel)*, **12**, 334, doi: 10.3390/cancers12020344.
57. Kim, S. R., Chun, S. H., Kim, J. R., Kim, S.-Y., Seo, J. Y., et al. (2021) The implications of clinical risk factors, CAR index, and compositional changes of immune cells on hyperprogressive disease in non-small cell lung cancer patients receiving immunotherapy, *BMC Cancer*, **21**, 1-11, doi: 10.1186/s12885-020-07727-y.
58. Sun, Z., Fourcade, J., Pagliano, O., Chauvin, J.-M., Sander, C., et al. (2015) IL10 and PD-1 cooperate to limit the activity of tumor-specific CD8⁺ T cells, *Cancer Res.*, **75**, 1635-1644, doi: 10.1158/0008-5472.CAN-14-3016.
59. Groux, H., Bigler, M., de Vries, J. E., and Roncarolo, M. G. (1996) Interleukin-10 induces a long-term antigen-specific anergic state in human CD4⁺ T cells, *J. Exp. Med.*, **184**, 19-29, doi: 10.1084/jem.184.1.19.
60. O'Garra, A., Barrat, F. J., Castro, A. G., Vicari, A., and Hawrylowicz, C. (2008) Strategies for use of IL-10 or its antagonists in human disease, *Immunol. Rev.*, **223**, 114-131, doi: 10.1111/j.1600-065X.2008.00635.x.
61. Gato-Cañas, M., Zuazo, M., Arasanz, H., Ibañez-Vea, M., Lorenzo, L., et al. (2017) PD-L1 signals through conserved sequence motifs to overcome interferon-mediated cytotoxicity, *Cell Rep.*, **20**, 1818-1829, doi: 10.1016/j.celrep.2017.07.075.
62. Xiong, D., Wang, Y., Singavi, A. K., Mackinnon, A. C., George, B., and You, M. (2018) Immunogenomic landscape contributes to hyperprogressive disease after anti-PD-1 immunotherapy for cancer, *iScience*, **9**, 258-277, doi: 10.1016/j.isci.2018.10.021.
63. Stathopoulou, C., Gangaplara, A., Mallett, G., Flomerfelt, F. A., Liniany, L. P., et al. (2018) PD-1 Inhibitory receptor downregulates asparaginyl endopeptidase and maintains Foxp3 transcription factor stability in induced regulatory T cells, *Immunity*, **49**, 247-263, doi: 10.1016/j.immuni.2018.05.006.
64. Tsukamoto, H., Fujieda, K., Miyashita, A., Fukushima, S., Ikeda, T., et al. (2018) Combined blockade of IL-6 and PD-1/PD-L1 signaling abrogates mutual regulation of their immunosuppressive effects in the tumor microenvironment, *Cancer Res.*, **78**, 5011-5022, doi: 10.1158/0008-5472.CAN-18-0118.
65. Schwartz, C., Khan, A. R., Floudas, A., Saunders, S. P., Hams, E., et al. (2017) ILC2s regulate adaptive Th2 cell functions via PD-L1 checkpoint control, *J. Exp. Med.*, **214**, 2507-2521, doi: 10.1084/jem.20170051.

PARAMETERS OF TUMOR MICROENVIRONMENT DETERMINE THE EFFECTIVENESS OF ANTI-PD-1/PD-L1 THERAPY

Review

**L. A. Tashireva*, D. T. Muravyova, N. O. Popova,
V. E. Goldberg, S. V. Vtorushin, and V. M. Perelmuter**

Cancer Research Institute, Tomsk NRMC, 634050 Tomsk, Russia; E-mail: tashireva@oncology.tomsk.ru

Undoubtedly, one of the most promising approaches to the treatment of cancer is the creation of pathogenetically based therapeutic drugs. Researchers from all over the world are trying to answer the question of what to choose as a target for influence and, in general, quite successfully. The Nobel Prize-winning discovery of mechanisms for regulating the activity of cells of the immune system through checkpoint molecules, as well as the discovery of the ability of tumor cells to use these mechanisms to suppress immune responses, has become the impetus for the development of modern immunotherapy, and now the routine practice of chemotherapists includes drugs such as inhibitors of immune checkpoints, in particular, PD-1/PD-L1. However, the use of such drugs can prolong the patient's life, but, unfortunately, not cure the disease at all. A certain contribution to this is made by the heterogeneity of tumor cells and microenvironment, but the main reasons may lie in the complex relationships between the tumor and the microenvironment, which, at times, are so plastic that they can change, adjusting to newly emerging conditions. The main characteristic of the tumor microenvironment is the type of the ongoing immune-inflammatory reaction (IIR), and since inhibitors of immune checkpoints act on cells forming IIR, it is obvious that the results of therapy, including hyperprogressive disease, can be associated with this initial parameter. The presented review reveals the essence of the interaction between the tumor and its microenvironment during therapy with PD-L1 inhibitors.

Keywords: PD-1/PD-L1 inhibitors, tumor microenvironment, efficacy of immunotherapy, hyperprogression

ИНГИБИРОВАНИЕ miR-21 СПОСОБСТВУЕТ ПРОЦЕССУ СТАРЕНИЯ ПОЛУЧЕННЫХ ИЗ КЛЕТОК NT2 АСТРОЦИТОВ

© 2021 V. Balint¹, D. Stanisavljevic-Ninkovic¹, N. Anastasov², S. Lazic¹,
N. Kovacevic-Grujicic¹, M. Stevanovic^{1,3,4}, A. Lazic^{1*}

¹ Laboratory for Human Molecular Genetics, Institute of Molecular Genetics and Genetic Engineering, University of Belgrade, 11042 Belgrade, Serbia; e-mail: andrijanak@imgge.bg.ac.rs

² Helmholtz Zentrum München, German Research Center for Environmental Health, Institute of Biological and Medical Imaging, 85764 Neuherberg, Germany

³ Faculty of Biology, University of Belgrade, 11158 Belgrade, Serbia

⁴ Serbian Academy of Sciences and Arts, 11000 Belgrade, Serbia

Поступила в редакцию 06.08.2021

После доработки 28.09.2021

Принята к публикации 28.09.2021

Астроциты являются основными клетками, поддерживающими гомеостаз центральной нервной системы (ЦНС). Они обеспечивают нейронам механическую, метаболическую и трофическую поддержку, поэтому нарушение функционирования или приобретение этими клетками фенотипа, ассоциированного с клеточным старением, могут вносить вклад в нарушение функционирования всей ЦНС и возникновение патологий. Тем не менее молекулярные механизмы, лежащие в основе сложной физиологии астроцитов, изучены недостаточно. Недавно было показано, что микроРНК участвуют в регуляции функционирования астроцитов через различные механизмы. Так, miR-21 является специфичной для астроцитов микроРНК, играющей важную роль в развитии астроглиоза. В то же время связи между этой микроРНК и старением астроцитов показано не было. С целью исследования роли miR-21 в этих клетках с прицельным вниманием на процессы клеточного старения мы использовали астроциты, полученные из клеток NT2 (NT2/A). С помощью технологии антисмысловых РНК мы понизили уровень экспрессии miR-21 как в незрелых, так и в зрелых клетках NT2/A. Полученные нами результаты свидетельствуют о том, что снижение уровня экспрессии miR-21 приводит к остановке клеточного роста и преждевременному старению клеток, что подтверждается такими маркерами клеточного старения, как повышенная экспрессия ингибиторов клеточного цикла (p21 и p53) и повышенная активность β-галактозидазы, ассоциированной со старением клеток. Кроме того, проведенный нами анализ *in silico* показал, что многие из генов, для которых ранее была показана повышенная экспрессия при индуцированном старении астроцитов, предположительно являются мишенями miR-21. В целом, полученные нами результаты указывают на то, что miR-21 может функционировать как регулятор старения астроцитов. По нашим сведениям, это первые данные, демонстрирующие связь между miR-21 и старением астроцитов. С учетом того, что сенесцентные астроциты ассоциированы с развитием различных патологий ЦНС, разработка новых терапевтических стратегий, основанных на применении микроРНК, может предотвратить наступление клеточного старения и способствовать улучшению физиологического состояния.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: miR-21, астроциты, NT2/D1, клеточное старение.

DOI: 10.31857/S0320972521110075

ВВЕДЕНИЕ

МикроРНК — это небольшие некодирующие РНК, опосредующие негативную регуляцию экспрессии генов на посттранскрипционном уровне. В последние годы была признана важная роль микроРНК в механизмах регуляции,

лежащих в основе дифференцировки нейронов [1]. МикроРНК также участвуют в контроле широкого спектра функций в головном мозге взрослого организма как в физиологических, так и в патологических условиях [2].

МикроРНК-21 (miR-21) является одним из самых интригующих представителей микроРНК в связи с широким набором её функций. В частности, miR-21 работает как онкоген: показано, что при различных опухолях, включая глиобластому, происходит повышение её экспрессии [3, 4]. Помимо этого, указанная микроРНК участвует в регуляции процессов развития. Так, показано, что miR-21 способствует пролифера-

Принятые сокращения: anti-miR-21 — антисмысловая miR-21; miR-21 — микроРНК-21; NT2/A — астроциты, полученные из клеток NT2/D1; RA — ретиноевая кислота; SA-β-gal — ассоциированная со старением бета-галактозидаза; SCI — повреждение спинного мозга.

* Адресат для корреспонденции.

ции нейрональных стволовых клеток и дифференцировке нейронов [5]. Кроме того, она вносит вклад в поддержание гомеостаза тканей взрослого организма, т.к. повышение уровня её экспрессии было выявлено в реактивных астроцитах при повреждении спинного мозга (SCI, spinal cord injury), где выраженные положительные изменения астроцитов были опосредованы действием miR-21 [6, 7]. Показано, что эта микроРНК также участвует в регуляции иммунной системы, обладая способностью модулировать «включение/выключение» воспалительного ответа в соответствующее время путем стимулирования или ингибирования сигнальных путей, в которых задействованы ядерный фактор каппа В (NF- κ B) и NOD-подобный рецепторный белок 3 (NLRP3), которые лежат в основе хронических системных воспалительных процессов, протекающих на низком уровне, которые имеют место при старении организма человека [8].

Астроциты являются основными клетками, поддерживающими гомеостаз ЦНС [9]. Они тесно интегрированы в нейронные сети и принимают участие в различных аспектах физиологии [9] и патологии [10] ЦНС. Эти клетки обладают уникальной способностью в ответ на повреждение трансформироваться из «дремлющего» (спокойного) в реактивное состояние. Этот феномен известен как реактивный астроглиоз, служащий в качестве компенсаторного ответа, модулирующего повреждение тканей и их восстановление [11]. Утрата астроцитами их функций (или усиление их нейровоспалительной функции) в результате клеточного старения может иметь серьезные последствия в виде развития возрастных нейродегенеративных заболеваний [12]. Противоположный реактивному астроглиозу процесс биологического старения клеток завершается состоянием, которое характеризуется необратимой остановкой роста, сопряженной с появлением других маркеров клеточного старения, таких как повышенная активность ассоциированной со старением бета-галактозидазы (SA- β -gal) и усиленная экспрессия ингибиторов клеточного цикла, а именно p21, p16 и p53 [12]. Тем не менее молекулярные механизмы, лежащие в основе всех этих процессов, изучены недостаточно хорошо. Несмотря на то что miR-21 рассматривается как потенциальная молекулярная мишень для оказания воздействия на процесс астроглиоза и улучшения клинического исхода после SCI [7], данных о связи между этой микроРНК и старением астроцитов пока не опубликовано.

Для исследования роли miR-21 в астроцитах с упором на процесс клеточного старения мы использовали в качестве модельной системы ли-

нию плюрипотентных клеток NT2/D1 эмбриональной карциномы человека. Эти клетки обладают способностью подвергаться дифференцировке по нейрональной линии с образованием популяций нейронов и глии под действием ретиноевой кислоты (RA) [13, 14]. Астроциты, полученные из клеток NT2 (NT2/A), похожи на первичные астроциты по таким показателям, как присутствие белков промежуточных филаментов, остановка роста и быстрый ответ на повреждение [14]. Кроме того, в смешанных культурах клетки NT2/A обладают активной системой транспорта глутамата и поддерживают рост и выживание нейронов, также образующихся из клеток NT2 (NT2/N) [14]. Мы инициировали снижение уровня экспрессии miR-21 как в незрелых, так и в зрелых клетках NT2/A и проанализировали влияние этих изменений на выживаемость, пролиферацию клеток и индукцию процессов клеточного старения. Согласно полученным нами результатам, снижение уровня экспрессии miR-21 индуцирует остановку роста и преждевременное старение незрелых и зрелых клеток NT2/A.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Культура клеток и их дифференцировка. Плюрипотентные клетки карциномы эмбриона человека линии NT2/D1 (ATCC® CRL-1973™) были культивированы как описано ранее [15]. Индукция дифференцировки клеток NT2/D1 достигалась добавлением в культуральную среду 10 мкМ полностью транс-ретиноевой кислоты («Sigma-Aldrich», США) на протяжении 4 недель. Обогащенную нейронами популяцию клеток получали в результате механического отделения, как было описано ранее [13]. Астроциты, продуцированные из клеток NT2, были получены из остающихся прикрепленными клеток согласно опубликованному протоколу [14]. Вкратце, после удаления NT2/N оставшиеся клетки были обработаны трипсином и помещены в новую культуральную посуду. Клетки культивировали в течение дополнительных 4 недель в среде DMEM с 10% FBS (фетальная бычья сыворотка) с высоким содержанием глюкозы, проводя субкультивирование при достижении конfluence (на 7–14 сут.). Морфологию клеток изучали с помощью фазово-контрастного микроскопа DM IL LED Inverted Microscope («Leica Microsystems», Германия).

Лентивирусная трансдукция астроцитов, полученных из клеток NT2/D1. Лентивирусные частицы получали путем транзientной котрансфекции клеток HEK-293T (ATCC® CRL-1573™) с

использованием реагента для трансфекции PEI MAX™ («Polysciences Inc.», США) согласно инструкции производителя. Котрансфекцию клеток HEK-293T проводили в культуральной посуде (диаметром 10 см) с 1,7 мкг pCMV-VSV-G (оболочечная плаزمид, envelope plasmid), 1 мкг pRSV-REV и 2,5 мкг pMDLg/RRE (упаковочные плазмиды, packaging plasmids) и 10 мкг лентивирусной антисмысловой конструкции для трансдукции miR-21 (anti-miR-21) [16] или пустого вектора pGreenPuro (pGP; «System Biosciences», США). Астроциты, полученные из клеток NT2/D1, инкубировали в течение ночи в среде, содержащей лентивирусные частицы (собранные через 48 ч после трансфекции) и 8 мкг/мл полибрейна («Sigma-Aldrich»). Отбор с помощью пурамицина инициировали через 48 ч после трансдукции. Клетки культивировали в течение 3 сут. в среде, содержащей сыворотку с 0,3 мкг/мл пурамицина (селективная среда). Не подвергшиеся трансдукции клетки, культивируемые в селективной среде, были использованы для контроля эффективности действия пурамицина. Клетки, устойчивые к действию пурамицина, были использованы для дальнейших экспериментов. GFP-позитивность клеток была подтверждена с помощью флуоресцентной микроскопии.

Иммуногистохимия. Клетки NT2/A в 4-недельном возрасте наносили прямо на покровные стекла, в то время как клетки NT2/N и клетки NT2/A, культивируемые в течение 1 недели, были нанесены на покровные стекла, покрытые Geltrex® («Thermo Fischer Scientific», США). Клетки фиксировали в 4%-ном параформальдегиде в PBS в течение 20 мин при комнатной температуре, обрабатывали для пермеабилзации в 0,2%-ном Triton X-100 в течение 20 мин и блокировали в 1%-ном BSA и 5%-ной нормальной козлиной сыворотке в PBS, pH 7,4, с 0,1%-ным Triton X-100 (PBT) в течение 1 ч при комнатной температуре. Первичные антитела разводили в PBT, содержащем 1% BSA, и инкубировали в течение ночи при 4 °C: мышиные антитела против MAP2 в разведении 1 : 500 (ab11267, «Abcam», Великобритания), мышиные антитела против виментина в разведении 1 : 300 (sc-6260, «Santa Cruz Biotechnology», США), кроличьи антитела против Ki67 в разведении 1 : 300 (ab15580, «Abcam»), кроличьи антитела против GFAP в разведении 1 : 200 (Z 0334, «Dako Cytomation», Дания). Связавшиеся первичные антитела были маркированы на протяжении 1 ч при комнатной температуре с использованием соответствующих вторичных антител: козлиные анти-кроличьи IgG (H+L) Alexa Fluor 488 (A-11034, «Invitrogen», США), козлиные анти-мышиные

IgG (H+L) Alexa Fluor 546 (A-11030, «Invitrogen») и козлиные анти-мышиные IgG (H+L) Alexa Fluor 488 (A-11029, «Invitrogen»), разведенные в 500 раз в PBT с добавлением 1% BSA. Антитела против GFAP обрабатывали препаратом биотинилированных козлиных анти-кроличьих IgG, разведенных в 500 раз (BA-1000, «Vector Laboratories», США), в течение 1 ч при комнатной температуре в PBS, pH 7,4, содержащем 1% BSA, и затем окрашивали стрептавидином (Streptavidin) DyLight® 594, разведенным в 500 раз (SA-5594, «Vector Laboratories») в PBS, pH 7,4, в течение 1 ч при комнатной температуре. Ядра окрашивали 0,1 мг/мл диаминофенилиндола (DAPI, «Sigma-Aldrich»). Визуализацию и фотосъемку образцов выполняли на флуоресцентном микроскопе Olympus BX51 с использованием программы Cytovision 3.1 («Applied Imaging Corporation», США) или на конфокальном микроскопе Leica TCS SP8, снабженном программой Leica Microsystems LAS AF-TCS SP8 («Leica Microsystems», Германия).

ПЦР с обратной транскрипцией (RT-PCR). Полученный препарат тотальной РНК обрабатывали ДНКазой I и использовали для синтеза кДНК как описано ранее [17]. Полученные кДНК использовали в качестве матриц для амплификации *OCT4* и *NEUROD1* с использованием набора KAPA 2G Fast HotStart Ready Mix («Kapa Biosystems», США) и для амплификации *p21^{Waf1/Cip1}* и *TP53* с использованием набора Power SYBR Green PCR Master Mix («Applied Biosystems», США) согласно инструкции производителя. Эксперименты проводили минимум в 3 повторениях. Амплификацию в реальном времени проводили с помощью системы 7500 Real Time PCR («Applied Biosystems»). Данные по каждому образцу получали трижды и брали среднее значение полученных результатов. Относительные уровни экспрессии генов *p21^{Waf1/Cip1}* и *TP53* рассчитывали с помощью метода $\Delta\Delta C_t$ и нормализовали относительно *GAPDH* как внутреннего контроля. Ниже указаны последовательности праймеров, используемых в настоящей работе (прямой и обратный соответственно):

OCT4: 5'-GCTTTGAGGCTCTGCAGCTT-3' и 5'-TCTCCAGGTTGCCTCTCACT-3', *NEUROD1*: 5'-GGAAACGAACCCACTGTGCT-3' и 5'-GCCACACCAATTCGTGGTG-3', *GAPDH*: 5'-GCTCAAGATCATCAGCAATGC-3' и 5'-CCACGATACCAAAGTTGTTCATGG-3', *p21^{Waf1/Cip1}*: 5'-GACCACTGGAGGGGTGACT-3' и 5'-CAGGTCACATGGTCTTCTCCT-3', *TP53*: 5'-CCCCTCC-TGGCCCCCTGTTCATCTTC-3' и 5'-GCAGCGCCTCACAACTCCGTCAT-3'.

Анализ TaqMan-микроРНК и обработка полученных данных. Наборы TaqMan для определения индивидуального уровня экспрессии микроРНК («Applied Biosystems») были использованы для miR-21 (Cat. No. 4427975; Assay ID 000397), miR-30d (Cat. No. 4427975; Assay ID 000420), miR-30d* (Cat. No. 4427975; Assay ID 002305), miR-124a (Cat. No. 4427975; Assay ID 000446), miR-219-5p (Cat. No. 4427975; Assay ID 000522) и miR-941 (Cat. No. 4427975; Assay ID 002183). Реакции с обратной транскрипцией проводили с помощью набора с обратной транскриптазой MultiScribe reverse transcriptase («Applied Biosystems»), как описано ранее [3]. Затем проводили количественную ПЦР с использованием набора TaqMan Universal PCR Master Mix на приборе 7500 Real Time apparatus («Applied Biosystems»), как описано ранее [3, 18]. Уровни относительной экспрессии отдельных микроРНК рассчитывали с использованием метода $\Delta\Delta C_t$ [3] и нормализовали относительно *RNU44* (Cat. No. 4427975; Assay ID 001095) как внутреннего контроля. Все эксперименты были выполнены в трех биологических повторениях с минимум двумя техническими.

Определение выживаемости клеток. Спустя 5 дней после трансдукции с помощью конструктора anti-miR-21 или пустого вектора клетки высевали на 96-луночные культуральные планшеты с плотностью $1,5 \times 10^4$ клеток на лунку в случае 1-недельных клеток NT2/A и 2×10^4 клеток на лунку — в случае 4-недельных клеток NT2/A. Для определения выживаемости 1-недельных клеток NT2/A использовали МТТ-тест («Merck», США), для определения выживаемости 4-недельных клеток NT2/A — набор CellTiter 96 Aqueous One Solution Cell Proliferation Assay («Promega», США). Все измерения проводили в соответствии с протоколом производителя. Для колориметрических измерений использовали микропланшетный ридер Infinite 200 PRO («Tecan», Швейцария). Все эксперименты были выполнены в шести технических повторениях и проведены в трех независимых экспериментах.

Анализ клеточной сенесцентности (старения). Чтобы определить активность SA- β -gal, клетки высевали в 24-луночные культуральные планшеты. Через 5 дней после трансдукции конструкцией anti-miR-21 или пустым вектором клетки окрашивали с помощью Senescence β -galactosidase Staining Kit (Cell Signaling Technology) согласно инструкциям производителя. Вкратце, клетки промывали PBS, фиксировали и окрашивали в течение 12 ч при 37 °C раствором X-gal, содержащим β -галактозидазу. Все клетки визуализировали в одинаковых условиях с помощью фазово-контрастного микроскопа DM IL LED Inverted

Microscope, определение интенсивности окрашивания препаратом SA- β -gal проводили с помощью программы ImageJ software (National Institutes of Health, США). Все результаты были получены на основании трех независимых биологических повторений.

Предсказание генов-мишеней. Для предсказания мишеней miR-21 (hSA-miR-21-5p) нами были использованы программы TargetScan Human Release 7.2 (http://www.targetscan.org/vert_72/) [19], DIANA TarBase v8 (https://carolina.imis.athena-innovation.gr/diana_tools/web/index.php?r=tarbasev8%2Findex) [20] и MirDB (<http://mirdb.org/>) [21]. Эти предварительно рассчитанные данные находятся в свободном доступе онлайн. Подтвержденные или предсказанные мишени miR-21, полученные с помощью каждого из указанных выше алгоритмов, были проанализированы на пересечение с генами, для которых характерно повышение экспрессии в астроцитах при индукции клеточного старения путем облучения, как показано в работе Limbad et al. [22].

Статистическая обработка результатов. Статистическая обработка данных была проведена с использованием программы SPSS statistical software (версия 20). Полученные данные представлены в виде среднего значения $\pm$ SEM на основании минимум трех независимых экспериментов. Значения *p* были рассчитаны с использованием критерия Стьюдента.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

Характеризация нейрональной *in vitro* дифференцировки плюрипотентных клеток NT2/D1 человека. Нами с помощью ретиноевой кислоты была осуществлена *in vitro* нейродифференцировка плюрипотентных клеток эмбриональной карциномы человека NT2/D1 как описано ранее [13]. Прогрессирование нейродифференцировки регистрировали по изменениям морфологии клеток (рис. 1, *a*) и уровню экспрессии специфических маркеров (рис. 1, *b*, *c*). Недифференцированные клетки NT2/D1, характеризующиеся быстрым клеточным делением и небольшим размером, росли в виде монослойной культуры (рис. 1, *a*). В этих клетках обнаруживалась экспрессия маркера плюрипотентных стволовых клеток *OCT4* (связывающийся с октамером фактор транскрипции 4) (рис. 1, *b*). После 4 недель обработки ретиноевой кислотой клетки формировали чрезвычайно плотную многослойную культуру, в которой кластеры клеток круглой формы размещались поверх очень плотного слоя прикрепленных клеток (рис. 1, *a*, +RA). Эта

многослойная клеточная культура содержала смесь популяций предшественников нейронов и глиальных клеток, как было показано ранее [13, 14]. Соответственно, в этой фазе нейродифференцировки нами был выявлен высокий уровень экспрессии маркера предшественников нейронов *NEUROD1* (фактор нейрогенной дифференцировки 1) (рис. 1, *b*). Далее мы выделили из этих многослойных культур клетки NT2/N и NT2/A (рис. 1, *a, c*) с использованием ранее разработанных протоколов [13, 14]. Нейроны и астроглиальные клетки были подтверждены фенотипически путём мониторинга экспрессии спе-

цифических белков цитоскелета. Так, в клетках NT2/N было выявлено интенсивное окрашивание белка MAP2 (белок 2, ассоциированный с микротрубочками), нейрон-специфического белка цитоскелета, обнаруживаемого во всех телах и отростках клеток (рис. 1, *c* и *c'*, NT2/N). Для выявления клеток NT2/A использовали антитела против внутрицитоплазматических филаментов, образованных виментином и белком GFAP (фибрилярный кислый белок глиальных клеток). В соответствии с результатами работы Sandhu et al. [14] в случае 1-недельной культуры, обогащенной клетками NT2/A, нами было по-

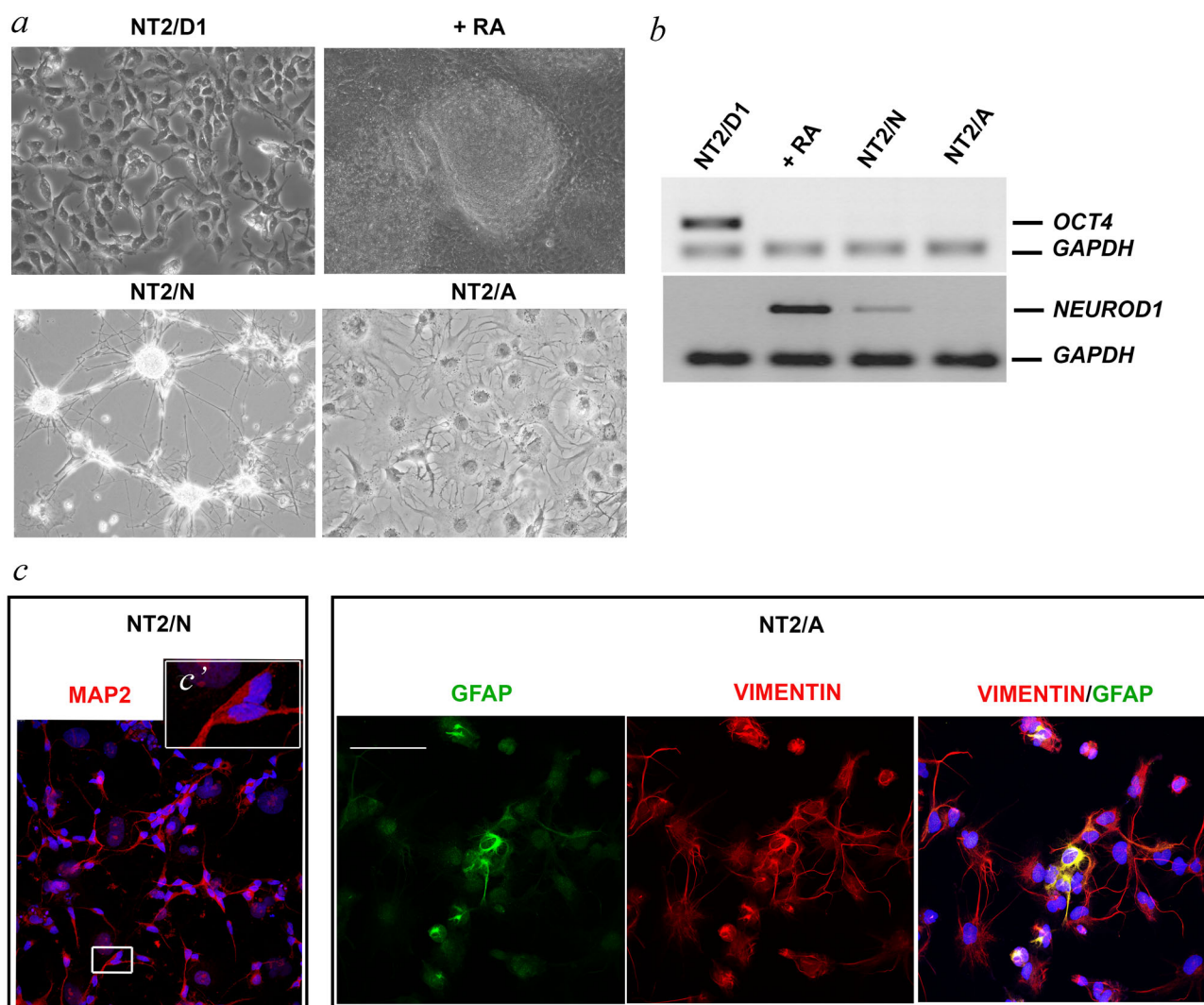


Рис. 1. *a* – Изображения, полученные с помощью фазово-контрастного микроскопа, демонстрирующие морфологические изменения, происходящие при индуцированной ретиноевой кислотой (RA) нейродифференцировке клеток NT2/D1. NT2/D1 – недифференцированные клетки; +RA – NT2/D1 после 4 недель обработки RA; NT2/N – зрелые нейроны; NT2/A – астроциты (1-недельные); 10-кратное увеличение. *b* – Полуколичественное определение уровня экспрессии *OCT4* и *NEUROD1* с помощью метода ПЦР с обратной транскрипцией. В качестве контроля использовали *GAPDH*. *c* – Иммуноокрашивание клеток NT2/N антителами, специфичными к MAP2 (красный), и клеток NT2/A – антителами, специфичными к белку GFAP (зеленый) и виментину (красный). Ядра клеток были контрокрашены с помощью DAPI (синий). Выделенный квадратом участок панели *c* показан в увеличенном виде на (*c'*). Шкала – 100 мкм

казано, что все изученные клетки являлись виментин-позитивными, в то время как лишь небольшая группа клеток NT2/A интенсивно окрашивалась на GFAP, маркер зрелых астроглиальных клеток (рис. 1, *c*, NT2/A).

