

# СОДЕРЖАНИЕ

---

---

Том 39, номер 6, 2022

---

---

## ОБЗОРЫ

Рецепторы SARS-CoV-2 и их участие в инфицировании клеток <i>П. П. Авдонин, Е. Ю. Рыбакова, С. К. Труфанов, П. В. Авдонин</i>	419
Прокоагулянтные свойства внеклеточных везикул при нормальной и патологической беременности <i>Е. М. Кольцова, А. А. Мартыанов, Н. А. Подоплелова</i>	431
***	
Изоформ-специфические ингибиторы PI3K подавляют агонист-индуцированную Ca <sup>2+</sup> -сигнализацию по PI3K-независимому механизму <i>Е. А. Дымова, О. А. Рогачевская, П. Д. Котова</i>	440
Дофамин защищает нейроны от токсического действия глутамата <i>Е. И. Федотова, А. Ю. Абрамов, А. В. Бережнов</i>	446
Миелоидная дифференцировка повышает устойчивость лейкозных клеток к TRAIL-индуцированной гибели путем снижения экспрессии рецепторов DR4 и DR5 <i>Я. В. Ломовская, М. И. Кобякова, А. С. Сенотов, И. С. Фадеева, А. И. Ломовский, К. С. Краснов, Д. Ю. Штатнова, В. С. Акатов, Р. С. Фадеев</i>	457
Влияние гимантана на активность фосфолипазы A2 и уровень циклооксигеназы-2 при экссудативном воспалении <i>Е. А. Иванова, Н. Н. Золотов, А. И. Матюшкин, Т. А. Воронина</i>	474
Действие озона на жирнокислотный состав и свободнорадикальную активность в тканях крыс при опухолевом росте <i>Т. П. Кулагина, Е. С. Жукова, А. В. Ариповский, Т. Г. Щербатюк, А. Б. Гапеев</i>	482
Правила для авторов	492

---

---

# Contents

---

---

Vol. 39, No. 6, 2022

---

---

## REVIEWS

SARS-CoV-2 Receptors and Their Role in Cell Infection <i>P. P. Avdonin, E. Yu. Rybakova, S. K. Trufanov, P. V. Avdonin</i>	419
Procoagulant Properties of Extracellular Vesicles in Normal and Pathological Pregnancy <i>E. M. Koltsova, A. A. Martyanov, N. A. Podoplelova</i>	431
***	
Isoform-Specific Inhibitors of PI3K Impair Agonist-Induced Ca <sup>2+</sup> Signaling in a PI3K-Independent Manner <i>E. A. Dymova, O. A. Rogachevskaja, P. D. Kotova</i>	440
Dopamine Protects Neurons against Glutamate-Induced Excitotoxicity <i>E. I. Fedotova, A. Y. Abramov, A. V. Berezhnov</i>	446
Myeloid Differentiation Increases Resistance of Leukemic Cells to TRAIL-Induced Death by Reducing the Expression of DR4 and DR5 Receptors <i>Ya. V. Lomovskaya, M. I. Kobayakova, A. S. Senotov, I. S. Fadeeva, A. I. Lomovsky, K. S. Krasnov, D. Yu. Shtatnova, V. S. Akatov, R. S. Fadeev</i>	457
Effect of Hemantane on Phospholipase A2 Activity and Cyclooxygenase-2 Level in Exudative Inflammation <i>E. A. Ivanova, N. N. Zolotov, A. I. Matyushkin, T. A. Voronina</i>	474
Effect of Ozone on the Fatty Acid Composition and Free Radical Activity in Rat Tissues during Tumor Growth <i>T. P. Kulagina, E. S. Zhukova, A. V. Aripovsky, T. G. Shcherbatyuk, A. B. Gapeyev</i>	484
Instructions for authors	492

---

---

УДК 578.233

## РЕЦЕПТОРЫ SARS-CoV-2 И ИХ УЧАСТИЕ В ИНФИЦИРОВАНИИ КЛЕТОК

© 2022 г. П. П. Авдонин<sup>а</sup>, Е. Ю. Рыбакова<sup>а</sup>, С. К. Труфанов<sup>а</sup>, П. В. Авдонин<sup>а</sup>. \*<sup>а</sup>Институт биологии развития им. Н.К. Кольцова РАН,  
Москва, 119334 Россия

\*e-mail: pvavdonin@yandex.ru

Поступила в редакцию 10.07.2022 г.

После доработки 30.07.2022 г.

Принята к публикации 01.08.2022 г.

Пандемия новой коронавирусной инфекции (COVID-19), вызванная вирусом SARS-CoV-2, многократно превзошла по масштабам эпидемии, вызванные SARS-CoV и MERS-CoV. Причиной этого стало наличие в белковой последовательности SARS-CoV-2 участков, обеспечивающих взаимодействие с более широким спектром рецепторных белков на поверхности клеток хозяина. В обзоре рассмотрены как уже известные рецепторы, общие для SARS-CoV и SARS-CoV-2, так и новые рецепторы, специфичные для SARS-CoV-2.

**Ключевые слова:** коронавирус SARS-CoV-2, рецепторы, фурин, катепсин L, ACE2, нейропилин, CD147, CD209, гепаран сульфат, GRP78, ASGR1, KREMEN1, тирозиновая протеинкиназа AXL

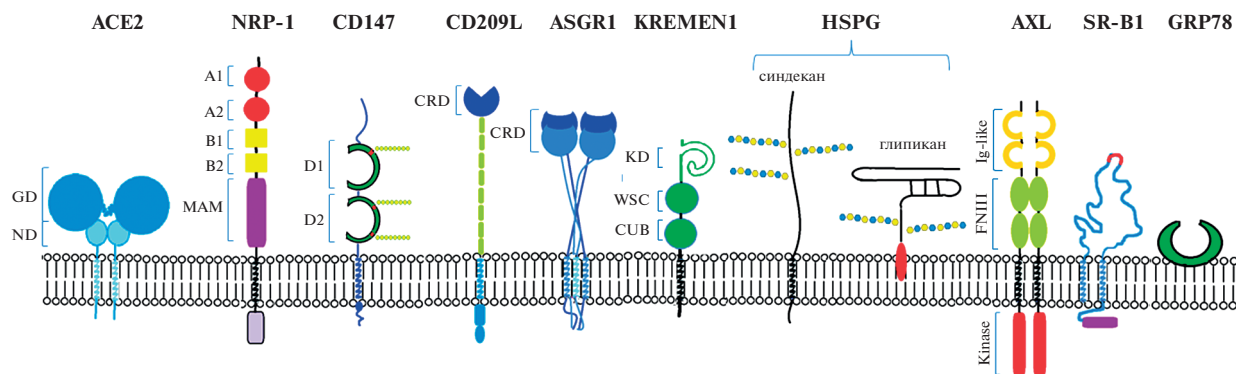
**DOI:** 10.31857/S0233475522060032

### ВВЕДЕНИЕ

С начала XXI века три коронавируса преодолели межвидовой барьер и стали причиной смертельной пневмонии у людей: коронавирус тяжелого острого респираторного синдрома (SARS-CoV), ближневосточный коронавирус респираторного синдрома (MERS-CoV) и коронавирус тяжелого острого респираторного синдрома 2 (SARS-CoV-2) [1]. Первые два из этих вирусов вызвали локальные эпидемии, тогда как появление SARS-CoV-2 привело к пандемии, которая продолжается уже около трех лет. По данным Всемирной организации здравоохранения (<https://covid19.who.int>), к началу августа 2022 г. в мире подтверждено более 570 млн случаев коронавирусной инфекции. Скончалось около 6.4 млн человек. Процент смертности от COVID-19 после начала массовой вакцинации существенно снизился, но наличие постковидных осложнений, так называемого постковидного синдрома, остается серьезной проблемой. Появление все новых вариантов SARS-CoV-2 по-прежнему вызывает большую озабоченность и внимание всего мира. Накопление мутаций в геноме вируса обусловлено непрерывной репликацией вируса в организме человека на фоне несвоевременной элиминации вирионов, связанной в основном с запоздалым клиническим лечением и отсутствием специфических и эффективных препаратов. Эти мутации могут привести к изменениям эпитопов и к снижению аффинности со-

ответствующих антител, генерируемых вакцинами. Поэтому важно разработать универсальные, специфические и эффективные препараты против имеющихся и возможных будущих вариантов коронавируса.

Способом защиты от коронавирусной инфекции может быть подавление транспорта вирусных частиц в клетки. На первом этапе инфицирования происходит связывание S-белка шипиков короны с рецепторами на мембране клеток-мишеней, расщепление S-белка на фрагменты S1 и S2, после чего происходит слияние вирусной мембраны с плазматической мембраной клетки либо эндоцитоз вирусных частиц [2–4]. После этого мРНК SARS-CoV-2 заходит внутрь клетки. Каноническим рецептором SARS-CoV-2 является ангиотензинпревращающий фермент 2 (ACE2), работающий в паре с мембранной протеазой TRMPSS2 [2]. Механизм проникновения в клетки с помощью ACE2 и TRMPSS2 был открыт ранее для вируса SARS-CoV. При анализе патогенеза новой коронавирусной инфекции выявилась парадоксальная ситуация – поражение вирусом SARS-CoV-2 клеток и органов во многих случаях не коррелировало с экспрессией в них ACE2 [5]. Это стимулировало поиск рецепторных и вспомогательных белков, специфичных именно для SARS-CoV-2. В результате исследований последних трех лет подтверждено участие в инфицировании клеток SARS-CoV-2 белковых мишеней



**Рис. 1.** Рецепторы и корецепторы, задействованные в инфицировании клеток коронавирусом SARS-CoV2: ангиотензинпревращающий фермент 2 (ACE2), нейропилин-1 (NRP-1), CD147 или базигин, CD209L или L-SIGN, рецептор 1 асиалогликопротеинов (ASGR1), белок KREMEN1 (kringle containing transmembrane protein 1 – трансмембранный белок, содержащий крингл-домен), гепарансульфатные протеогликаны (HSPG) синдекан и глипикан, рецепторная тирозинкиназа AXL, скэвенджер-рецептор типа 1 липопротеинов высокой плотности (SR-B1), GRP78 (glucose-regulated protein 78 – регулируемый глюкозой белок 78). Показаны домены рецепторных белков – GD (globular domain – глобулярный домен), ND (neck domain – соединительный домен), MAM (meprin, A-5 protein, receptor protein-tyrosine phosphatase  $\mu$ ), иммуноглобулиновые домены (D1 и D2), CRD (carbohydrate recognition domain – узнающий углеводы домен), KD (kringle domain – крингл или крендель домен), WSC (cell wall integrity and stress response component – компонент целостности клеточной стенки и ответа на стресс), CUB (complement C1r/C1s, Uegf, Bmp1), Ig-like (иммуноглобулин-подобный домен), FNIII (fibronectin type III – домен фибронектина III типа), kinase (тирозинкиназа), гликозильные остатки на молекуле CD147 и гепарансульфаты синдеканов и глипиканов.

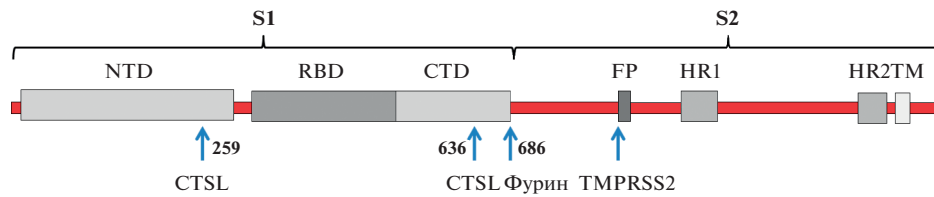
SARS-CoV, но также открыты новые рецепторы, которые обуславливают более высокую распространенность COVID-19 (рис. 1). В настоящем обзоре кратко охарактеризованы мишени коронавируса SARS-CoV-2 на клеточной поверхности и мембранные протеазы, активирующие S-белок. Кратко рассмотрена их роль в инфицировании разных тканей и клеток организма.

### ПРАЙМИРОВАНИЕ СПАЙКОВОГО БЕЛКА КОРОНАВИРУСА И ПРОНИКНОВЕНИЕ SARS-COV-2 В КЛЕТКИ

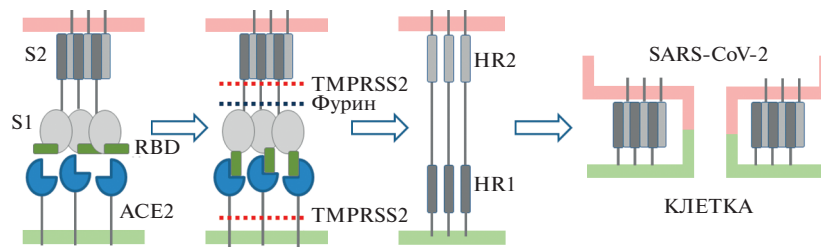
S-белок относится к вирусным fusion-белкам класса I, для которых характерна тримерная структура [6, 7]. Масса мономера составляет 180–200 кДа, к белку присоединено большое число полисахаридов [8]. Строение мономера S-белка показано на рис. 2. Пептидная цепь S-белка SARS-CoV-2 образована 1273 а.о. и включает сигнальный пептид (аминокислоты 1–13), расположенный на N-конце, и фрагменты S1 (14–685 а.о.) и S2 (686–1273 а.о.). В последовательности S1 имеется N-концевой домен (14–305 а.о.) и рецептор-связывающий домен (RBD – receptor binding domain, 319–541 а.о.), который непосредственно взаимодействует с ACE2. RBD может поворачиваться как на шарнире, переходя из компактной (положение “down”) в раскрытую (положение “up”) конформацию и обратно и при этом обнажая или скрывая мотив RBM (receptor binding motive), который связывается с рецепторным белком – ACE2 [9]. На поверхности вириона SARS-CoV-2

домен RBD S-белка спонтанно принимает обе эти конформации, и их соотношение может варьировать [10]. Далее после домена RBD расположен C-терминальный домен и участок, соединяющий S1 и S2. В состав фрагмента S2 входят fusion-пептид (FP) (788–806 а.о.), последовательность гептапептидных повторов 1 (HR1) (912–984 а.о.), HR2 (1163–1213 а.о.), трансмембранный домен TM и цитоплазматический домен (1237–1273 а.о.) [8].

Для того, чтобы содержимое вирусной частицы SARS-CoV-2 поступило в цитоплазму клетки, необходима активация S-белка, так называемое праймирование. В результате протеолитического расщепления образуются субъединицы S1 и S2 [11]. Субъединица S1 отвечает за связывание с ACE2, S2 за слияние с мембраной клетки – мишени коронавируса. После праймирования домен RBD приобретает открытую конформацию (положение “up”), при которой он способен связываться рецептором [3]. Снимается также пространственное ограничительное влияние S1 на S2. Имеющиеся данные говорят о том, что процесс праймирования идет следующим образом (рис. 3): мембранная препроотеинконвертаза фузин расщепляет белок S на S1- и S2-фрагменты справа от участка, содержащего основные аминокислоты R-X-(K/R)-R↓ (сайт протеолиза Q<sub>677</sub>TNSPRRAR-SV<sub>687</sub>, обозначаемый S1/S2). Фузин экспрессируется повсеместно в клетках организма. Наличие сайта протеолитического расщепления фурином считается основным фактором вирулентности высокопатогенных штаммов



**Рис. 2.** Структура S-белка коронавируса SARS-CoV-2. NTD (N-terminal domain – N-концевой домен), RBD (receptor binding domain – рецептор-связывающий домен), CTD (C-terminal domain – C-концевой домен), FP (fusion peptide – пептид слияния), TM (transmembrane domain – трансмембранный домен), HR1 и HR2 (heptapeptide repeats 1 and 2 – гептапептидные повторы 1 и 2), CTP (cathepsin L – катепсин L), TMPRSS2 (transmembrane protease, serine 2 – трансмембранная сериновая протеаза 2) Стрелками показаны точки протеолиза S-белка.



**Рис. 3.** Праймирование S-белка коронавируса SARS-CoV-2 и слияние вирусной и клеточной мембран. HR1 и HR2 – гептапептидные повторы 1 и 2.

таких вирусов, как ВИЧ, респираторно-синцитиальный вирус, вирус кори. Этот сайт есть у SARS-CoV-2, но отсутствует у SARS-CoV [12]. Он появился в результате инсерции фрагмента PRRA в полипептидную цепь коронавируса [11]. Далее после действия на S-белок фурина происходит расщепление фрагмента S2 протеазой TMPRSS2 по сайту S2' (DPSKPSKR↓SFIED) на N-конце S2-субъединицы [11, 13]. TMPRSS2 расщепляет S-белки как SARS-CoV, так и SARS-CoV-2. Показана колокализация TMPRSS2 с ACE2 [14]. Интересно, что TMPRSS2 расщепляет также пептидную цепь ACE2 и тем самым приводит к отделению ACE2 от мембраны.

В результате протеолиза по сайту S2' открывается N-концевой гидрофобный пептид FP (fusion peptide) субъединицы S2. FP прикрепляется к мембране инфицируемой клетки, далее происходит “слипание” альфа-спиральных участков HR1 и HR2, субъединица S2 сокращается и таким образом подтягивает вирусную частицу к поверхности клетки, плазматическая мембрана и мембрана вируса сливаются, образуется контакт между содержимым вирусной частицы и цитоплазмой, и происходит поступление вирусной РНК внутрь клетки (рис. 3). Благодаря тримерной структуре в “подтягивании” вируса к клетке участвуют одновременно три S2-субъединицы. При этом образуется пучок из шести альфа-спиралей. В присоединении вируса к клетке задействованы, по всей вероятности, не одна, а несколько молекул S-белка разных шипиков короны.

Расщепление S-белка коронавируса SARS-CoV-2 на S1- и S2-субъединицы может осуществлять протеаза катепсин L [15]. Zhao и соавт. [16] выявили консервативные сайты протеолиза S-белка катепсином L в положениях 259 и 636 (рис. 2), имеющиеся у всех вариантов SARS-CoV-2 (включая вариант Omicron), и показали, что протеолиз по этим точкам способствует принятию рецептор-связывающим доменом (RBD) активированной конформации (положение “up”), при которой он присоединяется к ACE2 и заражает клетки. В экспериментах по заражению клеток была использована псевдовирусная конструкция SARS-CoV-2. По данным [17], праймирование S-белка катепсином L происходит при эндоцитозе вирусных частиц, в отличие от активации S-белка протеазой TMPRSS2, когда идет слияние вирусной и плазматической мембран. Эндоцитоз коронавируса SARS-CoV-2 осуществляется по клатрин-зависимому механизму [4]. Крайне важно в плане возможного лечения COVID-19 учитывать, что одновременное воздействие ингибиторов сериновой и цистеиновой протеаз TMPRSS2 (камостат мезилата или нафамостат мезилата) и катепсина L (гидроксихлаксохина), которые входят в список известных лекарств, может синергично подавлять заражение клеток коронавирусом SARS-CoV-2 за счет блокирования обоих путей транспорта вирионов в клетки [17]. С помощью группового анализа дифференциальной экспрессии (genomic-guided gene set enrichment analysis – GSEA) эстрадиол и ретиноевая кислота также бы-

ли идентифицированы как возможные фармпрепараты, способные подавлять активность TM-PRSS2 и катепсина L и тем самым снижать транспорт SARS-CoV-2 в клетки [18]. Аналогичным образом, сетевой анализ перепрофилирования лекарств выявил возможность применения циклоспорина А, эстрадиола и кальцитриола в качестве потенциальных лекарств, подавляющих оба пути инфицирования клеток коронавирусом [19].

Поступление частиц SARS-CoV-2 в клетки происходит двумя путями – в результате эндоцитоза или слияния мембраны вирусной оболочки с плазматической мембраной клетки с высвобождением мРНК вируса в цитоплазму [20]. На вопрос о роли каждого из этих механизмов транспорта вирионов пока нет ясного ответа. В отношении SARS-CoV есть данные, что в легких инфицирование клеток через слияние мембран на 2–3 порядка эффективнее эндоцитоза благодаря предварительной активации S-белка экстраклеточными протеазами трипсином и термолизинном [21]. Транспортный путь SARS-CoV-2 в клетки зависит от относительной экспрессии протеаз на плазматической мембране [17].

### АНГИОТЕНЗИНПРЕВРАЩАЮЩИЙ ФЕРМЕНТ 2 (ACE2)

Роль ACE2 в качестве рецептора для коронавирусного S-белка первоначально была показана для SARS-CoV [22, 23], а позднее также для SARS-CoV-2 [2, 24, 25]. Домен RBD S1-субъединицы связывается с N-концевым пептидазным доменом ACE2 [26]. ACE2 открыт в 2000 г., его транскрипты обнаружены в сердце, почках и семенниках, а гистохимический анализ показал экспрессию в эндотелии коронарных и почечных сосудов и в тубулярном эпителии почек [27, 28]. Согласно атласу белков человека, ACE2 в наибольших количествах экспрессируется в кишечнике, почках и семенниках и в более низких концентрациях в легких и сердце [29]. В сосудистой системе наиболее высокая экспрессия ACE2 была выявлена в эндотелии микрососудов легких, а самая низкая – в эндотелии лимфатических сосудов [30]. Хотя инфекция SARS-CoV-2 в основном проявляется симптомами поражения респираторной системы, секвенирование мРНК отдельных клеток показало низкую экспрессию ACE2 в легочных и бронхиальных тканях и, напротив, высокий уровень экспрессии в клетках почек и пищеварительной системы [5, 31]. Это свидетельствует о том, что помимо ACE2, в клетках существуют другие мишени SARS-CoV-2, посредством которых происходит инфицирование. В пользу такой точки зрения говорят также данные о наличии у переболевших COVID-19 нейтрализующих антител, которые связываются с SARS-CoV-2 по

участку или участкам, отличным от RBD-домена [32, 33].