Анализ уровня экспрессии отдельных микроРНК в процессе нейрональной дифференцировки клеток NT2/D1, индуцированной ретиноевой кислотой. Всесторонний анализ экспрессии микроРНК, проведенный Smith et al. [23], привел к обнаружению микроРНК, ассоциированных с отдельными фазами нейродифференцировки клеток NT2/D1, индуцированной ретиноевой кислотой. Соответственно, чтобы далее изучить эту модельную систему с точки зрения паттернов экспрессии микроРНК, нами были отобраны miR-219 и miR-30d как микроРНК, специфичные для предшественников нейронов, а также miR-124 и miR-21, характерные для нейронов и астроцитов, образующихся из клеток NT2, соответственно [23]. Кроме того, мы включили в наш анализ miR-30d*, другой член семейства miR-30, а также miR-941. Последняя представляет особый интерес, поскольку эта микроРНК является специфичной для клеток человека и имеет повышенный уровень экспрессии в клетках головного мозга, оказывая влияние на гены, вовлеченные в пути передачи сигналов нейромедиаторов [24].

После 4 недель культивирования клеток NT2/D1 с ретиноевой кислотой, максимальные уровни экспрессии были продемонстрированы для 4 из 6 проанализированных микроРНК (miR-30d, miR-30d*, miR-219 и miR-941) (рис. 2). Несмотря на значительные различия уровней экспрессии членов семейства miR-30, а именно miR-30d и miR-30d*, они продемонстрировали схожие паттерны экспрессии в ходе дифференцировки клеток NT2/D1 (рис. 2). Наивысший уровень экспрессии в клетках NT2/N и NT2/A был продемонстрирован miR-124 и miR-21 соответственно (рис. 2). Следует, однако, отметить, что в отличие от miR-124, для которой описан высокий уровень экспрессии в головном мозге и важная роль в процессе нейрогенеза как при развитии мозга, так и у взрослых индивидов [25, 26], роль miR-21 в астроцитах до сих пор не была изучена. Поэтому в своих работах мы сосредоточили внимание на изучении этой микроРНК и её роли в клетках NT2/A.

Характеризация клеток NT2/A на различных стадиях их созревания. Процесс созревания клеток NT2/A был задокументирован в виде изменений клеточной морфологии (рис. 3, *a*), снижения скорости пролиферации клеток (рис. 3, *b*, *c*) и экспрессии специфических маркеров (рис. 3, *a*, нижняя панель). Однонедель-

ные культуры клеток NT2/A состояли в основном из небольших похожих на звездочки клеток с многочисленными отростками, подобными фибриллам (рис. 3, *a*). Эти фибриллярные или звездчатые астроциты обнаруживались растущими поверх протоплазматических астроцитов в первые две недели культивирования клеток. В процессе дальнейшего созревания клеток NT2/A доля фибриллярных астроцитов резко снижалась, и к четвертой неделе клеточные культуры преимущественно состояли из протоплазматических астроцитов, т.е. плоских клеток с короткими цитоплазматическими отростками, простирающимися от практически круглых клеточных тел (рис. 3, *a*). В то время как и фибриллярные и протоплазматические клетки были виментин-позитивными, интенсивное окрашивание GFAP наблюдалось лишь в подгруппе фибриллярных астроцитов, но не в больших протоплазматических клетках (рис. 3, *a*, нижняя панель).

Скорость пролиферации клеток NT2/A на двух различных стадиях созревания оценивали путем оценки экспрессии Ki67, ядерного белка, ассоциированного с пролиферацией клеток (рис. 3, *b*). Число Ki67-меченых клеток существенно снижалось в процессе созревания клеток NT2/A (рис. 3, *c*). В частности, в 1-недельных культурах клеток NT2/A нами было обнаружено 66% Ki67-меченых клеток, в то время как после 4 недель созревания мы наблюдали 29% митотически активных клеток от общего количества подсчитанных клеток. Таким образом, дальнейшее созревание клеток NT2/A в течение дополнительных 3 недель сопровождается примерно двукратным снижением скорости пролиферации. Схожие фенотипические изменения в процессе созревания NT2/A были ранее описаны Sandhu et al. [14]. Следующей целью было исследование того, меняется ли уровень экспрессии miR-21 в процессе созревания клеток NT2/A. Мы обнаружили незначительное снижение уровня экспрессии miR-21 в 4-недельных клетках в сравнении с 1-недельными (рис. 3, *d*), что указывает в пользу того, что уровень экспрессии miR-21 остается без изменений в процессе созревания клеток NT2/A.

Снижение уровня экспрессии miR-21 влияет на пролиферацию клеток NT2/A. Для исследования влияния miR-21 на фенотипические характеристики клеток NT2/A мы снизили уровень экспрессии этой микроРНК как в незрелых, так и в зрелых клетках NT2/A. Нами была проведена трансдукция 1-недельных и 4-недельных клеток NT2/A конструкцией, экспрессирующей anti-miR-21, через 5 суток после чего мы определяли уровни экспрессии miR-21. Экспрессия

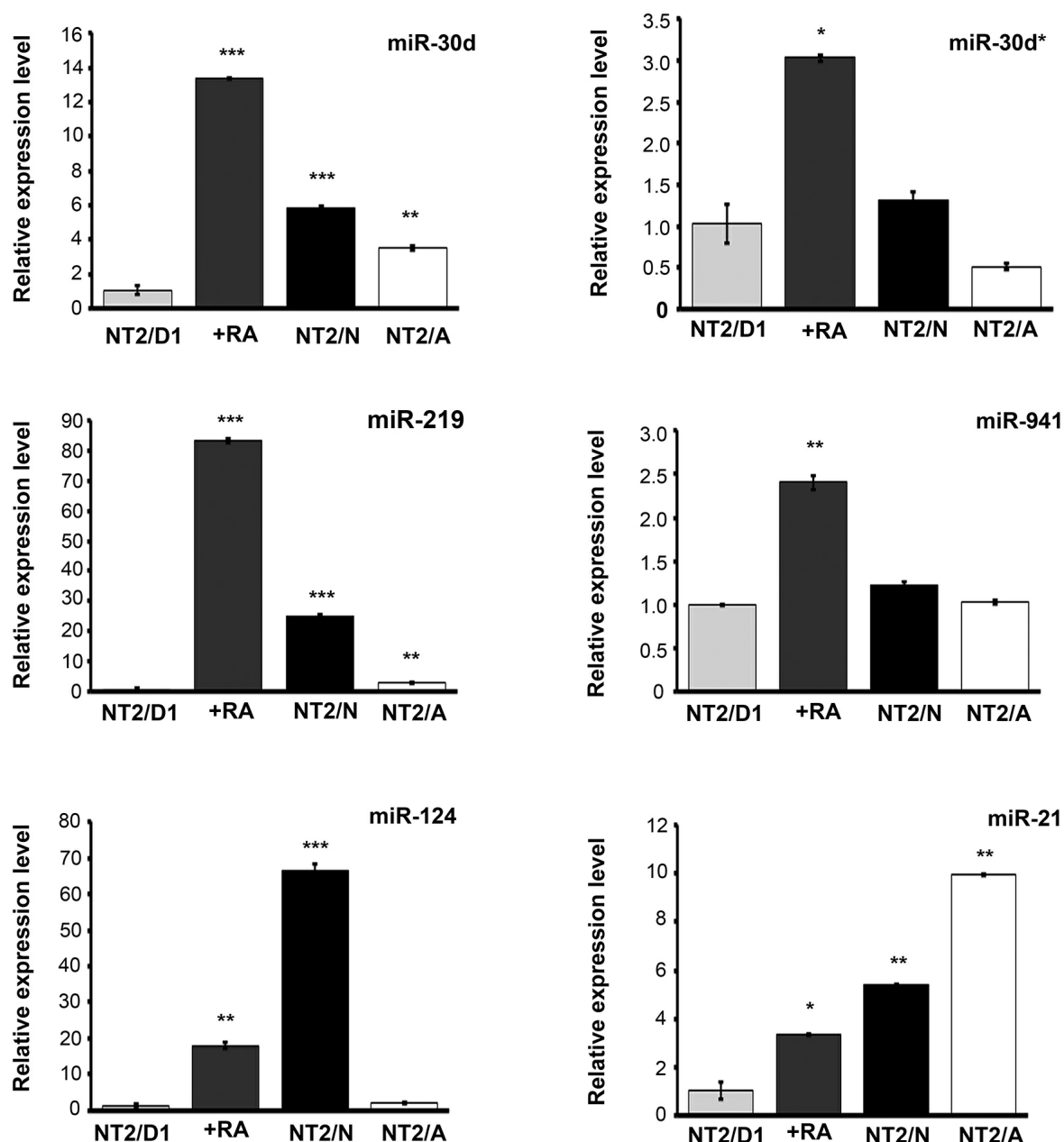


Рис. 2. Анализ экспрессии микроРНК на различных фазах индуцированной ретиноевой кислотой (RA) нейродифференцировки клеток NT2/D1. NT2/D1 – недифференцированные клетки; +RA – NT2/D1 после 4 недель их обработки RA; NT2/N – зрелые нейроны; NT2/A – астроциты (1-недельные). Относительные уровни экспрессии микроРНК рассчитывали на основе сравнения с уровнем экспрессии в недифференцированных клетках NT2/D1, который был принят за единицу. * $p \leq 0,05$, ** $p \leq 0,01$, *** $p \leq 0,001$

указанной микроРНК снижалась до значений $0,39 \pm 0,09$ (в 1-недельной культуре клеток NT2/A) и $0,60 \pm 0,03$ (в 4-недельных культурах клеток NT2/A) в сравнении с уровнем miR-21 в контрольных клетках, трансдуцированных пустым вектором, который был взят за единицу (рис. 4, а).

Вначале мы изучили влияние снижения уровня экспрессии miR-21 на выживаемость

клеток NT2/A на обеих стадиях созревания. Оценку выживаемости клеток NT2/A определяли через 5 дней после трансдукции с использованием реагента МТТ в случае 1-недельных клеток NT2/A и с применением МТС – в случае зрелых клеток NT2/A (4 недели культивирования). Снижение уровня экспрессии miR-21 вызывало значительное снижение выживаемости клеток NT2/A (рис. 4, б). В частности, выживаемость

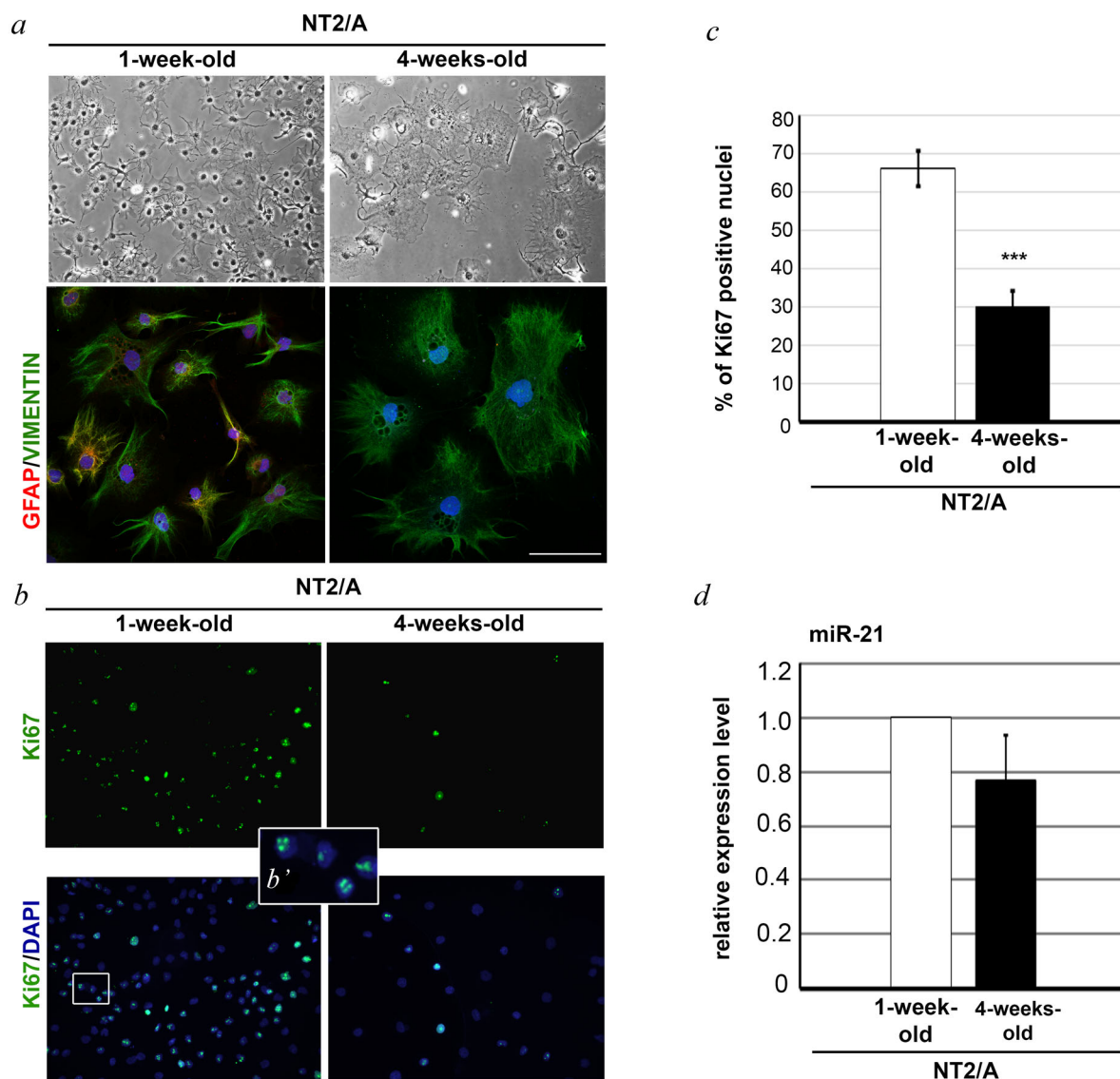


Рис. 3. *a* – Изображения, полученные с помощью фазово-контрастного микроскопа, демонстрируют морфологические различия между 1-недельными и 4-недельными клетками NT2/A (верхняя панель) при увеличении в 10 раз. Иммуноокрашивание с помощью антител против виментина (зеленый) и белка GFAP (красный) (нижняя панель). Клеточные ядра контрокрашены с помощью DAPI (синий). Шкала – 100 мкм. *b* – Определение экспрессии Ki-67 (зеленый) с помощью иммунофлуоресценции, увеличение в 20 раз. Выделенный квадратом участок панели *b* (слева) показан в увеличенном виде на *b'*. *c* – Статистический анализ клеток, иммунопозитивных в отношении Ki-67 в 1-недельных и 4-недельных культурах клеток NT2/A. Процент Ki-67-позитивных клеток рассчитывали относительно общего количества клеток, меченых DAPI (минимум 100 клеток). *d* – Относительный уровень экспрессии miR-21 в 4-недельных клетках NT2/A был рассчитан в сравнении с уровнем экспрессии в 1-недельной культуре клеток NT2/A, который был взят за единицу. *** $p \leq 0,001$

мость клеток снижалась на 60% и 40% для 1-недельных и 4-недельных клеток NT2/A соответственно (рис. 4, *b*). Затем мы оценивали экспрессию Ki-67 путем регистрации иммунофлуоресценции для определения влияния уровня экспрессии miR-21 на скорость пролиферации клеток NT2/A (рис. 4, *c*). Как показано на рис. 4, *d*, количество Ki-67-позитивных клеток снизилось примерно на 30% и 20% в 1-недель-

ных и 4-недельных культурах клеток NT2/A соответственно. Таким образом, обнаруженное снижение выживаемости клеток NT2/A вызвано – по крайней мере, частично – уменьшением скорости пролиферации клеток.

Снижение уровня экспрессии miR-21 индуцирует старение клеток NT2/A. Для определения того, сопровождалась ли остановка роста, наблюдаемая после трансдукции 1-недельных и

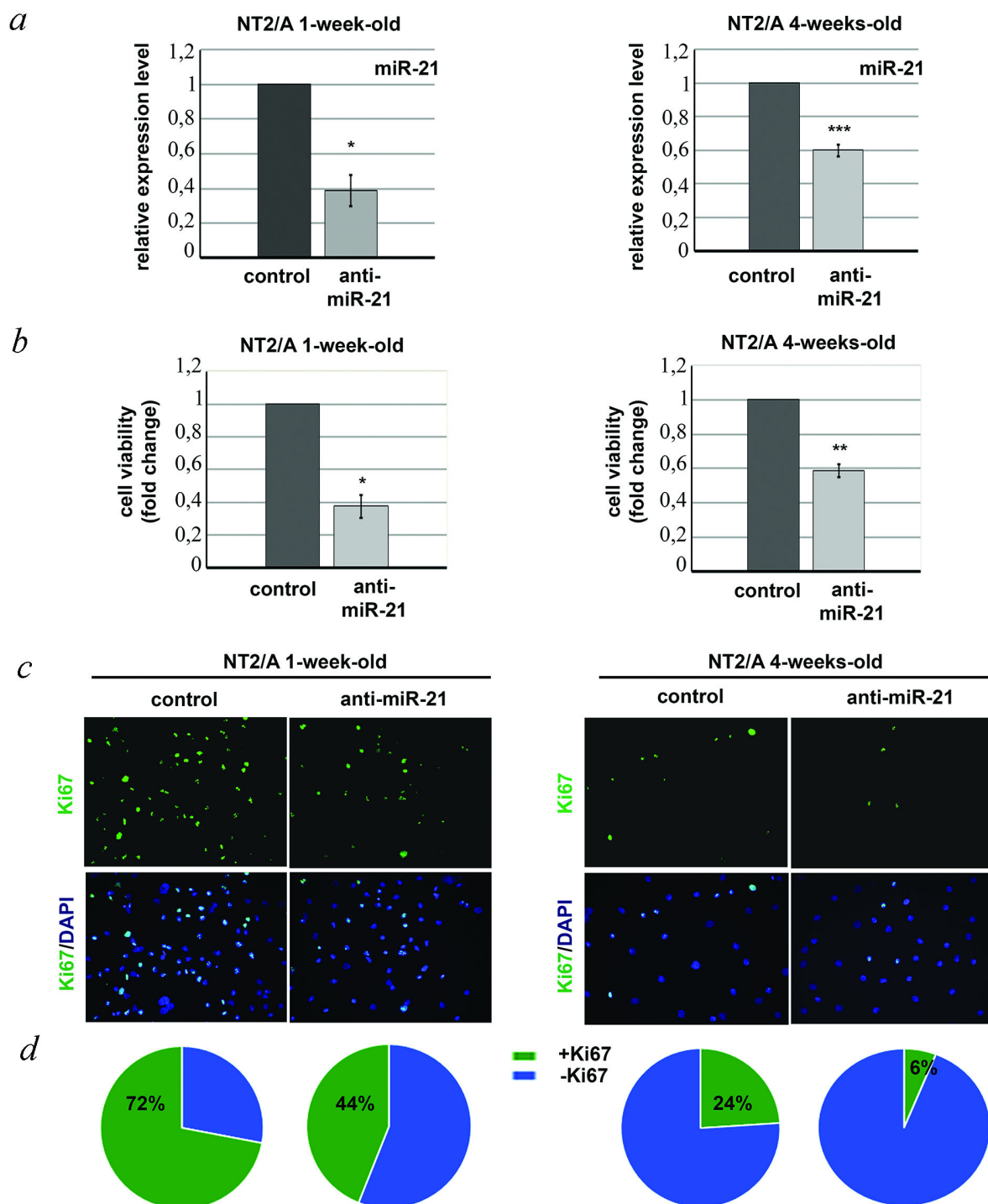


Рис. 4. *a* – Относительное снижение уровня экспрессии miR-21 в 1-недельных и 4-недельных клетках NT2/A после их трансдукции конструкцией anti-miR-21 было рассчитано относительно уровня экспрессии miR-21 в контроле (клетки, трансдуцированные пустым вектором), который был приравнен к единице. *b* – Относительные значения выживаемости 1-недельных и 4-недельных клеток NT2/A после трансдукции конструкцией anti-miR-21 рассчитывали относительно выживаемости клеток, трансдуцированных пустым вектором, которая была принята за единицу. *c* – Репрезентативные изображения иммуноокрашивания белка Ki-67 (зеленый) 1-недельных (панель слева) и 4-недельных (панель справа) клеток NT2/A, трансдуцированных конструкцией anti-miR-21 или пустым вектором (контроль). Ядра клеток были контрокрашены препаратом DAPI (синий), 20-кратное увеличение. *d* – Статистическая обработка Ki-67-иммунопозитивных 1-недельных и 4-недельных клеток NT2/A после трансдукции конструкцией anti-miR-21 или пустым вектором. Процент Ki-67-иммунопозитивных клеток рассчитывали относительно общего количества клеток, меченых DAPI (минимум 180 клеток). Данные получены из двух независимых экспериментов. * $p \leq 0,05$, ** $p \leq 0,01$, *** $p \leq 0,001$

4-недельных клеток NT2/A конструкцией anti-miR-21, изменениями уровней экспрессии ингибиторов клеточного цикла, мы проанализировали экспрессию *p21^{Waf1/Cip1}* и *TP53* (рис. 5, *a*, *b*). Уровни экспрессии обоих анализируемых ингибиторов клеточного цикла возрастали после трансдукции клеток anti-miR-21. Повышение уровня экспрессии *p21^{Waf1/Cip1}* и *TP53* было заметно как в 1-недельных, так и в 4-недельных куль-

турах клеток NT2/A, трансдуцированных anti-miR-21 (рис. 5, *a*). Повышенная экспрессия ингибиторов клеточного цикла p21 и p53, а также остановка роста клеток свидетельствуют об инициации клеточного старения [12].

Чтобы определить, влияет ли снижение уровня экспрессии miR-21 на процесс клеточного старения, мы проанализировали активность SA- β -gal в 1-недельных и 4-недельных клетках

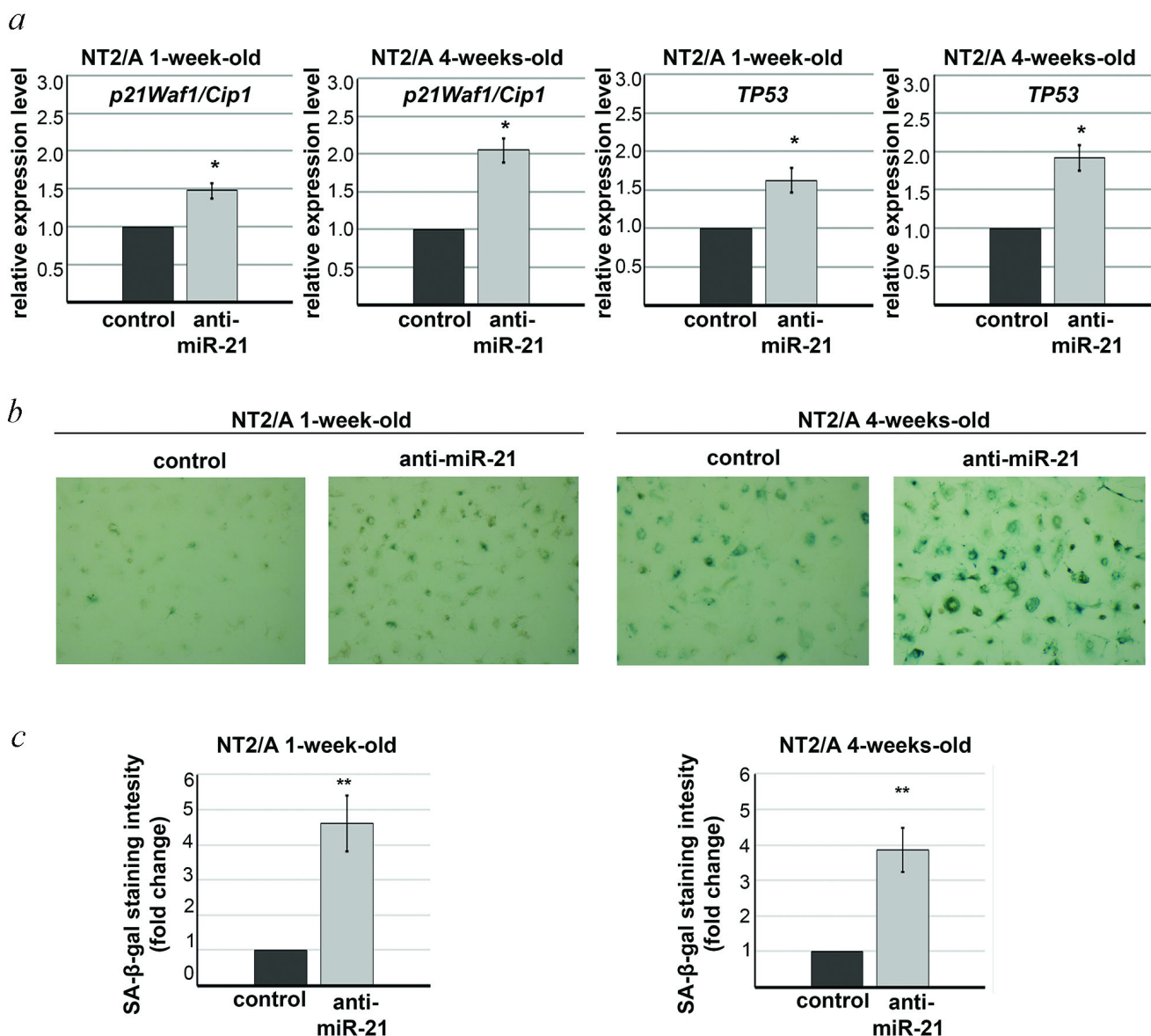


Рис. 5. *a* – Анализ экспрессии *p21^{Waf1/Cip1}* и *TP53* с помощью количественной ПЦР с обратной транскрипцией в 1-недельных и 4-недельных клетках NT2/A после их трансдукции конструкцией anti-miR-21. Относительные уровни экспрессии p21 и p53 в 1-недельных и 4-недельных клетках NT2/A после их трансдукции anti-miR-21 рассчитывали относительно уровня экспрессии p21 и p53 в контрольных клетках (трансдуцированных пустым вектором), который был принят за единицу. *b* – Репрезентативные изображения окрашивания SA- β -gal (зеленый) 1-недельных и 4-недельных клеток NT2/A, трансдуцированных anti-miR-21 или пустым вектором. *c* – Относительное увеличение интенсивности окрашивания SA- β -gal в 1-недельных и 4-недельных клетках NT2/A, трансдуцированных anti-miR-21, было рассчитано путём сравнения с интенсивностью окрашивания SA- β -gal в клетках, трансдуцированных пустым вектором, которая была приравнена к единице. * $p \leq 0,05$, ** $p \leq 0,01$

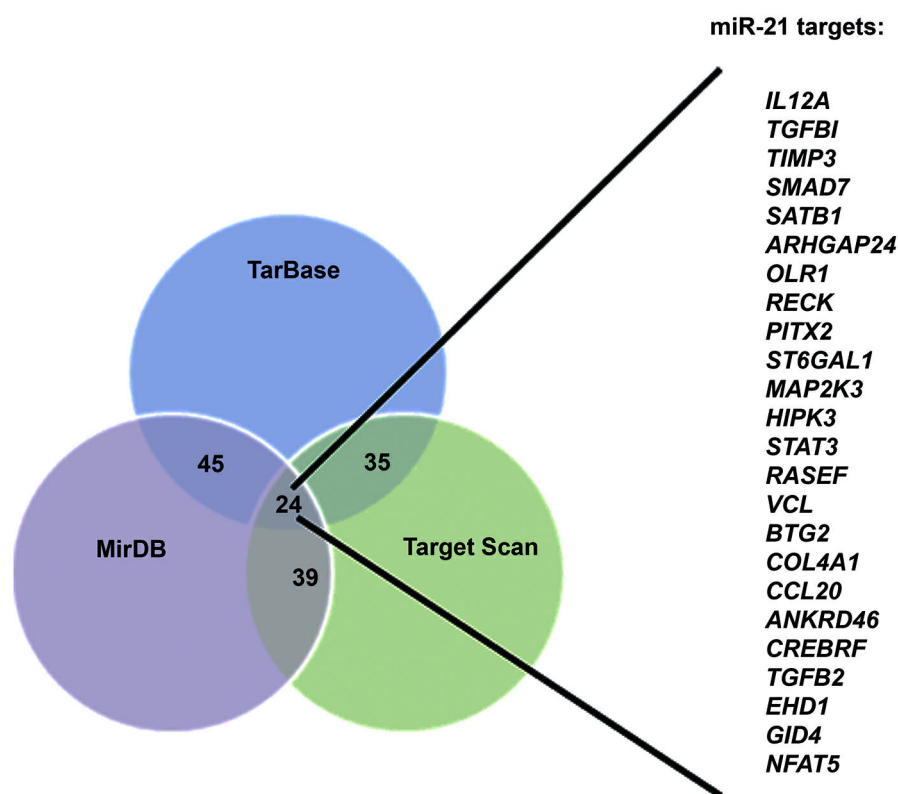


Рис. 6. Диаграмма Венна, показывающая, что предсказанные гены-мишени miR-21 характеризуются повышенной экспрессией в стареющих астроцитах [22] и выявляются всеми 3 алгоритмами – TargetScan, TarBase и MirDB. Показаны 24 гена, присутствующие в выдаче всех трех алгоритмов

NT2/A после их трансдукции конструкцией anti-miR-21. Во-первых, мы наблюдали, что количество стареющих клеток NT2/A увеличивалось в процессе их созревания (рис. 5, *b*, нижняя панель, сравнение контрольных/1-недельных и контрольных/4-недельных культур клеток NT2/A). Кроме того, было также обнаружено интенсивное окрашивание SA- β -gal как в 1-недельных, так и в 4-недельных клетках NT2/A, трансдуцированных anti-miR-21 (рис. 5, *b*, нижняя панель). Определение интенсивности окрашивания SA- β -gal продемонстрировало, что снижение уровня экспрессии miR-21 вызывает увеличение активности SA- β -gal в 1-недельных и 4-недельных клетках NT2/A в 4,6 и 3,8 раза соответственно в сравнении с клетками, трансдуцированными пустым вектором (рис. 5, *c*).

В целом, необратимая остановка клеточного роста в сочетании с повышенной экспрессией ингибиторов клеточного цикла p21 и p53 и повышенной активностью SA- β -gal свидетельствовали в пользу того, что снижение уровня экспрессии miR-21 вызывает старение как 1-недельных, так и 4-недельных клеток NT2/A.