### НЕЙРОПИЛИН

Установлено, что в поступлении коронавируса в клетки участвует мембранный белок нейропилин-1 (NRP1). Он работает как корецептор (host-factor) ACE2 при инфекции SARS-CoV-2 [34]. NRP1 – это гликопротеин с молекулярной массой около 130 кДа, выполняющий многообразные функции в нервной системе и других органах и тканях. Он был открыт как фактор, необходимый для формирования и направленного роста пучков нервных волокон [35]. Это происходит благодаря связыванию с NRP1 семафоринов класса 3, которые являются нейрональными хеморепеллентами [36]. Кроме того, установлена роль NRP1 в клеточной адгезии посредством гетерофильного молекулярного взаимодействия [37]. В эндотелиальных клетках NRP1 выступает как рецептор фактора роста эндотелия сосудов VEGF<sub>165</sub>, но не VEGF<sub>121</sub>, и регулирует ангиогенез [38]. Внеклеточная часть NRP1 (рис. 1) содержит домены, присутствующие в ряде белков, но образующие комбинацию, не характерную для других мембранных рецепторов [37]. В частности, a1/a2 имеют общие последовательности с компонентами комплемента C1g и C1s, b1/b2-подобные домены присутствуют в факторах свертывания крови V и VIII, домен MAM (Mepripin, A-5 protein, receptor protein-tyrosine phosphatase  $\mu$ ) содержится в металлоэндопептидазах мепринах и рецепторной протеинтирозинфосфатазе. Показано, что связывание семафоринов происходит с доменами a1/a2 и b1/b2, VEGF165 связывается с b1/b2, и они же обеспечивают клеточную адгезию [37].

Связывание VEGF165 и семафоринов 3 с доменом b1 осуществляется через имеющуюся у этих белков на C-конце многоосновную последовательность Arg/Lys-X-X-Arg/Lys (мотив CendR – C end Rule sequence). Установлено, что присоединение вирусной части SARS-CoV-2 к нейропину происходит в этом же участке [34]. В случае SARS-CoV-2 фуриин расщепляет белок S на белки S1 и S2, в результате чего на C-конце S1 экспонируется последовательность Arg-Arg-Ala-Arg (RRAR), с которой взаимодействует NRP1. Благодаря связыванию коронавируса с NRP1 облегчается проникновение вирусных частиц в клетки. Это происходит, по-видимому, в результате стабилизации C-концевой части (остатки 640–685) молекулы S1, что облегчает высвобождение N-концевого фрагмента (686–700 а.о.) субъединицы S2 и разделение субъединиц [39].

NRP1 инициирует инфицирование вирусом SARS-CoV-2 клеток обонятельного эпителия, несмотря на низкий уровень экспрессии в этих клетках ACE2 [40]. В опытах на макаках-резусах

показано, что при инфицировании центральной нервной системы (ЦНС) вирусом SARS-CoV-2 реализуется механизм положительной обратной связи: в коре головного мозга происходит увеличение экспрессии NRP1, усиление иммунного ответа с высвобождением провоспалительных факторов и развитием вирусного энцефалита [41]. В варианте Омикрон рядом с мотивом CendR в S1 произошли мутации, благодаря которым связывание S1 с NRP1 энергетически более выгодно [42]. Возможно, это обуславливает повышенную инфекционность Омикрона. NRP1 рассматривается в качестве мишени для низкомолекулярных антиковидных препаратов, действующих по участку связывания CendR белка S1 [43].

### CD147 (БАЗИГИН)

Трансмембранный гликопротеин базигин (от слов *basic immunoglobulin*, другие названия CD147 и EMMPRIN – *extracellular matrix metalloproteinase inducer*) относится к суперсемейству иммуноглобулинов. Он представлен двумя изоформами, различающимися по числу иммуноглобулиновых доменов в экстраклеточной части полипептидной цепи. У базигина-1 три домена, он локализован в ретине и служит рецептором трофического белка палочек сетчатки глаза (RdCVF), секретируемого колбочками [44]. У более распространенной изоформы – базигина-2, которая, собственно, и носит название базигин или CD147, имеется два иммуноглобулиновых домена [45]. CD147 выполняет функцию рецептора для циклофилинов, белка S100A9 и гликопротеина VI тромбоцитов. В иммуноглобулиновых доменах имеются гликозилированные участки, которыми CD147 связывается с лектинами – E-селектином и галектином [45, 46].

CD147 (базигин) известен как белок, обеспечивающий поступление малярийного плазмодия в эритроциты [47]. Кроме этого, он выступает в качестве рецепторного белка при заражении клеток вирусом иммунодефицита человека типа 1, вирусами гепатита С и гепатита В, герпес-вирусом, ассоциированным с саркомой Капоши, вирусом SARS-CoV [48]. При инфицировании клеток ВИЧ-1 это происходит благодаря образованию тройного комплекса вируса с циклофилином А и CD147 [46].

Есть серия исследований, в которых получены данные об участии CD147 (базигина) в клеточной рецепции SARS-CoV-2. В работе большого коллектива китайских исследователей [49] было показано, что антитело против CD147 (базигина) меплазумаб подавляет амплификацию коронавируса в клетках Vero E6 и BEAS-2B. Напротив, экспрессия CD147 в невосприимчивых к SARS-CoV-2 клетках ВНК-21 способствовала проникновению в них вируса. Меплазумаб подавлял заражение

клеток Vero E6 исходным Уханьским вариантом SARS-CoV-2 и его последующими вариантами альфа, бета, гамма и дельта [50]. Подавление экспрессии CD147 в клетках CaLu3 (эпителиальные клетки человека из аденокарциномы легких НТВ-55™) с помощью siRNA в 2–3 раза снижало инфицирование, которое определяли по синтезу мРНК SARS-CoV-2 [48]. Xu и соавт. [51] использовали псевдотипированный вирус SARS-CoV-2, выращенный в клетках с бессывороточной средой, и показали, что он может инфицировать клетки A549 с низким уровнем hACE2 при участии CD147. Кроме того, мыши hCD147KI-NSG, у которых был экспрессирован человеческий CD147, были более чувствительны к заражению коронавирусом по сравнению с однопоментными мышами дикого типа WT-NSG [52]. CD147 относится к числу онкомаркеров, в связи с чем предполагается, что он может быть дополнительной важной мишенью при лечении COVID-19 у больных раком [53].

Несмотря на убедительные свидетельства в пользу важной роли CD147 в заражении новой коронавирусной инфекцией, остается неясным, как происходит взаимодействие вирусных частиц с CD147. Так, в исследованиях Shilts и соавт. [54] не было выявлено непосредственного связывания рекомбинантного пептида S1 и полного тримерного S-белка SARS-CoV-2 с CD147. В экспериментах исследователей из Великобритании и США [55] не обнаружено влияния поликлональных антител против CD147 на заражение клеток Vero E6 коронавирусом. Эти исследователи также не обнаружили прямого взаимодействия S-белка и RBD-домена с CD147. Возможно, что во взаимодействии CD147 и вирусных частиц участвуют дополнительные белки. Так, в заражении клеток SARS-CoV, как и в случае ВИЧ, участвует циклофилин А. Циклофилин А экспрессируется в цитоплазме, а также секретируется во внеклеточную среду. Однако в работе Fenizia и соавт. [48] показано, что, в отличие от SARS-CoV, комплекс CD147 с циклофилином А не участвует в заражении клеток коронавирусом SARS-CoV-2. По данным этих авторов, подавление экспрессии CD147 с помощью siRNA приводит к снижению уровня ACE2, и это рассматривается как один из возможных механизмов действия SARS-CoV-2, опосредованного CD147. В инфицированных псевдовиром SARS-CoV-2 клетках Vero E6 и Huh-7 S-белок локализуется с CD147 и Rab5a, что говорит о CD147-опосредованном эндоцитозе вирусных частиц [56]. CD147-опосредованный эндоцитоз SARS-CoV-2 происходит по Arf6-зависимому механизму.

### ГЕПАРАН СУЛЬФАТ

Гепарансульфат (ГС) — это линейный полисахарид, структурной единицей которого являются сульфатированные *D*-глюкуроновая или *L*-идуриновая кислота, соединенная с сульфатированным *N*-ацетилглюкозаминном. ГС присоединен к коровому, или стержневому, белку (core protein) и образует гепарансульфатные протеоглики, экспрессированные на поверхности почти всех клеток млекопитающих и во внеклеточном матриксе. Имеется два типа мембранных гепарансульфатных протеогликанов — синдицины и глипиканы [57]. Белок синдицинов связан с мембраной за счет трансмембранного С-концевого фрагмента, глипиканы ковалентно присоединены к фосфолипиду гликозилфосфатидилинозитолу (рис. 1). ГС выступает в качестве корцептора ACE2 при связывании вирусных частиц SARS-CoV-2 с клеточной мембраной. Clausen и соавт. показали [58], что ГС присоединяется к S-белку в участке домена RBD, расположенном рядом с участком связывания молекулы ACE2. По данным молекулярного докинга, при этом происходит образование тройного комплекса, причем гепарансульфат способствует разворачиванию сайта связывания ACE2. Сульфатированные полисахариды конкурентно ингибируют связывание S-белка с гепарансульфатом. Показано, что гепарин и эноксапарин (низкомолекулярный гепарин, мол. масса около 4500 Да) подавляют поступление псевдотипированного вируса SARS-CoV-2 в клетки HEK293T с IC<sub>50</sub> соответственно 5.99 и 1.77 мкг/л [59].

### CD209L (L-SIGN) и CD209/DC-SIGN

Гликопротеины CD209L, обозначаемые также L-SIGN (Liver/Lymph node-Specific ICAM-3 Grabbing Non-integrin) и CD209/DC-SIGN (Dendritic Cell-Specific Intercellular adhesion molecules (ICAM)-3 Grabbing Non-integrin), относятся к лектинам С-типа. Они непосредственно распознают широкий спектр вирусов HIV-1, Ebola, гепатита С, микобактерий *Mycobacterium tuberculosis*, паразитического микроорганизма *Leishmania pifanoi* и ряда других микроорганизмов (см. обзор [60]). Роль CD209L и CD209 в инфицировании клеток коронавирусами была первоначально установлена для SARS-CoV [61] и впоследствии подтверждена для SARS-CoV-2 [62, 63]. CD209L и CD209 выступают в качестве корцепторов ACE2 при связывании S-белка. В работе Theraut и соавт. [64] показано, что лектин CD209L сам по себе при захвате вируса не вызывает заражение клеток Vero E6, не экспрессирующих ACE2, но способствует переносу вируса в клетки ACE2+ Vero E6. CD209L может выступать в качестве корцептора ACE2, образуя с ним гетеродимер [63]. Эти же авторы показали, что SARS-CoV-2 способен инфицировать эндотелиальные клетки (ЭК) со-

судов человека, причем нокдаун CD209L или добавление растворимого CD209L снижает заражение. Вклад CD209L особенно выражен в клетках, в которых уровень экспрессии ACE2 низок, а экспрессия CD209L, напротив, высока. Это относится к ЭК синуса печени человека и эндотелиальным клеткам лимфатических узлов [30, 65]. Методом конфокальной микроскопии вирусные частицы выявлены в ЭК синуса печени в аутопсийном материале от больных COVID [65]. ЭК синуса печени являются основными источниками фактора Виллебранда (vWF) и фактора свертывания VIII (FVIII). Заражение этих ЭК коронавирусом, по-видимому, является одной из причин повышенного свертывания крови и тромбообразования при коронавирусной инфекции. В миелоидных клетках SARS-CoV-2 усиливает провоспалительные реакции посредством CD209 и других лектинов С-типа — секрецию интерлейкинов 1b и 8, цитокинов CCL2/3, хемокина CXCL10 [66]. Специфические антагонисты CD209L PolyMan26 и другие гликомиметики маннозида подавляют связывание S-белка и инфицирование клеток [67]. Есть данные об участии CD209L и других лектинов С-типа в активации коронавирусом SARS-CoV-2 секреции миелоидными клетками провоспалительных цитокинов и хемокинов [66].

### GRP78 (GLUCOSE-REGULATED PROTEIN 78)

GRP78 (Glucose-Regulated Protein 78) является белком теплового шока — шапероном, в нормальных клетках осуществляющим рефолдинг белков в эндоплазматическом ретикулуме либо направляющим развернутые белки в клеточные системы деградации [68]. При стрессе эндоплазматического ретикулума происходит гиперэкспрессия и транслокация GRP78 на клеточную мембрану [69], где он также проводит обработку большого числа развернутых белков. Однако экспонированный на плазматической мембране GRP78, помимо восстановительной работы по рефолдингу белков, способствует проникновению в клетку патогенов — вирусов, бактерий и грибков. Гиперэкспрессия GRP78 наблюдается на мембранах различных раковых клеток, что повышает агрессивность онкологического заболевания. Молекулярный докинг выявил предполагаемое взаимодействие между GRP78 и рецептор-связывающим доменом (RBD) S-белка SARS-CoV-2 [70]. GRP78 может образовывать комплекс с SARS-2-S и ACE2 на поверхности и в околоядерной области, характерной для эндоплазматического ретикулума в клетках VeroE6-ACE2, причем показано, что субстрат-связывающий домен GRP78 имеет решающее значение для этого взаимодействия [71]. Чтобы исследовать роль GRP78, авторами цитированной работы был проведен нокдаун GRP78 в клетках VeroE6-ACE2. Потеря GRP78 заметно снижа-



ла экспрессию ACE2 на клеточной поверхности. Был сделан вывод, что GRP78 представляет собой вспомогательный фактор для проникновения SARS-CoV-2 в клетки [71].

### РЕЦЕПТОРНАЯ ТИРОЗИНКИНАЗА AXL

По данным Wang и соавт. [5], рецепторная тирозинкиназа AXL специфически взаимодействует с N-концевым доменом S1-субъединицы S-белка коронавируса SARS-CoV-2. Избыточная экспрессия AXL в клетках HEK293T способствовала проникновению SARS-CoV-2 так же эффективно, как и избыточная экспрессия ACE2. В клетках легких H1299 и первичных эпителиальных клетках легких человека, где уровень ACE2 низкий, а уровень AXL высок, нокаут последней значительно снижал инфицирование SARS-CoV-2. Растворимая человеческая рекомбинантная тирозинкиназа AXL блокировала инфекцию SARS-CoV-2 в клетках, экспрессирующих высокие уровни AXL. Авторы статьи показали, что уровень экспрессии AXL хорошо коррелирует с уровнем S-белка SARS-CoV-2 в клетках жидкости бронхоальвеолярного лаважа у пациентов с COVID-19. На основе этих данных был сделан вывод о том, что AXL является новым рецептором для SARS-CoV-2, который может играть важную роль в распространении коронавирусной инфекции дыхательной системы человека. Лигандом AXL является белок GAS6, служащий мостиком, соединяющим фосфатидилсерин вирусной мембраны с AXL [72]. Таким способом клетки инфицируют ряд вирусов, в частности Денге, Западного Нила и Эбола. В статье [5] авторы на основании собственных данных утверждают, что в случае SARS-CoV-2 работает некий альтернативный механизм.

### ASGR1 и KREMEN1

Недавно были выявлены два новых рецептора, специфично связывающих S-белок SARS-CoV-2 [73]. Этими белками оказались ASGR1 (asialoglycoprotein receptor-1) и KREMEN1 (Kringle Containing Transmembrane Protein 1). Для выявления рецепторов был проведен скрининг 5054 мембранных белков человека (91.6% от общего количества предполагаемых белков мембран) на предмет связывания ими S-белка. Каждый из этих белков по отдельности экспрессировали в клетках HEK293E с нокаутом ACE2 и определяли связывание с данными клетками экстраклеточного фрагмента S-белка вирусов SARS-CoV-2, SARS-CoV и MERS. В результате было обнаружено 12 белков, способных специфически связывать с высоким сродством S-белок SARS-CoV-2 ( $K_{дис} \leq 525$  нМ), включая уже известные рецепторы ACE2 и CD209L (L-SIGN). Константы диссоциации  $K_{дис}$  S-белка SARS-CoV-2 с ASGR1 и KREMEN1 со-

ставили 94.8 и 19.3 нМ, что сопоставимо с  $K_{дис}$  для ACE2 – 12.4 нМ. Авторы показали, что KREMEN1 связывается с доменами RBD, NTD и S2-доменом экстраклеточной части S-белка с наибольшей аффинностью по отношению к RBD, а ASGR1 эффективно связывается с доменом RBD и с меньшим сродством с доменом NTD. S-белки вирусов SARS-CoV и MERS не связывались с ASGR1 и KREMEN1.

Было исследовано, экспрессия каких белков из числа выявленных рецепторов экстраклеточного фрагмента S-белка коронавируса делает клетки, не экспрессирующие ACE2, чувствительными к заражению вирусом SARS-CoV-2. Оказалось, что ACE2-независимое инфицирование происходит только с ASGR1 и KREMEN1. Этот результат не противоречит ранее полученным данным о том, что CD209L (L-SIGN) участвует в транспортировке коронавируса в клетки в паре с ACE2 [64]. Возможно, другие связывающие S-белок мембранные белки из приведенного в работе [73] списка, включая родственный CD209L другой лектин C-типа, CD207, также работают как функциональные рецепторы коронавируса в связке с ACE2. Несмотря на то, что ASGR1 и KREMEN1 могут работать как независимые транспортеры SARS-CoV-2, при их совместной экспрессии с ACE2 способность SARS-CoV-2 инфицировать клетки синергично увеличивалась [73].

Структуры ASGR1 и KREMEN1 схематично представлены на рис. 1. В экстраклеточной части KREMEN1 имеется три домена – Krm (Kringle domain), WSC и CUB [74]. Главную роль в связывании S-белка играют домен CUB в KREMEN1. В ASGR1 связывание осуществляется с доменом лектина C-типа. KREMEN1 в организме выполняет функции высокоаффинного рецептора DKK1 – антагониста Wnt-сигнального пути [74, 75] и, кроме того, является переносчиком в клетки некоторых энтеровирусов [76]. ASGR1 экспрессируется преимущественно в гепатоцитах и регулирует концентрацию гликопротеинов в плазме крови, осуществляя эндоцитоз десилированных гликопротеинов [77]. Известна его роль как рецептора вируса гепатита С [78].

### СКЭВЕНДЖЕР-РЕЦЕПТОР ЛИПОПРОТЕИНОВ ВЫСОКОЙ ПЛОТНОСТИ В ТИПА 1

В работе Wei и соавт. [79] показано, что скэвенджер-рецептор (рецептор-мусорщик) липопротеинов высокой плотности (ЛПВП) В типа 1 (SR-B1) способствуеет зависимо от ACE2 проникновению SARS-CoV-2. SR-B1 облегчает проникновение SARS-CoV-2 в клетки благодаря более прочному прикреплению вируса к мембране. Авторами показано, что S-белок способен связывать холестерин и ЛПВП, что, возможно, обеспе-

чивает присоединение коронавируса к рецепторам SR-B1. Известна другая патогенетическая роль SR-B1 – он переносит в гепатоциты вирусы гепатита С и вируса Денге [80]. Рецептор SR-B1 в наибольшей степени экспрессирован в печени и в стероидогенных клетках, где осуществляет поступление холестерина соответственно для синтеза желчных кислот и стероидных гормонов [81].

### ТЯЖЕЛАЯ ЦЕПЬ НЕМЫШЕЧНОГО МИОЗИНА IIA (NONMUSCLE MYOSIN HEAVY CHAIN IIA)

Тяжелая цепь немышечного миозина IIA (НТЦМ IIA) была идентифицирована как еще один белок, способствующий инфицированию клеток легких человека коронавирусом SARS-CoV-2 [82]. Было показано, что NTG-домен S1-субъединицы и субъединица S2 непосредственно взаимодействуют с С-концевым доменом тяжелой цепи. Удаление генетическим путем НТЦМ IIA значительно снижало псевдовирусную инфекцию SARS-CoV-2 в клетках дикого типа (WT) A549 и Calu-3, а сверхэкспрессия НТЦМ IIA ее усиливала.

### ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Интенсивное изучение коронавируса SARS-CoV-2 показало, что механизмы его действия на клетки человека более разнообразные и сложные, чем это исходно представлялось. Получены данные о наличии у клеток дополнительных помимо ACE2 рецепторов для S-белка, расширены представления о протеолитическом праймировании коронавируса, появились новые сведения о его влиянии на сигнальные системы клетки. Изучение этих вопросов имеет принципиальное значение, поскольку у людей разного возраста, в частности, взрослых и детей, у людей с разными сопутствующими заболеваниями течение новой коронавирусной инфекции проявляет существенные особенности, которые могут быть обусловлены характером экспрессии и активности тех или иных рецепторов коронавируса SARS-CoV-2 и вспомогательных белков, участвующих в заражении клеток. Изучение молекулярных механизмов взаимодействия вирусов с клетками должно также способствовать пониманию того, почему уже появившиеся и возможные будущие штаммы коронавируса различаются по клеточной и органной специфичности и по тяжести воздействия на организм человека.

**Конфликт интересов.** Авторы декларируют отсутствие явных и потенциальных конфликтов интересов, связанных с публикацией настоящей статьи.

**Источники финансирования.** Работа выполнена при поддержке Российского научного фонда (грант № 21-15-00441).

**Соответствие принципам этики.** Настоящая статья не содержит описания каких-либо исследований с участием людей или животных в качестве объектов.

### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Peeri N.C., Shrestha N., Rahman M.S., Zaki R., Tan Z., Bibi S., Baghbanzadeh M., Aghamohammadi N., Zhang W., Haque U. 2020. The SARS, MERS and novel coronavirus (COVID-19) epidemics, the newest and biggest global health threats: What lessons have we learned? *Int. J. Epidemiol.* **49**, 717–726. <https://doi.org/10.1093/ije/dyaa033>
2. Hoffmann M., Kleine-Weber H., Schroeder S., Kruger N., Herrler T., Erichsen S., Schiergens T.S., Herrler G., Wu N.H., Nitsche A., Muller M.A., Drosten C., Pohlmann S. 2020. SARS-CoV-2 cell entry depends on ACE2 and TMPRSS2 and is blocked by a clinically proven protease inhibitor. *Cell*. **181**, 271–280 e278. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2020.02.052>
3. Shang J., Wan Y., Luo C., Ye G., Geng Q., Auerbach A., Li F. 2020. Cell entry mechanisms of SARS-CoV-2. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **117**, 11727–11734. <https://doi.org/10.1073/pnas.2003138117>
4. Bayati A., Kumar R., Francis V., McPherson P.S. 2021. SARS-CoV-2 infects cells after viral entry via clathrin-mediated endocytosis. *J. Biol. Chem.* **296**, 100306. <https://doi.org/10.1016/j.jbc.2021.100306>
5. Wang S., Qiu Z., Hou Y., Deng X., Xu W., Zheng T., Wu P., Xie S., Bian W., Zhang C., Sun Z., Liu K., Shan C., Lin A., Jiang S., Xie Y., Zhou Q., Lu L., Huang J., Li X. 2021. AXL is a candidate receptor for SARS-CoV-2 that promotes infection of pulmonary and bronchial epithelial cells. *Cell Res.* **31**, 126–140. <https://doi.org/10.1038/s41422-020-00460-y>
6. Bosch B.J., van der Zee R., de Haan C.A., Rottier P.J. 2003. The coronavirus spike protein is a class I virus fusion protein: Structural and functional characterization of the fusion core complex. *J. Virol.* **77**, 8801–8811. <https://doi.org/10.1128/jvi.77.16.8801-8811.2003>
7. Schibli D.J., Weissenhorn W. 2004. Class I and class II viral fusion protein structures reveal similar principles in membrane fusion. *Mol. Membr. Biol.* **21**, 361–371. <https://doi.org/10.1080/09687860400017784>
8. Huang Y., Yang C., Xu X.F., Xu W., Liu S.W. 2020. Structural and functional properties of SARS-CoV-2 spike protein: Potential antiviral drug development for COVID-19. *Acta Pharmacol. Sin.* **41**, 1141–1149. <https://doi.org/10.1038/s41401-020-0485-4>
9. Wrapp D., Wang N., Corbett K.S., Goldsmith J.A., Hsieh C.L., Abiona O., Graham B.S., McLellan J.S. 2020. Cryo-EM structure of the 2019-nCoV spike in the prefusion conformation. *Science*. **367**, 1260–1263. <https://doi.org/10.1126/science.abb2507>
10. Cai Y., Zhang J., Xiao T., Peng H., Sterling S.M., Walsh R.M., Jr., Rawson S., Rits-Volloch S., Chen B. 2020. Distinct conformational states of SARS-CoV-2 spike protein. *Science*. **369**, 1586–1592. <https://doi.org/10.1126/science.abd4251>

11. Walls A.C., Park Y.J., Tortorici M.A., Wall A., McGuire A.T., Veesler D. 2020. Structure, function, and antigenicity of the SARS-CoV-2 spike glycoprotein. *Cell*. **181**, 281–292 e286. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2020.02.058>
12. Coutard B., Valle C., de Lamballerie X., Canard B., Seidah N.G., Decroly E. 2020. The spike glycoprotein of the new coronavirus 2019-nCoV contains a furin-like cleavage site absent in CoV of the same clade. *Antiviral Res.* **176**, 104742. <https://doi.org/10.1016/j.antiviral.2020.104742>
13. Zhang Q., Xiang R., Huo S., Zhou Y., Jiang S., Wang Q., Yu F. 2021. Molecular mechanism of interaction between SARS-CoV-2 and host cells and interventional therapy. *Signal Transduct. Target Ther.* **6**, 233. <https://doi.org/10.1038/s41392-021-00653-w>
14. Guney C., Akar F. 2021. Epithelial and endothelial expressions of ACE2: SARS-CoV-2 entry routes. *J. Pharm. Pharm. Sci.* **24**, 84–93. <https://doi.org/10.18433/jpps31455>
15. Zhao M.M., Yang W.L., Yang F.Y., Zhang L., Huang W.J., Hou W., Fan C.F., Jin R.H., Feng Y.M., Wang Y.C., Yang J.K. 2021. Cathepsin L plays a key role in SARS-CoV-2 infection in humans and humanized mice and is a promising target for new drug development. *Signal Transduct. Target Ther.* **6**, 134. <https://doi.org/10.1038/s41392-021-00558-8>
16. Zhao M.M., Zhu Y., Zhang L., Zhong G., Tai L., Liu S., Yin G., Lu J., He Q., Li M.J., Zhao R.X., Wang H., Huang W., Fan C., Shuai L., Wen Z., Wang C., He X., Chen Q., Liu B., Xiong X., Bu Z., Wang Y., Sun F., Yang J.K. 2022. Novel cleavage sites identified in SARS-CoV-2 spike protein reveal mechanism for cathepsin L-facilitated viral infection and treatment strategies. *Cell Discov.* **8**, 53. <https://doi.org/10.1038/s41421-022-00419-w>
17. Padmanabhan P., Desikan R., Dixit N.M. 2020. Targeting TMPRSS2 and Cathepsin B/L together may be synergistic against SARS-CoV-2 infection. *PLoS Comput. Biol.* **16**, e1008461. <https://doi.org/10.1371/journal.pcbi.1008461>
18. Prasad K., AlOmar S.Y., Almuqri E.A., Rudayni H.A., Kumar V. 2021. Genomics-guided identification of potential modulators of SARS-CoV-2 entry proteases, TMPRSS2 and Cathepsins B/L. *PLoS One.* **16**, e0256141. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0256141>
19. Prasad K., Ahamad S., Kanipakam H., Gupta D., Kumar V. 2021. Simultaneous Inhibition of SARS-CoV-2 Entry Pathways by Cyclosporine. *ACS Chem. Neurosci.* **12**, 930–944. <https://doi.org/10.1021/acchemneuro.1c00019>
20. Evans J.P., Liu S.L. 2021. Role of host factors in SARS-CoV-2 entry. *J. Biol. Chem.* **297**, 100847. <https://doi.org/10.1016/j.jbc.2021.100847>
21. Matsuyama S., Ujike M., Morikawa S., Tashiro M., Taguchi F. 2005. Protease-mediated enhancement of severe acute respiratory syndrome coronavirus infection. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **102**, 12543–12547. <https://doi.org/10.1073/pnas.0503203102>
22. Li W., Moore M.J., Vasilieva N., Sui J., Wong S.K., Berne M.A., Somasundaran M., Sullivan J.L., Luzuriaga K., Greenough T.C., Choe H., Farzan M. 2003. Angiotensin-converting enzyme 2 is a functional receptor for the SARS coronavirus. *Nature.* **426**, 450–454. <https://doi.org/10.1038/nature02145>
23. Kuba K., Imai Y., Rao S., Gao H., Guo F., Guan B., Huan Y., Yang P., Zhang Y., Deng W., Bao L., Zhang B., Liu G., Wang Z., Chappell M., Liu Y., Zheng D., Leibbrandt A., Wada T., Slutsky A.S., Liu D., Qin C., Jiang C., Penninger J.M. 2005. A crucial role of angiotensin converting enzyme 2 (ACE2) in SARS coronavirus-induced lung injury. *Nat. Med.* **11**, 875–879. <https://doi.org/10.1038/nm1267>
24. Lin C.R., Bahmed K., Simborio H., Hayek H., Bolla S., Marchetti N., Criner G.J., Kosmider B. 2021. Expression of SARS-CoV-2 entry factors in human alveolar type II cells in aging and emphysema. *Biomedicines.* **9**. <https://doi.org/10.3390/biomedicines9070779>
25. Zhou P., Yang X.L., Wang X.G., Hu B., Zhang L., Zhang W., Si H.R., Zhu Y., Li B., Huang C.L., Chen H.D., Chen J., Luo Y., Guo H., Jiang R.D., Liu M.Q., Chen Y., Shen X.R., Wang X., Zheng X.S., Zhao K., Chen Q.J., Deng F., Liu L.L., Yan B., Zhan F.X., Wang Y.Y., Xiao G.F., Shi Z.L. 2020. A pneumonia outbreak associated with a new coronavirus of probable bat origin. *Nature.* **579**, 270–273. <https://doi.org/10.1038/s41586-020-2012-7>
26. Yan R., Zhang Y., Li Y., Xia L., Guo Y., Zhou Q. 2020. Structural basis for the recognition of SARS-CoV-2 by full-length human ACE2. *Science.* **367**, 1444–1448. <https://doi.org/10.1126/science.abb2762>
27. Donoghue M., Hsieh F., Baronas E., Godbout K., Gosselin M., Stagliano N., Donovan M., Woolf B., Robison K., Jeyaseelan R., Breitbart R.E., Acton S. 2000. A novel angiotensin-converting enzyme-related carboxypeptidase (ACE2) converts angiotensin I to angiotensin 1–9. *Circ. Res.* **87**, E1–9. <https://doi.org/10.1161/01.res.87.5.e1>
28. Tipnis S.R., Hooper N.M., Hyde R., Karran E., Christie G., Turner A.J. 2000. A human homolog of angiotensin-converting enzyme. Cloning and functional expression as a captopril-insensitive carboxypeptidase. *J. Biol. Chem.* **275**, 33238–33243. <https://doi.org/10.1074/jbc.M002615200>
29. Hikmet F., Mear L., Edvinsson A., Micke P., Uhlen M., Lindskog C. 2020. The protein expression profile of ACE2 in human tissues. *Mol. Syst. Biol.* **16**, e9610. <https://doi.org/10.15252/msb.20209610>
30. Li J., Gao J., Xu Y.P., Zhou T.L., Jin Y.Y., Lou J.N. 2007. Expression of severe acute respiratory syndrome coronavirus receptors, ACE2 and CD209L in different organ derived microvascular endothelial cells. *Zhonghua Yi Xue Za Zhi.* **87**, 833–837.
31. Han X., Zhou Z., Fei L., Sun H., Wang R., Chen Y., Chen H., Wang J., Tang H., Ge W., Zhou Y., Ye F., Jiang M., Wu J., Xiao Y., Jia X., Zhang T., Ma X., Zhang Q., Bai X., Lai S., Yu C., Zhu L., Lin R., Gao Y., Wang M., Wu Y., Zhang J., Zhan R., Zhu S., Hu H., Wang C., Chen M., Huang H., Liang T., Chen J., Wang W., Zhang D., Guo G. 2020. Construction of a human cell landscape at single-cell level. *Nature.* **581**, 303–309. <https://doi.org/10.1038/s41586-020-2157-4>
32. Chi X., Yan R., Zhang J., Zhang G., Zhang Y., Hao M., Zhang Z., Fan P., Dong Y., Yang Y., Chen Z., Guo Y., Zhang J., Li Y., Song X., Chen Y., Xia L., Fu L., Hou L.,

- Xu J., Yu C., Li J., Zhou Q., Chen W. 2020. A neutralizing human antibody binds to the N-terminal domain of the Spike protein of SARS-CoV-2. *Science*. **369**, 650–655.  
<https://doi.org/10.1126/science.abc6952>
33. Brouwer P.J.M., Caniels T.G., van der Straten K., Snitselaar J.L., Aldon Y., Bangaru S., Torres J.L., Okba N.M.A., Claireaux M., Kerster G., Bentlage A.E.H., van Haaren M.M., Guerra D., Burger J.A., Schermer E.E., Verheul K.D., van der Velde N., van der Kooi A., van Schooten J., van Breemen M.J., Bijl T.P.L., Slieden K., Aartse A., Derking R., Bontjer I., Kootstra N.A., Wiersinga W.J., Vidarsson G., Haagmans B.L., Ward A.B., de Bree G.J., Sanders R.W., van Gils M.J. 2020. Potent neutralizing antibodies from COVID-19 patients define multiple targets of vulnerability. *Science*. **369**, 643–650.  
<https://doi.org/10.1126/science.abc5902>
  34. Daly J.L., Simonetti B., Klein K., Chen K.E., Williamson M.K., Anton-Plagaro C., Shoemark D.K., Simon-Gracia L., Bauer M., Hollandi R., Greber U.F., Horvath P., Sessions R.B., Helenius A., Hiscox J.A., Teesalu T., Matthews D.A., Davidson A.D., Collins B.M., Cullen P.J., Yamauchi Y. 2020. Neuropilin-1 is a host factor for SARS-CoV-2 infection. *Science*. **370**, 861–865.  
<https://doi.org/10.1126/science.abd3072>
  35. Fujisawa H., Kitsukawa T., Kawakami A., Takagi S., Shimizu M., Hirata T. 1997. Roles of a neuronal cell-surface molecule, neuropilin, in nerve fiber fasciculation and guidance. *Cell Tissue Res*. **290**, 465–470.  
<https://doi.org/10.1007/s004410050954>
  36. Telley L., Cadilhac C., Cioni J.M., Saywell V., Jahnault-Talignani C., Huettl R.E., Sarrailh-Faivre C., Dayer A., Huber A.B., Ango F. 2016. Dual function of NRP1 in axon guidance and subcellular target recognition in cerebellum. *Neuron*. **91**, 1276–1291.  
<https://doi.org/10.1016/j.neuron.2016.08.015>
  37. Shimizu M., Murakami Y., Suto F., Fujisawa H. 2000. Determination of cell adhesion sites of neuropilin-1. *J. Cell Biol.* **148**, 1283–1293.  
<https://doi.org/10.1083/jcb.148.6.1283>
  38. Soker S., Takashima S., Miao H.Q., Neufeld G., Klagsbrun M. 1998. Neuropilin-1 is expressed by endothelial and tumor cells as an isoform-specific receptor for vascular endothelial growth factor. *Cell*. **92**, 735–745.  
[https://doi.org/10.1016/s0092-8674\(00\)81402-6](https://doi.org/10.1016/s0092-8674(00)81402-6)
  39. Li Z.L., Buck M. 2021. Neuropilin-1 assists SARS-CoV-2 infection by stimulating the separation of Spike protein S1 and S2. *Biophys. J.* **120**, 2828–2837.  
<https://doi.org/10.1016/j.bpj.2021.05.026>
  40. Cantuti-Castelvetri L., Ojha R., Pedro L.D., Djannatian M., Franz J., Kuivanen S., van der Meer F., Kallio K., Kaya T., Anastasina M., Smura T., Levantov L., Szivovicsza L., Tobi A., Kallio-Kokko H., Osterlund P., Joensuu M., Meunier F.A., Butcher S.J., Winkler M.S., Mollenhauer B., Helenius A., Gokce O., Teesalu T., Hepojoki J., Vapalahti O., Stadelmann C., Balistreri G., Simons M. 2020. Neuropilin-1 facilitates SARS-CoV-2 cell entry and infectivity. *Science*. **370**, 856–860.  
<https://doi.org/10.1126/science.abd2985>
  41. Gao C.C., Li M., Deng W., Ma C.H., Chen Y.S., Sun Y.Q., Du T., Liu Q.L., Li W.J., Zhang B., Sun L., Liu S.M., Li F., Qi F., Qu Y., Ge X., Liu J., Wang P., Niu Y., Liang Z., Zhao Y.L., Huang B., Peng X.Z., Yang Y., Qin C., Tong W.M., Yang Y.G. 2022. Differential transcriptomic landscapes of multiple organs from SARS-CoV-2 early infected rhesus macaques. *Protein Cell*.  
<https://doi.org/10.1007/s13238-022-00915-5>
  42. Baidara P., Roy D., Mandal S.M., Schrum A.G. 2022. Conservation and enhanced binding of SARS-CoV-2 Omicron spike protein to coreceptor neuropilin-1 predicted by docking analysis. *Infect. Dis. Rep.* **14**, 243–249.  
<https://doi.org/10.3390/idr1402029>
  43. Kolaric A., Jukic M., Bren U. 2022. Novel small-molecule inhibitors of the SARS-CoV-2 spike protein binding to neuropilin 1. *Pharmaceuticals (Basel)*. **15** (2), 165.  
<https://doi.org/10.3390/ph15020165>
  44. Ait-Ali N., Fridlich R., Millet-Puel G., Clerin E., Delalande F., Jaillard C., Blond F., Perrocheau L., Reichman S., Byrne L.C., Olivier-Bandini A., Bellalou J., Moysse E., Bouillaud F., Nicol X., Dalkara D., van Dorsseleer A., Sahel J.A., Leveillard T. 2015. Rod-derived cone viability factor promotes cone survival by stimulating aerobic glycolysis. *Cell*. **161**, 817–832.  
<https://doi.org/10.1016/j.cell.2015.03.023>
  45. Muramatsu T. 2016. Basigin (CD147), a multifunctional transmembrane glycoprotein with various binding partners. *J. Biochem.* **159**, 481–490.  
<https://doi.org/10.1093/jb/mvv127>
  46. Pushkarsky T., Zybarth G., Dubrovsky L., Yurchenko V., Tang H., Guo H., Toole B., Sherry B., Bukrinsky M. 2001. CD147 facilitates HIV-1 infection by interacting with virus-associated cyclophilin A. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **98**, 6360–6365.  
<https://doi.org/10.1073/pnas.111583198>
  47. Crosnier C., Bustamante L.Y., Bartholdson S.J., Bei A.K., Theron M., Uchikawa M., Mboup S., Ndir O., Kwiatkowski D.P., Duraisingh M.T., Rayner J.C., Wright G.J. 2011. Basigin is a receptor essential for erythrocyte invasion by *Plasmodium falciparum*. *Nature*. **480**, 534–537.  
<https://doi.org/10.1038/nature10606>
  48. Fenizia C., Galbiati S., Vanetti C., Vago R., Clerici M., Tacchetti C., Daniele T. 2021. SARS-CoV-2 entry: At the crossroads of CD147 and ACE2. *Cells*. **10** (6), 1434.  
<https://doi.org/10.3390/cells10061434>
  49. Wang K., Chen W., Zhang Z., Deng Y., Lian J.Q., Du P., Wei D., Zhang Y., Sun X.X., Gong L., Yang X., He L., Zhang L., Yang Z., Geng J.J., Chen R., Zhang H., Wang B., Zhu Y.M., Nan G., Jiang J.L., Li L., Wu J., Lin P., Huang W., Xie L., Zheng Z.H., Zhang K., Miao J.L., Cui H.Y., Huang M., Zhang J., Fu L., Yang X.M., Zhao Z., Sun S., Gu H., Wang Z., Wang C.F., Lu Y., Liu Y.Y., Wang Q.Y., Bian H., Zhu P., Chen Z.N. 2020. CD147-spike protein is a novel route for SARS-CoV-2 infection to host cells. *Signal Transduct. Target Ther.* **5**, 283.  
<https://doi.org/10.1038/s41392-020-00426-x>
  50. Geng J., Chen L., Yuan Y., Wang K., Wang Y., Qin C., Wu G., Chen R., Zhang Z., Wei D., Du P., Zhang J., Lin P., Zhang K., Deng Y., Xu K., Liu J., Sun X., Guo T., Yang X., Wu J., Jiang J., Li L., Zhang K.,

- Wang Z., Zhang J., Yan Q., Zhu H., Zheng Z., Miao J., Fu X., Yang F., Chen X., Tang H., Zhang Y., Shi Y., Zhu Y., Pei Z., Huo F., Liang X., Wang Y., Wang Q., Xie W., Li Y., Shi M., Bian H., Zhu P., Chen Z.N. 2021. CD147 antibody specifically and effectively inhibits infection and cytokine storm of SARS-CoV-2 and its variants delta, alpha, beta, and gamma. *Signal Transduct. Target Ther.* **6**, 347. <https://doi.org/10.1038/s41392-021-00760-8>
51. Xu C., Wang A., Geng K., Honnen W., Wang X., Bruiners N., Singh S., Ferrara F., D'Angelo S., Bradbury A.R.M., Gennaro M.L., Liu D., Pinter A., Chang T.L. 2021. Human immunodeficiency viruses pseudotyped with SARS-CoV-2 spike proteins infect a broad spectrum of human cell lines through multiple entry mechanisms. *Viruses*. **13**. <https://doi.org/10.3390/v13060953>
52. Badeti S., Jiang Q., Naghizadeh A., Tseng H.C., Bushkin Y., Marras S.A.E., Nisa A., Tyagi S., Chen F., Romanienko P., Yehia G., Evans D., Lopez-Gonzalez M., Alland D., Russo R., Gause W., Shi L., Liu D. 2022. Development of a novel human CD147 knock-in NSG mouse model to test SARS-CoV-2 viral infection. *Res. Sq.* rs.3.rs-1431484. <https://doi.org/10.21203/rs.3.rs-1431484/v1>
53. Xia P., Dubrovskaya A. 2020. Tumor markers as an entry for SARS-CoV-2 infection? *FEBS J.* **287** (17), 3677–3680. <https://doi.org/10.1111/febs.15499>
54. Shilts J., Crozier T.W.M., Greenwood E.J.D., Lehner P.J., Wright G.J. 2021. No evidence for basigin/CD147 as a direct SARS-CoV-2 spike binding receptor. *Sci. Rep.* **11**, 413. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-80464-1>
55. Ragotte R.J., Pulido D., Donnellan F.R., Hill M.L., Gorini G., Davies H., Brun J., McHugh K., King L.D.W., Skinner K., Miura K., Long C.A., Zitzmann N., Draper S.J. 2021. Human basigin (CD147) does not directly interact with SARS-CoV-2 spike glycoprotein. *mSphere*. **6**, e0064721. <https://doi.org/10.1128/mSphere.00647-21>
56. Zhou Y.Q., Wang K., Wang X.Y., Cui H.Y., Zhao Y., Zhu P., Chen Z.N. 2022. SARS-CoV-2 pseudovirus enters the host cells through spike protein-CD147 in an Arf6-dependent manner. *Emerg. Microbes Infect.* **11**, 1135–1144. <https://doi.org/10.1080/22221751.2022.2059403>
57. De Pasquale V., Quiccione M.S., Tafuri S., Avallone L., Pavone L.M. 2021. Heparan sulfate proteoglycans in viral infection and treatment: A special focus on SARS-CoV-2. *Int. J. Mol. Sci.* **22**. <https://doi.org/10.3390/ijms22126574>
58. Clausen T.M., Sandoval D.R., Spliid C.B., Pihl J., Perrett H.R., Painter C.D., Narayanan A., Majowicz S.A., Kwong E.M., McVicar R.N., Thacker B.E., Glass C.A., Yang Z., Torres J.L., Golden G.J., Bartels P.L., Porell R.N., Garretson A.F., Laubach L., Feldman J., Yin X., Pu Y., Hauser B.M., Caradonna T.M., Kellman B.P., Martino C., Gordts P., Chanda S.K., Schmidt A.G., Godula K., Leibel S.L., Jose J., Corbett K.D., Ward A.B., Carlin A.F., Esko J.D. 2020. SARS-CoV-2 infection depends on cellular heparan sulfate and ACE2. *Cell*. **183**, 1043–1057. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2020.09.033>
59. Tandon R., Sharp J.S., Zhang F., Pomin V.H., Ashpole N.M., Mitra D., McCandless M.G., Jin W., Liu H., Sharma P., Linhardt R.J. 2021. Effective inhibition of SARS-CoV-2 entry by heparin and enoxaparin derivatives. *J. Virol.* **95**. <https://doi.org/10.1128/JVI.01987-20>
60. Khoo U.S., Chan K.Y., Chan V.S., Lin C.L. 2008. DC-SIGN and L-SIGN: The SIGNs for infection. *J. Mol. Med. (Berl.)*. **86**, 861–874. <https://doi.org/10.1007/s00109-008-0350-2>
61. Jeffers S.A., Tusell S.M., Gillim-Ross L., Hemmila E.M., Achenbach J.E., Babcock G.J., Thomas W.D., Jr., Thackray L.B., Young M.D., Mason R.J., Ambrosino D.M., Wentworth D.E., Demartini J.C., Holmes K.V. 2004. CD209L (L-SIGN) is a receptor for severe acute respiratory syndrome coronavirus. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **101**, 15748–15753. <https://doi.org/10.1073/pnas.0403812101>
62. Amraie R., Napoleon M.A., Yin W., Berrigan J., Suder E., Zhao G., Olejnik J., Gummuluru S., Muhlberger E., Chitalia V., Rahimi N. 2020. CD209L/L-SIGN and CD209/DC-SIGN act as receptors for SARS-CoV-2 and are differentially expressed in lung and kidney epithelial and endothelial cells. *bioRxiv*. <https://doi.org/10.1101/2020.06.22.165803>
63. Amraei R., Yin W., Napoleon M.A., Suder E.L., Berrigan J., Zhao Q., Olejnik J., Chandler K.B., Xia C., Feldman J., Hauser B.M., Caradonna T.M., Schmidt A.G., Gummuluru S., Muhlberger E., Chitalia V., Costello C.E., Rahimi N. 2021. CD209L/L-SIGN and CD209/DC-SIGN Act as Receptors for SARS-CoV-2. *ACS Cent. Sci.* **7**, 1156–1165. <https://doi.org/10.1021/acscentsci.0c01537>
64. Thepaut M., Luczkowiak J., Vives C., Labiod N., Bally I., Lasala F., Grimoire Y., Fenel D., Sattin S., Thielens N., Schoehn G., Bernardi A., Delgado R., Fieschi F. 2021. DC/L-SIGN recognition of spike glycoprotein promotes SARS-CoV-2 trans-infection and can be inhibited by a glycomimetic antagonist. *PLoS Pathog.* **17**, e1009576. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1009576>
65. Kondo Y., Larabee J.L., Gao L., Shi H., Shao B., Hoover C.M., McDaniel J.M., Ho Y.C., Silasi-Manstaf R., Archer-Hartmann S.A., Azadi P., Srinivasan R.S., Rezaie A.R., Borczuk A., Laurence J.C., Lupu F., Ahamed J., McEver R.P., Papin J.F., Yu Z., Xia L. 2021. L-SIGN is a receptor on liver sinusoidal endothelial cells for SARS-CoV-2 virus. *JCI Insight*. **6**. <https://doi.org/10.1172/jci.insight.148999>
66. Lu Q., Liu J., Zhao S., Gomez Castro M.F., Laurent-Rolle M., Dong J., Ran X., Damani-Yokota P., Tang H., Karakousi T., Son J., Kaczmarek M.E., Zhang Z., Yeung S.T., McCune B.T., Chen R.E., Tang F., Ren X., Chen X., Hsu J.C.C., Teplova M., Huang B., Deng H., Long Z., Mudianto T., Jin S., Lin P., Du J., Zang R., Su T.T., Herrera A., Zhou M., Yan R., Cui J., Zhu J., Zhou Q., Wang T., Ma J., Korolov S.B., Zhang Z., Aifantis I., Segal L.N., Diamond M.S., Khanna K.M., Stapleford K.A., Cresswell P., Liu Y., Ding S., Xie Q., Wang J. 2021. SARS-CoV-2 exacerbates proinflammatory responses in myeloid cells through C-type lectin receptors and TWEET family member 2. *Immunity*. **54**, 1304–1319 e1309. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2021.05.006>

67. Pollastri S., Delaunay C., Thepaut M., Fieschi F., Bernardi A. 2022. Glycomimetic ligands block the interaction of SARS-CoV-2 spike protein with C-type lectin co-receptors. *Chem. Commun. (Camb)*. **58**, 5136–5139. <https://doi.org/10.1039/d2cc00121g>
68. Ibrahim I.M., Abdelmalek D.H., Elfiky A.A. 2019. GRP78: A cell's response to stress. *Life Sci*. **226**, 156–163. <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2019.04.022>
69. Elfiky A.A., Baghdady A.M., Ali S.A., Ahmed M.I. 2020. GRP78 targeting: Hitting two birds with a stone. *Life Sci*. **260**, 118317. <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2020.118317>
70. Ibrahim I.M., Abdelmalek D.H., Elshahat M.E., Elfiky A.A. 2020. COVID-19 spike-host cell receptor GRP78 binding site prediction. *J. Infect*. **80**, 554–562. <https://doi.org/10.1016/j.jinf.2020.02.026>
71. Carlos A.J., Ha D.P., Yeh D.W., Van Krieken R., Tseng C.C., Zhang P., Gill P., Machida K., Lee A.S. 2021. The chaperone GRP78 is a host auxiliary factor for SARS-CoV-2 and GRP78 depleting antibody blocks viral entry and infection. *J. Biol. Chem*. **296**, 100759. <https://doi.org/10.1016/j.jbc.2021.100759>
72. Morizono K., Chen I.S. 2014. Role of phosphatidylserine receptors in enveloped virus infection. *J. Virol*. **88**, 4275–4290. <https://doi.org/10.1128/JVI.03287-13>
73. Gu Y., Cao J., Zhang X., Gao H., Wang Y., Wang J., He J., Jiang X., Zhang J., Shen G., Yang J., Zheng X., Hu G., Zhu Y., Du S., Zhu Y., Zhang R., Xu J., Lan F., Qu D., Xu G., Zhao Y., Gao D., Xie Y., Luo M., Lu Z. 2022. Receptome profiling identifies KREMEN1 and ASGR1 as alternative functional receptors of SARS-CoV-2. *Cell Res*. **32**, 24–37. <https://doi.org/10.1038/s41422-021-00595-6>
74. Nakamura T., Nakamura T., Matsumoto K. 2008. The functions and possible significance of Kremen as the gatekeeper of Wnt signalling in development and pathology. *J. Cell Mol. Med*. **12**, 391–408. <https://doi.org/10.1111/j.1582-4934.2007.00201.x>
75. Mao B., Wu W., Davidson G., Marhold J., Li M., Mechler B.M., Delius H., Hoppe D., Stanek P., Walter C., Glinka A., Niehrs C. 2002. Kremen proteins are Dickkopf receptors that regulate Wnt/beta-catenin signalling. *Nature*. **417**, 664–667. <https://doi.org/10.1038/nature756>
76. Staring J., van den Hengel L.G., Raaben M., Blomen V.A., Carette J.E., Brummelkamp T.R. 2018. KREMEN1 Is a Host Entry Receptor for a Major Group of Enteroviruses. *Cell Host Microbe*. **23**, 636–643 e635. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2018.03.019>
77. Hooper J.K. 2020. ASGR1 and its enigmatic relative, CLEC10A. *Int. J. Mol. Sci*. **21**, 48818. <https://doi.org/10.3390/ijms21144818>
78. Saunier B., Triyatni M., Ulianich L., Maruvada P., Yen P., Kohn L.D. 2003. Role of the asialoglycoprotein receptor in binding and entry of hepatitis C virus structural proteins in cultured human hepatocytes. *J. Virol*. **77**, 546–559. <https://doi.org/10.1128/jvi.77.1.546-559.2003>
79. Wei C., Wan L., Yan Q., Wang X., Zhang J., Yang X., Zhang Y., Fan C., Li D., Deng Y., Sun J., Gong J., Yang X., Wang Y., Wang X., Li J., Yang H., Li H., Zhang Z., Wang R., Du P., Zong Y., Yin F., Zhang W., Wang N., Peng Y., Lin H., Feng J., Qin C., Chen W., Gao Q., Zhang R., Cao Y., Zhong H. 2020. HDL-scavenger receptor B type 1 facilitates SARS-CoV-2 entry. *Nat. Metab*. **2**, 1391–1400. <https://doi.org/10.1038/s42255-020-00324-0>
80. Kluck G.E.G., Yoo J.A., Sakarya E.H., Trigatti B.L. 2021. Good Cholesterol Gone Bad? HDL and COVID-19. *Int. J. Mol. Sci*. **22**. <https://doi.org/10.3390/ijms221910182>
81. Shen W.J., Asthana S., Kraemer F.B., Azhar S. 2018. Scavenger receptor B type 1: expression, molecular regulation, and cholesterol transport function. *J. Lipid Res*. **59**, 1114–1131. <https://doi.org/10.1194/jlr.R083121>
82. Chen J., Fan J., Chen Z., Zhang M., Peng H., Liu J., Ding L., Liu M., Zhao C., Zhao P., Zhang S., Zhang X., Xu J. 2021. Nonmuscle myosin heavy chain IIA facilitates SARS-CoV-2 infection in human pulmonary cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **118**. <https://doi.org/10.1073/pnas.2111011118>

## SARS-CoV-2 Receptors and Their Role in Cell Infection

P. P. Avdonin<sup>1</sup>, E. Yu. Rybakova<sup>1</sup>, S. K. Trufanov<sup>1</sup>, P. V. Avdonin<sup>1</sup>, \*

<sup>1</sup>Koltsov Institute of Developmental Biology, Russian Academy of Sciences, Moscow, 119334 Russia

\*e-mail: pvavdonin@yandex.ru

The new coronavirus infection (COVID-19) pandemic caused by the SARS-CoV-2 virus has many times surpassed the epidemic caused by SARS-CoV. The reason for this is the presence of amino acid sequences in the peptide chain of the SARS-CoV-2 S-protein that ensure interaction with a wider range of receptors on the host cell surface. The review considers both already known receptors common to SARS-CoV and SARS-CoV-2 and new receptors specific to SARS-CoV-2.

**Keywords:** SARS-CoV-2 coronavirus, receptors, furin, cathepsin L, ACE2, neuropilin, CD147, CD209, heparan sulfate, GRP78, ASGR1, KREMEN1, tyrosine protein kinase AXL

УДК 612.13

## ПРОКОАГУЛЯНТНЫЕ СВОЙСТВА ВНЕКЛЕТОЧНЫХ ВЕЗИКУЛ ПРИ НОРМАЛЬНОЙ И ПАТОЛОГИЧЕСКОЙ БЕРЕМЕННОСТИ

© 2022 г. Е. М. Кольцова<sup>a, b, \*</sup>, А. А. Мартьянов<sup>a, b, c</sup>, Н. А. Подоплелова<sup>a, b</sup><sup>a</sup>Национальный медицинский исследовательский центр детской гематологии, онкологии и иммунологии им. Дмитрия Рогачева, Москва, 117997 Россия<sup>b</sup>Центр теоретических проблем физико-химической фармакологии РАН, Москва, 109029 Россия<sup>c</sup>Институт биохимической физики им. Н.М. Эмануэля РАН, Москва, 119334 Россия

\*e-mail: ekaterina\_koltsova@bk.ru

Поступила в редакцию 25.11.2021 г.

После доработки 16.04.2022 г.

Принята к публикации 17.04.2022 г.

Внеклеточные везикулы – это двухслойные мембранные липидные структуры без ядер, которые высвобождаются из различных клеток в результате физиологических и метаболических изменений. Они играют важную роль в межклеточной коммуникации посредством передачи широкого спектра биоактивных молекул, способствуя регуляции различных физиологических и патологических процессов. Внеклеточные везикулы могут обладать прокоагулянтными свойствами вследствие наличия фосфатидилсерина, ускоряющего реакции свертывания, на внешнем слое мембраны, а также экспрессии тканевого фактора, активирующего свертывание по внешнему пути, на поверхности некоторых везикул. В большом количестве клинических и экспериментальных исследований показано, что при различных патологиях и специфических физиологических состояниях, включая состояние беременности, концентрации внеклеточных везикул существенно превышают концентрации у здоровых добровольцев, что теоретически может являться одним из факторов развития гиперкоагуляционных состояний. Данный обзор будет сосредоточен на описании прокоагулянтных свойств внеклеточных везикул различного происхождения при нормальной и патологической беременности.

**Ключевые слова:** гемостаз, везикулы, беременность, плацента, тромбин, гиперкоагуляция

DOI: 10.31857/S023347552206007X

### ВВЕДЕНИЕ

Внеклеточные везикулы представляют собой двухслойные мембранные липидные структуры без ядер, которые высвобождаются из различных клеток в результате физиологических и метаболических изменений [1]. Их можно разделить на три основные класса: экзосомы, эктосомы или микровезикулы и апоптотические тельца [2]. Разделение на классы происходит исходя из размера частиц, их происхождения, внутреннего содержания и выполняемых функций [3, 4]. Экзосомы имеют сравнительно небольшие размеры от ~40 до 160 нм и высвобождаются из мультивезикулярных телец при экзоцитозе (т.е. при слиянии мембраны телец с плазматической мембраной) [5, 6]. Эктосомы или микровезикулы довольно крупные частицы размером от ~50 нм до 1 мкм образуются из выпячиваний плазматической мембраны [7]. Отличительной чертой эктосом является наличие фосфатидилсерина (ФС) на внешнем слое мембраны. Апоптотические тельца высвобождаются

клетками, подвергающимися апоптозу, и имеют размер от 1 мкм и больше [8].

Изменение качественного и количественного состава внеклеточных везикул сопровождает широкий круг физиологических и патологических состояний. Особенную роль внеклеточные везикулы играют при беременности, поскольку они опосредуют взаимодействие плода и матери и участвуют во многих важных физиологических процессах, включая имплантацию эмбриона и развитие эмбриональных кровеносных сосудов, а также вследствие появления нового органа – плаценты, который также является источником внеклеточных везикул в кровотоке матери [9–12]. В последних публикациях указывается на изменение качественного и количественного состава внеклеточных везикул при развитии патологических состояний у беременных женщин (преэклампсия [13], сахарный диабет [14], преждевременные роды и выкидыш [15]). Физиологическая гиперкоагуляция, характерная для нормальной беременности, имеет неясное происхождение, а повышенные риски тромботических осложнений

как в группе здоровых беременных, так и в группе с различными акушерскими патологиями, привлекает внимание к исследованию возможных причин возникновения гиперкоагуляции при беременности.

Данный обзор будет сосредоточен на описании прокоагулянтных свойств внеклеточных везикул различного происхождения при нормальной и патологической беременности.

### ВЕЗИКУЛЫ ИЗ КЛЕТОК КРОВИ И ЭНДОТЕЛИЯ И ИХ ПРОКОАГУЛЯНТНЫЕ СВОЙСТВА

Несмотря на то, что беременность является физиологическим состоянием женщины, она сама по себе характеризуется сдвигом гемостаза в сторону гиперкоагуляции и склонности к тромботическим осложнениям. Развитие патологических состояний у беременных женщин (преэклампсия, сахарный диабет, преждевременные роды и выкидыш) существенно влияет на состав и свойства внеклеточных везикул в кровотоке, в том числе внеклеточных везикул из клеток крови, что, в свою очередь, может влиять на баланс системы гемостаза.

В целом, все типы клеток способны формировать и высвобождать во внеклеточное пространство различные типы везикул. Согласно ряду исследований, наиболее представленными в кровотоке являются внеклеточные везикулы тромбоцитарного происхождения [16]. По данным криоэлектронной микроскопии примерно 30% всех внеклеточных везикул в свободной от тромбоцитов плазме положительны по CD41 [17]. Для идентификации тромбоцитарных внеклеточных везикул могут применяться как маркеры характерные для всех тромбоцитов (CD41, CD42b), так и маркеры специфичные исключительно для активированных тромбоцитов (CD62P или антигена к активной форме интегрина  $\alpha\text{IIb}\beta 3$ ) [18]. Так же могут быть использованы и менее специфичные маркеры CD31 и CD61, оба из которых также экспрессируются на эндотелиальных внеклеточных везикулах. Полный список маркеров, используемых для идентификации происхождения внеклеточных везикул представлен на рис. 1.

Также важным источником внеклеточных везикул являются эндотелиальные клетки. Было показано, что до 10% внеклеточных везикул, циркулирующих в кровотоке здоровых добровольцев, имеют эндотелиальное происхождение [19]. При этом активация или повреждение эндотелия в результате травмы или патологии приводит к существенному росту количества данных везикул в кровотоке. Фактически эндотелиальные внеклеточные везикулы могут использоваться в качестве маркера дисфункции эндотелия [20]. В качестве

основных маркеров для идентификации эндотелиальных внеклеточных везикул могут использоваться CD31, CD105 и CD144, или CD62E и CD106 (васкулярная молекула клеточной адгезии 1, VCAM-1) в случае активации эндотелия [21]. Поскольку некоторые из маркеров, такие как CD31, также экспрессируются на других типах клеток (например, тромбоцитах и лейкоцитах), рекомендуется использование нескольких маркеров из данного списка.

Важным источником внеклеточных везикул являются иммунные клетки, в частности лейкоциты. Данный тип внеклеточных везикул является минорным в кровотоке здоровых доноров, однако при патологиях их количество может возрастать. Это делает данные внеклеточные везикулы перспективными для исследования в качестве возможного маркера различных заболеваний [22].

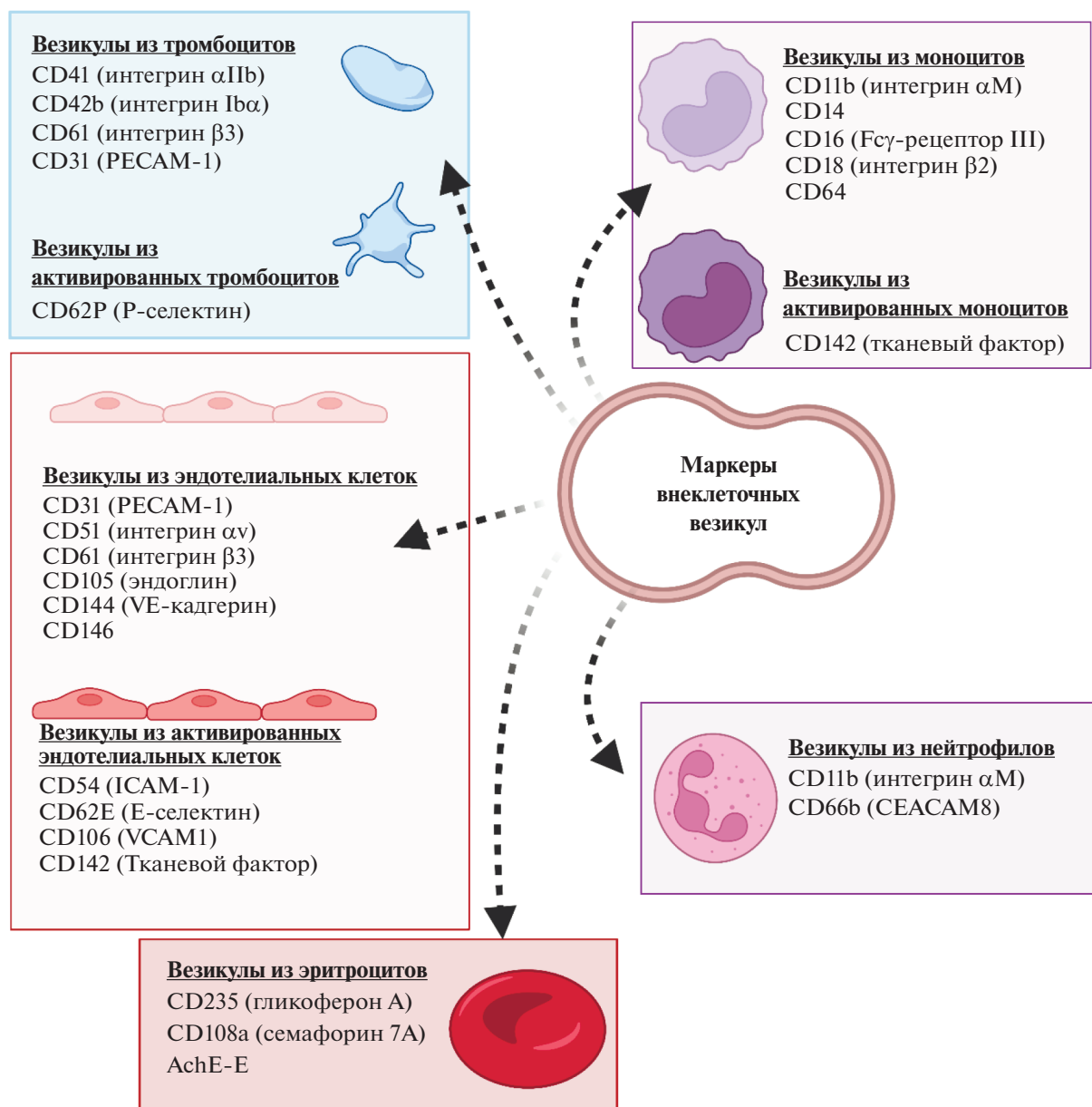
Помимо эндотелиальных клеток, тромбоцитов и лейкоцитов, эритроциты также могут быть источником внеклеточных везикул [23]. Эритроцитарные внеклеточные везикулы в больших количествах были обнаружены в эритроконцентрах при длительном хранении или использовании жестких методов обработки [24]. Считается, что данные внеклеточные везикулы ответственны как за положительные, так и за отрицательные эффекты, наблюдаемые после переливания крови [25].