Анализ *in silico* ассоциированных со старением генов, являющихся мишенями miR-21. Масштаб-

ный анализ результатов секвенирования РНК, проведенный Limbad et al. [22], выявил значительные изменения в транскриптом стареющих в результате воздействия облучения астроцитов. Было показано, что уровень экспрессии многих генов, играющих важную роль в нормальном функционировании астроцитов, снижен, в то время как уровень экспрессии многочисленных провоспалительных генов был, наоборот, повышен [22]. Чтобы выявить потенциальные мишени miR-21 среди генов с повышенной экспрессией, нами был проведен анализ *in silico* с использованием различных онлайн-сервисов для предсказания: TargetScan, TarBase и MirDB. Полученные нами результаты продемонстрировали, что многие гены с повышенной экспрессией в стареющих в результате облучения астроцитах были предсказаны в качестве мишеней miR-21 (Приложение, табл. S1). Среди них оказалось 24 гена, для которых предсказания всех онлайн-программ совпадали (рис. 6). Эти данные дали дополнительное подтверждение полученным нами ранее результатам, указывающим на miR-21 как потенциальный регулятор клеточного старения астроцитов.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Широкомасштабное профилирование экспрессии микроРНК в клетках NT2/D1 человека в процессе индуцированного РА перехода из предшественников в полностью дифференцированные нейрональные клетки продемонстрировало, что эта модельная система подходит для изучения специфических функций микроРНК в процессе развития нервной системы человека [23]. В соответствии с этими масштабными исследованиями экспрессии микроРНК нами было показано, что miR-219 и miR-30d являются специфичными для стадий предшественников нейронов при индуцированной РА дифференцировке клеток NT2/D1. Аналогичный вывод можно сделать для miR-941, специфичной для человека (рис. 2). Высокий уровень экспрессии miR-941 спустя 4 недели после обработки клеток NT2/D1 ретиноевой кислотой может быть связан с дифференцировкой клеток, т.к. было показано, что мишенями этой специфичной для человека микроРНК являются гены, вовлеченные в сигнальные пути, необходимые для клеточной дифференцировки [24]. Обнаруженные нами высокие уровни экспрессии miR-124 и miR-21 в образующихся из клеток NT2 нейронах и астроцитах соответственно (рис. 2) также соответствовали данным, опубликованным Smith et al. [23]. Полученные в указанной работе результаты свидетельствовали о высоких уровнях экспрессии этих микроРНК в NT2-дифференцированных клетках и соответствующих им первичных культурах клеток человека [23].

Клетки NT2/A продемонстрировали фенотипические изменения в процессе созревания в условиях *in vitro* (рис. 3), включая, в частности, наличие виментина даже в зрелых астроцитах, что соответствовало результатам предыдущего исследования [14]. Количество участвующих в клеточном цикле Ki-67-меченых клеток значительно снижалось по мере старения культур клеток NT2/A (рис. 3, *b*, *c*), что, согласно Sandhu et al. [14], обусловлено остановкой клеточного цикла в фазе G0/G1. И хотя эти клетки сохраняли способность к возобновлению пролиферации после повреждения [14], полученные нами результаты свидетельствуют о том, что снижение скорости роста культур NT2/A было также связано с индукцией процесса клеточного старения, ассоциированного с повышенной активностью SA- β -gal в 4-недельных культурах по сравнению с 1-недельными культурами клеток NT2/A (рис. 5, *b*). Сделанный нами вывод согласуется с тем, что культуры NT2/A обладают ограниченной продолжитель-

ностью жизни (от 6 до 10 пассажей), что было показано ранее в работе Sandhu et al. [14].

Роль miR-21 в головном мозге взрослого организма в основном рассматривалась в контексте поражения спинного мозга (SCI). Было высказано предположение, что указанная микроРНК может работать в качестве регулятора функционирования астроцитов, способствуя их восстановлению после SCI как *in vitro*, так и *in vivo* [6, 7]. В частности, показано, что повышение экспрессии miR-21 после SCI способствует пролиферации астроцитов и ингибированию их апоптоза [6]. В соответствии с этими данными нами было показано, что снижение уровня экспрессии miR-21 приводит к снижению пролиферации клеток NT2/A. Интересно, что данный эффект отмечался не только в 1-недельных культурах клеток NT2/A, состоящих преимущественно из митотически активных клеток, но также и в 4-недельных культурах, где большинство клеток уже достигли фазы покоя (рис. 4, *c*, *d*). Такая активность miR-21, способствующая пролиферации клеток, уже была описана во многих других клеточных контекстах, преимущественно в различных типах злокачественных опухолей, включая глиобластому [27, 28]. Таким образом, достаточно неожиданным является факт того, что повышенная экспрессия miR-21 также наблюдается в зрелых культурах клеток NT2/A (рис. 3, *d*), несмотря на то что количество клеток с нормальным клеточным циклом (cycling cells) значительно уменьшилось. Мы можем предположить, что астроциты должны поддерживать определенный уровень экспрессии miR-21 в процессе созревания, чтобы предотвратить преждевременное старение клеток. Действительно, остановка роста клеток, индуцированная снижением уровня экспрессии miR-21, сопровождалась повышением экспрессии *p21^{Waf1/Cip1}* и *TP53* (рис. 5, *a*). Повышение уровня экспрессии этих ингибиторов клеточного цикла, сопряженное с повышенной активностью SA- β -gal, являются четкими индикаторами того, что снижение экспрессии miR-21 индуцирует клеточное старение (рис. 5, *b*, *c*). По нашим сведениям, это первые данные, демонстрирующие связь между miR-21 и старением астроцитов. Сходные результаты были получены и на других клеточных моделях [29, 30]. Изменения базового уровня экспрессии miR-21 часто коррелируют с различными патологиями ЦНС, что наиболее ярко видно на примере глиобластомы [4]. Кроме того, показано, что уровень miR-21 в процессе старения существенно изменяется как в тканях, так и в крови, и ассоциируется с различными воспалительными процессами и возрастными

заболеваниями [8]. В целом, мы можем предположить, что поддержание базового уровня экспрессии miR-21 играет важную роль в поддержании нормальной физиологической активности астроцитов.

Ассоциированная с клеточным старением дисфункция астроцитов имеет серьезные последствия в контексте старения мозга и развития нейродегенеративных заболеваний [31]. Неблагоприятное воздействие сенесцентных астроцитов на свое микроокружение состоит в основном в приобретенном провоспалительном секреторном фенотипе [32]. Кроме того, описаны и другие изменения в астроцитах, вызванные клеточным старением, которые могут иметь отношение к их нейротоксичности. Так, снижение уровня калия и транспортеров глутамата с последующим снижением защиты нейронов может приводить к развитию нейродегенеративных заболеваний, в том числе болезни Альцгеймера и подобных типов деменции [22, 31, 33].

В нашей работе было выявлено *in silico* 24 гена, являющихся мишенями miR-21, которые, предположительно, связаны со старением (рис. 6). Также было показано, что в астроцитах человека повышается экспрессия некоторых из этих потенциальных генов-мишеней miR-21 (*TIMP3*, *TGFB1*, *IL12A*, *RECK*, *VCL*, *COL4A1* и *EHD1*) в процессе индуцированного окислительным стрессом клеточного старения [33]. Более того, для некоторых из указанных генов (*TIMP3*, *RECK*, *SMAD7*, *SATB1*, *PITX2*, *MAP2K3*, *BTG2*, *CCL20* и *ANKRD46*) была экспериментально подтверждена их роль в качестве непосредственных мишеней miR-21 в различных типах клеток [34–41]. Наши данные, указывающие на регуляторную роль miR-21 в процессе

старения астроцитов, также подтверждают полученные ранее результаты. Интересно отметить, что некоторые предсказанные мишени miR-21, представленные на рис. 6, включают гены, имеющие отношение к ассоциированному со старением секреторному фенотипу, среди них интерлейкин *IL12A*, цитокин *CCL20*, фактор ангиогенеза *TGFB* и ингибиторы металлопротеаз *TIMP3* и *RECK*. Тем не менее для исследования miR-21-ассоциированных механизмов, лежащих в основе старения астроцитов, необходимо проведение функционального анализа. Как уже обсуждалось ранее, сенесцентные астроциты ассоциированы с различными патологиями ЦНС, поэтому выявление ассоциированных с микроРНК механизмов, лежащих в основе процесса старения астроцитов, могут иметь практическое значение. Новые микроРНК-ассоциированные терапевтические стратегии могут предотвратить переход клеток в сенесцентное состояние и способствовать улучшению клинических исходов.

Финансирование. Настоящая работа была выполнена при поддержке Министерства образования, науки и развития технологий Республики Сербия (гранты № 451-03-68/2020-14/200042 и 451-03-9/2021-14/200042), программы IBRO/PERC InEurope Short Stay Grants и Сербской Академии наук и искусств (грант № 01-2021).

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Соблюдение этических норм. В настоящей статье не содержится описания исследований с участием людей или животных, выполненных кем-либо из авторов статьи.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Rajman, M., and Schratt, G. (2017) MicroRNAs in neural development: from master regulators to fine-tuners, *Development*, **144**, 2310-2322.
2. Qureshi, I. A., and Mehler, M. F. (2012) Emerging roles of non-coding RNAs in brain evolution, development, plasticity and disease, *Nat. Rev. Neurosci.*, **13**, 528-541.
3. Anastasov, N., Hofig, I., Vasconcellos, I. G., Rappl, K., Braselmann, H., et al. (2012) Radiation resistance due to high expression of miR-21 and G2/M checkpoint arrest in breast cancer cells, *Radiat. Oncol.*, **7**, 206.
4. Chan, J. A., Krichevsky, A. M., and Kosik, K. S. (2005) MicroRNA-21 is an antiapoptotic factor in human glioblastoma cells, *Cancer Res.*, **65**, 6029-6033.
5. Zhang, W. M., Zhang, Z. R., Yang, X. T., Zhang, Y. G., and Gao, Y. S. (2018) Overexpression of miR21 promotes neural stem cell proliferation and neural differentiation via the Wnt/betacatenin signaling pathway *in vitro*, *Mol. Med. Rep.*, **17**, 330-335.
6. Liu, R., Wang, W., Wang, S., Xie, W., Li, H., and Ning, B. (2018) microRNA-21 regulates astrocytic reaction post-acute phase of spinal cord injury through modulating TGF-beta signaling, *Aging (Albany NY)*, **10**, 1474-1488.
7. Bhalala, O. G., Pan, L., Sahni, V., McGuire, T. L., Gruner, K., et al. (2012) microRNA-21 regulates astrocytic response following spinal cord injury, *J. Neurosci.*, **32**, 17935-17947.
8. Olivieri, F., Prattichizzo, F., Giuliani, A., Maccacchione, G., Rippo, M. R., et al. (2021) miR-21 and miR-146a: the microRNAs of inflammaging and age-related diseases, *Ageing Res. Rev.*, **70**, 101374.
9. Verkhratsky, A., and Nedergaard, M. (2018) Physiology of astroglia, *Physiol. Rev.*, **98**, 239-389.

10. Meldolesi, J. (2020) Astrocytes: news about brain health and diseases, *Biomedicines*, **8**, 394, doi: 10.3390/biomedicines8100394.
11. Barreto, G. E., Gonzalez, J., Torres, Y., and Morales, L. (2011) Astrocytic-neuronal crosstalk: implications for neuroprotection from brain injury, *Neurosci. Res.*, **71**, 107-113.
12. Cohen, J., and Torres, C. (2019) Astrocyte senescence: evidence and significance, *Aging Cell*, **18**, e12937.
13. Pleasure, S. J., Page, C., and Lee, V. M. (1992) Pure, post-mitotic, polarized human neurons derived from NTera 2 cells provide a system for expressing exogenous proteins in terminally differentiated neurons, *J. Neurosci.*, **12**, 1802-1815.
14. Sandhu, J. K., Sikorska, M., and Walker, P. R. (2002) Characterization of astrocytes derived from human NTera-2/D1 embryonal carcinoma cells, *J. Neurosci. Res.*, **68**, 604-614.
15. Andrews, P. W. (1984) Retinoic acid induces neuronal differentiation of a cloned human embryonal carcinoma cell line *in vitro*, *Dev. Biol.*, **103**, 285-293.
16. Radulovic, V., Heider, T., Richter, S., Moertl, S., Atkinson, M. J., and Anastasov, N. (2017) Differential response of normal and transformed mammary epithelial cells to combined treatment of anti-miR-21 and radiation, *Int. J. Radiat. Biol.*, **93**, 361-372.
17. Popovic, J., Stanisavljevic, D., Schwirtlich, M., Klajn, A., Marjanovic, J., and Stevanovic, M. (2014) Expression analysis of SOX14 during retinoic acid induced neural differentiation of embryonal carcinoma cells and assessment of the effect of its ectopic expression on SOXB members in HeLa cells, *PLoS One*, **9**, e91852.
18. Kramer, M. F. (2011) Stem-loop RT-qPCR for miRNAs, *Curr. Protoc. Mol. Biol.*, **Chapter 15**, Unit 15.10, doi: 10.1002/0471142727.mb1510s95.
19. Agarwal, V., Bell, G. W., Nam, J. W., and Bartel, D. P. (2015) Predicting effective microRNA target sites in mammalian mRNAs, *Elife*, **4**, e05005, doi: 10.7554/eLife.05005.
20. Karagkouni, D., Paraskevopoulou, M. D., Chatzopoulos, S., Vlachos, I. S., Tastsoglou, S., et al. (2018) DIANA-TarBase v8: a decade-long collection of experimentally supported miRNA-gene interactions, *Nucleic Acids Res.*, **46**, D239-D245.
21. Liu, W., and Wang, X. (2019) Prediction of functional microRNA targets by integrative modeling of microRNA binding and target expression data, *Genome Biol.*, **20**, 18.
22. Limbad, C., Oron, T. R., Alimirah, F., Davalos, A. R., Tracy, T. E., et al. (2020) Astrocyte senescence promotes glutamate toxicity in cortical neurons, *PLoS One*, **15**, e0227887.
23. Smith, B., Treadwell, J., Zhang, D., Ly, D., McKinnell, I., et al. (2010) Large-scale expression analysis reveals distinct microRNA profiles at different stages of human neurodevelopment, *PLoS One*, **5**, e11109.
24. Hu, H. Y., He, L., Fominykh, K., Yan, Z., Guo, S., et al. (2012) Evolution of the human-specific microRNA miR-941, *Nat. Commun.*, **3**, 1145.
25. Cheng, L. C., Pastrana, E., Tavazoie, M., and Doetsch, F. (2009) miR-124 regulates adult neurogenesis in the subventricular zone stem cell niche, *Nat. Neurosci.*, **12**, 399-408.
26. Kawahara, H., Imai, T., and Okano, H. (2012) MicroRNAs in neural stem cells and neurogenesis, *Front. Neurosci.*, **6**, 30.
27. Gaur, A. B., Holbeck, S. L., Colburn, N. H., and Israel, M. A. (2011) Downregulation of Pdc4 by miR-21 facilitates glioblastoma proliferation *in vivo*, *Neuro Oncol.*, **13**, 580-590.
28. Lou, Y., Yang, X., Wang, F., Cui, Z., and Huang, Y. (2010) MicroRNA-21 promotes the cell proliferation, invasion and migration abilities in ovarian epithelial carcinomas through inhibiting the expression of PTEN protein, *Int. J. Mol. Med.*, **26**, 819-827.
29. Savickiene, J., Baronaite, S., Zentelyte, A., Treigyte, G., and Navakauskiene, R. (2016) Senescence-associated molecular and epigenetic alterations in mesenchymal stem cell cultures from amniotic fluid of normal and fetus-affected pregnancy, *Stem Cells Int.*, **2016**, 2019498.
30. Marasa, B. S., Srikantan, S., Martindale, J. L., Kim, M. M., Lee, E. K., et al. (2010) MicroRNA profiling in human diploid fibroblasts uncovers miR-519 role in replicative senescence, *Aging (Albany NY)*, **2**, 333-343.
31. Baker, D. J., and Petersen, R. C. (2018) Cellular senescence in brain aging and neurodegenerative diseases: evidence and perspectives, *J. Clin. Invest.*, **128**, 1208-1216.
32. Chinta, S. J., Woods, G., Rane, A., Demaria, M., Campisi, J., and Andersen, J. K. (2015) Cellular senescence and the aging brain, *Exp. Gerontol.*, **68**, 3-7.
33. Crowe, E. P., Tuzer, F., Gregory, B. D., Donahue, G., Gosai, S. J., et al. (2016) Changes in the transcriptome of human astrocytes accompanying oxidative stress-induced senescence, *Front. Aging Neurosci.*, **8**, 208.
34. Ahmed, M. I., Pickup, M. E., Rimmer, A. G., Alam, M., Mardaryev, A. N., et al. (2019) Interplay of microRNA-21 and SATB1 in epidermal keratinocytes during skin aging, *J. Invest. Dermatol.*, **139**, 2538-2542 e2532.
35. Cui, M., Zhang, M., Liu, H. F., and Wang, J. P. (2017) Effects of microRNA-21 targeting PITX2 on proliferation and apoptosis of pituitary tumor cells, *Eur. Rev. Med. Pharmacol. Sci.*, **21**, 2995-3004.
36. Gabriely, G., Wurdinger, T., Kesari, S., Esau, C. C., Burchard, J., et al. (2008) MicroRNA 21 promotes glioma invasion by targeting matrix metalloproteinase regulators, *Mol. Cell. Biol.*, **28**, 5369-5380.
37. Liu, M., Wu, H., Liu, T., Li, Y., Wang, F., et al. (2009) Regulation of the cell cycle gene, BTG2, by miR-21 in human laryngeal carcinoma, *Cell Res.*, **19**, 828-837.
38. Marts, L. T., Green, D. E., Mills, S. T., Murphy, T., and Sueblinvong, V. (2017) MiR-21-mediated suppression of Smad7 induces TGFβ1 and can be inhibited by activation of Nrf2 in alcohol-treated lung fibroblasts, *Alcohol Clin. Exp. Res.*, **41**, 1875-1885.
39. Yan, L. X., Wu, Q. N., Zhang, Y., Li, Y. Y., Liao, D. Z., et al. (2011) Knockdown of miR-21 in human breast cancer cell lines inhibits proliferation, *in vitro* migration and *in vivo* tumor growth, *Breast Cancer Res.*, **13**, R2.
40. Yao, T., and Lin, Z. (2012) MiR-21 is involved in cervical squamous cell tumorigenesis and regulates CCL20, *Biochim. Biophys. Acta*, **1822**, 248-260.
41. Yao, X., Wang, Y., and Zhang, D. (2018) microRNA-21 Confers Neuroprotection against cerebral ischemia-reperfusion injury and alleviates blood-brain barrier disruption in rats via the MAPK signaling pathway, *J. Mol. Neurosci.*, **65**, 43-53.

INHIBITION OF miR-21 PROMOTES CELLULAR SENESENCE IN NT2-DERIVED ASTROCYTES

Vanda Balint¹, Danijela Stanisavljevic-Ninkovic¹, Natasa Anastasov², Stefan Lazic¹,
Natasa Kovacevic-Grujicic¹, Milena Stevanovic^{1,3,4}, and Andrijana Lazic^{1*}

¹ *Laboratory for Human Molecular Genetics, Institute of Molecular Genetics and Genetic Engineering,
University of Belgrade, 11042 Belgrade, Serbia; e-mail: andrijanak@imgge.bg.ac.rs*

² *Helmholtz Zentrum München, German Research Center for Environmental Health,
Institute of Biological and Medical Imaging, 85764 Neuherberg, Germany*

³ *Faculty of Biology, University of Belgrade, 11158 Belgrade, Serbia*

⁴ *Serbian Academy of Sciences and Arts, 11000 Belgrade, Serbia*

Astrocytes are the main homeostatic cells in the central nervous system (CNS). They provide mechanical, metabolic and trophic support to neurons and disruption of their physiological roles or the acquisition of senescence-associated phenotype can contribute to the CNS dysfunction and pathology. However, molecular mechanisms underlying the complex physiology of astrocytes are insufficiently explored. Recent studies have shown that miRNAs are involved in the regulation of astrocyte function through different mechanisms. Although miR-21 has been reported as an astrocytic miRNA with an important role in astrogliosis, no link between this miRNA and cellular senescence of astrocytes has been reported. To address the role of miR-21 in astrocytes, with special focus on cellular senescence, we used NT2-derived astrocytes (NT2/A). We down-regulated miR-21 expression in both immature and mature NT2/A by antisense technology. Our results revealed that miR-21 down-regulation induced growth arrest and premature cellular senescence, indicated by senescence hallmarks including increased expression of cell cycle inhibitors p21 and p53 and augmented senescence-associated β -galactosidase activity. Additionally, our *in silico* analyses revealed that many of the genes, previously shown to be up-regulated in irradiation-induced senescent astrocytes, were predicted miR-21 targets. Taken together, our results point to miR-21 as a potential regulator of astrocyte senescence. To the best of our knowledge, these are the first data showing the link between miR-21 and cellular senescence of astrocytes. Since senescent astrocytes are associated with different CNS pathologies, development of novel therapeutic strategies based on miRNA manipulation could prevent the senescent state and may improve the physiological outcome.

Keywords: miR-21, astrocytes, NT2/D1, senescence

УДК 577.175.6

ЦИТОТОКСИЧЕСКИЕ ЭФФЕКТЫ СЕЛЕКТИВНЫХ ЛИГАНДОВ МЕМБРАННЫХ РЕЦЕПТОРОВ ПРОГЕСТЕРОНА В КЛЕТКАХ ВхРС3 АДЕНОКАРЦИНОМЫ ПОДЖЕЛУДОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ ЧЕЛОВЕКА

© 2021 А.И. Гончаров¹, И.С. Левина², В.Л. Шляпина¹, И.А. Морозов³, П.М. Рубцов³,
И.В. Заварзин², О.В. Смирнова¹, Т.А. Щелкунова^{1*}

¹ Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, биологический факультет,
119991 Москва, Россия; электронная почта: schelkunova-t@mail.ru

² Институт органической химии имени Н.Д. Зелинского, 119991 Москва, Россия

³ Институт молекулярной биологии имени В.А. Энгельгардта, 119991 Москва, Россия

Поступила в редакцию 31.08.2021

После доработки 23.09.2021

Принята к публикации 23.09.2021

Прогестерон и его синтетические аналоги оказывают свое действие на клетки через разные типы рецепторов, влияя на процессы пролиферации и апоптоза. Они действуют через ядерные рецепторы и малоизученные мембранные рецепторы (mPRs) семейства адипонектиновых и прогестинных рецепторов (PAQR). Нами были выявлены два селективных лиганда mPRs, активирующие избирательно только этот тип рецепторов — 19-гидроксипрегн-4-ен-20-он (LS-01) и 19-гидроксипрегн-5 β -прегн-3-ен-20-он (LS-02). Главной целью этой работы было исследование их действия на процессы пролиферации и гибели опухолевых клеток ВхРС3 аденокарциномы поджелудочной железы человека, а также изучение участия двух киназ, p38 MAPK и JNK, в сигнальных каскадах, активируемых прогестинами через mPRs. Показано, что прогестерон и соединение LS-01 достоверно ($p < 0,05$) снижают жизнеспособность клеток ВхРС3, при этом посредником их действия является JNK. Выявлены мишени этих двух стероидов — ими являются гены, кодирующие белки Ki67, циклина D1, PCNA и p21. Установлено, что прогестерон и соединение LS-01 достоверно ($p < 0,05$) стимулируют процесс фрагментации ДНК, приводя к усилению гибели клеток. Главным посредником в этом является p38 MAPK. Выявленной мишенью для обоих стероидов является ген, кодирующий белок BCL2A1. Соединение LS-02 оказывает достоверное действие ($p < 0,05$) на проницаемость мембран и экспонирование на наружной мембране фосфатидилсерина, что также приводит к усилению гибели клеток. Показано, что посредниками этого действия являются обе киназы — JNK и p38 MAPK. Мишенью соединения LS-02 являются гены, кодирующие белки HRK, каспазу 9 и DAPK.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: прогестерон, селективные лиганды, пролиферация, апоптоз, экспрессия, ядерный рецептор, мембранные рецепторы прогестерона.

DOI: 10.31857/S0320972521110087

ВВЕДЕНИЕ

Прогестерон (прегн-4-ен-3,20-дион, P4) оказывает разнонаправленное действие на пролиферацию и апоптотическую гибель клеток в зависимости от их фенотипа и рецепторного

состава. Как все стероидные гормоны, он может действовать через свои ядерные рецепторы, являющиеся транскрипционными факторами, активируемыми лигандами (nPRs). Также P4 может оказывать эффекты через обнаруженные значительно позднее мембранные рецепторы (mPRs), относящиеся к семейству PAQR-адипонектиновых и прогестинных рецепторов пяти субтипов [1–2]. Действуя на разные типы клеток, P4 и его синтетические аналоги способны как стимулировать пролиферативные процессы, так и наоборот, подавлять их [3]. Такие же разнонаправленные эффекты эти стероиды имеют на выживаемость опухолевых клеток [4]. Роль мембранных рецепторов в этих процессах мало изучена. Исследование их функции затруднено тем, что эти рецепторы часто локализуются в тех же клетках, что и nPRs. Экспрессия mPRs наб-

Принятые сокращения: циклин D1 — активатор циклин-зависимых протеинкиназ; DAPK — протеинкиназа 1, ассоциированная со смертью (Death-associated protein kinase 1); FAS — Fas-рецептор или апоптотический антиген 1 (Fas cell surface death receptor); GPCRs — рецепторы, сопряженные с G-белками (G protein coupled receptors); HRK — белок, взаимодействующий с BCL2 (Harakiri); Ki67 — маркер пролиферации; mPRs — мембранные рецепторы прогестерона; nPRs — ядерные рецепторы прогестерона; PCNA — ядерный антиген пролиферирующих клеток; P4 — прогестерон; p21 — ингибитор 1A циклин-зависимой киназы; p27 — ингибитор 1B циклин-зависимой киназы.

* Адресат для корреспонденции.

людается как в нормальных тканях, так и в раковых клетках. Исследования показывают, что прогестины через mPRs стимулируют процесс канцерогенеза в одних линиях клеток рака молочной железы [5–7], но ингибируют пролиферацию и метастазирование других линий клеток этого органа [8–9]. Прогестины способствуют миграции, инвазии и пролиферативной активности клеток глиобластомы человека через mPR α [10], но ингибируют процесс канцерогенеза в опухолевых клетках рака яичников и легких — также через активацию mPRs [11, 12]. Таким образом, через эти рецепторы P4 влияет на процессы, которые играют, по-видимому, важную роль в прогрессии опухолей.

Ранее в нашей работе было показано, что P4 ингибирует пролиферацию клеток VxPC3 аденокарциномы поджелудочной железы человека, действуя через свои мембранные рецепторы [13]. Экспрессии генов классических ядерных рецепторов прогестерона в этих клетках обнаружено не было, в то время как экспрессия генов mPRs, преимущественно субтипов α и γ , наблюдалась на самом высоком уровне среди 16 изученных линий опухолевых клеток человека, достигая 270–283% от уровня мРНК GAPDH. Изучение белкового состава рецепторов прогестерона методом вестерн-блоттинга подтвердило эти выводы [13]. Самая низкая экспрессия mPRs наблюдалась в клеточной линии LNCaP аденокарциномы простаты, где уровни мРНК mPRs субтипов α , β и γ не превышали 2% от уровня GAPDH, причем мРНК nPRs в них также не была обнаружена [13]. Максимальный эффект подавления пролиферативной активности клеток VxPC3 прогестероном наблюдался через 72 ч инкубации с гормоном. При изучении лигандной специфичности сродства серии синтезированных прогестинов к mPRs в сравнении с классическими рецепторами прогестерона нами были выявлены два селективных лиганда мембранных рецепторов, практически не взаимодействующие с nPRs. Соединения 19-гидроксипрегн-4-ен-20-он (LS-01) и 19-гидрокси-5 β -прегн-3-ен-20-он (LS-02), формулы которых опубликованы ранее [14, 15], имеют относительную конкурентную активность по отношению к mPRs, равную в среднем 10% и 24% от активности прогестерона соответственно [14, 15]. Эффекты селективных лигандов mPRs были изучены в иммунных клетках [16]. В данной работе мы исследовали действие этих соединений на пролиферацию и гибель опухолевых клеток VxPC3 в сравнении с эффектами P4, а также участие p38 MAPK и JNK в этих процессах.

Как было показано в ряде работ, посредниками действия P4 при активации mPRs могут

быть разные сигнальные каскады: ERK1/2 (p42/44 MAPK) [2, 5, 17–19], стимуляция PI3K/Akt [5–7, 10, 18–20], подавление активности той же PI3K/Akt [21, 22], p38 MAPK [11, 23, 24], JNK1/2 [11, 23], Src [8, 10], MEK1/2 и PKA [25], TGF β 1 [26] и другие [8, 22]. При активации ERK1/2 и PI3K/Akt наблюдалось, как правило, усиление пролиферации клеток и ингибирование их гибели. Противоположный эффект проявлялся при активации через mPRs сигнального каскада p38 MAPK и JNK1/2 [11, 23]. Поскольку прогестерон путем действия через эти рецепторы оказывал антипролиферативный эффект на клетки VxPC3, мы исследовали роль p38 MAPK и JNK в сигнальных путях, активируемых при взаимодействии гормонов с mPRs. Для этого мы использовали ингибиторы SB203580 и SP600125, блокирующие работу этих двух ферментов, и оценивали фосфорилирование последних при обработке клеток P4 и селективными лигандами mPRs — LS-01 и LS-02.

При изучении механизма действия mPRs важную роль играет топология этих белков, особенно расположение С-концевого участка рецепторов по отношению к мембране. Существуют данные, позволяющие отнести mPRs к семейству рецепторов, связанных с G-белками, характеризующимися внутриклеточным расположением С-концевого участка [24, 27, 28]. Тем не менее с использованием биоинформатических алгоритмов было предсказано, что С-конец мембранных рецепторов прогестерона расположен вне клетки [29], что в дальнейшем было показано экспериментально для одного из субтипов mPRs [30]. Поскольку топология изучаемых белков является предметом разногласий [17, 27, 31], мы изучили взаимодействие клеток VxPC3 с антителами к внутреннему и С-концевому участку mPRs трех субтипов для дополнительного подтверждения экспрессии белков и определения локализации их С-доменов.