Прокоагулянтные свойства внеклеточных везикул в первую очередь связывают с наличием на их мембране белка тканевого фактора (ТФ) [26] и/или отрицательно заряженных фосфолипидов, в частности ФС [27]. Присутствие этих прокоагулянтных молекул напрямую связано с источником и механизмом образования везикул.

ТФ является одним из цитокиновых рецепторов и экспрессируется большинством несосудистых и периваскулярных клеток. Он активирует свертывание после сосудистого повреждения [28]. Помимо своей непосредственной роли в свертывании, ТФ необходим для развития эмбриональных кровеносных сосудов, миграции и пролиферации гладкомышечных клеток сосудистой стенки и регуляции воспаления [29, 30]. Считается, что в нормальных условиях клетки, контактирующие с кровью, не экспрессируют физиологически активный ТФ, поскольку даже его субпиколярных концентраций достаточно для запуска свертывания [31]. Микровезикулы плазмы в норме также не несут на себе ТФ, однако присутствие внеклеточных везикул (в основном микровезикул), несущих на себе ТФ, подтверждено при различных патологических состояниях, связанных с тромботическими осложнениями, таких как сепсис, рак и сердечно-сосудистые заболевания [32].

Моноциты являются основным источником внеклеточных везикул, несущих на себе ТФ





**Рис. 1.** Схематический рисунок, обобщающий наиболее распространенные маркеры, используемые для характеристики происхождения внеклеточных везикул, с акцентом на клетки, участвующие в свертывании крови.

[33, 34]. Внеклеточные везикулы тромбоцитарного происхождения не несут ТФ и не участвуют в запуске каскада свертывания по внешнему пути [18].

Вторым важным источником прокоагулянтной активности внеклеточных везикул является наличие ФС на внешнем слое мембраны, так как все основные реакции свертывания крови протекают на отрицательно заряженных фосфолипидных мембранах [27]. Кроме того, ФС-положительные везикулы могут напрямую активировать свертывание крови через фактор свертывания XII и контактный путь [35].

Было показано, что при нормальной неосложненной беременности уже начиная с первого триместра наблюдается повышение количества циркулирующих в кровотоке матери внеклеточных везикул, в основном в исследованиях упоминаются микровезикулы размером до 1 мкм [36, 37]. При этом их количество увеличивается по мере развития беременности и достигает своего максимума в третьем триместре [38]. Наблюдается значительное увеличение концентраций микровезикул тромбоцитарного, лейкоцитарного, эндотелиального происхождения при нормальной беременности и при преэклампсии [38, 39]. Одна-

ко только данными тремя источниками невозможно объяснить высокие уровни ФС-положительных прокоагулянтных микровезикул в кровотоке беременных. Это указывает на возможную роль плацентарных внеклеточных везикул как источника прокоагулянтной поверхности [40, 41].

### ВЕЗИКУЛЫ ПЛАЦЕНТАРНОГО ПРОИСХОЖДЕНИЯ ПРИ БЕРЕМЕННОСТИ И ИХ ПРОКОАГУЛЯНТНЫЕ СВОЙСТВА

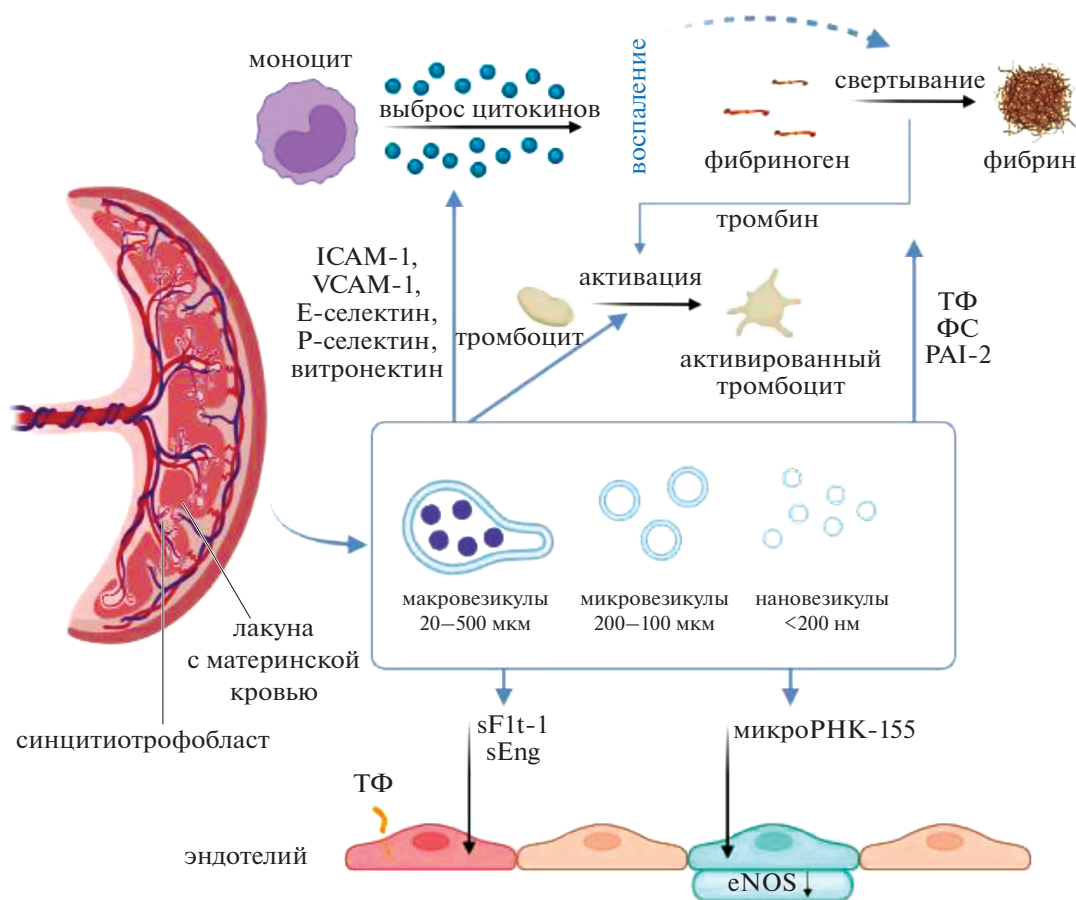
В крови беременных женщин циркулирует большое количество везикул плацентарного происхождения. В плаценте человека присутствует три подтипа трофобластов: ворсинчатый цитотрофобласт, вневорсинчатый трофобласт (ВВТ) и синцитиотрофобласт (СТФ). STF представляет собой многоядерную одиночную клетку-симпласт [42], которая покрывает обращенную к матери часть плаценты. Он формируется на ранних стадиях развития эмбриона путем начального слияния мононуклеарных цитотрофобластов, а затем обновляется на протяжении всей беременности за счет рекрутирования нижележащих клеток цитотрофобласта [43]. STF непосредственно контактирует с материнским кровотоком и, по сути, представляет собой границу между кровообращением матери и плода, обеспечивая транспорт питательных веществ и кислорода к развивающемуся эмбриону и вырабатывая гормоны, поддерживающие беременность [44]. STF также функционирует как защитный иммунологический барьер, поскольку никогда не экспрессирует молекулы человеческого лейкоцитарного антигена (HLA), а это означает, что, несмотря на присутствие аллогенного плода, циркулирующие иммунные клетки не распознают STF как мишень [45]. Именно STF является источником микровезикул (200–1000 нм) и нановезикул (<200 нм). Кроме того, благодаря своей многоядерной природе STF также способен продуцировать третий тип везикул, уникальных для плаценты человека — макровезикулы [46, 47]. Макровезикулы содержат в себе в среднем 60 ядер и имеют размер от 20 до 500 мкм [47]. Макровезикулы плаценты перемещаются по крупным венам матери в легкие, где они сталкиваются с системой мелких капилляров и застревают из-за своего физического размера. В мелких сосудах периферии макровезикулы обнаруживаются крайне редко [48] в отличие от микро- и нановезикул.

Наличие активного TF на самом STF и его везикулах, на данный момент является спорным вопросом. Хотя неоднократно сообщалось, что TF присутствует на мембранах, полученных обработкой ультразвуком ворсин плаценты [49], клеточных линий хориокарциномы [50] и STF, дифференцированных *in vitro* из первичных трофобластов ворсинок [51], гистологические исследова-

ния показывают, что TF присутствует в высокой концентрации в децидуальной оболочке, но отсутствует в самих STF [52, 53]. Тем не менее, группа Teng и др. [54] сообщила о повышенных уровнях антигена TF в STF у женщин с преэклампсией. Активность TF STF была функционально оценена группой Gardiner и др. [55], которая показала, что добавление микровезикул, полученных из STF в плазму достоверно сдвигает свертывание в область гиперкоагуляции в тесте генерации тромбина у женщин с преэклампсией по сравнению с женщинами с нормально протекающей беременностью, и данный сдвиг связан с повышенной экспрессией TF на мембранах микровезикул STF при преэклампсии. Принимая во внимание тот факт, что помимо качественной разницы в уровне экспрессии TF, существует еще и количественное превышение в 2–10 раз продукции микровезикул при преэклампсии [56–60] по сравнению со здоровой беременностью, можно предположить, что в совокупности это является одним из факторов тромботического риска. К сожалению, на данный момент трудно сказать, какую роль микровезикулы STF играют в гиперкоагуляции, характерной для нормально протекающей беременности.

Помимо непосредственной активации от TF, STF является потенциально прокоагулянтным за счет экстернализации ФС на поверхности материнской мембраны во время формирования многоядерного STF путем слияния клеток цитотрофобласта [61], поскольку экстернализация ФС необходима для формирования миотрубки [62]. Несмотря на эти наблюдения, в норме свертывания в области ворсин не происходит, поскольку трофобласты продуцируют антикоагулянтные белки тромбомодулин и аннексин V, причем тромбомодулин ассоциирован с микроворсинками STF [63], а аннексин V связывается с ФС. На данный момент не существует убедительных данных о том, что микровезикулы STF несут на себе ФС, однако их наличие является потенциально возможным в патологических условиях, например, при антифосфолипидном синдроме, поскольку синтез аннексина V при данной патологии сильно снижен [64]. Ингибитор активатора плазминогена (PAI-2), который является ингибитором фибринолиза, специфичным для беременности, был также обнаружен на микровезикулах STF [65].

Что касается опосредованного влияния микровезикул плацентарного происхождения на гемостаз матери, то здесь следует отдельно отметить влияние на функцию эндотелия. Нарушение функции эндотелия значительно увеличивает риск сосудистых осложнений во время беременности, особенно при преэклампсии [66]. Fms-подобная тирозинкиназа-1 (Flt-1), которая является антиангиогенным фактором, присутствует на по-



**Рис. 2.** Механизмы возникновения эндотелиальной дисфункции и гиперкоагуляции при беременности. Плацентарные везикулы синцитиотрофобласта несут на своей поверхности различные молекулы адгезии, потенциально увеличивая способность к взаимодействию с клетками-мишенями и их последующей активации (например, моноцитами и тромбоцитами). Кроме того, на своей поверхности везикулы несут ТФ, ФС и PAI-2, которые активируют, либо усиливают свертывание и снижают фибринолиз. Плацентарные везикулы напрямую взаимодействуют с эндотелиальными клетками, вызывая эндотелиальную дисфункцию, частично за счет переноса fms-подобной тирозинкиназы-1 (sFlt-1) и эндоглина (sEng). Путем переноса своих микроРНК плацентарные везикулы влияют на уровни экспрессии eNOS (микроРНК-155). Сокращения: eNOS – эндотелиальная синтаза оксида азота; ICAM-1 – молекула межклеточной адгезии 1; ФС – фосфатидилсерин; PAI-2 – ингибитор активатора плазминогена-2; sFlt – растворимая fms-подобная тирозинкиназа-1; sEng – растворимый эндоглин; ТФ – тканевый фактор; VCAM-1 – васкулярная молекула клеточной адгезии 1.

верхности микровезикул СТФ и, как предполагается, участвует в повреждении эндотелия у пациенток с преэклампсией [67]. Содержание растворимого Flt-1 и растворимого эндоглина (sEng) были увеличены в микровезикулах, выделенных из плазмы пациентов с преэклампсией, по сравнению с нормальным контролем. Кроме того, Chang и др. показали, что микровезикулы обеспечивают эффективный перенос sFlt-1 и sEng в эндотелиальные клетки, что ослабляет пролиферацию, миграцию и образование микротрубочек в эндотелиальных клетках *in vitro* [68]. Экспрессия на микровезикулах СТФ молекул адгезии, таких как молекула межклеточной адгезии 1 (ICAM-1), VCAM-1, Е-селектин, Р-селектин и витронектин, может влиять на адгезию этих микровезикул к

различным клеткам-мишеням и способствовать их взаимодействию [13]. Исследования *in vitro* показали, что микроРНК-155 может переноситься из микровезикул СТФ в клетки эндотелия и может подавлять экспрессию эндотелиальной синтазы оксида азота (eNOS) [69].

Помимо влияния на эндотелий, микровезикулы СТФ также *in vitro* вызывают агрегацию тромбоцитов и ускоряют скорость образования тромбов при исследовании в потоке [70], а также влияют на функцию моноцитов и макрофагов, вызывая продукцию провоспалительных цитокинов [71].

Схема воздействия везикул плацентарного происхождения на гемостаз представлена на рис. 2.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Повышение концентрации прокоагулянтных внеклеточных везикул при беременности, происходящих как из клеток крови, так и из плаценты, подтверждаются клиническими и экспериментальными исследованиями. Это может являться одним из компонентов физиологической гиперкоагуляции, возникающей при данном состоянии. Таким образом, повышение концентраций прокоагулянтных везикул может являться одним из факторов, обуславливающих повышенный риск тромбоза во время беременности, однако данный факт все еще не доказан напрямую. Для выявления роли внеклеточных везикул в тромбообразовании у беременных необходимо проведение проспективных исследований в данной группе.

**Конфликт интересов.** Авторы заявляют, что у них нет конфликта интересов.

**Источники финансирования.** Автор Е.М. Кольцова поддержана грантом Президента МК-432.2020.7 (соглашение № 075-15-2020-181), автор А.А. Мартыанов поддержан стипендией Президента СП-2675.2019.4, автор Н.А. Подошлева поддержана грантом Президента МК-6271.2021.1.4 (соглашение № 075-15-2021-413).

**Соответствие принципам этики.** Настоящая статья не содержит описания каких-либо исследований с участием людей или животных в качестве объектов.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Théry C., Witwer K.W., Aikawa E., Alcaraz M.J., Anderson J.D., Andriantsitohaina R., Antoniou A., Arab T., Archer F., Atkin-Smith G.K., Ayre D.C., Bach J.M., Bachurski D., Baharvand H., Balaj L., et al. 2018. Minimal information for studies of extracellular vesicles 2018 (MISEV2018): A position statement of the International Society for Extracellular Vesicles and update of the MISEV2014 guidelines. *J. Extracell. vesicles*. **7** (1), 1535750. <https://doi.org/10.1080/20013078.2018.1535750>
- Yáñez-Mó M., Siljander P.R., Andreu Z., Zavec A.B., Borràs F.E., Buzas E.I., Buzas K., Casal E., Cappello F., Carvalho J., Colás E., Cordeiro-da Silva A., Fais S., Falcon-Perez J.M., Ghobrial I.M., et al. 2015. Biological properties of extracellular vesicles and their physiological functions. *J. Extracell. vesicles*. **4** (2015), 27066. <https://doi.org/10.3402/jev.v4.27066>
- Colombo M., Raposo G., Théry C. 2014. Biogenesis, secretion, and intercellular interactions of exosomes and other extracellular vesicles. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* **30**, 255–289. <https://doi.org/10.1146/annurev-cellbio-101512-122326>
- Rojalin T., Phong B., Koster H.J., Carney R.P. 2019. Nanoplasmonic approaches for sensitive detection and molecular characterization of extracellular vesicles. *Front. Chem.* **7**, 279. <https://doi.org/10.3389/fchem.2019.00279>
- Raposo G., Stoorvogel W. 2013. Extracellular vesicles: Exosomes, microvesicles, and friends. *J. Cell Biol.* **200** (4), 373–383. <https://doi.org/10.1083/jcb.201211138>
- Bebelmann M.P., Smit M.J., Pegtel D.M., Baglio S.R. 2018. Biogenesis and function of extracellular vesicles in cancer. *Pharmacol. Ther.* **188**, 1–11. <https://doi.org/10.1016/j.pharmthera.2018.02.013>
- Cretoiu D., Xu J., Xiao J., Cretoiu S.M. 2016. Telocytes and their extracellular vesicles—evidence and hypotheses. *Int. J. Mol. Sci.* **17** (8), 1322. <https://doi.org/10.3390/ijms17081322>
- Wickman G., Julian L., Olson M.F. 2012. How apoptotic cells aid in the removal of their own cold dead bodies. *Cell Death Differ.* **19** (5), 735–742. <https://doi.org/10.1038/cdd.2012.25>
- Tannetta D., Dragovic R., Alyahyaee Z., Southcombe J. 2014. Extracellular vesicles and reproduction—promotion of successful pregnancy. *Cell. Mol. Immunol.* **11** (6), 548–563. <https://doi.org/10.1038/cmi.2014.42>
- Burnett L.A., Nowak R.A. 2016. Exosomes mediate embryo and maternal interactions at implantation and during pregnancy. *Front. Biosci.* **8** (1), 79–96. <https://doi.org/10.2741/s448>
- Chiarello D.I., Salsoso R., Toledo F., Mate A., Vázquez C.M., Sobrevia L. 2018. Foetoplacental communication via extracellular vesicles in normal pregnancy and preeclampsia. *Mol. Aspects Med.* **60**, 69–80. <https://doi.org/10.1016/j.mam.2017.12.002>
- Sheller-Miller S., Choi K., Choi C., Menon R. 2019. Cyclic-recombinase-reporter mouse model to determine exosome communication and function during pregnancy. *Am. J. Obstet. Gynecol.* **221** (5), 502.e1–502.e12. <https://doi.org/10.1016/j.ajog.2019.06.010>
- Han C., Han L., Huang P., Chen Y., Wang Y., Xue F. 2019. Syncytiotrophoblast-derived extracellular vesicles in pathophysiology of preeclampsia. *Front. Physiol.* **10**, 1236. <https://doi.org/10.3389/fphys.2019.01236>
- James-Allan L.B., Devaskar S.U. 2021. Extracellular vesicles and their role in gestational diabetes mellitus. *Placenta*. **113**, 15–22. <https://doi.org/10.1016/j.placenta.2021.02.012>
- Menon R., Shahin H. 2021. Extracellular vesicles in spontaneous preterm birth. *Am. J. Reprod. Immunol.* **85**(2), 139–148. <https://doi.org/10.1111/aji.13353>
- Weiss R., Gröger M., Rauscher S., Fendl B., Eichhorn T., Fischer M.B., Spittler A., Weber V. 2018. Differential interaction of platelet-derived extracellular vesicles with leukocyte subsets in human whole blood. *Sci. Rep.* **8** (1), 6598. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-25047-x>
- Arraud N., Linares R., Tan S., Gounou C., Pasquet J.M., Mornet S., Brisson A.R. 2014. Extracellular vesicles from blood plasma: Determination of their morphology, size, phenotype and concentration. *J. Thromb. Haemost.* **12** (5), 614–627. <https://doi.org/10.1111/jth.12554>

18. Koltsova E.M., Sorokina M.A., Pisaryuk A.S., Povalyayev N.M., Ignatova A.A., Polokhov D.M., Kotova E.O., Balatskiy A.V., Ataullakhanov F.I., Pantelev M.A., Kobalava Z.D., Balandina A.N. 2021. Hypercoagulation detected by routine and global laboratory hemostasis assays in patients with infective endocarditis. *PLoS One*. **16** (12), e0261429. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0261429>
19. Combes V., Simon A.C., Grau G.E., Arnoux D., Camoin L., Sabatier F., Mutin M., Sanmarco M., Sampol J., Dignat-George F. 1999. In vitro generation of endothelial microparticles and possible prothrombotic activity in patients with lupus anticoagulant. *J. Clin. Invest.* **104** (1), 93–102. <https://doi.org/10.1172/JCI4985>
20. Dickhout A., Koenen R.R. 2018. Extracellular vesicles as biomarkers in cardiovascular disease: Chances and risks. *Front. Cardiovasc. Med.* **5**, 113. <https://doi.org/10.3389/fcvm.2018.00113>
21. Dignat-George F., Boulanger C.M. 2011. The many faces of endothelial microparticles. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **31**(1), 27–33. <https://doi.org/10.1161/ATVBAHA.110.218123>
22. Sedgwick A.E., D'Souza-Schorey C. 2018. The biology of extracellular microvesicles. *Traffic*. **19** (5), 319–327. <https://doi.org/10.1111/tra.12558>
23. Thangaraju K., Neerukonda S.N., Katneni U., Buehler P.W. 2020. Extracellular vesicles from red blood cells and their evolving roles in health, coagulopathy and therapy. *Int. J. Mol. Sci.* **22** (1), 153. <https://doi.org/10.3390/ijms22010153>
24. Gamonet C., Desmarests M., Mourey G., Biichle S., Aupet S., Laheurte C., François A., Resch E., Bigey F., Binda D., Bardiaux L., Naegelen C., Marpoux N., Delettre F.A., Saas P., Morel P., Tiberghien P., Lacroix J., Capellier G., Vidal C., Garnache-Ottou F. 2020. Processing methods and storage duration impact extracellular vesicle counts in red blood cell units. *Blood Adv.* **4** (21), 5527–5539. <https://doi.org/10.1182/bloodadvances.2020001658>
25. Jy W., Ricci M., Shariatmadar S., Gomez-Marin O., Horstman L.H., Ahn Y.S. 2011. Microparticles in stored red blood cells as potential mediators of transfusion complications. *Transfusion*. **51** (4), 886–893. <https://doi.org/10.1111/j.1537-2995.2011.03099.x>
26. Giesen P.L.A., Rauch U., Bohrmann B., Kling D., Roqué M., Fallon J.T., Badimon J.J., Himer J., Riederer M.A., Nemerson Y. 1999. Blood-borne tissue factor: Another view of thrombosis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **96** (5), 2311–2315. <https://doi.org/10.1073/pnas.96.5.2311>
27. Reddy E.C., Rand M.L. 2020. Procoagulant phosphatidylserine-exposing platelets in vitro and in vivo. *Front Cardiovasc. Med.* **7** (15), 15. <https://doi.org/10.3389/fcvm.2020.00015>
28. Mackman N. 2009. The many faces of tissue factor. *J. Thromb. Haemost.* **7**, 136–139. <https://doi.org/10.1111/j.1538-7836.2009.03368.x>
29. Ruf W., Dorfleutner A., Riewald M. 2003. Specificity of coagulation factor signaling. *J. Thromb. Haemost.* **1** (7), 1495–1503. <https://doi.org/10.1046/j.1538-7836.2003.00300.x>
30. Monroe D.M., Key N.S. 2007. The tissue factor-factor VIIa complex: Procoagulant activity, regulation, and multitasking. *J. Thromb. Haemost.* **5**(6), 1097–1105. <https://doi.org/10.1111/j.1538-7836.2007.02435.x>
31. Butenas S., Orfeo T., Mann K.G. 2009. Tissue factor in coagulation: Which? Where? When? *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **29** (12), 1989–1996. <https://doi.org/10.1161/ATVBAHA.108.177402>
32. Mackman N., Tilley R.E., Key N.S. 2007. Role of the extrinsic pathway of blood coagulation in hemostasis and thrombosis. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **27** (8), 1687–1693. <https://doi.org/10.1161/ATVBAHA.107.141911>
33. Andrews A.M., Rizzo V. 2016. Microparticle-induced activation of the vascular endothelium requires caveolin-1/caveolae. *PLoS One*. **11** (2), e0149272. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0149272>
34. Shustova O.N., Antonova O.A., Golubeva N.V., Khaspekova S.G., Yakushkin V.V., Aksuk S.A., Alchinova I.B., Karganov M.Y., Mazurov A.V. 2017. Differential procoagulant activity of microparticles derived from monocytes, granulocytes, platelets and endothelial cells: Impact of active tissue factor. *Blood Coagul. Fibrinolysis*. **28** (5), 373–382. <https://doi.org/10.1097/MBC.0000000000000609>
35. Yang A., Chen F., He C., Zhou J., Lu Y., Dai J., Birge R.B., Wu Y. 2017. The procoagulant activity of apoptotic cells is mediated by interaction with factor XII. *Front. Immunol.* **8**, 1188. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2017.01188>
36. Bretelle F., Sabatier F., Desprez D., Camoin L., Grunebaum L., Combes V., D'Ercole C., Dignat-George F. 2003. Circulating microparticles: A marker of procoagulant state in normal pregnancy and pregnancy complicated by preeclampsia or intrauterine growth restriction. *Thromb. Haemost.* **89** (3), 486–492. <https://doi.org/10.1055/s-0037-1613378>
37. Alijotas-Reig J., Palacio-Garcia C., Farran-Codina I., Zarzoso C., Cabero-Roura L., Vilardell-Tarres M. 2011. Circulating cell-derived microparticles in women with pregnancy loss. *Am. J. Reprod. Immunol.* **66** (3), 199–208. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0897.2010.00972.x>
38. Radu C.M., Campello E., Spiezia L., Dhima S., Visentin S., Gavasso S., Woodhams B., Cosmi E., Simioni P. 2015. Origin and levels of circulating microparticles in normal pregnancy: A longitudinal observation in healthy women. *Scand. J. Clin. Lab. Invest.* **75** (6), 487–495. <https://doi.org/10.3109/00365513.2015.1052551>
39. Zhang Y., Zhao C., Wei Y., Yang S., Cui C., Yang J., Zhang J., Qiao R. 2018. Increased circulating microparticles in women with preeclampsia. *Int. J. Lab. Hematol.* **40** (3), 352–358. <https://doi.org/10.1111/ijlh.12796>
40. Alijotas-Reig J., Palacio-Garcia C., Llurba E., Vilardell-Tarres M. 2013. Cell-derived microparticles and vascular pregnancy complications: A systematic and comprehensive review. *Fertil. Steril.* **99** (2), 441–449. <https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2012.10.009>
41. Aharon A., Brenner B. 2011. Microparticles and pregnancy complications. *Thromb. Res.* **127**, S67–S71. [https://doi.org/10.1016/S0049-3848\(11\)70019-6](https://doi.org/10.1016/S0049-3848(11)70019-6)

42. Burton G.J., Fowden A.L. 2015. The placenta: A multifaceted, transient organ. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.* **370** (1663), 20140066. <https://doi.org/10.1098/rstb.2014.0066>
43. Huppertz B., Kadyrov M., Kingdom J.C.P. 2006. Apoptosis and its role in the trophoblast. *Am. J. Obstet. Gynecol.* **195** (1), 29–39. <https://doi.org/10.1016/j.ajog.2005.07.039>
44. Haider S., Meinhardt G., Saleh L., Kunihs V., Gamperl M., Kaindl U., Ellinger A., Burkard T.R., Fiala C., Pollheimer J., Mendjan S., Latos P.A., Knöfler M. 2018. Self-renewing trophoblast organoids recapitulate the developmental program of the early human placenta. *Stem Cell Reports.* **11** (2), 537–551. <https://doi.org/10.1016/j.stemcr.2018.07.004>
45. Moffett A., Loke C. 2006. Immunology of placentation in eutherian mammals. *Nat. Rev. Immunol.* **6** (8), 584–594. <https://doi.org/10.1038/nri1897>
46. Askelund K.J., Chamley L.W. 2011. Trophoblast deportation part I: Review of the evidence demonstrating trophoblast shedding and deportation during human pregnancy. *Placenta.* **32** (10), 716–723. <https://doi.org/10.1016/j.placenta.2011.07.081>
47. Holland O., Kroneis T., El-Heliebi A., McDowell-Hook M., Stone P., Sedlmayr P., Chamley L. 2017. Detection of fetal sex, aneuploidy and a microdeletion from single placental syncytial nuclear aggregates. *Fetal Diagn. Ther.* **41** (1), 32–40. <https://doi.org/10.1159/000445112>
48. Johansen M., Redman C.W., Wilkins T., Sargent I.L. 1999. Trophoblast deportation in human pregnancy – its relevance for pre-eclampsia. *Placenta.* **20** (7), 531–539. <https://doi.org/10.1053/plac.1999.0422>
49. Reverdiu P., Jarousseau A.C., Thibault G., Khalifoun B., Watier H., Lebranchu Y., Bardos P., Gruel Y. 1995. Tissue factor activity of syncytiotrophoblast plasma membranes and tumoral trophoblast cells in culture. *Thromb. Haemost.* **73** (1), 49–54. <https://doi.org/10.1055/s-0038-1653724>
50. Teng Y.C., Lin Q.De., Lin J.H., Ding C.W., Zuo Y. 2009. Coagulation and fibrinolysis related cytokine imbalance in preeclampsia: The role of placental trophoblasts. *J. Perinat. Med.* **37** (4), 343–348. <https://doi.org/10.1515/JPM.2009.060>
51. Aharon A., Brenner B., Katz T., Miyagi Y., Lanir N. 2004. Tissue factor and tissue factor pathway inhibitor levels in trophoblast cells: Implications for placental hemostasis. *Thromb. Haemost.* **92** (4), 776–786. <https://doi.org/10.1160/TH04-01-0033>
52. Lakasing L., Campa J.S., Poston R., Khamashta M.A., Poston L. 1999. Normal expression of tissue factor, thrombomodulin, and annexin V in placentas from women with antiphospholipid syndrome. *Am. J. Obstet. Gynecol.* **181** (1), 180–189. [https://doi.org/10.1016/s0002-9378\(99\)70457-6](https://doi.org/10.1016/s0002-9378(99)70457-6)
53. Faulk W.P., Labarrere C.A., Carson S.D. 1990. Tissue factor: Identification and characterization of cell types in human placentae. *Blood.* **76**(1), 86–96.
54. Teng Y., Jiang R., Lin Q., Ding C., Ye Z. 2010. The relationship between plasma and placental tissue factor, and tissue factor pathway inhibitors in severe pre-eclampsia patients. *Thromb. Res.* **126** (1), e41–e45. <https://doi.org/10.1016/j.thromres.2010.02.012>
55. Gardiner C., Tannetta D.S., Simms C.A., Harrison P., Redman C.W.G., Sargent I.L. 2011. Syncytiotrophoblast microvesicles released from pre-eclampsia placentae exhibit increased tissue factor activity. *PLoS One.* **6** (10), e26313. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0026313>
56. Ng E.K.O., Leung T.N., Tsui N.B.Y., Lau T.K., Panesar N.S., Chiu R.W.K., Lo Y.M.D. 2003. The concentration of circulating corticotropin-releasing hormone mRNA in maternal plasma is increased in preeclampsia. *Clin. Chem.* **49** (5), 727–731. <https://doi.org/10.1373/49.5.727>
57. Freeman D.J., Tham K., Brown E.A., Rumley A., Lowe G.D., Greer I.A. 2008. Fetal corticotrophin-releasing hormone mRNA, but not phosphatidylserine-exposing microparticles, in maternal plasma are associated with factor VII activity in pre-eclampsia. *J. Thromb. Haemost.* **6** (3), 421–427. <https://doi.org/10.1111/j.1538-7836.2007.02882.x>
58. Goswami D., Tannetta D.S., Magee L.A., Fuchisawa A., Redman C.W.G., Sargent I.L., von Dadelszen P. 2006. Excess syncytiotrophoblast microparticle shedding is a feature of early-onset pre-eclampsia, but not normotensive intrauterine growth restriction. *Placenta.* **27** (1), 56–61. <https://doi.org/10.1016/j.placenta.2004.11.007>
59. Knight M., Redman C.W.G., Linton E.A., Sargent I.L. 1998. Shedding of syncytiotrophoblast microvilli into the maternal circulation in pre-eclamptic pregnancies. *Br. J. Obstet. Gynaecol.* **105** (6), 632–640. <https://doi.org/10.1111/j.1471-0528.1998.tb10178.x>
60. Lok C.A.R., Van Der Post J.A.M., Sargent I.L., Hau C.M., Sturk A., Boer K., Nieuwland R. 2008. Changes in microparticle numbers and cellular origin during pregnancy and preeclampsia. *Hypertens. Pregnancy.* **27** (4), 344–360. <https://doi.org/10.1080/10641950801955733>
61. Huppertz B., Frank H.G., Kingdom J.C., Reister F., Kaufmann P. 1998. Villous cytotrophoblast regulation of the syncytial apoptotic cascade in the human placenta. *Histochem. Cell Biol.* **110** (5), 495–508. <https://doi.org/10.1007/s004180050311>
62. Owens A.P. 3rd, Mackman N. 2012. Microparticles in hemostasis and thrombosis. **108** (10), 1284–1297. <https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.110.233056>
63. Fazel A., Vincenot A., Malassiné A., Soncin F., Gaussem P., Alsat E., Evain-Brion D. 1998. Increase in expression and activity of thrombomodulin in term human syncytiotrophoblast microvilli. *Placenta.* **19** (4), 261–268. [https://doi.org/10.1016/s0143-4004\(98\)90057-1](https://doi.org/10.1016/s0143-4004(98)90057-1)
64. Lanir N., Aharon A., Brenner B. 2003. Haemostatic mechanisms in human placenta. *Best Pract. Res. Clin. Haematol.* **16** (2), 183–195. [https://doi.org/10.1016/s1521-6926\(02\)00098-1](https://doi.org/10.1016/s1521-6926(02)00098-1)
65. Štok U., Čučnik S., Sodin-Šemrl S., Žigon P. 2021. Extracellular vesicles and antiphospholipid syndrome: State-of-the-art and future challenges. *Int. J. Mol. Sci.* **22** (9), 4689. <https://doi.org/10.3390/ijms22094689>

66. Goulopoulou S., Davidge S.T. 2015. Molecular mechanisms of maternal vascular dysfunction in preeclampsia. *Trends Mol. Med.* **21** (2), 88–97. <https://doi.org/10.1016/j.molmed.2014.11.009>
67. Tannetta D.S., Dragovic R.A., Gardiner C., Redman C.W., Sargent I.L. 2013. Characterisation of syncytiotrophoblast vesicles in normal pregnancy and pre-eclampsia: Expression of Flt-1 and endoglin. *PLoS One.* **8** (2), e56754. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0056754>
68. Lok C.A.R., Böing A.N., Sargent I.L., Sooranna S.R., van der Post J.A.M., Nieuwland R., Sturk A. 2008. Circulating platelet-derived and placenta-derived microparticles expose Flt-1 in preeclampsia. *Reprod. Sci.* **15** (10), 1002–1010. <https://doi.org/10.1177/1933719108324133>
69. Cronqvist T., Tannetta D., Mörgelin M., Belting M., Sargent I., Familiar M., Hansson S.R. 2017. Syncytiotrophoblast derived extracellular vesicles transfer functional placental miRNAs to primary human endothelial cells. *Sci. Rep.* **7** (1), 4558. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-04468-0>
70. Tannetta D.S., Hunt K., Jones C.I., Davidson N., Coxon C.H., Ferguson D., Redman C.W., Gibbins J.M., Sargent I.L., Tucker K.L. 2015. Syncytiotrophoblast extracellular vesicles from pre-eclampsia placentas differentially affect platelet function. *PLoS One.* **10** (11), e0142538. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0142538>
71. Tannetta D., Masliukaite I., Vatish M., Redman C., Sargent I. 2017. Update of syncytiotrophoblast derived extracellular vesicles in normal pregnancy and pre-eclampsia. *J. Reprod. Immunol.* **119**, 98–106. <https://doi.org/10.1016/j.jri.2016.08.008>

## Procoagulant Properties of Extracellular Vesicles in Normal and Pathological Pregnancy

E. M. Koltsova<sup>1, 2, \*</sup>, A. A. Martyanov<sup>1, 2, 3</sup>, N. A. Podoplelova<sup>1, 2</sup>

<sup>1</sup>Dmitry Rogachev National Medical Research Center of Pediatric Hematology, Oncology and Immunology, Moscow, 117997 Russia

<sup>2</sup>Center for Theoretical Problems of Physicochemical Pharmacology, Russian Academy of Sciences, Moscow, 109029 Russia

<sup>3</sup>Emanuel Institute of Biochemical Physics, Russian Academy of Sciences, Moscow, 119334 Russia

\*e-mail: [ekaterina\\_koltsova@bk.ru](mailto:ekaterina_koltsova@bk.ru)

Extracellular vesicles are lipid bilayer membrane structures without nuclei that are released from various cells as a result of physiological and metabolic changes. They play an important role in intercellular communication through the transfer of a wide range of bioactive molecules, contributing to the regulation of various physiological and pathological processes. Extracellular vesicles may have procoagulant properties due to the presence of phosphatidylserine, which accelerates coagulation reactions, on the outer layer of the membrane, as well as the expression of tissue factor, which activates coagulation along the external pathway, on the surface of some vesicles. A large number of clinical and experimental studies have shown that in various pathologies and specific physiological conditions, including pregnancy, the concentration of extracellular vesicles significantly exceeds that in healthy volunteers, which could theoretically be a factor in the development of hypercoagulable states. This review focuses on describing the procoagulant properties of extracellular vesicles of various origins in normal and pathological pregnancy.

**Keywords:** hemostasis, vesicles, pregnancy, placenta, thrombin, hypercoagulation

УДК 577.352.465

## ИЗОФОРМ-СПЕЦИФИЧЕСКИЕ ИНГИБИТОРЫ P13K ПОДАВЛЯЮТ АГОНИСТ-ИНДУЦИРОВАННУЮ Ca<sup>2+</sup>-СИГНАЛИЗАЦИЮ ПО P13K-НЕЗАВИСИМОМУ МЕХАНИЗМУ

© 2022 г. Е. А. Дымова<sup>а</sup>, О. А. Рогачевская<sup>а</sup>, П. Д. Котова<sup>а</sup> \*<sup>а</sup>Институт биофизики клетки РАН, ФИЦ ПНЦБИ РАН,  
Пушино, Московская обл., 142290 Россия

\*e-mail: p.d.kotova@gmail.com

Поступила в редакцию 14.04.2022 г.

После доработки 10.05.2022 г.

Принята к публикации 12.05.2022 г.

Ацетилхолин является первичным медиатором в аутокринных и паракринных регуляциях, контролируемых физиологические процессы в различных клетках и тканях. В данной работе с помощью микрофотометрии, Ca<sup>2+</sup>-зонда Fluo-4 и ингибиторного анализа показано, что в клетках линии HEK-293 ацетилхолин вызывает мобилизацию Ca<sup>2+</sup>, стимулируя мускариновые рецепторы, сопряженные с фосфоинозитидным сигнальным каскадом. При исследовании роли P13-киназы (P13K) в трансдукции ацетилхолина установлено, что специфические ингибиторы P13Kβ (AZD 6482), P13Kγ (AS 605240) и P13Kδ (LTURM 36) полностью подавляют агонист-индуцированные Ca<sup>2+</sup>-сигналы. При этом специфический ингибитор P13Kα (GSK 1059615) не оказывает влияния на способность клеток HEK-293 генерировать Ca<sup>2+</sup>-ответы на ацетилхолин. Ряд фактов указывает на то, что эффекты ингибиторов P13K на клеточные ответы обусловлены механизмами, независимыми от ингибирования P13K, и что возможной клеточной мишенью этих соединений является мускариновый рецептор M3. Высказано предположение, что изоформ-специфические ингибиторы P13K AZD 6482, AS 605240 и LTURM 36 являются антагонистами M3-рецепторов.

**Ключевые слова:** ингибиторы P13-киназы, мускариновые рецепторы, Ca<sup>2+</sup>-сигнализация**DOI:** 10.31857/S0233475522060044

### ВВЕДЕНИЕ

Ацетилхолин играет важную роль в физиологии клеток и тканей, в частности, выполняя роль нейротрансмиттера в центральной и периферической нервной системе и являясь первичным медиатором в аутокринных и паракринных регуляциях, контролируемых физиологические процессы в различных ненейрональных тканях [1, 2]. Чувствительность клеток к ацетилхолину обеспечивается поверхностными рецепторами двух классов, включая ионотропные никотиновые рецепторы, представляющие собой лиганд-активируемые Ca<sup>2+</sup>-проницаемые катионные каналы, и мускариновые рецепторы, сигнальная функция которых обеспечивается сопряжением с G-белками (G-protein coupled receptor, GPCR-рецепторы) и различными внутриклеточными сигнальными путями [1]. Ряд мускариновых рецепторов (M1, M3, M5) сопряжен с фосфоинозитидным каскадом и мобилизацией внутриклеточного Ca<sup>2+</sup> [1]. Ключевыми в этом процессе являются продукция вторичного медиатора IP3, катализируемая фосфолипазой C, и IP3-зависимый выброс депони-

рованного Ca<sup>2+</sup> из Ca<sup>2+</sup>-депо [3, 4]. Регуляторная роль IP3 сводится к активации IP3-рецепторов, которые фактически являются лиганд-управляемыми Ca<sup>2+</sup>-проницаемыми каналами, функционирующими в эндоплазматическом ретикулуме и некоторых других внутриклеточных органеллах [5]. Помимо IP3, коагонистом IP3-рецепторов является цитозольный Ca<sup>2+</sup>, который оказывает бифазное действие на их активность через Ca<sup>2+</sup>-связывающие центры двух типов [6]. Связывание Ca<sup>2+</sup> с высокоаффинным активаторным сайтом IP3-рецептора приводит к существенному росту вероятности открытого состояния этого Ca<sup>2+</sup>-канала [7], так что ионы Ca<sup>2+</sup>, высвобождающиеся из Ca<sup>2+</sup>-депо через IP3-рецептор, потенцируют его активность. Эта положительная обратная связь лежит в основе Ca<sup>2+</sup>-индуцированного выброса депонированного Ca<sup>2+</sup> (Ca<sup>2+</sup>-induced Ca<sup>2+</sup> release) – регенеративного процесса, который определяет многие аспекты внутриклеточной Ca<sup>2+</sup>-сигнализации [3, 8].