Связывание P4 с mPRs имеет сродство примерно в 5–30 раз более низкое по сравнению с nPRs [13, 14, 27]. Считается, что через эти рецепторы прогестерон действует в высоких физиологических концентрациях, наблюдаемых при беременности или локально — в местах синтеза этого стероида. Поэтому в работе мы использовали высокие физиологические и фармакологические концентрации прогестинов, от 1 до 20 мкМ, для наилучшего выявления эффектов, опосредуемых мембранными рецепторами. Показано, что P4 в концентрациях 20–80 мкМ не влиял на жизнеспособность здоровых фибробластов человека и клеток первичной культуры кортикальных нейронов крысы [32, 33]. Кроме того, подобные концентрации прогестерона

наблюдались в сыворотке животных при его введении, при этом они не страдали от токсических эффектов, которые оценивали по выживаемости, активности животных и изменению массы тела [32].

Таким образом, главной целью этой работы было изучение действия селективных лигандов mPRs LS-01 и LS-02 в сравнении с эффектами P4 на пролиферацию и апоптотическую гибель клеток ВхРС3 аденокарциномы поджелудочной железы человека с высоким содержанием мембранных рецепторов. Для этого мы исследовали:

1) наличие белков mPRs в этих клетках методом, отличным от использованного нами ранее [13];

2) влияние P4, LS-01 и LS-02 на: а) жизнеспособность клеток ВхРС3 с использованием клеток LNCaP в качестве негативного контроля; б) фрагментацию ядерной ДНК, экспонирование фосфатидилсерина на наружной мембране клеток и проницаемость мембран клеток для йодистого пропидия; в) экспрессию генов факторов, связанных с пролиферацией и процессами апоптоза;

3) влияние P4, LS-01 и LS-02 на активирующее фосфорилирование p38 MAPK и JNK. Эксперименты проводили в отсутствие и в присутствии ингибиторов p38 MAPK и JNK для исследования роли последних в опосредовании эффектов P4 и селективных лигандов mPRs на изучаемые процессы.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Материалы. Все реактивы, среды и сыворотки были произведены компаниями «HyClone» (США), «Gibco» (США), «ПанЭко» (РФ), «Sigma-Aldrich» (США), «Invitrogen» (США), «Promega» (США), «Синтол» (РФ), «Biological Industries» (США), «Thermo Scientific» (США), «GE Healthcare» (Великобритания), «SelleckChem» (США). В работе были использованы следующие антитела: ab75508, ab123693, ab79517, goat anti-rabbit IgG H&L (Alexa Fluor 488) ab150077 «Abcam» (США), Phospho-p38 MAPK (Thr180, Tyr182) S.417.1 «Invitrogen», Anti-JNK antibody SAB4200176, monoclonal anti-JNK, activated (diphosphorylated JNK) J4750, Anti-p38 MAPK antibody SAB4500490, Anti-GAPDH antibody G9545 «Sigma-Aldrich». Прогестерон ($\geq 99\%$) приобретен у компании «Sigma-Aldrich». 19-Гидроксипрегн-4-ен-20-он (LS-01) и 19-гидроксипрегн-3-ен-20-он (LS-02) были синтезированы как описано ранее [14]. Клетки LNCaP (карциномы простаты) и ВхРС3 (аденокарциномы

поджелудочной железы) человека были получены из Американской коллекции типовых культур (ATCC).

Клеточные культуры. Клеточные линии культивировали в стандартных условиях при 37 °С в инкубаторе с 5% CO₂. Клетки ВхРС3 и LNCaP выращивали в среде RPMI-1640, в которую были добавлены 10% фетальной бычьей сыворотки (FBS) и 1× (однократный) раствор смеси антибиотика и антимикотика. Четвертый пассаж культур после размораживания переносили в среду, не содержащую фенолового красного, в которую были добавлены 10% фетальной бычьей сыворотки, обработанной декстран-покрытым углем (DFBS), и антибиотики. После трех пассажей в среде, не содержащей стероиды, клетки использовали для проведения ХТТ-теста, анализа TUNEL, анализа связывания аннексина V, экстракции РНК и иммуноблоттинга.

Изучение экспрессии mPRs на поверхности клеток ВхРС3. Клетки ВхРС3 выращивали в среде с феноловым красным, снимали раствором трипсина, переносили в пробирки Eppendorf (200 000 клеток/пробирка) и осаждали центрифугированием (300 g, 5 мин, 20 °С). Клетки фиксировали в 3,5%-ном растворе параформальдегида в PBS в течение 10 мин; часть клеток не фиксировали. Промывку клеток производили трижды, центрифугируя и суспендируя в PBS с 0,1% Tween 20. К осадку клеток добавляли блокирующий буфер (3,5% глицин в 1% BSA–PBS–0,1% Tween 20) и инкубировали 30 мин при комнатной температуре на шейкере при 150 об./мин. Затем клетки промывали раствором 1% BSA–PBS–0,1% Tween 20. После этого осадок клеток обрабатывали разведенными в 500 раз антителами к mPR α (ab75508), разведенными в 100 раз антителами к mPR β (ab123693) или разведенными в 500 раз антителами к mPR γ (ab79517). Ранее мы использовали те же самые антитела для иммуноблоттинга и выявляли с их помощью белки ожидаемого молекулярного веса [13]. Для контроля на специфическое окрашивание использовали клетки без обработки первичными антителами в 1% BSA–PBS–0,1% Tween 20. Обработку клеток первичными антителами проводили 60 мин при 150 об./мин и 20–22 °С, отмывали и обрабатывали раствором вторичных антител, разведенных в 500 раз (Alexa Fluor 488, ab150077), в течение 60 мин при 150 об./мин и 20–22 °С. Контрольные клетки также обрабатывали вторичными антителами. После инкубации клетки трижды отмывали в PBS–0,1% Tween 20. Полученный осадок клеток суспендировали в растворе PBS и использовали для определения интенсивности флуоресцентного окрашивания Alexa Fluor 488 (канал

«FITC») на проточном цитофлуориметре (LSRFortessa, «BD Biosciences», США).

Обработка гормонами и ингибиторами киназ. Для инкубации со стероидами использовали третий пассаж клеток ВхРС3 или LNCaP в среде RPMI-1640 без фенолового красного с добавками, описанными выше. Опухолевые клетки помещали в чашки Петри для культивирования или в 6/24/96-луночные планшеты и выращивали до 70% конфлюэнтности. Затем добавляли свежую среду без фенолового красного, содержащую стероиды или растворитель этанол (0,2% объема среды). Клетки подвергали воздействию различных концентраций прогестерона и селективных лигандов mPR (1, 5, 20 мкМ) в течение 48 или 72 ч. При работе с ингибиторами p38 MAPK и JNK соединения SB203580 и SP600125 растворяли в диметилсульфоксиде (ДМСО), разводили в среде и добавляли в лунки до конечной концентрации 15 и 2,5 мкМ соответственно. Используемые концентрации были подобраны в предварительно проведенных экспериментах. Ингибиторы добавляли как к клеткам, инкубируемым со стероидами, так и к контрольным пробам с этанолом. После окончания инкубации культуральный супернатант удаляли, клетки использовали для проведения экспериментов.

ХТТ-тест. Жизнеспособность клеток оценивалась с помощью ХТТ-теста. Клетки ВхРС3 и LNCaP пересеивали в 96-луночный планшет по 10–13 тыс. клеток на лунку и оставляли на ночь при 37 °С для прикрепления к поверхности, затем клетки обрабатывали прогестероном или соединениями LS-01 и LS-02 в разных концентрациях в отсутствие или в присутствии ингибиторов, как описано выше. Затем в лунки с объемом среды 100 мкл добавляли по 50 мкл маркировочной смеси 2,3-бис-(2-метокси-4-нитро-5-сульфофенил)-2Н-тетразолиум-5-карбоксанилида (ХТТ) на лунку и инкубировали в течение 3 ч при 37 °С и 5% CO₂. Оптическую плотность образцов измеряли при 450 и 620 нм с использованием планшетного спектрофотометра (Multiscan EX «Thermo Electron Corporation», США).

TUNEL-тест. Клетки ВхРС3 высевали на 6-луночный планшет по 800 тыс. клеток на лунку, через сутки их обрабатывали гормонами в отсутствие или в присутствии ингибиторов, как описано выше. Анализ TUNEL проводили в соответствии с инструкциями производителя по протоколу для TUNEL Alexa Fluor® («Invitrogen») с использованием набора APO-BrdU™ TUNEL Assay Kit с Alexa Fluor® 488 Anti-BrdU-A23210 («Invitrogen»). Количество апоптотических клеток подсчитывали методом точечной цитометрии на LSRFortessa.

Анализ клеток, окрашенных конъюгатом Annexin V–FITC. Клетки высевали на 24-луночный планшет (из расчета 60 тыс. клеток на лунку). На следующий день производили обработку клеток исследуемыми стероидами в отсутствие и на фоне ингибиторов p38 и JNK, как описано выше. После окончания инкубации клетки снимали раствором трипсина и переносили в пробирки. Для определения апоптотических и некротических клеток использовали набор Annexin V–FITC conjugate (A13199, «Invitrogen»). Определение производили согласно рекомендациям производителя. Интенсивность флуоресцентного окрашивания клеток анализировали на проточном цитофлуориметре LSRFortessa, используя каналы «FITC» и «PerCP-cy5-5 A».

Измерение содержания мРНК. Клетки ВхРС3 обрабатывали гормонами на фоне или в отсутствие ингибиторов, как описано выше. Затем тотальную РНК экстрагировали из лизированных клеток с использованием реагента TRIzol («Invitrogen»), после чего на ней синтезировали кДНК с использованием набора для обратной транскрипции ImProm-IT™ Reverse Transcription System («Promega», США), следуя инструкциям производителя. Далее кДНК амплифицировали с помощью ПЦР в реальном времени на приборе Applied Biosystems 7500 («Applied Biosystems», США) с использованием набора реагентов, включающего интеркалирующие красители SYBR Green I и ROX в соответствии с рекомендациями производителя. Используемые для ПЦР специфические праймеры приведены в таблице в Приложении. Последовательности праймеров были выбраны с помощью программ Beacon Designer 7.51 (www.PremierBiosoft.com) и Primer designing tool (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>) и синтезированы в «Синтол». Уровень экспрессии мРНК изучаемых генов нормировали на уровень мРНК референсного гена («домашнего хозяйства») GAPDH (глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназы), а затем – на контрольный образец для относительного количественного определения с использованием метода ΔΔCt. Подробности описаны ранее [34].

Иммуноблоттинг. В этих экспериментах клетки ВхРС3 инкубировали с различными концентрациями прогестерона и селективных лигандов mPRs (0, 1, 5, 20 мкМ) в течение 40 мин. Лизаты клеток готовили с помощью реагента для лизиса клеток (CellLytic™ M, C2978, «Sigma»), дополненного ингибитором протеаз и фосфатаз (MS-SAFE Protease and Phosphatase inhibitor, «Sigma»). Концентрацию белка определяли по методу Брэдфорд. Белки лизатов кле-

ток (20 мкг) разделяли электрофорезом в SDS-полиакриламидном геле и переносили на нитроцеллюлозные мембраны для блоттинга («GE Healthcare Life Sciences», Германия) в течение 1 ч. Затем мембраны обрабатывали в течение 1 ч блокирующим буфером — PBS, содержащим 0,1% Tween 20 и 2% блокирующего агента (ECL Advance Blocking Agent, «GE Healthcare Life Sciences»), и инкубировали с первичными антителами к фосфо-p38 MAPK (Thr180, Tyr182), p38 MAPK, активированной JNK (Thr183, Tyr185-дифосфорилированной JNK), JNK или GAPDH в течение ночи при 4 °C. После этого мембраны промывали физиологическим раствором на основе Tris-буфера, содержащим 0,1% Tween 20, и инкубировали с вторичными антителами, конъюгированными с пероксидазой хрена («GE Healthcare Life Sciences», Великобритания) в течение 1 ч при комнатной температуре, затем опять промывали. Сигналы регистрировали с помощью реагента ECL SuperSignal™ West Femto Maximum Sensitivity Substrate («Thermo Scientific») на приборе ChemiDoc MP system («Bio-Rad», США).

Статистический анализ. Результаты измерений представлены как среднее $\pm$ стандартное отклонение. Для статистического анализа использовали программу GraphPad Prism 6.01 («GraphPad Software», США). Данные проанализированы при помощи однофакторного дисперсионного анализа (one-way ANOVA) с использованием критерия Даннетта для множественных сравнений (Dunnett's multiple comparisons test). Различия считали достоверными при $p < 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

Выявление белков mPRs в клетках VxPC3 с помощью цитофлуориметрии с использованием антител к внутреннему и С-концевым участкам рецепторных белков α , β и γ субтипов. Для выявления mPR α были использованы первичные поликлональные антитела (АТ) ab75508, выработанные к внутреннему домену этого белка; для выявления mPR β и mPR γ — АТ ab123693 и ab79517, выработанные к С-концевым участкам соответствующих субтипов рецепторов. При проточной флуориметрии клеток VxPC3 без фиксации (рис. 1, а, б, в) мы наблюдаем пики при совместной обработке (в центре) вторичными и первичными АТ к mPR α , β и γ (ab75508, ab123693 и ab79517), аналогичные тем, что визуализируются при обработке только вторичными АТ (слева). Эти пики при совмещении практически сливаются (справа). Следовательно, пер-

вичные АТ не взаимодействуют с интактными нефиксированными клетками. Как видно на рис. 2 (а, б, в), при анализе с помощью проточной флуориметрии пики флуоресценции фиксированных 3,5%-ным параформальдегидом клеток, обработанных первичными АТ к разным субтипам mPRs с последующей обработкой вторичными АТ, сдвинуты в область более интенсивной флуоресценции по сравнению с теми, что характерны для клеток, обработанных только вторичными АТ. Таким образом, после фиксации клеток первичные АТ получили доступ к специфическим эпитопам, находящимся внутри клетки во внутреннем участке белка mPR α или на С-концевом участке белков mPR субтипов β и γ , следовательно, С-концевой домен mPRs погружен внутрь клетки. Полученные в этом эксперименте данные дополнительно подтверждают результаты иммуноблоттинга [13] касательно наличия белковых продуктов mPRs в клетках VxPC3.

Эффект прогестерона и селективных лигандов mPRs на жизнеспособность клеток VxPC3 и клеток LNCaP человека, взятых в качестве негативного контроля в связи с отсутствием в них рецепторов прогестерона. По результатам ХТТ-теста на клеточной линии VxPC3 с максимальным уровнем экспрессии mPRs через 72 ч инкубации Р4 вызывал достоверное снижение жизнеспособности клеток на 10% ($p = 0,0431$) и 45% ($p < 0,0001$) в концентрациях 5 и 20 мкМ соответственно. Соединение LS-01 в тех же концентрациях вызывало снижение жизнеспособности клеток VxPC3 на 7% и 15% соответственно ($p < 0,0001$). Соединение LS-02 достоверного эффекта не оказывало (рис. 3). Достоверного влияния изучаемых стероидов на жизнеспособность клеток LNCaP обнаружено не было.

Эффект прогестерона и селективных лигандов mPRs на жизнеспособность клеточных линий человека VxPC3 и LNCaP в присутствии ингибиторов p38 MAPK и JNK. Рис. 4, а демонстрирует, что по результатам ХТТ-теста действие Р4 и селективных лигандов на подавление жизнеспособности клеток VxPC3 усиливалось в присутствии ингибитора p38 MAPK, SB203580. Жизнеспособность клеток достоверно снижалась до значений 78% ($p = 0,0026$), 65% ($p < 0,0001$) и 44% ($p < 0,0001$) от контроля под действием прогестерона в концентрациях 1, 5 и 20 мкМ соответственно и до 77% ($p = 0,0043$), 81% ($p = 0,0015$) и 59% ($p < 0,0001$) соответственно под действием соединения LS-01 в тех же концентрациях. Стоит отметить, что соединение LS-02, которое не влияло на пролиферативную активность клеток VxPC3, все же начинало

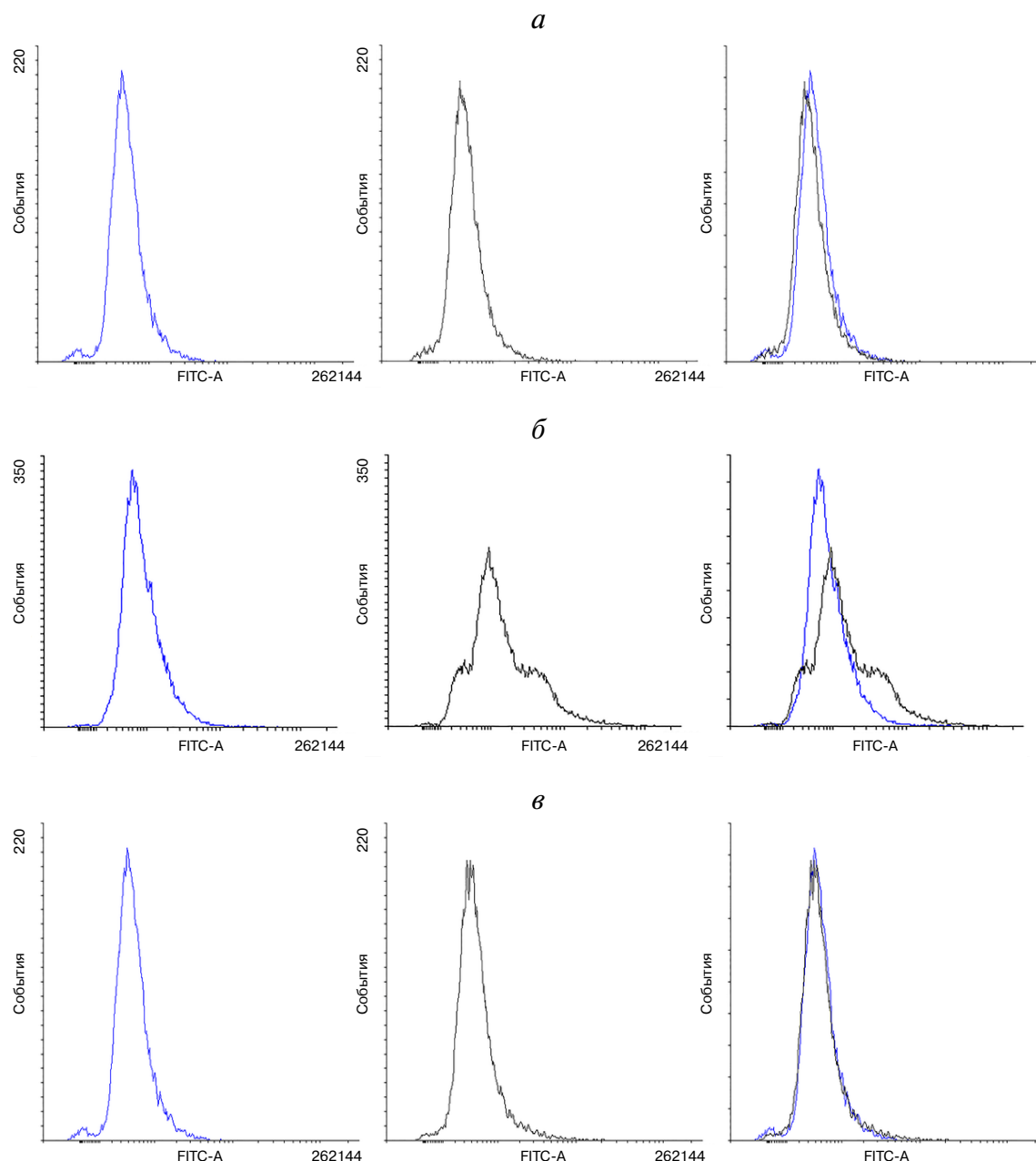


Рис. 1. Данные цитофлуориметрии клеток VxPC3 без фиксации, обработанных либо только вторичными АТ (слева), либо первичными АТ с последующей обработкой вторичными АТ (в центре); совмещение обоих пиков (справа). *а* – Первичные АТ к mPR α , *б* – первичные АТ к mPR β , *в* – первичные АТ к mPR γ

действовать на фоне этого ингибитора, но только в максимальной концентрации, 20 мкМ, снижая жизнеспособность клеток до 64% ($p < 0,0001$) от контроля. Противоположная картина наблюдалась на фоне ингибитора SP600125, подавляющего активность JNK — действие стероидов практически сводилось к нулю (рис. 4, б), лишь максимальная концентрация Р4 оказывала слабый эффект. Жизнеспособность клеток LNCaP на фоне ингибиторов

достоверно не изменялась под действием прогестерона и соединений LS-01, LS-02 — также, как и в отсутствие ингибиторов.

Эффект прогестерона и селективных лигандов mPRs на фрагментацию ДНК ядер клеток VxPC3 человека в отсутствие и в присутствии ингибиторов киназ, SB203580 и SP600125. Классическим стандартом для определения апоптоза в клетках является обнаружение в их ядрах фрагментированной ДНК с помощью TUNEL-

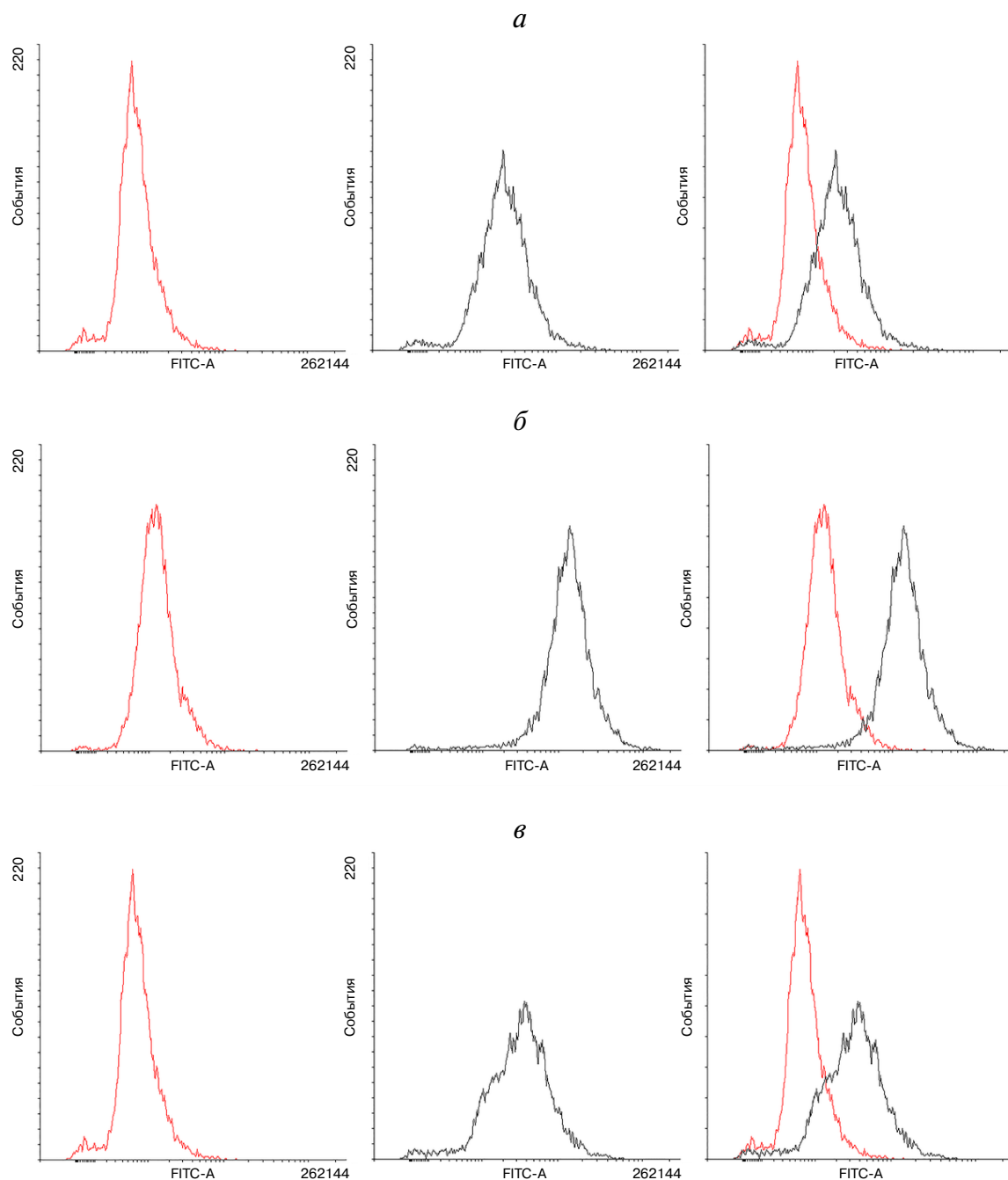


Рис. 2. Данные цитофлуориметрии клеток VxPC3 после фиксации 3,5%-ным параформальдегидом, обработанных либо только вторичными АТ (слева), либо первичными с последующей обработкой вторичными АТ (в центре); совмещение обоих пиков (справа). *а* – Первичные АТ к mPR α , *б* – первичные АТ к mPR β , *в* – первичные АТ к mPR γ

теста. Мы изучили действие на этот параметр 3 стероидов в максимально используемой концентрации 20 мкМ через 72 ч инкубации в сравнении с контролем без воздействия гормонов. Результаты одного из 4 экспериментов приведены на рис. 5. Можно видеть, что все 3 соединения вызывают появление (или значительное увеличение) пика с высокой интенсивностью флуо-

ресценции, обусловленное взаимодействием меченых антител с разрывами ДНК после включения в них 5-бром-2'-дезоксинуринов. Результаты статистического обсчета всех 4 экспериментов TUNEL-анализа показали, что в контроле в среднем обнаруживается 5,5% клеток в процессе апоптоза, в присутствии Р4 это значение возрастает до 19% ($p = 0,0012$), соеди-

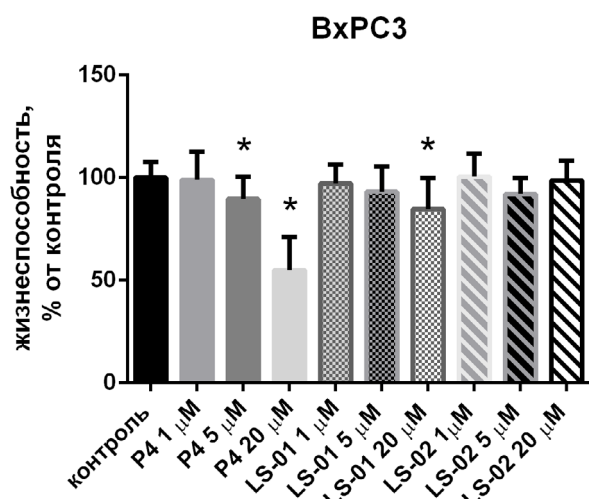


Рис. 3. Действие прогестерона (P4) и соединений LS-01 и LS-02 на жизнеспособность клеток VxPC3, определяемую с помощью ХТТ-теста. Статистическая значимость различий определена с применением one-way ANOVA и критерия Даннетта для множественных сравнений, приведено значение среднего $\pm$ стандартного отклонения по 4–5 независимым экспериментам. * Достоверные различия с контролем, где $p < 0,05$

нения LS-01 – до 17,3% ($p = 0,0043$), соединения LS-02 – до 12,5% ($p = 0,0894$).

В присутствии ингибитора p38 MAPK эффекты стероидов на уровень фрагментации ДНК клеток не отличались от контроля, а на фоне ингибитора JNK сохранялись, но несколько ослабевали. В среднем на фоне ингибитора SP600125 в контроле наблюдалось 4% клеток в процессе апоптоза, в присутствии P4 – 18,7%

($p = 0,0271$), LS-01 – 14% ($p = 0,1674$), LS-02 – 7,3% ($p = 0,8771$).

Эффект прогестерона и селективных лигандов mPRs на экспонирование фосфатидилсерина на наружной мембране клеток VxPC3 человека и на проницаемость их мембран для йодистого пропидия. Еще одним признаком апоптоза клеток является экспонирование фосфолипидов фосфатидилсерина на их поверхности, обнаруживаемого по связыванию с меченым аннексином V при проточной цитометрии. В нашем эксперименте параллельно с клетками, имеющими признаки апоптоза, определяли некротические клетки, мембраны которых становятся проницаемыми для йодистого пропидия. После 72 ч воздействия на клетки VxPC3 прогестерона или изучаемых стероидов LS-01 и LS-02 в максимально используемой концентрации (20 мкМ) мы не обнаружили достоверных различий между контролем и образцами, инкубированными с гормонами – ни в связывании клеток с меченым аннексином V, ни в проницаемости их мембран для йодистого пропидия. Также были проведены эксперименты по определению уровня связывания меченого аннексина V через 48 ч инкубации со стероидами в концентрации 20 мкМ. Оказалось, что только соединение LS-02 достоверно увеличивало количество клеток, связывающих аннексин V, и тех, чьи мембраны стали проницаемыми для йодистого пропидия. При статистическом обсчете экспериментальных данных по проточной цитометрии клеток VxPC3 в контроле (рис. 6, а) и после инкубации в течение 48 ч с 20 мкМ соединения LS-02 (рис. 6, б)

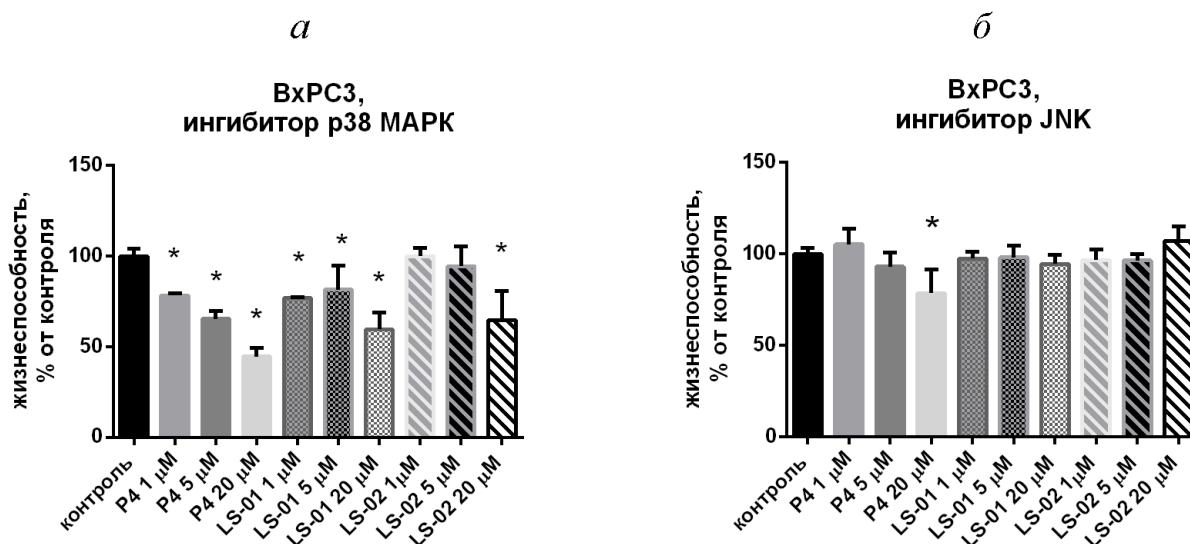


Рис. 4. Действие прогестерона (P4) и соединений LS-01 и LS-02 на жизнеспособность клеток VxPC3 на фоне ингибиторов киназ SB203580 (а) и SP600125 (б), определяемую с помощью ХТТ-теста. Статистическая значимость различий определена с помощью one-way ANOVA и критерия Даннетта для множественных сравнений, приведено значение среднего $\pm$ стандартного отклонения по 3 независимым экспериментам. * Достоверные различия с контролем, где $p < 0,05$

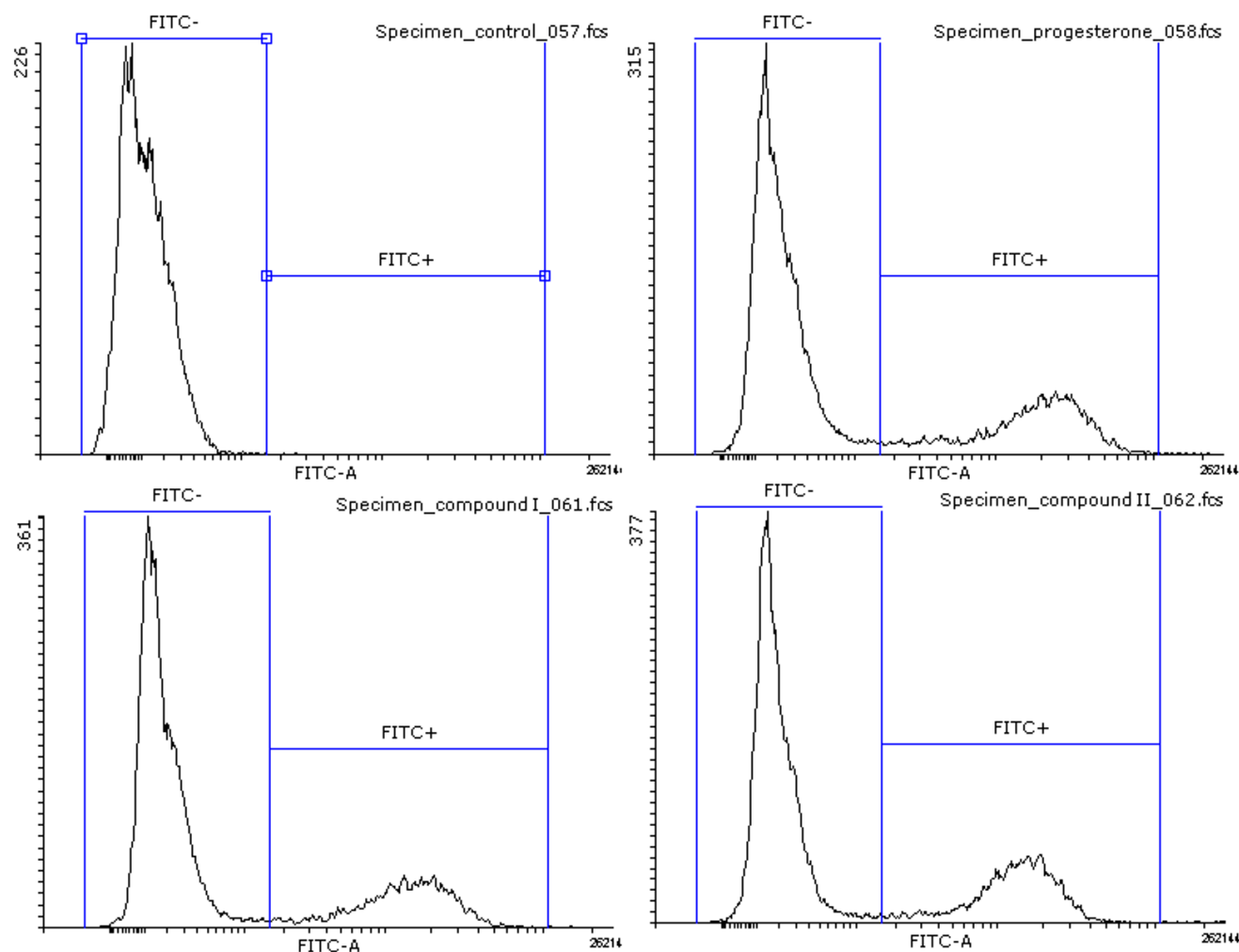


Рис. 5. Результаты одного из 4 повторов TUNEL-теста, демонстрирующие действие прогестерона, а также соединений LS-01 и LS-02 на появление пика флуоресценции, соответствующего клеткам с фрагментированной ДНК. Верхний левый график – контроль, верхний правый график – действие 20 мкМ прогестерона, левый нижний график – действие 20 мкМ соединения LS-01 (I), правый нижний график – действие соединения LS-02 (II)

наблюдалось увеличение пиков, характеризующих число клеток, связавших аннексин V, в 1,3 раза ($p = 0,0171$) по сравнению с контролем; пиков, характеризующих число клеток, поглотивших йодид пропидия – в 1,4 раза ($p = 0,0545$); а также пиков, соответствующих клеткам, одновременно связывающим аннексин V и проникаемым для йодида пропидия – в 1,5 раза ($p = 0,0304$) от контрольных значений. Соединение LS-02 теряло активность на фоне обоих ингибиторов, SB203580 и SP600125, как в области своего действия на апоптотические изменения мембран клеток VxPC3, так и в модуляции проницаемости мембран для йодистого пропидия.

Регуляция прогестероном и селективными лигандами mPRs в клетках VxPC3 экспрессии генов факторов, связанных с процессами пролиферации и апоптоза, как в отсутствие ингибиторов киназ, так и на их фоне. Методом обратной транскрип-

ции и последующей ПЦР в реальном времени было изучено действие трех стероидов в концентрациях 5 и 20 мкМ на уровень мРНК маркеров пролиферации, Ki67, PCNA и циклина D1, а также ингибиторов циклин-зависимых киназ, p21 и p27, через 72 ч их инкубации с клетками VxPC3. В отсутствие ингибиторов киназ P4 снижал содержание мРНК Ki67 в клетках в среднем до 77% и 51% ($p < 0,0001$) от контрольного уровня при концентрациях 5 и 20 мкМ соответственно; мРНК циклина D1 – до 85% и 48% ($p < 0,0001$); мРНК PCNA – до 83% и 60% ($p < 0,0001$); повышал уровень мРНК p21 в 1,2 и 2,3 раза ($p < 0,0001$) по сравнению с контролем в концентрациях 5 и 20 мкМ соответственно. Уровень мРНК p27 достоверно не изменялся при 72-часовой инкубации ни с одним из трех стероидов. Соединение LS-01 в концентрации 5 мкМ слабо действовало на экспрессию изуча-

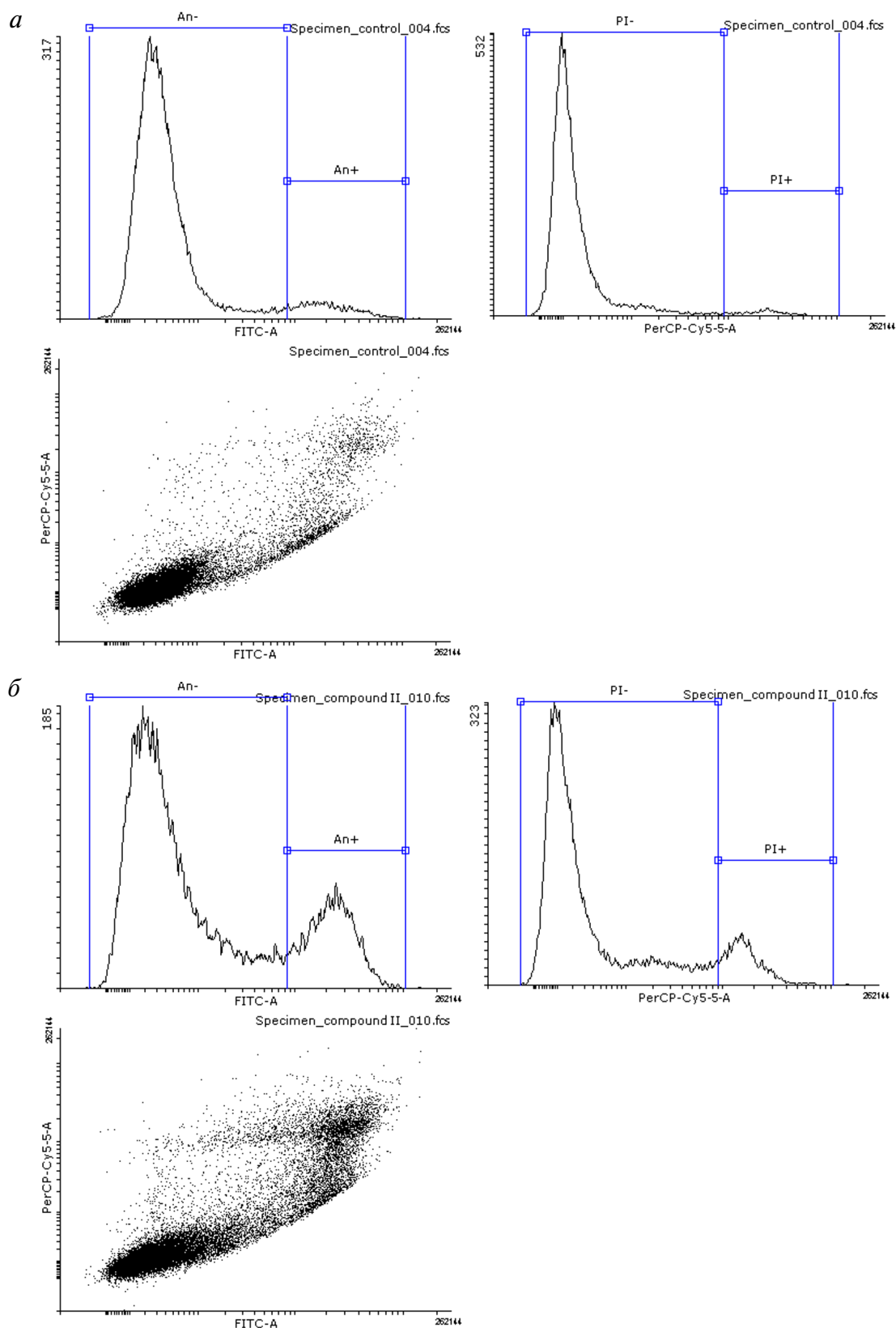


Рис. 6. *a* – Графики и точечная диаграмма распределения клеток в контрольном эксперименте по связыванию меченого аннексина V и поглощению йодистого пропидия; *б* – графики и точечная диаграмма распределения клеток под воздействием соединения LS-02 (II) в течение 48 ч в эксперименте по связыванию меченого аннексина V и поглощению йодистого пропидия

емых генов. В концентрации 20 мкМ наиболее сильный эффект, аналогичный прогестерону, оно оказывало на содержание в клетках мРНК циклина D1 и PCNA, снижая в среднем их уровень до 63% ($p < 0,0001$) и 77% ($p = 0,0998$) от контроля соответственно. Соединение LS-02 не влияло на жизнеспособность клеток в ХТТ-тесте и не изменяло экспрессии изучаемых генов факторов, связанных с пролиферацией. В присутствии ингибитора p38 MAPK эффекты P4 и соединения LS-01 на экспрессию генов факторов пролиферации нивелировались, за исключением гена, кодирующего белок Ki67. Такая же ситуация с подавлением экспрессии кодирующего Ki67 гена наблюдалась и на фоне ингибитора JNK для прогестерона и соединения LS-01, тогда как их эффекты на экспрессию трех других генов тоже исчезали в присутствии SP600125. Таким образом, уровни мРНК циклина D1, PCNA, а также ингибитора циклин-зависимых киназ p21 регулируются прогестинами в этих клетках с участием не только p38 MAPK, но и JNK, в то время как экспрессия гена, кодирующего Ki67, подавляется ими через другой сигнальный путь с не выявленным в нашем исследовании посредником.

В настоящей работе мы также изучали действие P4 и двух селективных лигандов mPRs на экспрессию 12 генов факторов, связанных с программируемой гибелью клеток путем апоптоза. Определялся уровень мРНК каспаз 3, 8 и 9, BAD, BAX, BCL2A1, DAPK, FAS, HRK, APAF1, BIK и p53. В отсутствие ингибиторов P4 и соединения LS-01 снижали уровень экспрессии двух генов — *BCL2A1* и *BAX*, причем достоверным было только воздействие максимальных концентраций обоих стероидов на экспрессию *BCL2A1*. Прогестерон в концентрациях 5 и 20 мкМ снижал содержание мРНК антиапоптотического фактора *BCL2A1* в среднем до 75% и 28% ($p < 0,0001$) от контрольных значений, а соединение LS-01 — до 67% и 35% ($p < 0,0001$) от контроля соответственно. Все три изучаемых стероида повышали уровень мРНК проапоптотического HRK, но только эффект максимально используемой концентрации соединения LS-02 был достоверным в отсутствие ингибиторов киназ. P4 повышал содержание мРНК HRK в 1,3 и 1,7 раз в зависимости от концентрации; соединение LS-01 — в 1,5 раза; соединение LS-02 — в 1,6 и 2,7 раза ($p < 0,0001$) при концентрациях 5 и 20 мкМ соответственно. Также в концентрации 20 мкМ соединение LS-02 достоверно повышало содержание мРНК каспазы 9 в 1,4 раза ($p = 0,0003$) и DAPK — в 1,7 раз ($p < 0,0001$). Таким образом, при действии соединения LS-02 повышалась экспрессия трех генов проапопто-

тических факторов, тогда как действие P4 и соединения LS-01 на уровни изучаемых мРНК, связанных с апоптозом генов, было неоднозначно, поскольку они подавляли экспрессию не только *BCL2A1*, но и *BAX*. На фоне ингибитора p38 MAPK проапоптотический эффект соединения LS-02 еще более усиливался. Наблюдался подъем уровня мРНК каспазы 3 в среднем в 1,5 раза ($p < 0,0001$) при его концентрации в 20 мкМ, а подъем уровня мРНК каспазы 9 в 1,6 раз ($p = 0,0006$) происходил уже при концентрации 5 мкМ, в 1,7 раза ($p < 0,0001$) — при 20 мкМ; повышался уровень мРНК BAD в 1,4 ($p = 0,0008$) и 1,7 раза ($p < 0,0001$), а мРНК BAX — в 1,5 ($p = 0,0328$) и 1,6 раз ($p = 0,0053$) при 5 и 20 мкМ стероида соответственно. Сохранялось действие LS-02 на фоне ингибитора SB203580 на усиление экспрессии гена *HRK* в 1,4 и 2,6 раз ($p = 0,0017$), но пропадал стимулирующий эффект на экспрессию гена *DAPK*. У P4 и соединения LS-01 на фоне ингибитора p38 MAPK полностью исчезало подавляющее действие на экспрессию гена *BAX* и несколько ослабевало влияние прогестерона на уровень мРНК *BCL2A1*. Как и соединение LS-02, на фоне SB203580 два других стероида повышали уровень мРНК BAD: прогестерон — в 1,1 и 1,4 раза ($p = 0,0038$), а соединение LS-01 — в 1,5 ($p = 0,0002$) и 1,3 раза ($p = 0,0162$) в зависимости от их концентраций. Ингибитор JNK не оказывал никакого влияния на эффекты LS-02 в отношении регуляции экспрессии генов факторов апоптоза. Если соединение LS-02 действовало в отсутствие ингибитора, то продолжало действовать и в его присутствии; если же оно не демонстрировало достоверной активности, то и на фоне ингибитора JNK оставалось неактивным. Также этот ингибитор не влиял на подавление прогестероном и соединением LS-01 экспрессии *BCL2A1*. На фоне SP600125, во-первых, исчезал эффект соединения LS-01 на подавление экспрессии гена *BAX*; во-вторых, в его присутствии усиливались стимулирующие эффекты P4 и соединения LS-01 на уровень мРНК HRK. P4 повышал его в 1,2 и 3,1 раза ($p < 0,0001$) по сравнению с контрольными значениями, соединение LS-01 — в 1,6 и 2,7 раз ($p < 0,0001$) выше контроля в зависимости от концентрации. Из результатов этих экспериментов можно сделать заключение, что участие JNK в регуляции подавления пролиферативной активности клеток VxPC3 и регуляции экспрессии генов, с ней связанных, является более значимым, чем ее посредничество в регуляции экспрессии факторов апоптоза и самого процесса программируемой гибели клеток под действием изучаемых стероидов. JNK — один из медиаторов сигнальных пу-

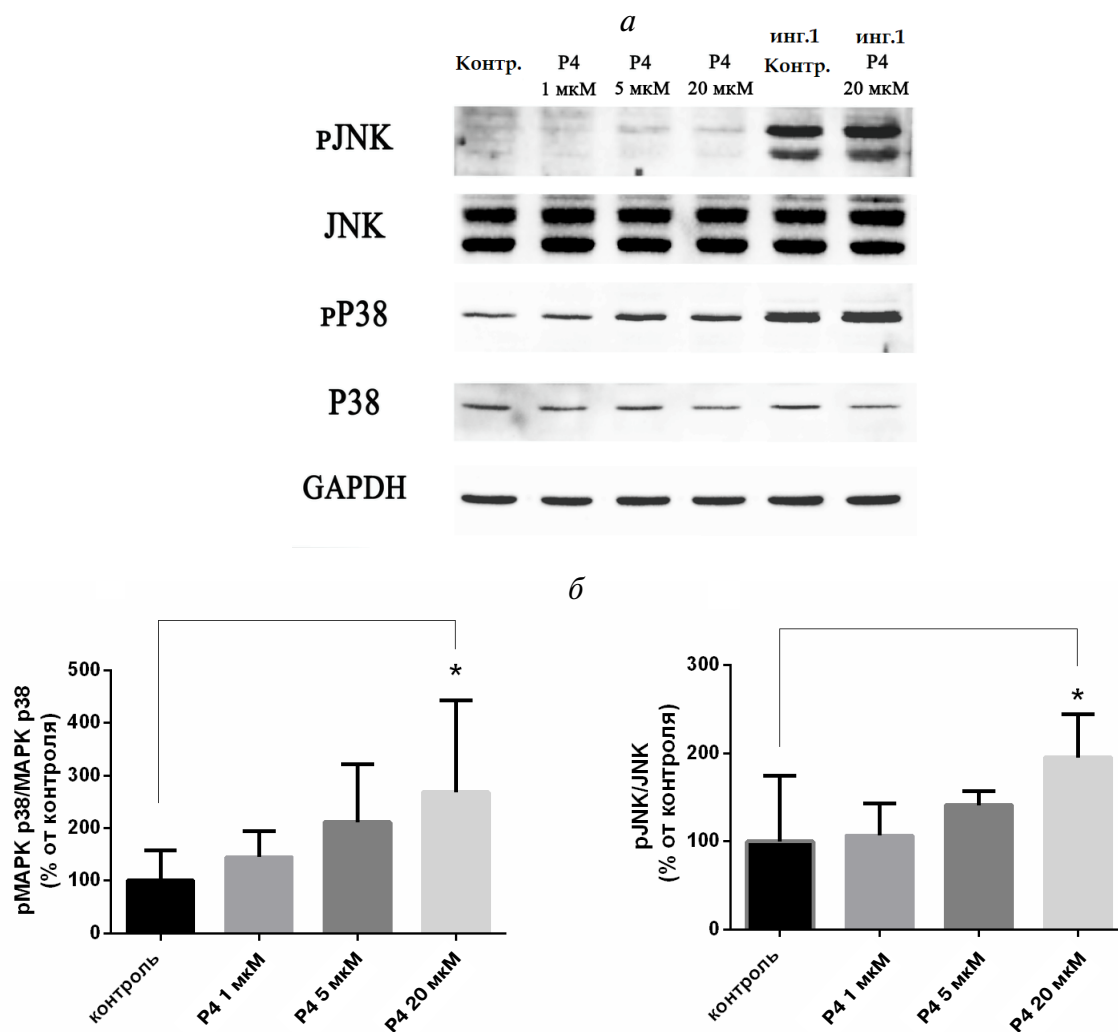


Рис. 7. Эффект прогестерона (P4) на фосфорилирование JNK и p38 MAPK в клетках ВхРС3. *a* – Иммуноблоттинг лизатов клеток ВхРС3, обработанных P4 в концентрациях 1, 5 и 20 мкМ и ингибитором (инг.1) SB203580. На фотографии представлены фосфорилированная форма (pJNK) и общая JNK, фосфорилированная форма (pP38) и общая p38 MAPK, референсный белок (GAPDH). *б* – Денситометрический анализ результатов иммуноблоттинга: слева – соотношение фосфорилированной формы p38 MAPK к тотальному белку p38 MAPK в лизатах клеток ВхРС3 в контроле и при действии 1, 5 и 20 мкМ прогестерона. Приведено значение среднего $\pm$ стандартного отклонения по 13 независимым экспериментам; справа – отношение суммарного уровня фосфорилированных изоформ JNK к суммарному уровню всех изоформ JNK в лизатах контрольных и обработанных 1, 5 и 20 мкМ прогестерона клеток ВхРС3. Приведено значение среднего $\pm$ стандартного отклонения по 7 независимым экспериментам. Статистическая значимость различий определена с помощью one-way ANOVA и критерия Даннетта для множественных сравнений. * Достоверные различия с контролем, где $p < 0,05$

тей, активируемых через mPRs прогестероном и селективными лигандами этих рецепторов в клетках ВхРС3. Посредниками их действия также являются p38 MAPK и, по-видимому, еще какой-то не выявленный нами сигнальный каскад.

Прогестерон и селективные лиганды mPRs стимулируют активирующее фосфорилирование p38 MAPK и JNK. Изучение регуляции стероидами процессов пролиферации клеток ВхРС3 и их гибели путем апоптоза на фоне ингибиторов SB203580 и SP600125 показало, что обе киназы – p38 MAPK и JNK – могут быть медиаторами сигнальных путей, активируемых через mPRs

и действующих на разные мишени внутри этих клеток. Для подтверждения данного предположения мы изучили регуляцию фосфорилирования этих двух киназ под действием изучаемых соединений, ведущее к повышению их активности. С помощью антител к фосфорилированным формам этих ферментов и к белкам вне зависимости от их фосфорилирования было показано, что все три стероида дозозависимо активируют p38 MAPK и суммарно – все изоформы JNK (рис. 7, 8).

На рисунке 7 приведены результаты анализа вестерн-блоттинга фосфорилированных форм

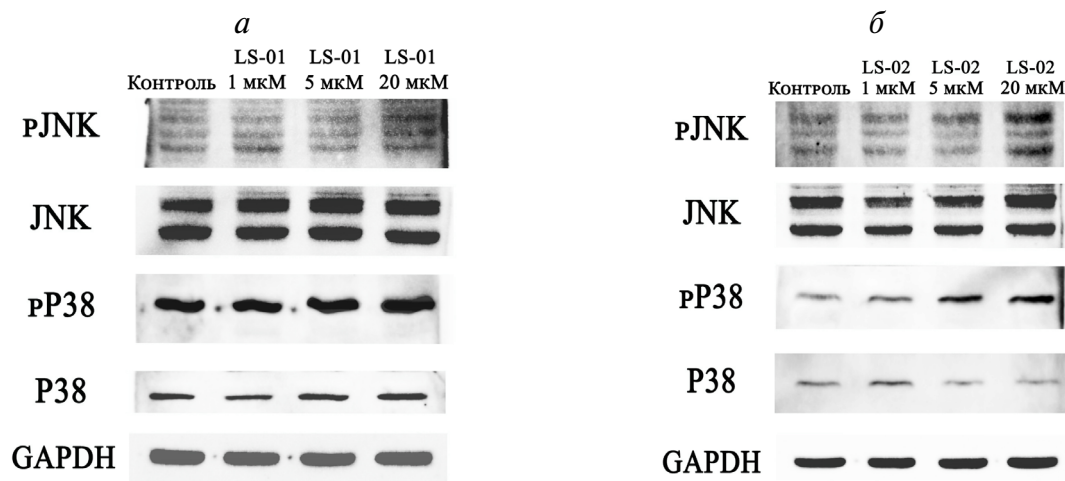


Рис. 8. Эффект соединения LS-01 (*а*) и LS-02 (*б*) на фосфорилирование JNK и p38 MAPK в клетках VxPC3. Иммуноблоттинг лизатов клеток VxPC3, обработанных соединением LS-01 или LS-02 в концентрациях 1, 5 и 20 мкМ. На фотографии представлены фосфорилированная форма (pJNK) и общая JNK, фосфорилированная форма (pP38) и общая p38 MAPK, а также референсный белок (GAPDH)

JNK и p38 MAPK при действии возрастающих концентраций P4. Фосфорилирование обеих киназ усиливалось прогестероном. Также на рисунке видно, что на фоне ингибитора p38 MAPK фосфорилирование самой киназы p38 усиливается. Это происходит, видимо, вследствие того, что механизм действия ингибитора SB203580 заключается в блокировании связывания АТР в соответствующем кармане фермента, при этом он не ингибирует фосфорилирование p38 MAPK вышерасположенными в сигнальном каскаде (upstream) киназами. В результате по механизму отрицательной обратной связи upstream киназы становятся значительно активнее, пытаясь восстановить инактивированный ингибитором фермент. Особый интерес представляет неожиданное усиление фосфорилирования JNK на фоне этого ингибитора p38 MAPK (рис. 7, *а*). По-видимому, в клетках VxPC3 JNK и p38 MAPK фосфорилируются общей upstream киназой. Действие ингибитора SP600125 было ожидаемым и приводило к снижению фосфорилирования JNK. На рис. 7, *б* представлены гистограммы результатов статистического обобщения денситометрического анализа данных вестерн-блоттинга по фосфорилированию p38 MAPK (13 экспериментов) и фосфорилированию JNK (7 экспериментов) под действием 3 различных концентраций прогестерона. P4 в зависимости от концентрации повышает активирующее фосфорилирование p38 MAPK в среднем в 1,5; 2,1 и 2,7 раза ($p = 0,013$), JNK — в 1,1; 1,4 и 2 раза ($p = 0,043$) для всех изоформ суммарно.

С соединениями LS-01 и LS-02 было проведено по 3 независимых эксперимента. Их ре-

зультаты показали, что под действием LS-01 фосфорилирование p38 MAPK повышается в среднем в 1,7–2 раза, фосфорилирование суммарно всех изоформ JNK повышается в среднем в 1,1; 1,3 и 1,6 раз в зависимости от концентрации; под действием LS-02 фосфорилирование p38 MAPK повышается в среднем в 1,3; 2,4 и 2,5 раза, фосфорилирование суммарно всех изоформ JNK повышается в среднем в 2,0–2,2 раза (рис. 8, *а, б*). Таким образом, P4 и селективные лиганды, изучаемые в данной работе, активируя mPRs в клетках VxPC3, запускают сигнальные каскады с участием как p38 MAPK, так и JNK, действующие на разные конкретные мишени в этих клетках.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

В данной работе впервые было изучено действие селективных лигандов mPRs в сравнении с прогестероном на пролиферативную активность и программируемую гибель клеток путем апоптоза и некроза. Главной целью было исследование роли mPRs в этих процессах, которая пока еще слабо изучена в опухолевых клетках.

Ранее было показано, что уровень мРНК mPRs в клетках VxPC3 аденокарциномы поджелудочной железы человека наиболее высок среди всех изученных линий опухолевых клеток человека и составляет для субтипа α 270%, β — 27% и γ — 283% от уровня мРНК GAPDH, при этом мРНК nPRs в этих клетках практически не обнаруживается [13]. В клетках LNCaP аденокар-

циномы предстательной железы, наоборот, содержание мРНК mPRs было очень низким: для субтипов α и γ — менее 1%, для β — 2% от уровня мРНК GAPDH, в то время как nPRs также не были обнаружены. Таким образом, это послужило причиной выбора данной клеточной линии в качестве негативного контроля в наших экспериментах. Изучение белкового состава рецепторов прогестерона методом иммуноблоттинга подтвердило ранее сделанные выводы, продемонстрировав наличие в клетках VxPC3 всех трех субтипов mPRs и отсутствие nPRs [13]. В данной работе мы еще одним методом подтвердили экспрессию мембранных рецепторов прогестерона в этих клетках, определив вместе с этим топологию C-концевого участка указанных белков. Ранее с использованием биоинформатических алгоритмов было предсказано внеклеточное расположение C-конца mPRs [29]. Такая прогнозируемая топология затрудняла объяснение фактов, свидетельствующих о функционировании некоторых субтипов mPRs как рецепторов, сопряженных с G-белками (GPCRs) [24, 27, 28]. Топологию разных субтипов этих рецепторов исследовали в ряде работ, однако полного единства мнений по этому вопросу достигнуто не было [17, 27, 31]. Так, в клетках СНО после транзientной трансфекции экспрессированные mPRs имели внутриклеточный N-конец и внеклеточный C-конец, то есть топологию, аналогичную топологии рецепторов адипонектина и «противоположную» GPCRs [30]. В нашей работе целые нефиксированные клетки VxPC3 не взаимодействовали с АТ к C-концу mPR β и γ , так же, как и с АТ к внутриклеточному домену mPR α (рис. 1, а, б, в). Очевидно, данные эпитопы находятся не на наружной поверхности мембран. При фиксации клеток ситуация изменилась, в данных условиях АТ связывались со ставшими доступными внутриклеточными фрагментами mPRs, и пики флуоресценции сдвинулись в область яркого свечения (рис. 2, а, б, в). Таким образом, было показано, что C-концевой фрагмент всех трех белков mPRs имеет внутриклеточное расположение. Наши результаты на клетках VxPC3 подтверждают данные, полученные другими исследователями для mPR α в трансфицированных клетках MDA-MB-231 и для mPR β — в нейрональных клетках линии PC12 [17, 27].