На протекание процесса  $\text{Ca}^{2+}$ -индуцированного выброса депонированного  $\text{Ca}^{2+}$  влияют механизмы, регулирующие IP3-рецепторы, активность которых, в частности, контролируется процессами фосфорилирования/дефосфорилирования при участии ряда киназ, включая фосфатидилинозитол-3-киназу (P13K) [9, 10]. Ранее нами было показано, что ингибитор P13K вортманнин не влияет на способность клеток НЕК-293 генерировать  $\text{Ca}^{2+}$ -ответы на ацетилхолин, тогда как ингибитор P13K другой химической природы P1828 полностью подавляет эти ответы [11]. Разная эффективность вортманнина и P1828 могла быть связана с тем, что в клетках НЕК-293 функционируют изоформы P13K, существенно более чувствительные к P1828. Для внесения ясности в этот вопрос мы исследовали влияние изоформ-специфических ингибиторов P13K на  $\text{Ca}^{2+}$ -сигнализацию, инициируемую ацетилхолином.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

**Культура клеток.** Клетки линии НЕК-293 (российская коллекция клеточных культур позвоночных) культивировали в среде DMEM с высоким содержанием глюкозы (Invitrogen) с добавлением 10% эмбриональной бычьей сыворотки (HyClone), 100 мг/мл гентамицина (Sigma-Aldrich), 2 мМ глутамина (Sigma-Aldrich) (ростовая среда) во влажной атмосфере с 5% содержанием  $\text{CO}_2$  в воздухе при 37°C.

**Мониторинг внутриклеточного  $\text{Ca}^{2+}$ .** Для эксперимента клетки снимали с культурального пластика 0.25% раствором трипсина (Sigma-Aldrich), а затем прикрепляли ко дну фотометрической камеры с помощью адгезивного материала Cell Tak (Corning). При дальнейших манипуляциях клетки находились во внеклеточном растворе, содержащем (мМ): 130 NaCl, 5 KCl, 2  $\text{CaCl}_2$ , 1  $\text{MgCl}_2$ , 10 HEPES, pH 7.4, 10 глюкозы, в ряде экспериментов использовали внеклеточный раствор, содержащий 260 нМ свободного  $\text{Ca}^{2+}$ , для чего 2 мМ  $\text{CaCl}_2$  заменяли на 0.5 мМ EGTA + 0.4 мМ  $\text{CaCl}_2$  (все соли и буферы произведены Sigma-Aldrich). Для загрузки флуоресцентным  $\text{Ca}^{2+}$ -зондом Fluo-4 клетки инкубировали в присутствии проникающего через мембрану Fluo-4 AM (4 мМ) и детергента Pluronic (0.02%) (оба Molecular Probes) при комнатной температуре в течение 30 мин. Затем клетки отмывали внеклеточным раствором и выдерживали в нем при комнатной температуре в течение 1 ч.

Фотометрические эксперименты проводили с использованием инвертированного флуоресцентного микроскопа Axiovert 135 (Zeiss), оборудованного объективом Plan NeoFluar 20×/0.75 и цифровой EMCCD камерой LucaR (Andor Technology). Флуоресценцию клеток возбуждали на

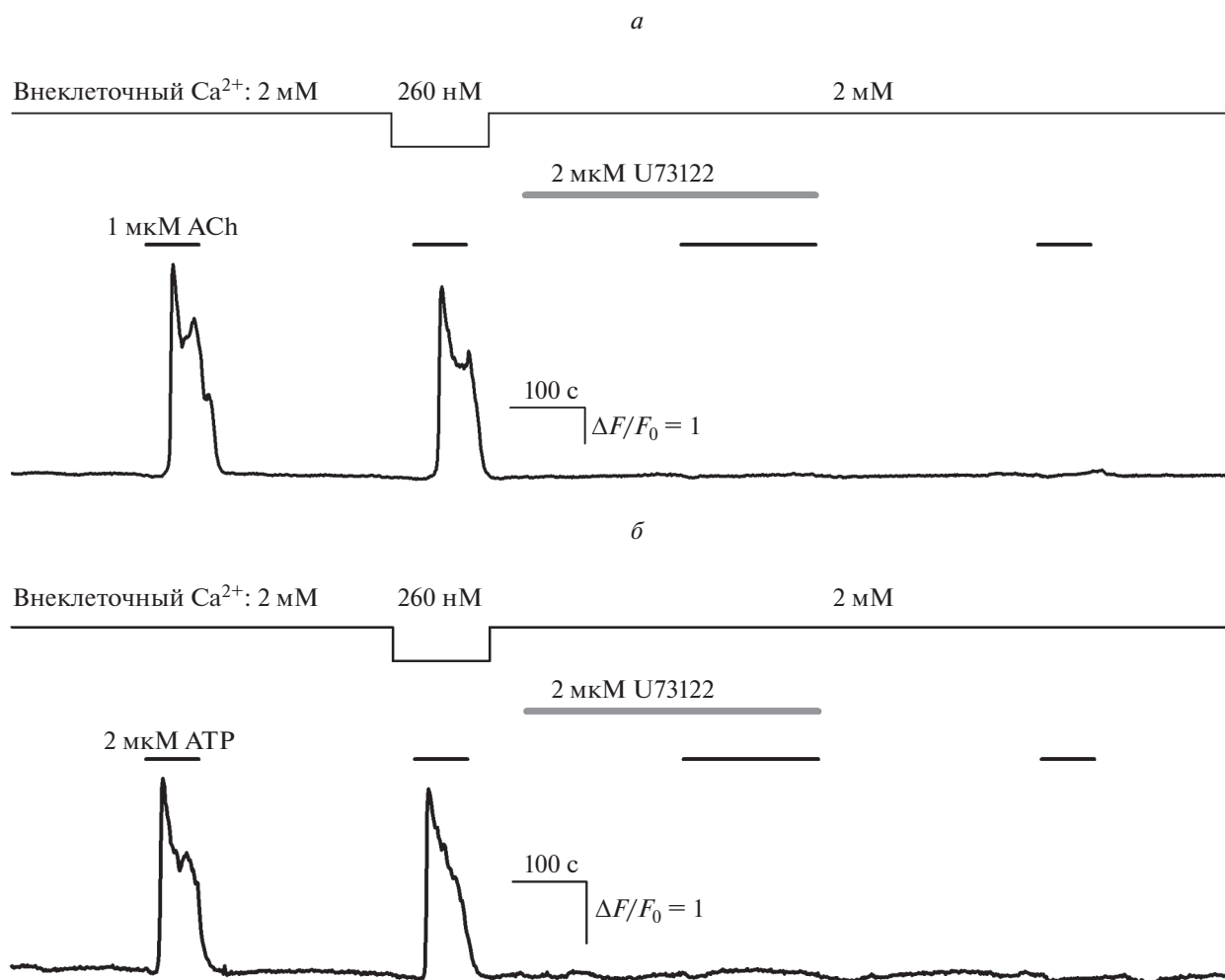
длине волны  $480 \pm 10$  нм, эмиссию регистрировали в области  $520 \pm 20$  нм, что соответствует спектральным характеристикам Fluo-4. Изменение уровня  $\text{Ca}^{2+}$  в цитоплазме оценивали по относительному изменению интенсивности флуоресценции Fluo-4  $\Delta F/F_0$ , где  $\Delta F = F - F_0$ ,  $F$  и  $F_0$  – интенсивность эмиссии  $\text{Ca}^{2+}$ -индикатора в текущий момент времени и в начале регистрации соответственно. Количественный фотометрический анализ изображений осуществляли с использованием программы NIS Elements (Nikon). Полученные экспериментальные данные обрабатывали с помощью программы Sigma Plot 12.5 (Systat Software Inc).

Все химические соединения, использованные в описанных ниже экспериментах, применяли путем полной замены раствора в фотометрической камере с помощью системы перфузии. В работе использовали: ацетилхолин, АТФ, AS 605240, AZD 6482, GSK 1059615, LTURM 36 (все Tocris Bioscience).

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

В физиологических экспериментах практически все клетки НЕК-293 генерировали  $\text{Ca}^{2+}$ -ответы на стимуляцию ацетилхолином. Нами были проанализированы механизмы, используемые клетками НЕК-293 для генерации  $\text{Ca}^{2+}$ -ответов на ацетилхолин. Одной из решавшихся задач было выяснение вклада источников ацетилхолин-индуцируемого поступления  $\text{Ca}^{2+}$  в цитозоль, т.е. выброса  $\text{Ca}^{2+}$  из внутриклеточного депо и входа наружного  $\text{Ca}^{2+}$ . Для этого, в частности, анализировали способность клеток НЕК-293 генерировать  $\text{Ca}^{2+}$ -ответы на ацетилхолин в среде с пониженным до цитоплазматического уровня содержанием  $\text{Ca}^{2+}$  (260 нМ). Оказалось, что все протестированные холинергические НЕК-293 в среде с пониженным  $\text{Ca}^{2+}$  генерировали практически нормальные по амплитуде и кинетике ответы на ацетилхолин (рис. 1а). Это свидетельствует о том, что основным источником  $\text{Ca}^{2+}$  для исследуемых ответов служит депонированный  $\text{Ca}^{2+}$ , а за чувствительность НЕК-293 к ацетилхолину ответственные GPCR-рецепторы ацетилхолина – мускариновые рецепторы. В связи с этим было вполне ожидаемо, что  $\text{Ca}^{2+}$ -ответы на ацетилхолин подавлялись в присутствии ингибитора фосфолипазы C U73122 (рис. 1а). В совокупности эти данные свидетельствуют о том, что для генерации  $\text{Ca}^{2+}$ -ответов на ацетилхолин клетки НЕК-293 преимущественно используют мускариновые рецепторы, сопряженные с фосфоинозитидным путем трансдукции сигнала.

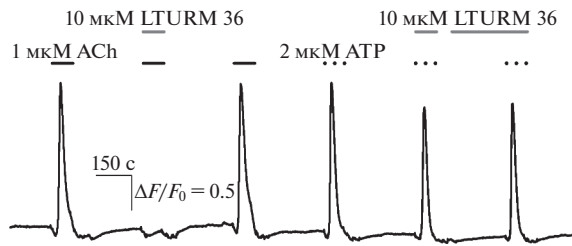
При исследовании эффектов изоформ-специфических ингибиторов P13K оказалось, что  $\text{Ca}^{2+}$ -



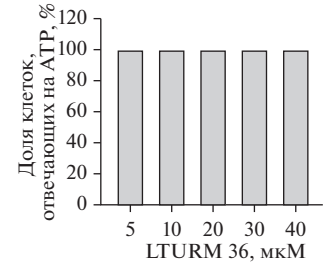
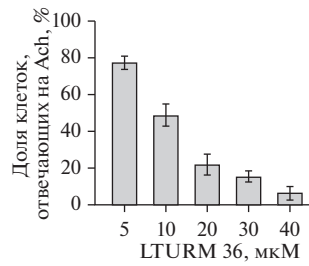
**Рис. 1.** Вклад фосфоинозитидного каскада в  $\text{Ca}^{2+}$ -ответы HEK-293 на ацетилхолин и АТР. Репрезентативные регистрации  $\text{Ca}^{2+}$ -ответов двух различных клеток HEK-293 при варьируемом внеклеточном  $\text{Ca}^{2+}$  и в присутствии ингибитора фосфолипазы С U73122 (2 мкМ) при стимуляции: *a* – 1 мкМ ацетилхолина (ACh), *б* – 2 мкМ АТР. Здесь и далее моменты и продолжительность аппликаций веществ обозначены горизонтальными линиями выше экспериментальной кривой. Изменение внутриклеточного  $\text{Ca}^{2+}$  оценивается по относительному изменению флуоресценции Fluo-4:  $\Delta F/F_0$ , где  $\Delta F = F - F_0$ ,  $F$  и  $F_0$  – текущая интенсивность эмиссии зонда и его эмиссия в начале регистрации соответственно.

ответы на ацетилхолин полностью подавлялись в присутствии AZD 6482, AS 605240 и LTURM 36, использовавшихся в достаточных дозах (рис. 2). Наиболее эффективным оказался ингибитор  $\text{PI3K}\delta$  LTURM 36, который в концентрации 10 мкМ блокировал ответы 48.8% клеток, чувствительных к ацетилхолину (рис. 2*a*). Концентрации полуэффекта для ингибиторов  $\text{PI3K}\beta$  AZD 6482 и  $\text{PI3K}\gamma$  AS 605240 составляли приблизительно 30 и 40 мкМ соответственно (рис. 2*б*, 2*в*). В то же время ингибитор  $\text{PI3K}\alpha$  (GSK 1059615) в широком диапазоне концентраций (1–100 мкМ) не влиял на способность клеток генерировать  $\text{Ca}^{2+}$ -ответы на ацетилхолин (рис. 2*д*), которые подавлялись в присутствии неспецифического ингибитора  $\text{PI3K}$  PI828 (рис. 2*д*) [11]. Формально полученные ре-

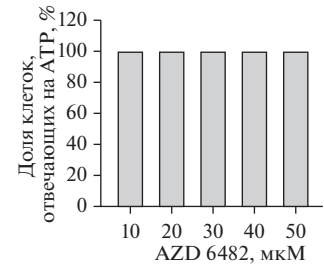
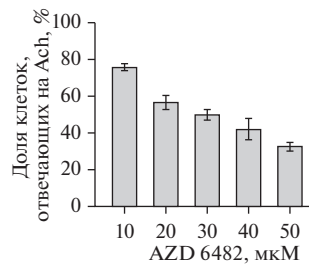
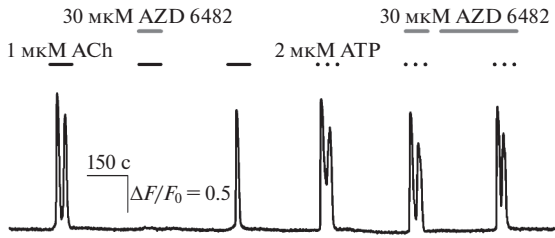
зультаты можно рассматривать как свидетельство того, что в генерации  $\text{Ca}^{2+}$ -ответов на ацетилхолин в клетках HEK-293 принимают участие  $\beta$ -,  $\gamma$ - и преимущественно  $\delta$ -изоформа  $\text{PI3K}$ , тогда как  $\alpha$ -изоформа не задействована в этом механизме. Однако обращал на себя внимание тот факт, что ингибирование  $\text{Ca}^{2+}$ -ответов в присутствии LTURM 36, AZD 6482 и AS 605240 наблюдалось при аппликации этих соединений одновременно с ацетилхолином, хотя обычно ингибирование внутриклеточных мишеней в интактных клетках требует времени для проникновения ингибитора через плазматическую мембрану. В связи с этим возникал вопрос, в какой степени наблюдавшееся подавление  $\text{Ca}^{2+}$ -ответов обуслов-



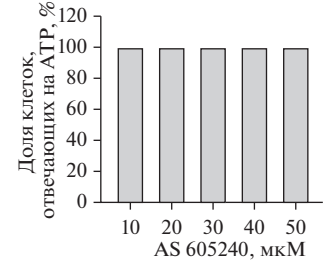
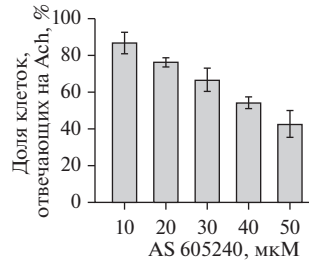
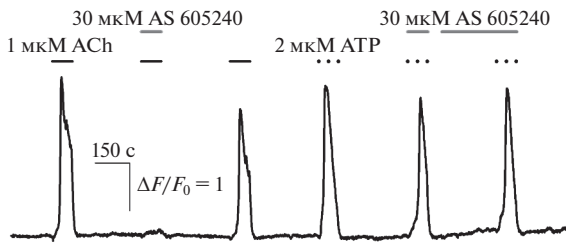
a



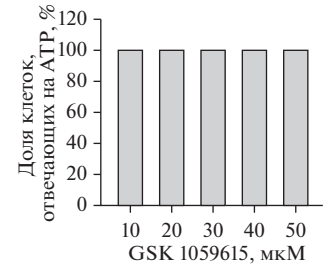
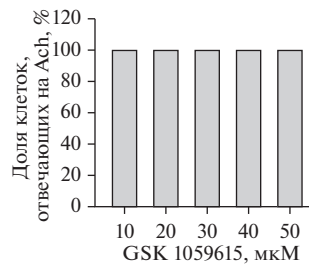
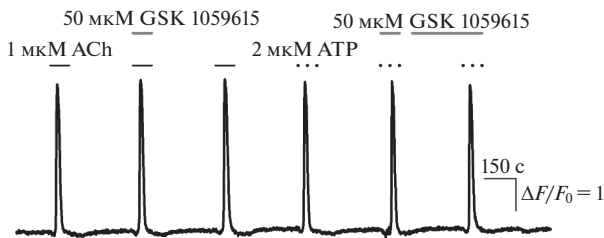
б



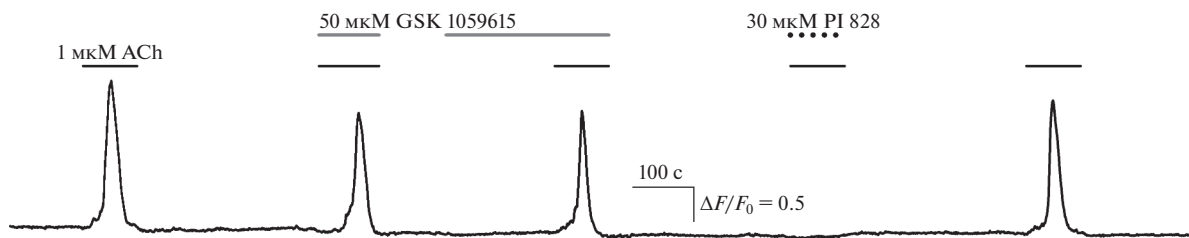
в



г



д



**Рис. 2.** Влияние специфических ингибиторов различных изоформ P13K на  $Ca^{2+}$ -ответы клеток НЕК-293 на ацетилхолин и АТР. *a–z* – На левых панелях представлены репрезентативные  $Ca^{2+}$ -ответы одиночных клеток на ацетилхолин (ACh) (1 мкМ) и АТР (2 мкМ) в контроле и присутствии ингибиторов: *a* – P13K $\delta$  LTURM 36 (10 мкМ), *b* – P13K $\beta$  AZD 6482 (30 мкМ), *в* – P13K $\gamma$  AS 605240 (30 мкМ), *z* – P13K $\alpha$  GSK 1059615 (50 мкМ). На средних панелях приводится доля (в %) клеток, отвечающих на ацетилхолин (1 мкМ), на правых панелях – доля (в %) клеток, отвечающих на АТР (2 мкМ), в присутствии ингибиторов: *a* – P13K $\delta$  LTURM 36 ( $n = 341$ ), *b* – P13K $\beta$  AZD 6482 ( $n = 280$ ), *в* – P13K $\gamma$  AS 605240 ( $n = 226$ ), *г* – P13K $\alpha$  GSK 1059615 ( $n = 357$ ). Данные представлены как среднее  $\pm$  стандартное отклонение; усреднение по 3–5 независимым экспериментам, в каждом из которых мониторинг внутриклеточного  $Ca^{2+}$  проводили в 80–100 индивидуальных клетках. *d* – Репрезентативная регистрация  $Ca^{2+}$ -ответов одиночной клетки на ацетилхолин (1 мкМ) в контроле и присутствии ингибитора P13K $\alpha$  GSK 1059615 (50 мкМ) и неспецифического ингибитора P13K P1828 (30 мкМ) ( $n = 274$ ).

лено воздействием перечисленных соединений именно на внутриклеточные сигнальные процессы, активируемые в НЕК-293 ацетилхолином и, прежде всего, на фосфоинозитидный сигнальный путь.

Одним из возможных вариантов проверки воздействия ингибиторов P13K на фосфоинозитидный каскад было исследование влияния этих соединений на  $Ca^{2+}$ -сигнализацию, инициируемую не холинергическими агонистами. В эксперименте, аналогичном описанному выше, было установлено, что, действуя через P2Y-рецепторы, АТР вызывает в клетках НЕК-293  $Ca^{2+}$ -ответы, которые также генерируются при участии фосфоинозитидного пути (рис. 1б). Оказалось, что ни один из исследовавшихся изоформ-специфических ингибиторов P13K не влиял на способность клеток НЕК-293 отвечать на АТР (рис. 2*a–z*), а значит, активность P13K вносит минимальный вклад в механизм их генерации.

Таким образом, исследовавшиеся ингибиторы P13K по-разному влияли на мобилизацию  $Ca^{2+}$ , индуцированную различными агонистами при участии фосфоинозитидного сигнального пути. С одной стороны, AZD 6482, AS 605240 и LTURM 36 полностью подавляли  $Ca^{2+}$ -ответы на ацетилхолин, однако когда в качестве агониста использовали АТР, то какое-либо влияние перечисленных ингибиторов P13K на клеточные ответы отсутствовало. Полученные данные указывали на то, что подавление  $Ca^{2+}$ -ответов на ацетилхолин соединениями AZD 6482, AS 605240, LTURM 36 связано не с ингибированием P13K, которая модулирует фосфоинозитидный каскад, а с воздействием на другую клеточную мишень, которая участвует в генерации  $Ca^{2+}$ -ответа на ацетилхолин, но не является частью фосфоинозитидного сигнального пути. Такой мишенью могут являться непосредственно мускариновые рецепторы ацетилхолина, что косвенно подтверждается способностью соединений AZD 6482, AS 605240, LTURM 36 блокировать  $Ca^{2+}$ -ответы при одновременной аппликации с ацетилхолином (рис. 2*a–z*). В исследованиях, предшествующих этому, нами было установлено, что за чувствительность НЕК-293 к ацетилхолину отвечает M3-рецептор [12], и, следовательно, именно этот

мускариновый рецептор является наиболее вероятной мишенью соединений AZD 6482, AS 605240, LTURM 36.