Мы использовали клетки VxPC3 с максимальным уровнем экспрессии mPRs и клетки LNCaP с крайне низким их содержанием как негативный контроль для изучения влияния Р4 и селективных лигандов на пролиферативную активность этих клеток. Инкубация с тремя концентрациями изучаемых стероидов прово-

дилась в течение 72 ч. Время было выбрано по результатам предыдущего исследования, в котором наблюдались изменения жизнеспособности клеток под действием Р4 в зависимости от времени инкубации с гормоном [13]. Как видно из результатов ХТТ-теста, на клетки с высоким уровнем mPRs ингибирующее действие оказывали Р4 и один из селективных лигандов — соединение LS-01 (рис. 3). На жизнеспособность клеток LNCaP статистически достоверного эффекта стероидов обнаружено не было. В клетках VxPC3 мишенями действия прогестерона среди изучаемых в нашей работе оказались гены белков Ki67, циклина D1, PCNA, а также ингибитора циклин-зависимых киназ p21. Через регуляцию их экспрессии Р4 может влиять на процесс пролиферации. Соединение LS-01 действовало слабее, наиболее значительный эффект оно оказывало на экспрессию гена циклина D1. Соединение LS-02 не влияло ни на жизнеспособность клеток VxPC3, ни на экспрессию генов факторов, связанных с пролиферацией.

Действие Р4 и селективных лигандов на разные стадии программируемой гибели клеток значительно различалось. Через 48 ч инкубации со стероидами статистически значимое действие на стадии гибели клеток VxPC3, связанные с изменениями мембран, оказало только соединение LS-02 (рис. 6). Под действием этого стероида достоверно увеличивалось количество клеток с измененными мембранами, экспонирующими фосфатидилсерин, также повышалось число некротических клеток. Через 72 ч воздействия данный эффект этого соединения нивелировался до контрольного уровня. На другие стадии апоптоза, связанные с фрагментацией ДНК клеток, через 72 ч воздействия эффект оказывали все три стероида (рис. 5), причем Р4 и LS-01 были наиболее эффективны, в то время как LS-02 действовало на этот процесс несколько слабее. Выявленной мишенью в регуляции апоптоза для прогестерона и соединения LS-01 является ген белка BCL2A1, экспрессия которого подавляется этими стероидами. Для соединения LS-02 показано, что его действие приводит к повышению уровня мРНК HRK, каспазы 9 и DAPK, стимулируя таким образом процесс апоптоза в клетках VxPC3.

Изучение влияния стероидов на активирующее фосфорилирование p38 MAPK и JNK показало, что все три соединения стимулируют активность этих киназ, следовательно, оба фермента являются посредниками в действии этих соединений — в зависимости от направленности эффекта (рис. 7, 8). При проверке действия ингибиторов на фосфорилирование мишеней их действия, p38 MAPK и JNK, эффект ингибитора

SP600125 был ожидаемым, а эффект SB203580 в этих клетках оказался двойственным (рис. 7, а). Оказалось, что ингибитор SB203580 не только инактивировал объект своего действия, р38 MAPK, но также приводил к значительному усилению фосфорилирования JNK, повышая ее активность. Происходило это, видимо, по причине того, что ингибирующее действие SB203580 не связано с блокированием фосфорилирования р38 MAPK upstream киназами. В результате эти киназы, пытаясь восстановить активность одной своей мишени, вместо этого активировали другой фермент. Согласно некоторым данным литературы, в ряде клеток р38 MAPK и JNK активируются киназой MKK4 [35]. В результате такого двойственного действия в ряде случаев оказалось затруднительным определить причины изменений, происходящих при действии стероидов на фоне ингибиторов.

Изучение участия сигнальных каскадов р38 MAPK и JNK в действии прогестина на исследуемые процессы с использованием ингибиторов выявило факт посредничества JNK в ингибирующем действии прогестерона и соединения LS-01 на пролиферативную активность клеток ВхРС3. На фоне ингибитора JNK действие Р4 существенно ослабевало, а действие соединения LS-01 исчезало полностью. На фоне ингибитора р38 MAPK действие изучаемых соединений усиливалось, вероятно, вследствие неожиданного эффекта этого ингибитора на усиление активности JNK, что также подтверждает ее участие в подавлении жизнеспособности клеток ВхРС3 (рис. 4). В клетках LNCaP стероиды не оказывали действия на пролиферацию ни в отсутствие ингибиторов, ни в их присутствии. В регуляции прогестероном и соединением LS-01 экспрессии генов, связанных с факторами пролиферации, такими как PCNA, циклин D1, а также ингибитор циклин-зависимых киназ p21, необходимо участие как JNK, так и р38 MAPK. Регуляция же экспрессии гена, кодирующего Ki67, опосредуется не идентифицированным в данной работе сигнальным каскадом.

В эффекте Р4 и селективных лигандов mPRs на усиление фрагментации ДНК клеток ВхРС3 главным посредником сигнального каскада является р38 MAPK. На фоне ингибитора р38 MAPK действие соединений полностью сводится к нулю. Возможно, некоторую роль в этом процессе играет и JNK, но ингибирование ее активности лишь незначительно ослабляет эффекты стероидов. Изучение регуляции экспрессии генов факторов апоптоза под действием Р4, LS-01 и LS-02 на фоне ингибиторов киназ показало, что JNK практически не

участвует в этом процессе, тогда как р38 MAPK опосредует некоторые эффекты. Именно через р38 MAPK прогестерон снижает содержание мРНК BCL2A1, соединение LS-01 регулирует экспрессию гена *BAX*, а соединение LS-02 повышает уровень мРНК DAPK. Единственный эффект ингибитора JNK в рассматриваемых процессах заключался в дополнительной стимуляции экспрессии гена *HRK* в его присутствии под действием Р4 и LS-01.

В заключение можно отметить, что Р4 и соединение LS-01 действуют практически на все изучаемые процессы схожим образом. Иногда эффекты LS-01 оказываются слабее по сравнению с эффектами природного гормона — это можно объяснить более низким сродством этого соединения к mPRs в сравнении с прогестероном. Наиболее выражено влияние этих двух стероидов на процессы пролиферации и на стадии апоптоза, связанные с фрагментацией ДНК. Соединение LS-02 практически не влияет на жизнеспособность клеток, однако проявляет более активное действие на апоптотические изменения клеток, связанные с экспонированием фосфатидилсерина на наружной мембране клеток; оно также имеет другой спектр мишеней регуляции экспрессии генов. Возможно, это связано с некоторыми временными параметрами активации рецепторов и/или сигнальных каскадов, а также с различающимся сродством этих стероидов к конкретным субтипам mPRs, α , β и γ , которое пока не изучено детально. Существенные различия в действии Р4 и LS-01 от LS-02 можно объяснить разницей в их пространственной структуре. Соединение LS-02 представляет собой Δ^3 -5 β -pregnanовый лиганд с цис-сочленением колец А и В и непланарной конформацией стероидного скаффолда, в отличие от соединения LS-01, представляющего собой 19-гидроксизамещенный 3-дезоксипрогестерон, близкий по конформации к прогестерону.

Применение селективных лигандов позволяет понять механизмы функционирования mPRs в опухолевых клетках, их роль в канцерогенезе и росте опухолевых тканей. Р4 и селективные лиганды mPRs оказывают цитотоксическое действие на клетки ВхРС3 аденокарциномы поджелудочной железы человека. Эти результаты позволяют предполагать, что mPRs являются перспективными мишенями при противоопухолевой терапии ряда тканей. Селективные лиганды этих рецепторов могут служить основой для разработки новых лекарственных средств, оказывающих избирательные эффекты через конкретный тип рецепторов и не влияющих на другие функции организма, опосредуе-

мые pPRs и тесно связанные с регуляцией половых циклов и процессами репродукции.

Благодарности. Авторы выражают благодарность Центру коллективного пользования «Геном» Института молекулярной биологии имени В.А. Энгельгардта РАН, а также ведущему научному сотруднику института И.Ю. Петрушанко за помощь в работе на проточном цитофлуориметре.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Финансирование. Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (грант № 20-015-00092).

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

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Zhu, Y., Bond, J., and Thomas, P. (2003) Identification, classification, and partial characterization of genes in humans and other vertebrates homologous to a fish membrane progesterin receptor, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **100**, 2237-2242, doi: 10.1073/pnas.0436133100.
2. Pang, Y., Dong, J., and Thomas, P. (2013) Characterization, neurosteroid binding and brain distribution of human membrane progesterone receptors delta and {epsilon} (mPRdelta and mPR{epsilon}) and mPRdelta involvement in neurosteroid inhibition of apoptosis, *Endocrinology*, **154**, 283-295, doi: 10.1210/en.2012-1772.
3. Щелкунова Т. А., Морозов И. А. (2015) Молекулярные основы и тканевая специфичность действия прогестин. Обзор, *Молекуляр. биология*, **49**, 728-748, doi: 10.7868/S0026898415050158.
4. Diep, C. H., Daniel, A. R., Mauro, L. J., Knutson, T. P., and Lange, C. A. (2015) Progesterone action in breast, uterine, and ovarian cancers, *J. Mol. Endocrinol.*, **54**, R31-53, doi: 10.1530/jme-14-0252.
5. Dressing, G. E., Alyea, R., Pang, Y., and Thomas, P. (2012) Membrane progesterone receptors (mPRs) mediate progestin induced antimorbidity in breast cancer cells and are expressed in human breast tumors, *Horm. Cancer*, **3**, 101-112, doi: 10.1007/s12672-012-0106-x.
6. Wu, X., Sun, L., Wang, X., Su, P., Li, Z., et al. (2016) Breast cancer invasion and metastasis by mPR α through the PI3K/Akt signaling pathway, *Pathol. Oncol. Res.*, **22**, 471-476, doi: 10.1007/s12253-015-0023-8.
7. Vares, G., Sai, S., Wang, B., Fujimori, A., Neno, M., and Nakajima, T. (2015) Progesterone generates cancer stem cells through membrane progesterone receptor-triggered signaling in basal-like human mammary cells, *Cancer Lett.*, **362**, 167-173, doi: 10.1016/j.canlet.2015.03.030.
8. Zuo, L., Li, W., and You, S. (2010) Progesterone reverses the mesenchymal phenotypes of basal phenotype breast cancer cells via a membrane progesterone receptor mediated pathway, *Breast Cancer Res.*, **12**, R34, doi: 10.1186/bcr2588.
9. Zhou, L., Zhou, W., Zhang, H., Hu, Y., Yu, L., et al. (2017) Progesterone suppresses triple-negative breast cancer growth and metastasis to the brain via membrane progesterone receptor α , *Int. J. Mol. Med.*, **40**, 755-761, doi: 10.3892/ijmm.2017.3060.
10. Gonzalez-Orozco, J. C., Hansberg-Pastor, V., Valadez-Cosmes, P., Nicolas-Ortega, W., Bastida-Beristain, Y., et al. (2018) Activation of membrane progesterone receptor- α increases proliferation, migration, and invasion of human glioblastoma cells, *Mol. Cell. Endocrinol.*, **477**, 81-89, doi: 10.1016/j.mce.2018.06.004.
11. Charles, N. J., Thomas, P., and Lange, C. A. (2010) Expression of membrane progesterone receptors (mPR/PAQR) in ovarian cancer cells: implications for progesterone induced signaling events, *Horm. Cancer*, **1**, 167-176, doi: 10.1007/s12672-010-0023-9.
12. Xiao, J., Chen, X., Lu, X., Xie, M., He, B., et al. (2020) Progesterone/Org inhibits lung adenocarcinoma cell growth via membrane progesterone receptor alpha, *Thorac. Cancer*, **11**, 2209-2223, doi: 10.1111/1759-7714.13528.
13. Goncharov, A. I., Maslakova, A. A., Polikarpova, A. V., Bulanov, E. A., Guseva, A. A., et al. (2017) Progesterone inhibits proliferation and modulates expression of proliferation-Related genes in classical progesterone receptor-negative human BxPC3 pancreatic adenocarcinoma cells, *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.*, **165**, 293-304, doi: 10.1016/j.jsbmb.2016.07.007.
14. Polikarpova, A. V., Maslakova, A. A., Levina, I. S., Kulikova, L. E., Kuznetsov, Y. V., et al. (2017) Selection of progesterone derivatives specific to membrane progesterone receptors, *Biochemistry (Mosc.)*, **82**, 140-148, doi: 10.1134/S0006297917020055.
15. Levina, I. S., Kuznetsov, Y. V., Shchelkunova, T. A., and Zavarzin, I. V. (2021) Selective ligands of membrane progesterone receptors as a key to studying their biological functions *in vitro* and *in vivo*, *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.*, **207**, 105827, doi: 10.1016/j.jsbmb.2021.105827.
16. Polikarpova, A. V., Levina, I. S., Sigai, N. V., Zavarzin, I. V., Morozov, I. A., et al. (2019) Immunomodulatory effects of progesterone and selective ligands of membrane progesterone receptors, *Steroids*, **145**, 5-18, doi: 10.1016/j.steroids.2019.02.009.
17. Kasubuchi, M., Watanabe, K., Hirano, K., Inoue, D., Li, X., et al. (2017) Membrane progesterone receptor beta (mPR β /PAQR8) promotes progesterone-dependent neurite outgrowth in PC12 neuronal cells via non-G protein-coupled receptor (GPCR) signaling, *Sci. Rep.*, **7**, 5168, doi: 10.1038/s41598-017-05423-9.
18. Pang, Y., Dong, J., and Thomas, P. (2015) Progesterone increases nitric oxide synthesis in human vascular endothelial cells through activation of membrane progesterone receptor α , *Am J. Physiol. Endocrinol. Metab.*, **308**, E899-911, doi: 10.1152/ajpendo.00527.2014.
19. Pang, Y., and Thomas, P. (2018) Progesterone induces relaxation of human umbilical cord vascular smooth muscle cells through mPR α (PAQR7), *Mol. Cell. Endocrinol.*, **474**, 20-34, doi: 10.1016/j.mce.2018.02.003.
20. Castelnovo, L. F., Caffino, L., Bonalume, V., Fumagalli, F., Thomas, P., and Magnaghi, V. (2020) Membrane progesterone receptors (mPRs/PAQRs) differently regulate migration, proliferation, and differentiation in rat schwann cells, *J. Mol. Neurosci.*, **70**, 433-448, doi: 10.1007/s12031-019-01433-6.
21. Kong, X., Li, M., Shao, K., Yang, Y., Wang, Q., and Cai, M. (2020) Progesterone induces cell apoptosis via the CACNA2D3/Ca²⁺/p38 MAPK pathway in endometrial cancer, *Oncol. Rep.*, **43**, 121-132, doi: 10.3892/or.2019.7396.
22. Godbole, M., Tiwary, K., Badwe, R., Gupta, S., and Dutt, A. (2017) Progesterone suppresses the invasion and

- migration of breast cancer cells irrespective of their progesterone receptor status, *Cell Oncol. (Dordr)*, **40**, 411-417, doi: 10.1007/s13402-017-0330-z.
23. Salazar, M., Lerma-Ortiz, A., Hooks, G. M., Ashley, A. K., and Ashley, R. L. (2016) Progesterone-mediated activation of MAPK and AKT in nuclear progesterone receptor negative breast epithelial cells: The role of membrane progesterone receptors, *Gene*, **591**, 6-13, doi: 10.1016/j.gene.2016.06.044.
 24. Karteris, E., Zervou, S., Pang, Y., Dong, J., Hillhouse, E. W., et al. (2006) Progesterone signaling in human myometrium through two novel membrane G protein coupled receptors: potential role in functional progesterone withdrawal at term, *Mol. Endocrinol.*, **20**, 1519-1534, doi: 10.1210/me.2005-0243.
 25. Lu, J., Reese, J., Zhou, Y., and Hirsch, E. (2015) Progesterone-induced activation of membrane-bound progesterone receptors in murine macrophage cells, *J. Endocrinol.*, **224**, 183-194, doi: 10.1530/JOE-14-0470.
 26. Camilletti, M. A., Ferraris, J., Abeledo-Machado, A., Converse, A., Faraoni, E. Y., et al. (2018) Participation of membrane progesterone receptor α in the inhibitory effect of progesterone on prolactin secretion, *J. Neuroendocrinol.*, **30**, e12614, doi: 10.1111/jne.12614.
 27. Thomas, P., Pang, Y., Dong, J., Groenen, P., Kelder, J., et al. (2007) Steroid and G protein binding characteristics of the seatrout and human progesterone membrane receptor subtypes α and their evolutionary origins, *Endocrinology*, **148**, 705-718, doi: 10.1210/en.2006-0974.
 28. Tokumoto, T., Hossain, M. B., and Wang, J. (2016) Establishment of procedures for studying mPR-interacting agents and physiological roles of mPR, *Steroids*, **111**, 79-83, doi: 10.1016/j.steroids.2016.02.015.
 29. Tang, Y. T., Hu, T., Arterburn, M., Boyle, B., Bright, J. M., et al. (2005) PAQR Proteins: a novel membrane receptor family defined by an ancient 7-transmembrane pass motif, *J. Mol. Evol.*, **61**, 372-380, doi: 10.1007/s00239-004-0375-2.
 30. Nader, N., Dib, M., Hodeify, R., Courjaret, R., Elmi, A., et al. (2020) Membrane progesterone receptor induces meiosis in *Xenopus oocytes* through endocytosis into signaling endosomes and interaction with APPL1 and Akt2, *PLoS Biol.*, **19**, e3001117, doi: 10.1371/journal.pbio.3000901.
 31. Fernandes, M. S., Brosens, J. J., and Gellersen, B. (2008) Honey, we need to talk about the membrane progesterone receptors, *Steroids*, **73**, 942-52, doi: 10.1016/j.steroids.2007.12.004.
 32. Atif, F., Yousuf, S., and Stein, D. G. (2015) Anti-tumor effects of progesterone in human glioblastoma multiforme: role of PI3K/Akt/mTOR signaling, *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.*, **146**, 62-73, doi: 10.1016/j.jsbmb.2014.04.007.
 33. Atif, F., Sayeed, I., Yousuf, S., Ishrat, T., Hua, F., et al. (2011) Progesterone inhibits the growth of human neuroblastoma: *in vitro* and *in vivo* evidence, *Mol. Med.*, **17**, 1084-1094, doi: 10.2119/molmed.2010.00255.
 34. Shchelkunova, T. A., Albert, E. A., Morozov, I. A., Rubtsov, P. M., Samokhodskaya, L. M., et al. (2011) Contents of mRNAs encoding endosome/lysosome components in normal human aorta and in stage II of atherosclerosis: a hidden regulation, *Biochemistry (Mosc.)*, **76**, 1178-1184, doi: 10.1134/S0006297911100129.
 35. Sui, X., Kong, N., Ye, L., Han, W., Zhou, J., et al. (2014) p38 and JNK MAPK pathways control the balance of apoptosis and autophagy in response to chemotherapeutic agents, *Cancer Lett.*, **344**, 174-179, doi: 10.1016/j.canlet.2013.11.019.

CYTOTOXIC EFFECTS OF THE SELECTIVE LIGANDS OF MEMBRANE PROGESTERONE RECEPTORS IN HUMAN PANCREATIC ADENOCARCINOMA CELLS BxPC3

A. I. Goncharov¹, I. S. Levina², V. L. Shliapina¹, I. A. Morozov³, P. M. Rubtsov³,
I. V. Zavarzin², O. V. Smirnova¹, and T. A. Shchelkunova^{1*}

¹ Lomonosov Moscow State University, Biological Faculty, 119991 Moscow, Russia; E-mail: Shchelkunova-t@mail.ru

² Zelinsky Institute of Organic Chemistry, Russian Academy of Sciences, 119991 Moscow, Russia

³ Engelhardt Institute of Molecular Biology, Russian Academy of Sciences, 119991 Moscow, Russia

Progesterone and its synthetic analogues act on cells through different types of receptors, affecting proliferation and apoptosis. These compounds exert their effect through the nuclear receptors and the insufficiently studied membrane progesterone receptors (mPRs) belonging to the progesterone and adiponectin Q receptor (PAQR) family. We have identified two selective ligands of mPRs that activate only this type of progesterone receptors – 19-hydroxypregn-4-en-20-one (LS-01) and 19-hydroxy-5 β -pregn-3-en-20-one (LS-02). The goal of this work is to study the effect of these compounds on proliferation and death of human pancreatic adenocarcinoma cells BxPC3 and involvement of the two kinases (p38 MAPK and JNK) in signaling pathways activated by progestins through mPRs. It was shown that progesterone and the compound LS-01 significantly ($p < 0.05$) inhibited the BxPC3 cell viability, with JNK serving as a mediator. The identified targets of these two steroids are the genes of the proteins Ki67, cyclin D1, PCNA, and p21. Progesterone and the compound LS-01 significantly ($p < 0.05$) stimulate DNA fragmentation, enhancing the cell death. The p38 mitogen-activated protein kinase (MAPK) is a key mediator of this process. The BCL2A1 protein gene was identified as a target of both steroids. The compound LS-02 significantly ($p < 0.05$) alters membrane permeability and changes the exposure of phosphatidylserine on the outer membrane leaflet, also enhancing the cell death. This compound acts on these processes by activating both kinases, JNK and p38 MAPK. The compound LS-02 targets the genes encoding the proteins HRK, caspase 9, and DAPK.

Keywords: progesterone, selective ligands, proliferation, apoptosis, expression, nuclear receptor, membrane progesterone receptors

УДК 577.21

ОСНОВАННЫЕ НА МОЛЕКУЛЯРНОМ ПУТИ EGFR ГЕННЫЕ ПОДПИСИ КЛИНИЧЕСКИ ЗНАЧИМЫХ МУТАЦИЙ ПРИ РАКЕ МОЛОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ, ЛЕГКИХ, ЩИТОВИДНОЙ ЖЕЛЕЗЫ И ПРИ МЕЛАНОМЕ

© 2021 М. Раевский^{1,2}, М. Сорокин^{3,4}, У. Владимиров³, М. Сунцова³, В. Ефимов²,
А. Гаража², А. Дробышев³, А. Моисеев³, П. Румянцев⁵, З. Ли⁶, А. Буздин^{1,2,3,7*}

¹ Omicsway Corp., 340 S Lemon Ave, 6040, Walnut, 91789 CA, USA; E-mail: buzdin@oncobox.com

² Московский физико-технический институт, 141701 Долгопрудный, Московская область, Россия

³ Первый Московский государственный медицинский университет имени И.М. Сеченова, 119991 Москва, Россия

⁴ Онкобокс Ltd., 121205 Москва, Россия

⁵ Федеральное государственное бюджетное учреждение «Национальный медицинский исследовательский центр эндокринологии» Министерства здравоохранения Российской Федерации, 117312 Москва, Россия

⁶ Кафедра патологии и лабораторной медицины Калифорнийского университета в Лос-Анджелесе, 90095 Лос-Анджелес, Калифорния, США

⁷ Институт биоорганической химии имени академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова, 117997 Москва, Россия

Поступила в редакцию 30.07.2021

После доработки 04.10.2021

Принята к публикации 04.10.2021

Гены *EGFR*, *BRAF*, *PIK3CA* и *KRAS* играют важную роль в молекулярном пути EGFR и при раке часто несут активирующие диагностические мутации, предсказывающие ответ на многие таргетные терапевтические препараты. Тем не менее связь между этими мутациями и особенностями генной экспрессии систематически не изучалась. Мы исследовали такие связи тремя способами. Во-первых, исследовали экспрессию этих генов в опухолях в зависимости от наличия мутаций с использованием базы данных профилей РНК-секвенирования проекта The Cancer Genome Atlas ($n = 3660$). Во-вторых, сравнили мутационный статус с уровнем активации молекулярного пути EGFR. В-третьих, сопоставили мутационный статус с расчетным уровнем экспрессии транскрипционной подписи, полученной из дифференциально экспрессируемых генов пути EGFR между опухолями, мутантными и референсными по данным генам. Активация пути EGFR оказалась связана с мутациями генов *BRAF* (рак щитовидной железы, меланома) и *PIK3CA* (рак молочной железы). Было показано, что уровни экспрессии генных подписей связаны с мутациями в *BRAF* (рак щитовидной железы, меланома), *EGFR* (плоскоклеточный рак легкого), *KRAS* (колоректальный рак), *PIK3CA* (рак молочной железы), однако приемлемый биомаркерный потенциал со значением $AUC > 0,7$ (0,809) мы наблюдали лишь для подписи гена *BRAF* при раке щитовидной железы. Эта подпись была затем проверена на независимом наборе литературных данных ($n = 127$, свежемороженые образцы, AUC 0,912), а также на экспериментальном наборе данных, полученном в Эндокринологическом научном центре г. Москвы ($n = 42$, образцы парафинизированной ткани, AUC 0,822). Полученные данные показывают, что профили генной экспрессии могут использоваться для надежной детекции мутации *BRAF* V600E при папиллярном подтипе рака щитовидной железы. Результаты демонстрируют применимость количественного анализа генной экспрессии для четкого определения статуса образца по драйверным онкогенным мутациям.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: мутации, EGFR, *BRAF* V600E, транскриптомный биомаркер, РНК-секвенирование, папиллярный рак щитовидной железы.

DOI: 10.31857/S0320972521110099

ВВЕДЕНИЕ

Гены *EGFR*, *BRAF*, *PIK3CA* и *KRAS* играют важную роль в сигнальном пути EGFR [1], в котором рецепторная тирозинкиназа EGFR явля-

ется первичным получателем сигнала, а продукты остальных генов — его нижестоящими передатчиками и регуляторами. Активирующие мутации в этих генах связаны с ответом на таргетные препараты гефитиниб/панитумумаб/эрло-

Принятые сокращения: АЛ — аденокарцинома легких; КРР — колоректальный рак; МКРЛ — мелкоклеточный рак легкого; РМЖ — рак молочной железы; РЩЖ — рак щитовидной железы; WT — дикий тип.

* Адресат для корреспонденции.

тиниб/цетуксимаб, алпелисиб, дабрафениб/вемурафениб (табл. 1). Так, активирующие мутации в гене *EGFR* являются предпосылкой для эффективного применения некоторых ингибиторов *EGFR* [2]. В свою очередь, активирующие мутации в генах нижестоящих передатчиков сигнала свидетельствуют о потенциально низкой эффективности *EGFR*-направленной терапии [3]. Например, для гена *BRAF* наиболее частой активирующей мутацией является *BRAF*^{V600E} [4], которая часто встречается при меланоме (~ 35–50% случаев [5]) и при папиллярном раке щитовидной железы (~ 51% [6]). Помимо блокаторов *EGFR*, были разработаны также специфические ингибиторы мутантной формы серин-треониновой киназы *BRAF* [7] и фосфоинозитид-3-киназы *PIK3CA* [8]. На графе молекулярного пути *EGFR* белки *PIK3CA* и *BRAF* расположены как нижележащие передатчики сигнала относительно представителей семейства *RAS* [9] и, следовательно, они могут быть эффективны даже в опухолях с мутированными *RAS*-белками.

С другой стороны, профили экспрессии различных молекул РНК оказались эффективными маркерами чувствительности опухоли к таргетным терапевтическим препаратам, согласно данным микрочипового профилирования [19] и РНК-секвенирования (RNA-seq) [20]. Профили РНК-секвенирования могут служить альтернативой иммуногистохимии в отдельных опухолях и могут служить маркерами ответа на таргетные препараты [21]. Кроме того, в качестве биомаркеров нового поколения могут быть использованы относительные уровни активации молекулярных путей, рассчитанные с использованием широкомасштабных данных генной экспрессии [22] для алгоритмической оценки эффективности противораковых препаратов [23]. Агрегация отдельных генов в пути или подписи приводит к более надежным результатам экспрессионного профилирования, что было предсказано теоретически [24] и доказано на экспериментальном материале опухолевых тканей [25].

Упомянутые выше результаты позволяют рассматривать анализ данных профилирования

Таблица 1. Одобренные для клинического использования таргетные противоопухолевые препараты, для которых известны диагностические активирующие мутации в генах *EGFR*, *BRAF*, *PIK3CA* и *KRAS*

Официальное название	Одобрены для видов рака	Сопутствующие биомаркеры	Ссылки
Цетуксимаб	колоректальный рак, рак головы и шеи	дикий тип <i>KRAS</i> , <i>NRAS</i> , <i>BRAF</i> (для КРР)	[10, 11]
Панитумумаб	колоректальный рак	дикий тип <i>KRAS</i> , <i>NRAS</i> , <i>BRAF</i>	[10]
Афатиниб	рак легких, рак молочной железы	активирующие мутации в <i>EGFR</i> (для РЛ): делеции экзона 19 или мутации экзона 21, L858R (для РЛ)	[12]
Гефитиниб	рак легких	активирующие мутации в <i>EGFR</i> : делеции экзона 19 или мутации экзона 21, L858R	[13]
Эрлотиниб	рак легких, панкреатический рак	активирующие мутации в <i>EGFR</i> : делеции экзона 19 или мутации экзона 21, L858R (для АЛ)	[12]
Дакомитиниб	рак легких	активирующие мутации в <i>EGFR</i> : делеции экзона 19 или мутации экзона 21, L858R	[12]
Осимертиниб	рак легких	активирующие мутации в <i>EGFR</i> : делеции экзона 19 или мутации экзона 21, L858R, также мутация T790M; но нет мутации экзона 20 C797S	[14]
Дабрафениб	рак легких, рак щитовидной железы	активирующая мутация в <i>BRAF</i> : V600E	[15]
Вемурафениб	меланома	активирующая мутация в <i>BRAF</i> : V600E	[16]
Алпелисиб + фулвестрант	рак щитовидной железы, папиллярный подтип	активирующая мутация в <i>BRAF</i> : V600E	[17]
Алпелисиб	рак молочной железы	активирующие мутации в <i>PIK3CA</i> : экзон 7 C420R; экзон 9 E542K, E545A, E545D (только 1635G>T), E545G, E545K, Q546E, Q546R; экзон 20 H1047L, H1047R, H1047Y	[18]

Примечание. АЛ — аденокарцинома легкого, РК — рак легкого, КРР — колоректальный рак.

РНК как новый перспективный подход в клинической онкологии, который в будущем может улучшить или заменить некоторые из нынешних диагностических методов [26]. Поэтому представляется важным также получить возможность идентифицировать клинически значимые мутации на основании данных генной экспрессии. Такие экспрессионные подписи действительно были реконструированы для некоторых мутаций, например, для амплификации гена транскрипционного фактора MYCN в нейробластоме [27], однако же эта задача остается в значительной степени нерешенной для активирующих мутаций генов *BRAF*, *PIK3CA*, *EGFR* и *KRAS*.

В настоящей работе мы исследовали транскрипционную проекцию мутаций *BRAF*, *PIK3CA*, *EGFR* и *KRAS* тремя способами. Во-первых, сравнивали экспрессию самих этих генов в опухолях, где они мутированы или имеют статус дикого типа. Сравнение проводили с использованием базы данных проекта The Cancer Gene Atlas (TCGA), $n = 3660$. Во-вторых, мутантный статус по каждому из генов сопоставляли с уровнем активации пути EGFR. В-третьих, мутации ассоциировали с генными подписями, полученными из наборов дифференциально экспрессирующихся генов пути EGFR между опухолями с мутантным статусом и статусом дикого типа.

Мы обнаружили, что мутации гена *EGFR* были связаны с повышенной экспрессией этого гена в аденокарциноме легкого (АЛ, $p = 0,021$), но не при плоскоклеточном раке легкого (ПКРЛ). Мутации *KRAS* были связаны с его транскрипционной активацией при колоректальном раке (КРР, $p = 4 \times 10^{-6}$), а мутация *BRAF* была связана с его повышенной экспрессией в меланоме ($p = 1 \times 10^{-7}$). Активация молекулярного пути EGFR была связана с мутациями *BRAF* при раке щитовидной железы (РЩЖ, $p = 1 \times 10^{-8}$), при меланоме ($p = 0,006$), а также с мутациями *PIK3CA* при раке молочной железы (РМЖ, $p = 2 \times 10^{-5}$). С другой стороны, генные экспрессионные подписи оказались статистически значимо связаны с мутациями *BRAF* при РЩЖ ($p < 1 \times 10^{-8}$) и при меланоме ($p < 1 \times 10^{-8}$), с мутациями *EGFR* для МКРЛ ($p = 2 \times 10^{-4}$), с мутациями *KRAS* при КРР ($p = 1 \times 10^{-8}$) и с мутациями *PIK3CA* при РМЖ ($p = 1 \times 10^{-9}$). Однако же большинство этих показателей имеют недостаточно сильный биомаркерный потенциал, что отражается в значениях ROC AUC (receiver operating characteristic, area under curve) $< 0,7$. Только лишь для подписи гена *BRAF* при РЩЖ был зафиксирован высокий биомаркерный потенциал со значением AUC, равным 0,809. Эту подпись мы проверили на независимом наборе литера-

турных данных из работы Yoo et al. [28] ($n = 127$, AUC 0,912, свежемороженные образцы) и наборе экспериментальных данных, полученных в Федеральном государственном бюджетном учреждении «Национальный медицинский исследовательский центр эндокринологии» Министерства здравоохранения Российской Федерации (Москва, РФ; далее в тексте — ЭНЦ) ($n = 42$, AUC 0,822, FFPE-образцы). Полученные нами данные свидетельствуют, что профили РНК-секвенирования могут быть использованы для надежной идентификации *BRAF*^{V600E} при раке щитовидной железы.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Экспериментальные клинические образцы биоматериала. Исследование проводилось в соответствии с этическими принципами Хельсинкской декларации. Ретроспективные биологические образцы были получены от пациентов с диагностированной первичной опухолью щитовидной железы, перенесших операцию в ЭНЦ. От всех пациентов или их законных представителей было получено письменное информированное согласие на участие в исследовании. Процедура получения письменного информированного согласия и дизайн исследования были одобрены локальным этическим комитетом ЭНЦ под председательством Е.Н. Андреевой. Для всех пациентов было получено согласие на публикацию информации о поле, возрасте, гистологическом типе опухоли, диагнозе и молекулярных данных, включая данные РНК-секвенирования, статусе мутации *BRAF*, но не о данных полногеномного или полноэкзомного секвенирования.

Биопрепараты представляли собой фиксированные в формалине парафинизированные (FFPE) блоки опухолевой ткани, которые были исследованы патологом для определения гистологического типа и оценки доли опухолевых клеток. В этом исследовании использовались только блоки FFPE, содержащие не менее 60% опухолевых клеток. В общей сложности для дальнейшего молекулярного скрининга было получено 42 образца папиллярного типа рака щитовидной железы, отвечающих вышеуказанным критериям. Клинические аннотации опухолевых образцов приведены в таблице в Приложении к статье.

Оценка статуса мутации *BRAF*^{V600E}. Статус мутации *BRAF*^{V600E} определяли с помощью аллель-специфической ПЦР с флуоресцентным зондом с двойной меткой согласно протоколу, опубликованному в работе [29]. Условия амплифика-

ции: начальная денатурация при 95 °C в течение 2 мин, затем 50 циклов по следующей программе — денатурация (94 °C, 10 с), отжиг и элонгация (60 °C, 15 с). Статус мутации считали положительным, если содержание мутантного аллеля составляло 3% и более от содержания аллеля дикого типа.

Подготовка транскриптомных библиотек и РНК-секвенирование. Библиотеки РНК были созданы, отсекуены и первично проанализированы согласно протоколам, ранее использованным для создания Атласа профилей РНК-секвенирования нормальных тканей человека [30]. Выделение РНК проводили с использованием набора RecoverAll™ Total Nucleic Acid Isolation Kit («Invitrogen», США), а длину выделенной РНК (RIN) измеряли с помощью биоанализатора Agilent 2100 («Agilent», США). Концентрацию РНК измеряли с помощью набора Qubit RNA Assay Kit («Thermo Fisher Scientific», США). Рибосомную РНК удаляли с использованием набора KAPA RNA Hyper Kit with RiboErase («Roche», Швейцария). Концентрации библиотек и распределение длин амплифицированных кДНК измеряли с помощью набора Qubit dsDNA HS Assay kit («Life Technologies», США) и Agilent TapeStation («Agilent») соответственно. Образцы секвенировали с использованием прибора Illumina HiSeq 3000 по протоколу для одноконцевых прочтений со средней длиной 50 п.н. с глубиной прочтения около 30 миллионов на образец. Первичную проверку качества данных отсекуенных библиотек проводили с помощью программы Illumina SAV. Демультимплексирование производили с использованием программы Illumina Bcl2fastq2 v2.17 согласно публикации [30].

Обработка данных РНК-секвенирования. Полученные прочтения РНК-секвенирования в формате файлов FASTQ обрабатывали с помощью программы STAR aligner [31] в режиме GeneCounts с использованием аннотации транскриптома человека Ensembl (сборка GRCh38, аннотация GRCh38.89). Идентификаторы генов Ensembl были преобразованы в названия генов согласно номенклатуре HGNC в соответствии с версией от 16 апреля 2021 (<https://www.genenames.org>). Уровни генной экспрессии были установлены для 36 596 аннотированных генов с HGNC-идентификаторами. Контроль качества полученных данных секвенирования проводили с использованием программы NCBI MAGIC [32]. Затем уровни прочтений индивидуальных генов были нормализованы с помощью метода квантильной нормализации [33]. Анализ дифференциальной экспрессии выполняли с использованием исходных

уровней генной экспрессии при помощи программы DESeq2, визуализацию данных проводили с помощью пакета EnhancedVolcano R.

Литературные транскриптомные данные с аннотацией мутационного статуса. Мы использовали транскриптомные данные, для которых также имелась аннотация мутационного статуса, полученные на открытом портале проекта TCGA (<https://portal.gdc.cancer.gov/>) [34]. Всего был проанализирован 491 образец РЩЖ, из которых 42,4% опухолей имели мутацию *BRAF*^{V600E}; 548 образцов меланомы, из которых 27,6% имели мутацию *BRAF*^{V600E}; 579 образцов КРР, из которых 37,1% имели мутацию *KRAS*; 1005 образцов РЛ, из которых 10,5% имели мутацию *EGFR*; 1037 образцов РМЖ, из которых 16,0% имели мутацию *PIK3CA*.

Для валидационных исследований использовали другой открытый набор данных РНК-секвенирования с аннотированным статусом мутации *BRAF*^{V600E} для образцов папиллярного РЩЖ, ранее опубликованный в работе Yoo et al. [28].

Аннотация молекулярного пути EGFR и оценка уровня его активации. В этом исследовании мы использовали две альтернативно аннотированные версии пути EGFR: «biocarta_egf_signaling_Main_Pathway» из базы данных Biocarta версии 1.2 [35] и «EGF_Pathway» из базы данных Qiagen Pathway Central [36]. Алгоритмически проиндексированные аннотации молекулярных функций для узлов пути были взяты из ранее опубликованных нами данных молекулярных путей [36]. Уровни активации молекулярных путей (PAL, Pathway activation levels) рассчитывали с помощью биоинформатической платформы Онкобокс (<https://oncobox.com/ru/>) [37].

Конструирование и оценка эффективности генных подписей. Генные подписи были сконструированы с использованием данных TCGA независимо для каждого типа рака на основе дифференциально экспрессируемых генов, относящихся к молекулярному пути EGFR в каждой из версий. Генные подписи оценивали по формуле:

$$GSS = \sum_{i=1}^n w_i g_i,$$

где *GSS* — это оценка значения генной подписи, *n* — общее число генов в подписи, *w_i* и *g_i* — двоичный логарифм отношения уровня экспрессии в образце и в контрольной группе и уровень экспрессии данного гена, включенного в подпись, соответственно. Таким образом, сконструированные генные подписи представляют собой

взвешенное среднее арифметическое экспрессии генов, включенных в соответствующую генную подпись.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

Анализ ассоциаций между мутациями и особенностями транскриптома. Путь EGFR играет решающую роль в развитии различных солидных опухолей, включая НМРЛ, РМЖ, РЩЖ и некоторые другие [13]. В настоящем исследовании мы ставили своей целью обнаружение специфических транскриптомных особенностей, связанных с наличием онкогенных мутаций в генах *BRAF*, *PIK3CA*, *EGFR* и *KRAS* тремя способами. Сначала мы проанализировали экспрессию этих генов в опухолях, имеющих по ним мутантный статус и статус дикого типа. Затем статус мутации этих генов сопоставляли с уровнем активации EGFR-пути. Далее мутации ассоциировали с генными подписями, сформированными из генов пути EGFR, которые дифференциально экспрессировались между опухолями с

мутированным статусом и статусом дикого типа для каждого из анализируемых генов.

Для решения указанной задачи мы использовали профили РНК-секвенирования, аннотированные мутационным статусом опухолей, из базы данных проекта TCGA [34]. Для нескольких видов рака мы исследовали, как уровень активации пути EGFR связан с онкогенными мутациями (табл. 2, 3): *KRAS* при КРР, *EGFR* при РЛ, *BRAF* при РЩЖ и меланоме, *PIK3CA* при РМЖ.

Для расчета уровня активации молекулярного пути (PAL) мы использовали два альтернативных варианта пути EGFR: «Основной путь передачи сигналов EGFR biocarta» из базы данных Biocarta и «Путь EGFR» из базы данных Qiagen Pathway Central, которые были единообразно алгоритмически аннотированы в отношении функциональной роли каждого из узлов пути [35, 36, 43].

Метод PAL для оценки активации молекулярного пути был выбран как отличающийся большей точностью и надежностью обнаружения новых биомаркеров по сравнению с уровнем экспрессии отдельных генов, что было по-

Таблица 2. Результаты ассоциативного исследования

Тип мутации	Тип опухоли	Генная экспрессия	Версия пути EGFR		Значения генной подписи для пути EGFR		Валидация генной подписи	
			Biocarta	Qiagen	Biocarta	Qiagen	литературная (PRJEB11591) [28]	экспериментальная (GSE138042) [38]
<i>BRAF</i> V600E [40]	РЩЖ	0,69 (0,073)	0,564 (0,015)	0,651 (9,7×10 ⁻⁹)	—	0,809 (2,2×10 ⁻¹⁶)	0,912 (3,5×10 ⁻¹⁵)	0,822 (3,7×10 ⁻⁴)
	меланома	0,69 (1,1×10 ⁻⁷)	0,568 (0,014)	0,576 (0,006)	—	0,692 (4,0×10 ⁻¹³)	—	—
<i>EGFR</i> : L858R и делеции в 19 и 28 экзонах [40]	АЛ	0,567 (0,021)	0,518 (0,59)	0,536 (0,34)	—	0,531 (0,43)	—	—
	ПРЛ	0,562 (0,95)	0,509 (0,83)	0,507 (0,89)	—	0,675 (1,7×10 ⁻⁴)	—	—
<i>KRAS</i> : мутации в 12, 13, 59, 61, 117, 146 кодонах [41]	КРР	0,69 (3,8×10 ⁻⁶)	0,534 (0,19)	0,508 (0,74)	—	0,646 (1,1×10 ⁻⁸)	—	—
<i>PIK3CA</i> [42]*	РМЖ	0,541 (0,46)	0,513 (0,6)	0,606 (1,5×10 ⁻⁵)	—	0,648 (1,3×10 ⁻⁹)	—	—

Примечание. Каждая строка представляет результаты сравнения между группами с мутантным статусом и статусом дикого типа по соответствующему гену для выбранных клинически значимых мутаций, в каждой ячейке показано значение ROC AUC (первое значение) и значение *p* (дано в скобках) согласно статистическому тесту по Вилкоксоу. Значения ROC AUC, превышающие 0,8, выделены жирным шрифтом.

* Экзон 7 C420R; экзон 9 E542K, E545A, E545D [1635G>T], E545G, E545K, Q546E, Q546R и экзон 20 H1047L, H1047R, H1047Y. АЛ — аденокарцинома легкого, РЩЖ — рак щитовидной железы, ПРЛ — плоскоклеточный рак легкого, КРР — колоректальный рак.

Таблица 3. Соотношение образцов с мутантным статусом и статусом дикого типа для каждого из проведенных сравнений

Ген	Рассматриваемые мутации	Тип опухоли	Источник данных	Количество образцов, статус дикого типа**	Количество образцов, мутированный статус**
<i>BRAF</i>	V600E [44]	РЩЖ	TCGA THCA	283 (57,6%)	208 (42,4%)
			PRJEB11591 [28]	75 (59,1%)	52 (40,9%)
			GSE138042 [38]	27 (64,3%)	15 (35,7%)
<i>EGFR</i>	L858R; делеции 19 и 28 экзона [40]	меланома	TCGA SKCM	397 (72,4%)	151 (27,6%)
		АЛ	TCGA LUAD	444 (86,9%)	67 (13,1%)
		ПРЛ	TCGA LUSC	455 (92,1%)	39 (7,9%)
<i>KRAS</i>	мутации в 12, 13, 59, 61, 117, 146 кодонах [41]	КРР	TCGA COAD READ	364 (62,9%)	215 (37,1%)
<i>PIK3CA</i>	[42]*	РМЖ	TCGA BRCA	871 (84,0%)	166 (16,0%)

Примечание. * Экзон 7 C420R; экзон 9 E542K, E545A, E545D (только 1635G>T), E545G, E545K, Q546E, Q546R и экзон 20 H1047L, H1047R, H1047Y.

** В скобках указан процент от общего числа образцов.

казано ранее [22]. Он также обладает большей стабильностью при независимом воспроизведении результатов [24]. Положительное значение PAL означает активацию молекулярного пути по сравнению с контрольной группой образцов, а отрицательное значение указывает на подавление пути, тогда как нулевое значение говорит об отсутствии изменений в активации пути [24]. В свою очередь, абсолютная величина PAL отражает степень изменения активации или ингибирования пути [22]. Таким образом, более высокое значение PAL отражает большую активацию пути, и наоборот [24].

Исследованные в данной работе генные подписи были сконструированы для каждой из двух версий пути EGFR с использованием следующих критериев: участвующие гены должны быть (i) включены в путь EGFR и (ii) дифференциально экспрессироваться ($p_{\text{adj}} - \text{value} < 0,05$ и $|\log_2\text{FoldChange}| > 1$) в мутированных образцах по сравнению с образцами дикого типа данного вида опухоли в отношении рассматриваемого онкогена. Значения генной подписи рассчитывали следующим образом:

$$GSS = \sum_{i=1}^n w_i g_i / n,$$

где GSS — это значение генной подписи, n — число генов в подписи, w_i и g_i — это двоичный логарифм отношения уровня экспрессии в образце к

контрольной группе и нормализованное число генных прочтений для гена i из данной подписи соответственно.

Связь с мутационным статусом оценивали с использованием двух различных статистических подходов. Во-первых, оценивали значимость различий между двумя сравниваемыми группами с использованием критерия Вилкоксона. Во-вторых, на основании значений ROC AUC определяли, можно ли использовать рассматриваемый показатель в качестве высококачественного биомаркера наличия данной мутации в образце. Площадь под ROC-кривой (AUC) — это показатель устойчивости биомаркера, который зависит от его чувствительности и специфичности [45]. Он изменяется в диапазоне от 0,5 до 1, а порог дискриминации обычно устанавливается на уровне 0,7, где элементы с более высоким значением AUC считаются биомаркерами хорошего качества [46]. Оценка AUC широко используется для аннотации молекулярных маркеров в онкологии [38]. Таким образом, оценка значения p согласно критерию Вилкоксона и ROC AUC помогают ответить на два вопроса: (1) регулируется ли рассматриваемый параметр по-разному среди двух сравниваемых групп и (2) может ли он служить для прогнозирования наличия мутации в конкретной опухоли. В нашем исследовании был обнаружен ряд ассоциаций для шести изучаемых видов опухолей.

Рак щитовидной железы. Папиллярный подтип РЩЖ был исследован в отношении мута-

пии *BRAF*^{V600E}. Мы обнаружили, что экспрессия *BRAF* существенно не различалась между мутированными и образцами РЩЖ дикого типа по этому гену (Wilcoxon test p -value = 0,073, ROC AUC 0,69; рис. S1 в Приложении). Тем не менее уровни PAL *EGFR* были значительно повышены в опухолях с мутацией *BRAF* по сравнению с опухолями дикого типа ($p = 0,015$ и $9,7 \times 10^{-9}$ для версий пути *EGFR* Biocarta и Qiagen соответственно; рис. S2 в Приложении). При этом, однако, значения PAL не могли служить качественными биомаркерами, позволяющими отличать индивидуальные опухоли с мутацией *BRAF* от опухолей дикого типа — они показали относительно низкие значения ROC AUC (0,564 и 0,651 для версий Biocarta и Qiagen соответственно; рис. S2 в Приложении).

Дальнейший анализ пути *EGFR* выявил дифференциально экспрессируемые гены только для версии Qiagen: экспрессия генов *FOS* и *RHOV* была подавлена, тогда как экспрессия *EPS8*, *RND3*, *CAV2*, *CAV1* и *MUC1* — активирована в образцах РЩЖ с мутацией *BRAF*. Для дифференциально экспрессируемых генов была сконструирована генная подпись, для которой провели оценку ее биомаркерного потенциала.

Значения генной подписи статистически значимо различались между образцами РЩЖ с мутантным статусом и статусом дикого типа ($p = 2,2 \times 10^{-16}$), при этом значение ROC AUC составило 0,809 (рис. 1). Это свидетельствует в пользу того, что такая подпись может служить качественным биомаркером наличия мутации *BRAF*^{V600E} в образце РЩЖ.

Меланома. Были исследованы образцы меланомы кожи на наличие связи с мутацией *BRAF*^{V600E}. Мы обнаружили, что экспрессия *BRAF* была значительно выше в мутированных опухолях ($p = 1,1 \times 10^{-7}$; рис. S3 в Приложении), но при этом уровень экспрессии этого гена не мог служить достаточно качественным биомаркером (ROC AUC = 0,69). Уровни активации путей *EGFR* Biocarta и Qiagen были также значительно повышены в мутированных меланоммах ($p = 0,014$ и $0,006$ соответственно; рис. S4, *a* в Приложении), но при этом также не были расценены как значимые биомаркеры (AUC = 0,568 и 0,576 соответственно; рис. S4, *b* в Приложении).

Генные подписи содержали только один ген с повышенной экспрессией (*STAT1*) для версии пути *EGFR* Biocarta; девять генов с повышенной экспрессией (*STAT1*, *JAK2*, *EGFR*, *DOK2*, *VAV1*, *SHC3*, *RHOH*, *PRKCQ*, *PIK3R5*) и восемь генов с пониженной экспрессией (*VAV2*, *MYC*, *MAP2K2*, *JUN*, *PIK3R2*, *RRAS2*, *RHOD*, *FOS*) для версии пути *EGFR* Qiagen (рис. S5 в Приложении). Обе

версии генных подписей продемонстрировали существенную разницу в значениях между мутированными и немутированными образцами ($p = 0,0081$ и $4,0 \times 10^{-13}$ соответственно), но показали невысокую прогностическую способность со значениями AUC, равными 0,586 и 0,692 соответственно (рис. S6 в Приложении).

Рак легкого. В раке легкого активирующие мутации в *EGFR* (*EGFR*^{L858R} и делеции в 19 и 28 экзонах) рассматривали для двух типов: аденокарцинома легкого (АЛ) и плоскоклеточный рак легких (ПРЛ).

Ген *EGFR* был статистически значимо сверхэкспрессирован в мутированных опухолях при АЛ, но не при ПРЛ ($p = 0,021$ и $0,95$ соответственно; рис. S7 в Приложении), однако экспрессия *EGFR* была слабым биомаркером даже для АЛ (AUC 0,567; рис. S7, *b* в Приложении). В то же время уровни активации обеих версий пути *EGFR* не были дифференциальными и оказались плохими биомаркерами как для АЛ, так и для ПРЛ (рис. S8 в Приложении).

Для АЛ удалось сгенерировать только одну генную подпись, которая содержала один ген с повышенной экспрессией (*EGFR*) и два — с пониженной (*VAV3* и *PIK3C2G*) (рис. S9, S10, *a* в Приложении). При этом указанная подпись не давала значимо различающихся значений между группами (рис. S11, *a* в Приложении) и не могла служить значимым биомаркером (рис. S11, *b* в Приложении).

Для ПРЛ также была выделена только одна генная подпись, включающая два гена с пониженной экспрессией (*HRAS* и *RELB*) из *EGFR* Qiagen пути (рис. S10, *b* в Приложении). Указанная подпись являлась дифференциальной ($p = 1,7 \times 10^{-4}$; рис. S12, *a* в Приложении), но не могла служить надежным биомаркером (AUC 0,675; рис. S12, *b* в Приложении).

Колоректальный рак. Для колоректального рака (КРР) оценивали ассоциации с мутациями гена *KRAS* (кодоны 12, 13, 59, 61, 117 и 146). Экспрессия *KRAS* была значительно выше в мутированных образцах ($p = 3,8 \times 10^{-6}$; рис. S13, *a* в Приложении), но при этом она являлась недостаточно надежным биомаркером (AUC 0,69, рис. S12, *b* в Приложении). Значения PAL для пути *EGFR* не были дифференциальными и служили плохими биомаркерами (рис. S14 в Приложении).

Единственную подпись удалось сконструировать для пути *EGFR* Qiagen с двумя активированными генами (*SHC2* и *PRKCG*; рис. S15 в Приложении). Она была дифференциальной ($p = 1,1 \times 10^{-8}$), но имела плохую прогностическую значимость (AUC 0,646; рис. S16 в Приложении).

Рак молочной железы. При РМЖ мы исследовали статус мутации гена *PIK3CA*. Уровень экспрессии *PIK3CA* не различался между мутированными опухолями и опухолями дикого типа (рис. S17 в Приложении). В то же время нами была обнаружена статистически значимая активация пути EGFR Qiagen (но не по версии Biocarta) в опухолях с мутацией *PIK3CA* ($p = 1,5 \times 10^{-5}$; рис. S18, *a* в Приложении), однако прогностическая значимость ее была низкой (рис. S18, *b* в Приложении).

Для пути EGFR Qiagen удалось сгенерировать подпись, включающую гены с повышенной регуляцией (*FOS* и *MUC1*) и гены с пониженной регуляцией (*PRKCG* и *ERBB2*; рис. S19 в Приложении). Значения для этой генной подписи оказались дифференциальными ($p = 1,3 \times 10^{-8}$), но имели недостаточную прогностическую значимость (AUC 0,648; рис. S19, *b* в Приложении).

Результаты описанных исследований обобщены в табл. 2. В целом, среди всех проверенных вариантов только один одновременно отличался достаточной статистической значимостью по обоим исследованным критериям: дифференциальности ($p = 2,2 \times 10^{-16}$) и значимости как биомаркера (AUC 0,809): 7-генная подпись для мутации *BRAF^{V600E}* при РЩЖ (рис. 1). Проверка этой подписи была в дальнейшем подтверждена на двух независимых наборах экспрессионных профилей РЩЖ.

Независимая проверка 7-генной подписи *BRAF^{V600E}* РЩЖ. Для 7-генной подписи оценивали биомаркерную значимость с использованием двух независимых наборов данных с профилями РНК-секвенирования для образцов папиллярного подтипа РЩЖ. Один набор данных ранее был опубликован в работе [28] и включал в себя 75 образцов дикого типа и 52 мутированных образца (*BRAF^{V600E}*). Другой набор данных включал образцы 27 опухолей дикого типа и 15 мутированных опухолей и был получен нами экспериментально в настоящем исследовании.

Для проверки подписи были собраны 42 ретроспективных гистологически и клинически охарактеризованных образца РЩЖ (таблица в Приложении) с установленным для них статусом мутации *BRAF^{V600E}*, и для них были получены профили РНК-секвенирования. Биологические образцы представляли собой парафинизированные блоки опухолевой ткани, содержащие не менее 60% опухолевых клеток. В исследование были включены 8 пациентов мужского пола и 34 — женского, возраст которых варьировал от 11 до 71 года (средний возраст — 45 лет; таблица в Приложении).

Семигенная подпись продемонстрировала хорошую биомаркерную значимость для обоих

наборов данных: AUC 0,912, значение $p = 3,5 \times 10^{-15}$ для литературного набора данных [28] (рис. 2, *a, b*) и AUC 0,822, $p = 3,7 \times 10^{-4}$ — для экспериментального набора (рис. 2, *c, d*).

Таким образом, на основе анализа трех независимых наборов данных, один из которых был экспериментальным, мы пришли к выводу, что 7-генная подпись, включающая гены *FOS*, *RHOB* с пониженной экспрессией и гены *PS8*, *RND3*, *CAV2*, *CAV1*, *MUC1* с повышенной экспрессией в мутированных опухолях, является надежным предсказательным маркером статуса мутации *BRAF^{V600E}* с использованием данных РНК-секвенирования.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

В настоящем исследовании мы подтвердили гипотезу о том, что при некоторых видах опухолей активирующие мутации в онкогенах могут быть статистически достоверно связаны с повышенной экспрессией соответствующих генов. Например, мутации *EGFR* были связаны с активацией этого гена при аденокарциноме легкого ($p = 0,021$), мутации *KRAS* — при колоректальном раке ($p = 4 \times 10^{-6}$), а мутации *BRAF* — при меланоме ($p = 1 \times 10^{-7}$).

Тем не менее подобных зависимостей не наблюдалось для тех же классов мутаций при других опухолях: для *EGFR* — при плоскоклеточном раке легкого, для *BRAF* — при раке щитовидной железы и для *PIK3CA* — при раке молочной железы (табл. 2).

Следует отметить, что продукты генов *EGFR*, *BRAF*, *KRAS* и *PIK3CA* образуют основные узлы молекулярного пути EGFR (рис. 2, *a, b*), поэтому мы поставили задачу впервые сравнить активацию пути EGFR с соответствующими статусами онкогенных мутаций. Было обнаружено, что активация пути EGFR связана с мутацией *BRAF^{V600E}* при раке щитовидной железы ($p = 1 \times 10^{-8}$) и при меланоме ($p = 0,006$), а также с активирующими мутациями *PIK3CA* при раке молочной железы ($p = 2 \times 10^{-5}$). В то же время для активирующих мутаций *EGFR* при раке легкого и для мутаций *KRAS* при колоректальном раке связи обнаружено не было (табл. 2).

На уровне значений алгоритмически сконструированных генных подписей удалось обнаружить значимую связь с мутацией *BRAF* при раке щитовидной железы ($p < 1 \times 10^{-8}$) и при меланоме ($p < 1 \times 10^{-8}$); с мутацией *EGFR* — при плоскоклеточной карциноме легкого ($p = 0,0002$); с мутацией *KRAS* — при колоректальном раке ($p = 1 \times 10^{-8}$); с мутацией *PIK3CA* — при раке молочной железы ($p = 1 \times 10^{-9}$). И только для мута-

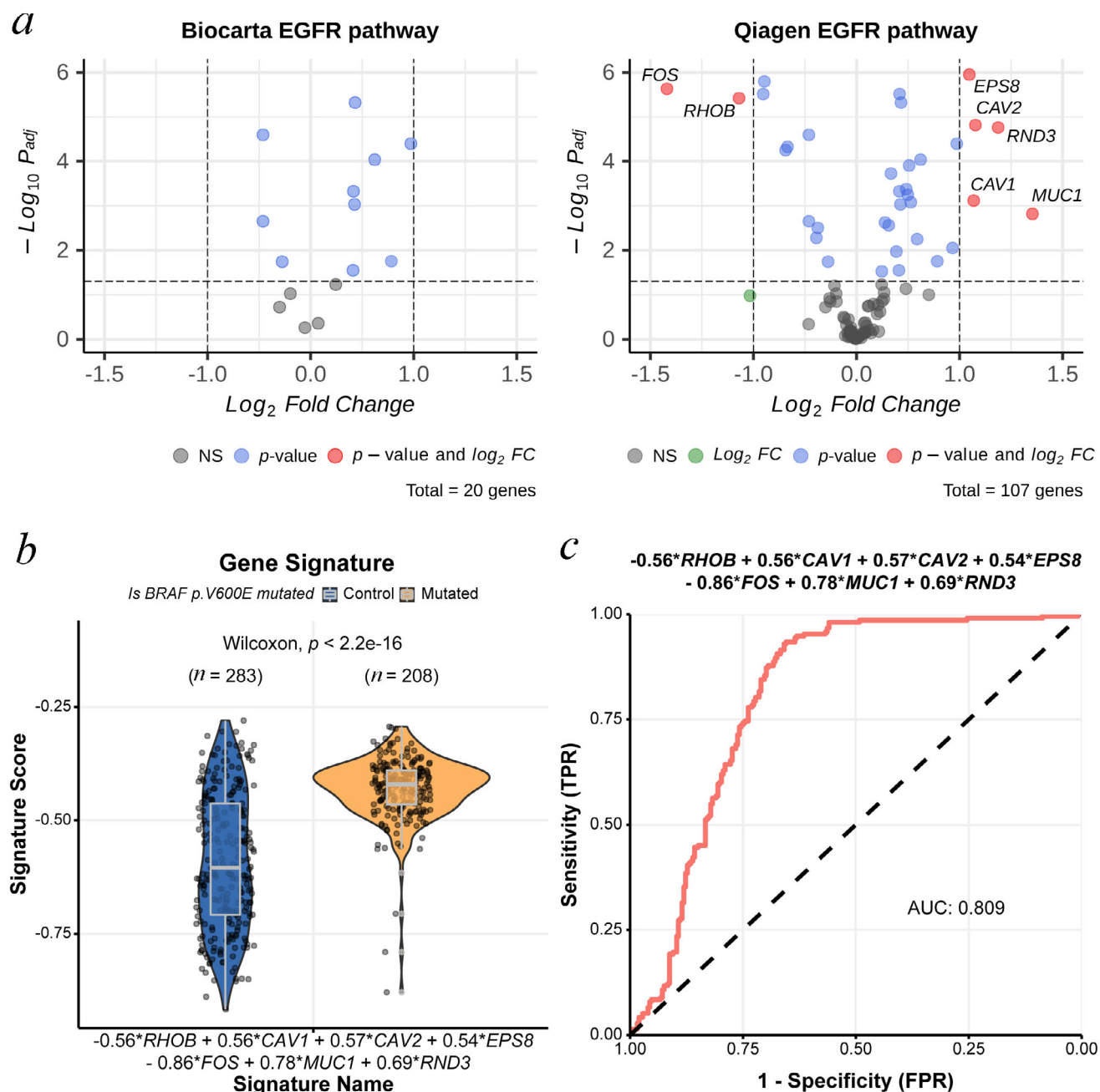


Рис. 1. *a* – Результаты анализа дифференциальной экспрессии генов пути EGFR (Biocarta 1.2 и Qiagen Pathway Central) между *BRAF*^{V600E} мутированными и образцами дикого типа РЩЖ из набора данных TCGA; *b* – значения генной подписи; *c* – биомаркерная значимость (ROC AUC) для генной подписи, сформированной из дифференциально экспрессируемых генов пути Qiagen EGFR

ций *EGFR* при аденокарциноме легкого связи обнаружено не было. Таким образом, мы предполагаем, что в целом текущая версия подхода, основанного на генных подписях, оказалась более эффективной в поиске ассоциаций с мутантным статусом, чем другие подходы, протестированные в настоящей работе. Среди всех проверенных ассоциаций только 7-генная подпись, разработанная для мутации *BRAF*^{V600E} при раке

щитовидной железы, оказалась надежным биомаркером (AUC 0,809–0,912), что подтверждается ее валидацией на трех независимых наборах данных (рис. 2). Интересно, что при этом в тех же самых наборах сходными были и особенности активации пути EGFR (рис. 3).

В двух видах рака (РЩЖ и меланома) мы реконструировали разные генные подписи, связанные с мутацией *BRAF*^{V600E}. Эти подписи

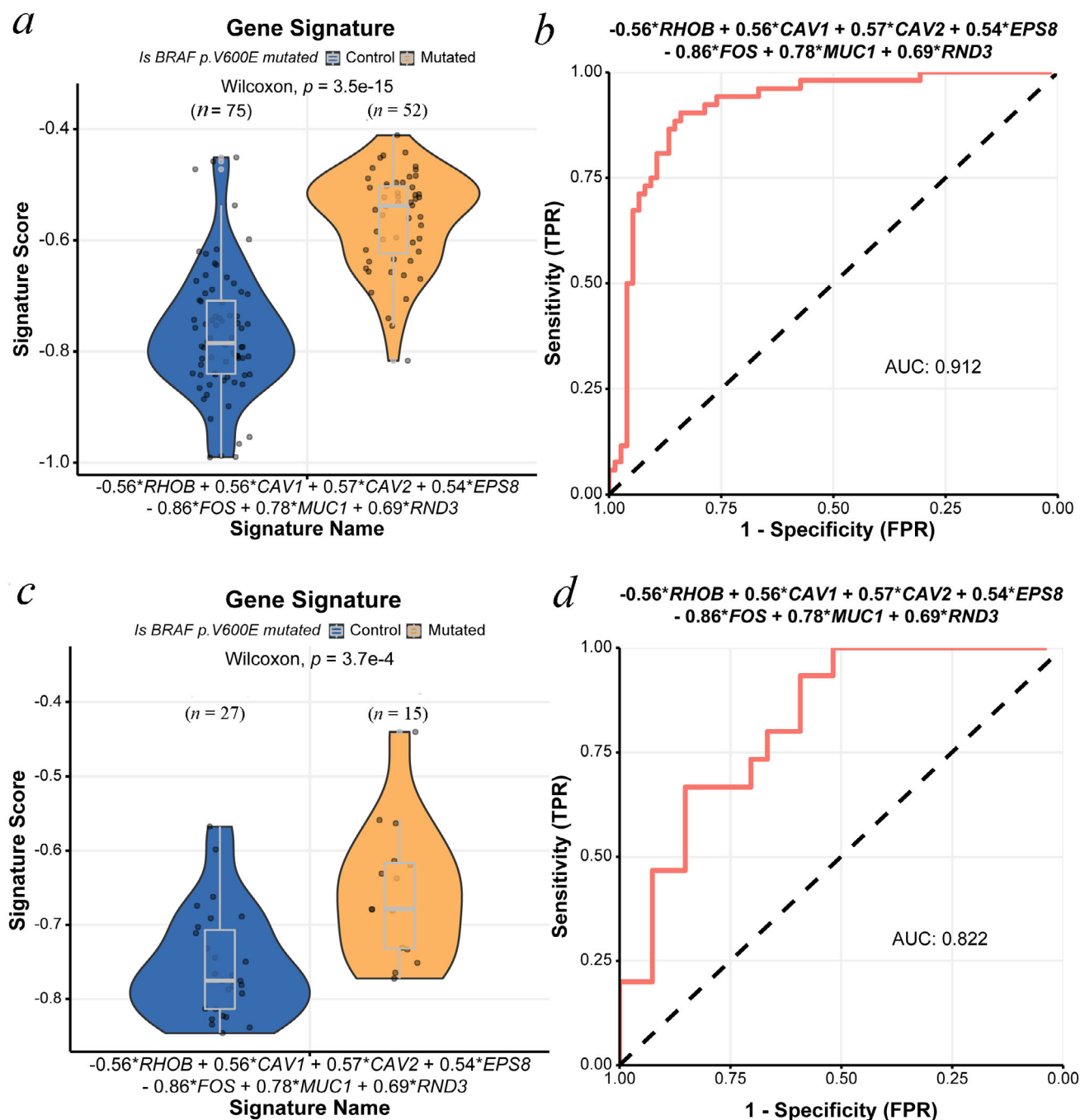


Рис. 2. Валидация 7-генной подписи на литературном (вверху) и экспериментальном (внизу) наборах данных. *a, c* — Значения генной подписи; *b, d* — её биомаркерная значимость (ROC AUC)

включали в себя 8 генов с пониженной и 8 генов с усиленной экспрессией при меланоме, 2 гена с пониженной и 5 генов с повышенной экспрессией при РЩЖ. Между этими двумя подписями было только одно совпадение по генному составу: ген *FOS* с пониженной экспрессией. Это доказывает, что одна и та же мутация *BRAF*^{V600E} при этих двух видах рака имеет различную молеку-

лярную реализацию даже среди генных продуктов пути EGFR. Возможно, эти различия могут лежать в основе успешной терапии блокаторами мутантного *BRAF* при меланоме [47] и отсутствием клинического интереса к ним при РЩЖ [17].

Клинические подходы на основе метода РНК-секвенирования в будущем могут стать



Рис. 3. Усредненный профиль активации пути Qiagen EGFR для образцов $BRAF^{V600E}$ мутированного папиллярного рака щитовидной железы по наборам данных (a) The Cancer Genome Atlas Thyroid Cancer (TCGA-THCA), (b) исследования Yoo et al. [28] (PRJEB11591) и (c) экспериментального набора GSE138042 [38]. Гены, включенные в 7-генную подпись для прогнозирования статуса $BRAF^{V600E}$ при раке щитовидной железы, обведены жирным кружком

прорывными технологиями, адаптированными к модели «все в одном тесте», поскольку в настоящее время в онкологии активно реконструируются многочисленные клинически значимые генные подписи [48]. Таким образом, обнаружение специфических для опухолей генных подписей для важных онкогенных мутаций имеет решающее значение для расширения функциональности тестов на основе РНК. Наши результаты доказывают, что это реалистичная задача: реконструирована и валидирована первая экспрессионная подпись, которая может надежно предсказать статус мутации *BRAF*^{V600E} при раке щитовидной железы. В то же время для того, чтобы обогатить репертуар клинических РНК-тестов и приложений РНК-секвенирования, необходимы дальнейшие исследования.

Финансирование. Выполнение данной работы было поддержано грантом Российского научного фонда № 18-15-00061.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов в какой-либо сфере деятельности.

Соблюдение этических норм. При выполнении настоящей работы были соблюдены все требования международных, национальных и/или ведомственных руководств по работе с лабораторными животными.

Дополнительные материалы. Приложение к статье на английском языке опубликовано на сайте журнала «Biochemistry» (Moscow) (<http://protein.bio.msu.ru/biokhimiya/>) и на сайте издательства Springer (www.springer.com/journal/10541), том 86, вып. 11, 2021.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Masuda, H., Zhang, D., Bartholomeusz, C., Doihara, H., Hortobagyi, G. N., and Ueno, N. T. (2021) Role of epidermal growth factor receptor in breast cancer, *Breast Cancer Res. Treat.*, **136**, 331-345.
- Bardeesy, N., Kim, M., Xu, J., Kim, R.-S., Shen, Q., et al. (2005) Role of epidermal growth factor receptor signaling in russian academy of sciences-driven melanoma, *Mol. Cell. Biol.*, **25**, 4176-4188, doi: 10.1128/mcb.25.10.4176-4188.2005.
- Zhou, C., and Yao, L. (2016) Di Strategies to improve outcomes of patients with EGRF-Mutant Non-Small cell lung cancer: review of the literature, *J. Thorac. Oncol.*, **11**, 174-186.
- Greaves, W. O., Verma, S., Patel, K. P., Davies, M. A., Barkoh, B. A., et al. (2013) Frequency and spectrum of BRAF mutations in a retrospective, single-institution study of 1112 cases of melanoma, *J. Mol. Diagnostics*, **15**, 220-226, doi: 10.1016/j.jmoldx.2012.10.002.
- Akbani, R., Akdemir, K. C., Aksoy, B. A., Albert, M., Ally, A., et al. (2015) Genomic classification of cutaneous melanoma, *Cell*, **161**, 1681-1696, doi: 10.1016/j.cell.2015.05.044.
- Kebebew, E., Weng, J., Bauer, J., Ranvier, G., Clark, O. H., et al. (2007) The prevalence and prognostic value of BRAF mutation in thyroid cancer, *Ann. Surg.*, **246**, 466-470, doi: 10.1097/SLA.0b013e318148563d.
- Holderfield, M., Deuker, M. M., McCormick, F., McMahon, M. (2014) Targeting RAF kinases for cancer therapy: BRAF-mutated melanoma and beyond, *Nat. Rev. Cancer*, **14**, 455-467.
- Silva, J. M., Bulman, C., and McMahon, M. (2014) BRAFV600E cooperates with PI3K signaling, independent of AKT, to regulate melanoma cell proliferation, *Mol. Cancer Res.*, **12**, 447-463, doi: 10.1158/1541-7786.MCR-13-0224-T.
- Normanno, N., De Luca, A., Bianco, C., Strizzi, L., Mancino, M., et al. (2006) Epidermal growth factor receptor (EGFR) signaling in cancer, *Gene*, **366**, 2-16.
- Frampton, J. E. (2010) Cetuximab: a review of its use in squamous cell carcinoma of the head and neck, *Drugs*, **70**, 1987-2010.
- Messersmith, W. A., and Ahnen, D. J. (2008) Targeting EGFR in colorectal cancer, *N. Engl. J. Med.*, **359**, 1834-1836.
- Alexander, M., Lin, E., and Cheng, H. (2020) Leptomeningeal metastases in non-small cell lung cancer: optimal systemic management in NSCLC with and without driver mutations, *Curr. Treat. Options Oncol.*, **21**, doi: 10.1007/s11864-020-00759-3.
- Garg, A., Batra, U., Choudhary, P., Jain, D., Khurana, S., et al. (2020) Clinical predictors of response to EGFR-tyrosine kinase inhibitors in EGFR-mutated non-small cell lung cancer: a real-world multicentric cohort analysis from India, *Curr. Probl. Cancer*, **44**, 100570, doi: 10.1016/j.cuprprobcancer.2020.100570.
- Lazzari, C., Gregorc, V., Karachaliou, N., Rosell, R., Santarpia, M. (2020) Mechanisms of resistance to osimertinib, *J. Thorac. Dis.*, **12**, 2851-2858, doi: 10.21037/jtd.2019.08.30.
- Odogwu, L., Mathieu, L., Blumenthal, G., Larkins, E., Goldberg, K. B., et al. (2018) FDA approval summary: dabrafenib and trametinib for the treatment of metastatic non-small cell lung cancers harboring BRAF V600E mutations, *Oncologist*, **23**, 740-745, doi: 10.1634/theoncologist.2017-0642.
- Kim, G., McKee, A. E., Ning, Y. M., Hazarika, M., Theoret, M., et al. (2014) FDA approval summary: Vemurafenib for treatment of unresectable or metastatic melanoma with the BRAFV600E mutation mutation, *Clin. Cancer Res.*, **20**, 4994-5000, doi: 10.1158/1078-0432.CCR-14-0776.
- Tang, K. T., and Lee, C. H. (2010) BRAF mutation in papillary thyroid carcinoma: pathogenic role and clinical implications, *J. Chinese Med. Assoc.*, **73**, 113-128.
- Narayan, P., Prowell, T. M., Gao, J. J., Fernandes, L. L., Li, E., et al. (2020) FDA Approval summary: alpelisib plus fulvestrant for patients with HR-positive, HER2-negative, PIK3CA-mutated, advanced or metastatic breast cancer, *Clin. Cancer Res.*, **27**, 1842-1849, doi: 10.1158/1078-0432.ccr-20-3652.
- Rodon, J., Soria, J. C., Berger, R., Miller, W. H., Rubin, E., et al. (2019) Genomic and transcriptomic profiling expands precision cancer medicine: the WINTHER trial, *Nat. Med.*, **25**, 751-758, doi: 10.1038/s41591-019-0424-4.
- Poddubskaya, E., Sorokin, M., Garazha, A., Glusker, A., Moiseev, A., et al. (2020) Clinical use of RNA sequencing

- and oncoPrint analytics to predict personalized targeted therapeutic efficacy, *J. Clin. Oncol.*, **38**, e13676-e13676, doi: 10.1200/jco.2020.38.15_suppl.e13676.
21. Butler, A., Hoffman, P., Smibert, P., Papalexi, E., and Satija, R. (2018) Integrating single-cell transcriptomic data across different conditions, technologies, and species, *Nat. Biotechnol.*, **36**, doi: 10.1038/nbt.4096.
 22. Buzdin, A., Sorokin, M., Garazha, A., Sekacheva, M., Kim, E., et al. (2018) Molecular pathway activation – new type of biomarkers for tumor morphology and personalized selection of target drugs, *Semin. Cancer Biol.*, **53**, 110-124.
 23. Borisov, N., Sergeeva, A., Suntsova, M., Raevskiy, M., Gaifullin, N., et al. (2021) Machine learning applicability for classification of PAD/VCD chemotherapy response using 53 multiple myeloma RNA sequencing profiles, *Front. Oncol.*, **11**, 652063, doi: 10.3389/fonc.2021.652063.
 24. Borisov, N., Suntsova, M., Sorokin, M., Garazha, A., Kovalchuk, O., et al. (2017) Data aggregation at the level of molecular pathways improves stability of experimental transcriptomic and proteomic data, *Cell Cycle*, **16**, 1810-1823, doi: 10.1080/15384101.2017.1361068.
 25. Borisov, N. M., Terekhanova, N. V., Aliper, A. M., Venkova, L. S., Smirnov, P. Y., et al. (2014) Signaling pathways activation profiles make better markers of cancer than expression of individual genes, *Oncotarget*, **5**, 10198-10205, doi: 10.18632/oncotarget.2548.
 26. Tsimberidou, A. M., Fountzilas, E., Bleris, L., and Kurzrock, R. (2020) Transcriptomics and solid tumors: the next frontier in precision cancer medicine, *Semin. Cancer Biol.*, doi: 10.1016/j.semcancer.2020.09.007.
 27. Petrov, I., Suntsova, M., Ilnitskaya, E., Roumiantsev, S., Sorokin, M., et al. (2017) Gene expression and molecular pathway activation signatures of MYCN-amplified neuroblastomas, *Oncotarget*, **8**, 83768-83780, doi: 10.18632/oncotarget.19662.
 28. Yoo, S. K., Lee, S., Kim, S. J., Jee, H. G., Kim, B. A., et al. (2016) Comprehensive analysis of the transcriptional and mutational landscape of follicular and papillary thyroid cancers, *PLoS Genet.*, **12**, doi: 10.1371/journal.pgen.1006239.
 29. Titov, S. E., Ivanov, M. K., Karpinskaya, E. V., Tsvlikova, E. V., Shevchenko, S. P., et al. (2016) miRNA profiling, detection of BRAF V600E mutation and RET-PTC1 translocation in patients from Novosibirsk oblast (Russia) with different types of thyroid tumors, *BMC Cancer*, **16**, doi: 10.1186/s12885-016-2240-2.
 30. Suntsova, M., Gaifullin, N., Allina, D., Reshetun, A., Li, X., et al. (2019) Atlas of RNA sequencing profiles for normal human tissues, *Sci. Data*, **6**, 1-9, doi: 10.1038/s41597-019-0043-4.
 31. Amin, S. B., Yip, W. K., Minvielle, S., Broyl, A., Li, Y., et al. (2014) Gene expression profile alone is inadequate in predicting complete response in multiple myeloma, *Leukemia*, **28**, 2229-2234, doi: 10.1038/leu.2014.140.
 32. Boratyn, G. M., Thierry-Mieg, J., Thierry-Mieg, D., Busby, B., and Madden, T. L. Magic-BLAST, an accurate RNA-seq aligner for long and short reads, *BMC Bioinformatics*, doi: 10.1186/s12859-019-2996-x.
 33. Zhao, Y., Wong, L., and Goh, W. W. B. (2020) How to do quantile normalization correctly for gene expression data analyses, *Sci. Rep.*, **10**, 1-11, doi: 10.1038/s41598-020-72664-6.
 34. Huang, X., Stern, D. F., and Zhao, H. (2016) Transcriptional profiles from paired normal samples offer complementary information on cancer patient survival – evidence from TCGA pan-cancer data, *Sci. Rep.*, **6**, 1-9, doi: 10.1038/srep20567.
 35. BioCarta – Online maps of metabolic and signaling pathways[HLS], Available online, URL: <https://www.hsls.pitt.edu/obrc/index.php?page=URL1151008585>.
 36. egf signaling – GeneGlobe, Available online, URL: <https://geneglobe.qiagen.com/us/explore/pathway-details/egf-signaling>.
 37. Sorokin, M., Kholodenko, R., Suntsova, M., Malakhova, G., Garazha, A., et al. (2018) Oncobox bioinformatical platform for selecting potentially effective combinations of target cancer drugs using high-throughput gene expression data, *Cancers (Basel)*, **10**, 365, doi: 10.3390/cancers10100365.
 38. Vladimirova, U., Rumiantsev, P., Zolotovskaya, M., Albert, E., Abrosimov, A., et al. (2021) DNA repair pathway activation features in follicular and papillary thyroid tumors, interrogated using 95 experimental RNA sequencing profiles, *Heliyon*, **7**, e06408, doi: 10.1016/j.heliyon.2021.e06408.
 39. Lokhandwala, P. M., Tseng, L. H., Rodriguez, E., Zheng, G., Pallavajjala, A., et al. (2019) Clinical mutational profiling and categorization of BRAF mutations in melanomas using next generation sequencing, *BMC Cancer*, **19**, 665, doi: 10.1186/s12885-019-5864-1.
 40. Hong, W., Wu, Q., Zhang, J., and Zhou, Y. (2019) Prognostic value of EGFR 19-del and 21-L858R mutations in patients with non-small cell lung cancer, *Oncol. Lett.*, **18**, 3887-3895, doi: 10.3892/ol.2019.10715.
 41. Gilson, P., Franczak, C., Dubouis, L., Husson, M., Rouyer, M., et al. (2019) Evaluation of KRAS, NRAS and BRAF hotspot mutations detection for patients with metastatic colorectal cancer using direct DNA pipetting in a fully-automated platform and Next-Generation Sequencing for laboratory workflow optimisation, **14**, e0219204, doi: 10.1371/journal.pone.0219204.
 42. Martínez-Saéz, O., Chic, N., Pascual, T., Adamo, B., Vidal, M. et al. (2020) Frequency and spectrum of PIK3CA somatic mutations in breast cancer, *Breast Cancer Res.*, **22**, doi: 10.1186/s13058-020-01284-9.
 43. Kamashev, D., Sorokin, M., Kochergina, I., Drobyshev, A., Vladimirova, U., et al. (2020) Human blood serum can donor-specifically antagonize effects of EGFR-targeted drugs on squamous carcinoma cell growth, *Heliyon*, **7**, e06394, doi: 10.1016/j.heliyon.2021.e06394.
 44. Crispo, F., Notarangelo, T., Pietrafesa, M., Lettini, G., Storto, G., et al. (2019) Braf inhibitors in thyroid cancer: clinical impact, mechanisms of resistance and future perspectives, *Cancers (Basel)*, **11**, 1388, doi: 10.3390/cancers11091388.
 45. Borisov, N., Sorokin, M., Tkachev, V., Garazha, A., and Buzdin, A. (2020) Cancer gene expression profiles associated with clinical outcomes to chemotherapy treatments, *BMC Med. Genomics*, **13**, 111, doi: 10.1186/s12920-020-00759-0.
 46. Boyd, J. C. (1997) Mathematical tools for demonstrating the clinical usefulness of biochemical markers, *Scand. J. Clin. Invest. Suppl.*, **227**, 46-63.
 47. Wong, D. J. L., and Ribas, A. (2016) Targeted therapy for melanoma, *Cancer Treat. Res.*, **167**, 251-262.
 48. Hou, J., Wang, Z., Li, H., Zhang, H., and Luo, L. (2020) Gene signature and identification of clinical trait-related m⁶A regulators in pancreatic cancer, *Front. Genet.*, **11**, 522, doi: 10.3389/fgene.2020.00522.

PATHWAY-BASED GENE SIGNATURES OF EGFR, BRAF, PIK3CA, AND KRAS GENE MUTATIONS IN BREAST, LUNG, THYROID CANCERS AND IN MELANOMA

M. Raevskiy^{1,2}, M. Sorokin^{3,4}, U. Vladimirova³, M. Suntsova³, V. Efimov², A. Garazha¹, A. Drobyshev³, A. Moiseev³, P. Rumiantsev⁵, X. Li⁶, and A. Buzdin^{1,2,3,7*}

¹ Omicsway Corp., 340 S Lemon Ave, 6040, Walnut, 91789 CA, USA; E-mail: buzdin@oncobox.com

² Moscow Institute of Physics and Technology, Dolgoprudny, 141701 Moscow Region, Russia

³ I. M. Sechenov First Moscow State Medical University, 119991 Moscow, Russia

⁴ Oncobox Ltd., 121205 Moscow, Russia

⁵ Endocrinology Research Centre, 117312 Moscow, Russia

⁶ Department of Pathology and Laboratory Medicine, University of California Los Angeles, Los Angeles, 90095 CA, USA

⁷ Shemyakin–Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry, 117997 Moscow, Russia

EGFR, *BRAF*, *PIK3CA*, and *KRAS* genes play major roles in EGFR pathway, and accommodate activating mutations that predict response to many targeted therapeutics. However, connections between these mutations and EGFR pathway expression patterns remain unexplored. Here, we investigated transcriptomic associations with these activating mutations in three ways. First, we compared expressions of these genes in the mutant and wild type tumors, respectively, using RNA sequencing profiles from The Cancer Genome Atlas project database ($n = 3660$). Second, mutations were associated with the activation level of EGFR pathway. Third, they were associated with the gene signatures of differentially expressed genes from these pathways between the mutant and wild type tumors. We found that the upregulated EGFR pathway was linked with mutations in the *BRAF* (thyroid cancer, melanoma) and *PIK3CA* (breast cancer) genes. Gene signatures were associated with *BRAF* (thyroid cancer, melanoma), *EGFR* (squamous cell lung cancer), *KRAS* (colorectal cancer), and *PIK3CA* (breast cancer) mutations. However, only for the *BRAF* gene signature in the thyroid cancer we observed strong biomarker diagnostic capacity with AUC > 0.7 (0.809). Next, we validated this signature on the independent literature-based dataset ($n = 127$, fresh-frozen tissue samples, AUC 0.912), and on the experimental dataset ($n = 42$, formalin fixed, paraffin embedded tissue samples, AUC 0.822). Our results suggest that the RNA sequencing profiles can be used for robust identification of the replacement of Valine at position 600 with Glutamic acid in the *BRAF* gene in the papillary subtype of thyroid cancer, and evidence that the specific gene expression levels could provide information about the driver carcinogenic mutations.

Keywords: mutation, EGFR, *BRAF* V600E, transcriptomic biomarker, RNA sequencing, papillary thyroid cancer

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 желательным представить аутентичный английский вариант рукописи.

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

(см. соответствующие Положения на сайтах журнала и на порталах издательств Springer и Pleiades).

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

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

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

Текст статьи следует разбить на разделы: 1) Введение, 2) Методы исследования, 3) Результаты исследования, 4) Обсуждение результатов (объединенный раздел «Результаты и их обсуждение» допускается в тех случаях, когда обсуждение невелико по объему), 5) Список литературы; 6) Резюме на английском языке.

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

Основное требование к изложению *методов исследования* состоит в том, чтобы процедуры были описаны максимально кратко, но по описанию можно было воспроизвести эксперименты; сюда же должны быть включены использованные в работе материалы, реактивы и приборы с указанием фирмы и страны-производителя, например: глицерин («Sigma-Aldrich», США), электронный микроскоп JEM 100C («JEOL», Япония). Только новые методы следует детально описывать; на ранее опубликованные и общеизвестные достаточно сослаться в списке литературы, указав автора и/или название метода (например, концентрацию белка определяли по методу Бредфорд [7]). Если метод известен 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 биoluminesцентного окисления люциферина светляков*. Дис. канд. хим. наук, МГУ, Москва.
8. Rosenkranz, A. A., Slastnikova, T. A., Durymanov, M. O., and Sobolev, A. S. (2013) Malignant melanoma and melanocortin 1 receptor, *Biochemistry (Moscow)*, **11**, 1228–1237, doi: 10.1134/S0006297913110035.

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

Объем **экспериментальной статьи**, включая список литературы, таблицы, рисунки (3 рисун-

ка считаются за 1 страницу) и подписи к ним, резюме на английском языке, не должен превышать 20 машинописных страниц, количество рисунков — не более 8; **краткое сообщение** — не более 12 страниц (включая не более 4 рисунков и/или таблиц); **мини-обзор** — не более 16 страниц (включая не более 5 рисунков); **обзор** — не более 35 страниц (включая не более 8 рисунков); сообщения в разделе «**Дискуссии**» — до 4 страниц.

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

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

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

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

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

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

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

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

— независимо от типа графики, рисунок должен обладать **высоким реальным разрешением**: не

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

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

- векторные иллюстрации не должны содержать точечных закрасок, таких как «Noise», «Black&white noise», «Top noise». Для векторной графики все использованные шрифты должны быть включены в файл;

- шрифты внутри рисунков выбираются из гарнитуры Arial размером 9 пунктов;

- следует избегать сканирования рисунков из книг и других печатных изданий, так как такие файлы дают низкое качество при печати и имеют неоправданно большой размер.

Несоблюдение правил подготовки графического материала приводит к необходимости переработки рисунков авторами и задержке публикации рукописи.

Дополнительные материалы к статьям. Для более полного описания исследования к статье могут прилагаться дополнительные материалы (аудио- и видеофайлы, презентации, дополнительные таблицы, рисунки и пр.) при условии, что автор является правообладателем прилагаемых материалов. Дополнительные материалы публикуются только в электронной версии журнала на сайте: <http://link.springer.com>, а также на сайте журнала: <http://protein.bio.msu.ru/biokhimiya/>. При наличии дополнительных материалов в тексте необходимо разместить ссылку на Приложение к статье.

Все **физические величины** рекомендуется приводить в международной системе СИ.

Поступившей в редакцию правильно оформленной рукописи присваивается регистрационный номер и фиксируется дата поступления, о чем редакция информирует авторов по электронной почте. **Рукописи, оформленные не по правилам, возвращаются авторам без рассмотрения.**

Рецензирование. При подаче рукописи авторы могут указать двух потенциальных рецензентов (ФИО, адрес электронной почты) из числа специ-

алистов в данной области исследований, а также тех, чье участие в рецензировании нежелательно.

Все рукописи рассматривает Ответственный ученый секретарь (Executive Editor-in-Chief) и направляет Ответственному Редактору по соответствующей конкретной области исследований; он, в свою очередь, указывает двух-трех специалистов для рецензирования рукописи. Список Ответственных Редакторов и членов редколлегии размещен на сайтах журнала, а также на порталах Pleiades и Springer.

Рукопись, получившая высшую оценку двух независимых рецензентов, печатается со специальной пометкой **«Ускоренная публикация»** (срок публикации – 3–4 месяца).

В случае необходимости рукопись направляется авторам на доработку по замечаниям рецензентов и редакторов, после чего она повторно рецензируется, и редколлегия вновь решает вопрос о приемлемости рукописи для публикации.

В журнале принято «одностороннее слепое рецензирование» (single blind review), т.е. авторам недоступны имена рецензентов, и редакция строго соблюдает конфиденциальность рецензентов. Все редакционные письма авторам идут за подписью Ответственного ученого секретаря журнала.

Через месяц после сдачи очередного выпуска журнала в печать редакция рассылает авторам по электронной почте корректуру статьи в виде PDF-файла и инструкцию по работе с ней. **На стадии корректуры не допускаются замены текста, рисунков или таблиц.**

Каждый выпуск журнала готовится одновременно на русском и английском языках. Перевод статей осуществляет группа высококвалифицированных переводчиков-биохимиков. В ходе работы у переводчиков часто возникает необходимость связаться с авторами и устранить неточности в русском тексте статьи. Согласованные с авторами исправления вносятся и в русский, и в английский тексты на стадии корректуры.

Авторы, достаточно хорошо владеющие профессиональным английским языком, представляют в редакцию свой **аутентичный** перевод статьи.

Переводы редактируются английской редакцией журнала, подготовленный текст направляется авторам для корректировки.

После выхода журнала в свет редакция рассылает авторам отиски русского и английского вариантов статей в виде PDF-файлов.

(С полным текстом Правил для авторов можно ознакомиться на сайте журнала: <https://www.biochemistrymoscow.com>.)