Ранее методами вычислительной биофизики нами была продемонстрирована возможность связывания с M3-рецепторами ингибиторов P13K LY294002, LY303511 и Voxelisib [12, 13]. Результаты физиологических экспериментов, описанные в данной работе, показали, что ингибитор P13K GSK 1059615 не влиял на способность клеток отвечать на ацетилхолин, а значит, не все синтетические ингибиторы P13-киназы обладают антагонистическими свойствами по отношению к мускариновым рецепторам. Полученные результаты по ингибированию клеточных ответов могут отражать эффективность связывания специфических ингибиторов P13K с M3-рецепторами, которая в этом случае описывается рядом: LTURM 36 > AZD 6482 > AS 605240. Сочетание экспериментальных подходов и математического моделирования, возможно, позволит в дальнейшем установить набор молекулярных признаков, которые обеспечивают узнавание M3-рецептором ингибиторов P13K как своих лигандов. В перспективе это может позволить создавать ингибиторы P13K, не оказывающие неспецифического действия на активность M3-рецепторов.

**Конфликт интересов.** Авторы декларируют отсутствие явных и потенциальных конфликтов интересов, связанных с публикацией настоящей статьи.

**Источники финансирования.** Работа выполнена при поддержке гранта РФФ № 19-75-10068.

**Соответствие принципам этики.** Настоящая статья не содержит описания каких-либо исследований с участием людей или животных в качестве объектов.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Brown D.A. 2019. Acetylcholine and cholinergic receptors. *Brain Neurosci. Adv.* 3, 2398212818820506.
2. Wessler I., Kirkpatrick C.J. 2008. Acetylcholine beyond neurons: The non-neuronal cholinergic system in humans. *Br. J. Pharmacol.* 154 (8), 1558–1571.
3. Berridge M.J. 2016. The inositol trisphosphate/calcium signaling pathway in health and disease. *Physiol. Rev.* 96, 1261–1296.

4. Thillaiappan N.B., Chakraborty P., Hasan G., Taylor C.W. 2019. IP3 receptors and Ca<sup>2+</sup> entry. *Biochim. Biophys. Acta Mol. Cell. Res.* **1866** (7), 1092–1100.
5. Hamada K., Mikoshiba K. 2020. IP3 receptor plasticity underlying diverse functions. *Annu. Rev. Physiol.* **82**, 151–176.
6. Prole D.L., Taylor C.W. 2019. Structure and function of IP3 receptors. *Cold Spring. Harb. Perspect. Biol.* **11** (4), a035063.
7. Mak D.O., Foskett J.K. 2015. Inositol 1,4,5-trisphosphate receptors in the endoplasmic reticulum: A single-channel point of view. *Cell Calcium.* **58**, 67–78
8. Rios E. 2018. Calcium-induced release of calcium in muscle: 50 years of work and the emerging consensus. *J. Gen. Physiol.* **150**, 521–537.
9. Szado T., Vanderheyden V., Parys J.B., De Smedt H., Rietdorf K., Kotelevets L., Chastre E., Khan F., Landegren U., Söderberg O., Bootman M.D., Roderick H.L. 2008. Phosphorylation of inositol 1,4,5-trisphosphate receptors by protein kinase B/Akt inhibits Ca<sup>2+</sup> release and apoptosis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **105** (7), 2427–2432.
10. Frégeau M.O., Régimbald-Dumas Y., Guillemette G. 2011. Positive regulation of inositol 1,4,5-trisphosphate-induced Ca<sup>2+</sup> release by mammalian target of rapamycin (mTOR) in RINm5F cells. *J. Cell Biochem.* **112** (2), 723–733.
11. Дымова Е.А., Рогачевская О.А., Воронова Е.А., Котова П.Д. 2021. PI828 подавляет Ca<sup>2+</sup>-сигнализацию, инициируемую аминергическими агонистами, по механизму, независимому от ингибирования PI3-киназы. *Биол. мембраны.* **38** (5), 265–273.
12. Лямин О.О., Котова П.Д., Дымова Е.А., Фадеев П.Ю., Рогачевская О.А., Воронова Е.А., Колесников С.С. 2022. Ингибитор PI3K и mTOR воксталисиб нарушает сопряжение мускаринового рецептора M3 с мобилизацией Ca<sup>2+</sup>. *Биол. мембраны.* **33** (3), 205–214.
13. Kotova P.D., Kochkina E.N., Lyamin O.O., Rogachevskaja O.A., Kovalenko N.P., Ivashin D.S., Bystrova M.F., Enukevich N.I., Kolesnikov S.S. 2020. Calcium signaling mediated by aminergic GPCRs is impaired by the PI3K inhibitor LY294002 and its analog LY303511 in a PI3K-independent manner. *Eur. J. Pharmacol.* **880**, 173182.

## Isoform-Specific Inhibitors of PI3K Impair Agonist-Induced Ca<sup>2+</sup> Signaling in a PI3K-Independent Manner

E. A. Dymova<sup>1</sup>, O. A. Rogachevskaja<sup>1</sup>, P. D. Kotova<sup>1</sup>, \*

<sup>1</sup>Institute of Cell Biophysics, Russian Academy of Sciences, FRC PSCBR RAS, Pushchino, Moscow oblast, 142290 Russia

\*e-mail: p.d.kotova@gmail.com

Acetylcholine (ACh) serves as the first messenger mediating certain autocrine and paracrine regulations to control a variety of physiological processes in diverse tissues and cells. Using the inhibitory analysis, Ca<sup>2+</sup> imaging, and Ca<sup>2+</sup> dye Fluo-4, here we demonstrated that ACh was capable of mobilizing intracellular Ca<sup>2+</sup> by stimulating muscarinic receptors coupled to the phosphoinositide signaling pathway. When a role for PI3K in the ACh transduction was analyzed, it was found that certain isoform-specific PI3K inhibitors, including AZD 6482 (PI3Kβ), AS 605240 (PI3Kγ), and LTURM 36 (PI3Kδ), suppressed ACh-induced Ca<sup>2+</sup> signaling, while the PI3Kα inhibitor GSK 1059615 was ineffective. The evidence suggested that PI3K inhibitors inhibited cell responsiveness to ACh in PI3K-independent manner, and that the M3 muscarinic receptor appeared to be a likely cellular target. Based on the overall finding, we hypothesize that the specific PI3K inhibitors AZD 6482, AS 605240 и LTURM 36 can directly antagonize the M3 receptor.

**Keywords:** PI3K inhibitors, muscarinic receptors, Ca<sup>2+</sup> signaling

УДК 577.352.26

## ДОФАМИН ЗАЩИЩАЕТ НЕЙРОНЫ ОТ ТОКСИЧЕСКОГО ДЕЙСТВИЯ ГЛУТАМАТА

© 2022 г. Е. И. Федотова<sup>а, \*</sup>, А. Ю. Абрамов<sup>б, с</sup>, А. В. Бережнов<sup>а, \*\*</sup><sup>а</sup>Институт биофизики клетки – ФИЦ ПНЦБИ РАН, Пущино, 142190 Россия<sup>б</sup>Институт неврологии Университетского колледжа Лондона, WC1N 3BG Лондон<sup>с</sup>Орловский государственный университет, Орел, 302026 Россия

\*e-mail: delf-fenka@rambler.ru

\*\*e-mail: g\_56@rambler.ru

Поступила в редакцию 01.07.2022 г.

После доработки 25.07.2022 г.

Принята к публикации 26.07.2022 г.

Болезнь Паркинсона – нейродегенеративное заболевание, связанное с потерей нейронов в среднем мозге с последующим развитием дефицита дофамина. Мы предположили, что дофамин может действовать как антагонист глутамата, а его дефицит может усиливать вызванную глутаматом эксайтотоксичность. Используя первичную культуру гиппокампа крысы и флуоресцентную микроскопию, мы показали, что дофамин снижает амплитуду кальциевого ответа, вызванного активацией NMDA-рецепторов, не влияя при этом на кальциевый сигнал, опосредованный AMPA- и KA-рецепторами, а также активацией потенциал-зависимых кальциевых каналов. Показано, что эффект дофамина зависит не только от NMDA-рецепторов, но и от дофаминовых рецепторов D2-типа и от ГАМК<sub>A</sub>-рецепторов. Дофамин уменьшает деполяризацию митохондрий, вызванную глутаматом, и улучшает выживаемость нейронов при действии глутамата в токсических дозах. Представленные данные свидетельствуют о защитной роли дофамина при эксайтотоксичности, вызванной глутаматом.

**Ключевые слова:** дофамин, глутамат, кальций, ионотропные глутаматные рецепторы, нейропротекторы

**DOI:** 10.31857/S0233475522060056

### ВВЕДЕНИЕ

Дофамин – это нейромедиатор центральной нервной системы, который участвует в регуляции различных физиологических функций. Нарушения метаболизма и сигнализации дофамина приводят к развитию таких нейродегенеративных заболеваний, как болезнь Паркинсона, болезнь Альцгеймера, шизофрения. Так, во время болезни Паркинсона наблюдается потеря дофаминергических нейронов, главным образом в черной субстанции, а также в других отделах центральной нервной системы [1].

Известно, что дофамин способен подавлять увеличение концентрации ионов кальция в цитозоле ( $[Ca^{2+}]_i$ ), возникающее в ответ на глутамат, который в норме является основным возбуждающим нейромедиатором в головном мозге, а при избыточном накоплении становится токсичным и вызывает патологические состояния [2]. Во время развития болезни Паркинсона, при которой характерен дефицит дофамина, возможно, даже невысокие дозы глутамата могут приводить к нейродегенерации. Как известно, глутамат опосредует активацию группы глутаматных рецепто-

ров, к которым относятся ионотропные рецепторы (NMDA-, AMPA- и KA-рецепторы), являющиеся лиганд-управляемыми ионными каналами и активируемые специфическими агонистами, и метаботропные рецепторы (mGlu1–mGlu8), сопряженные с G-белком [3].

Дофаминергические функции опосредованы активацией семейством дофаминовых рецепторов, состоящим из пяти типов и относящимся к двум группам: D1-подобные рецепторы (D1 и D5) и D2-подобные рецепторы (D2, D3 и D4). D1-подобные рецепторы представляют собой серпентиновые рецепторы, сопряженные с G<sub>s</sub>-белком, которые участвуют в регуляции высвобождения нейротрансмиттеров, таких как глутамат, ГАМК и ацетилхолин. D2-подобные сопряжены с ингибирующим G-белком (G<sub>i/o</sub>) и регулируют секрецию дофамина в нейронах в ответ на изменение внеклеточного уровня нейротрансмиттера [4].

Из литературы известно, что взаимодействие между дофаминергической и глутаматергической системами обеспечивает основу для сложных нейронных взаимодействий в головном мозге. Активация D1- и D2-подобных рецепторов мо-

жет регулировать функцию и транспорт NMDA-рецепторов. Так, дофаминовые рецепторы напрямую или опосредованно через активацию протеинкиназы А взаимодействуют с NMDA-рецепторами и могут влиять на NMDA-ответы в нейронах [5].

Мы предположили, что дофамин может действовать как протектор против глутаматной нейротоксичности, поскольку добавление дофамина к культуре клеток гиппокампа ослабляет вызванные глутаматом повышение  $[Ca^{2+}]_i$  и митохондриальную деполяризацию и увеличивает количество жизнеспособных клеток после воздействия глутамата. В настоящей работе, чтобы определить его влияние на амплитуду кальциевых ответов, вызванных агонистами глутаматных и дофаминовых рецепторов.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

**Культура нейронов.** Объектом исследования служила первичная нейроглиальная культура гиппокампа крысы. Клетки гиппокампа выделяли из головного мозга новорожденных крысят (P1–P3) породы *Sprague Dawley*. Согласно методике получения культуры клеток, после декапитации крысенка гиппокамп извлекали и переносили в холодный раствор Хенкса [6]. Далее ткань измельчали ножницами, инкубировали в 0.1% растворе трипсина в течение 15 мин при 37°C, отмывали 3 раза средой Neurobasal-A (Gibco, США), содержащей 2% Supplement B27 (Gibco), 1 мМ L-глутамин (Sigma, США), 7.5 мкг/мл гентамицин (Дальхимфарм, Россия), пипетируя ткань до образования суспензии клеток. После этого клетки размещали на круглых покровных стеклах диаметром 25 мм, покрытых полиэтиленглицином (Fluka, США), и помещали в чашки Петри (35 мм). Через 1 ч к прикрепившимся клеткам добавляли 1.5 мл культуральной среды Neurobasal и инкубировали 5–12 дней при 37°C и 5% CO<sub>2</sub>.

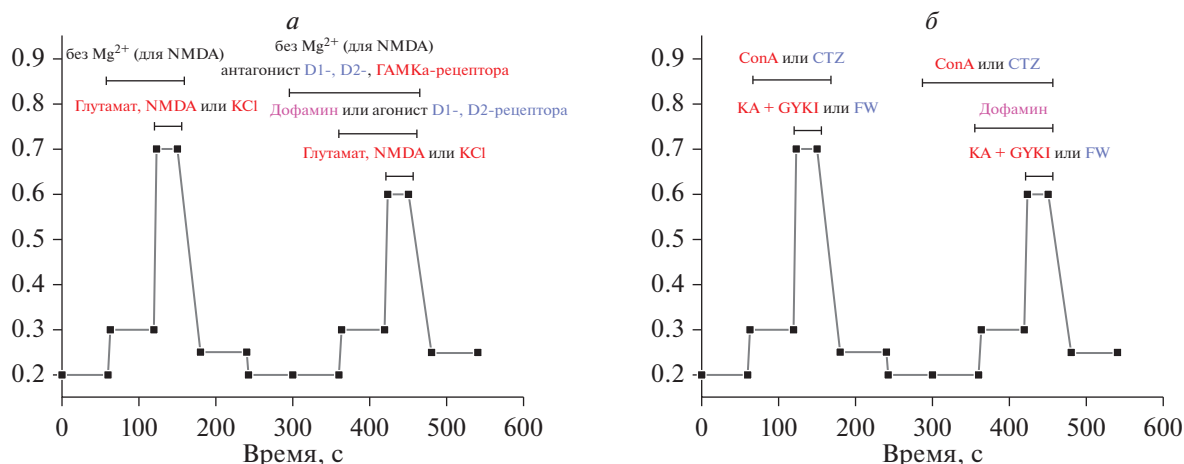
Эксперименты проводили в растворе Хенкса, содержащем (в мМ): 138 NaCl, 1.3 CaCl<sub>2</sub>, 0.4 MgSO<sub>4</sub>, 0.5 MgCl<sub>2</sub>, 5.3 KCl, 0.45 KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 4 NaHCO<sub>3</sub>, 0.3 Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 10 глюкозы, 20 HEPES (pH 7.3) при температуре 27–28°C. Эксперименты с NMDA проводили в среде без Mg<sup>2+</sup> с последующей заменой на раствор Хенкса.

**Измерение концентрации внутриклеточного кальция ( $[Ca^{2+}]_i$ ).** Изменения  $[Ca^{2+}]_i$  в нейронах оценивали по интенсивности флуоресценции двухволнового Ca<sup>2+</sup>-чувствительного зонда Fura-2 [7]. Культуру клеток нагружали 5 мкМ Fura-2AM (Invitrogen, США) в течение 60 мин с последующей отмывкой. Для регистрации  $[Ca^{2+}]_i$  использовали

систему анализа изображений на базе инвертированного моторизованного микроскопа Leica DM16000B (Leica Microsystems, Германия), оснащенного объективом Leica HC PL APO 20×/0.7 IMM. Для возбуждения и регистрации флуоресценции Fura-2 использовали набор светофильтров FU2 (возбуждение: 340 ± 6 и 380 ± 10 нм, регистрация: 510 ± 20 нм). Также использовалась система анализа изображений Cell Observer (Carl Zeiss, Германия) на базе инвертированного микроскопа Axiovert 200M, оснащенного объективом Plan Neofluar 10×/0.3. Для возбуждения и регистрации флуоресценции Fura-2 использовали набор светофильтров Filter set 21HE (возбуждение: 340 ± 6 и 380 ± 10 нм, регистрация: 510 ± 20 нм). Изображения получали с частотой 1 кадр в 3 с. Полученные в двух различных каналах временные серии изображений обрабатывали в программе ImageJ с использованием плагина Time Series Analyzer. Амплитуду кальциевых ответов (АКО) одиночных клеток оценивали как отношение сигналов флуоресценции Fura-2 при возбуждении светом длиной волны 340 и 380 нм. В эксперименте измеряли ответ 100–200 нейронов, находящихся в поле зрения микроскопа.

Для проведения эксперимента покровное стекло с культурой клеток монтировалось в специальную измерительную ячейку и содержалось в растворе Хенкса объемом 0.5 мл. Добавки реагентов и отмывку осуществляли с помощью системы перфузии, состоящей из подающего наконечника, подключенного к резервуарам с растворами, и наконечника, подключенного к водоструйному насосу и обеспечивающего постоянный уровень среды в измерительной ячейке. Наконечники располагались на противоположных сторонах ячейки. Для осуществления добавки система перфузии включалась на 8 с, что обеспечивало десятикратную (5 мл) смену рабочего раствора в ячейке. Таким же образом производилась отмывка. Контрольные эксперименты с оптически плотным красителем (трипановый синий) показали, что в этих условиях происходит полная (более 98%) замена раствора в измерительной ячейке. Такой протокол смены растворов является результатом оптимизации и обеспечивает отсутствие реакции клеток на механическое воздействие при смене среды. Тем не менее для оценки возможной реакции клеток в начале каждого эксперимента проводилась контрольная промывка 5 мл раствора Хенкса, которая указывала на отсутствие изменений  $[Ca^{2+}]_i$  в представленных опытах.

Для сравнения результатов опытов, проводимых в разные дни и на разных культурах, для нормирования сигналов в схеме опыта, а также для функционального разделения нейронов и глиальных клеток в культуре к клеткам добавляли стан-



**Рис. 1.** Схемы экспериментов для определения действия дофамина на амплитуду кальциевых сигналов, вызванных агонистами глутаматных рецепторов и KCl, на основе ранее разработанной методики [8]. *а* – Для глутамата, NMDA и KCl; *б* – для KA и AMPA.

дартный деполяризующий раствор KCl. В работе была использована методика оценки модулирующего действия различных соединений на активность ионотропных рецепторов глутамата – NMDA-, AMPA- и KA-рецепторов [8], которая основана на том, что в контроле несколько кратковременных (20–30 с) добавок агонистов этих рецепторов с интервалом в 10–15 мин вызывают кальциевые сигналы одинаковой амплитуды. Это позволяет использовать сигнал в ответ на первую добавку в качестве контроля, а на втором сигнале тестировать эффект того или иного соединения (рис. 1*а*). Амплитуды сигналов измеряли относительно исходного значения до добавки. В случае активации KA-рецепторов эксперименты проводили в присутствии ингибитора AMPA-рецепторов 30 мкМ GYKI-52466 (Tocris, Великобритания), поскольку каиновая кислота (KA, Sigma) является неселективным агонистом KA- и AMPA-рецепторов, а также ингибитора десенситизации KA-рецепторов 200 мкМ конканавалина А (ConA, Sigma). Для активации AMPA-рецепторов использовали селективный агонист этих рецепторов 5-фторвиллардин (FW, Santa Cruz Biotechnology, США) и ингибитор десенситизации AMPA-рецепторов 5 мкМ циклотиазид (CTZ, Tocris) (рис. 1*б*) [8].

**Измерение митохондриального потенциала.** Для регистрации клетки нагружали флуоресцентным потенциал-чувствительным зондом 20 мкМ Rhodamine 123 (Rh123, Sigma) в течение 10 мин. После этого дважды отмывали раствором Хенкса и использовали в эксперименте. Измерения проводили с помощью системы анализа изображений Cell Observer (Carl Zeiss) на базе инвертированного микроскопа Axiovert 200M, оснащенного объективом Plan Neofluar 10×/0.3. Для возбуждения и регистрации флуоресценции Rh123 исполь-

зовали набор светофильтров Filter set 44 (возбуждение:  $490 \pm 6$  нм, регистрация:  $550 \pm 20$  нм). В экспериментах использовался протокол прокрашки, основанный на зависимом от концентрации красителя тушении флуоресценции в энергизованных митохондриях, при деполяризации митохондриальных мембран наблюдается увеличение флуоресценции Rh123 [9]. Изображения получали с частотой 1 кадр в 5 с, которые обрабатывали в программе ImageJ с использованием плагина Time Series Analyzer. В эксперименте измеряли ответ 100–200 нейронов, находящихся в поле зрения микроскопа. Для нормирования сигналов в схеме опыта предусмотрена добавка 2 мкМ FCCP (Sigma), выявляющая наибольшую степень деполяризации митохондрий.

**Оценка жизнеспособности клеток.** Для оценки количества живых клеток в смешанной нейроглиальной культуре использовали метод двойного окрашивания флуоресцентными красителями Hoechst 33342 (2 мкг/мл, Sigma) и Propidium Iodide (PI, 2 мкг/мл, Sigma) в течение 10 мин с последующей отмывкой раствором Хенкса. Флуоресценцию красителей оценивали с использованием системы анализа изображений на базе инвертированного моторизованного микроскопа Leica DMI6000B (Leica Microsystems), оснащенного объективом Leica HC PL APO 20×/0.7 IMM. Для возбуждения и регистрации флуоресценции Hoechst использовали набор светофильтров DAPI (возбуждение:  $340 \pm 6$  нм, регистрация:  $470 \pm 20$  нм), для PI – набор светофильтров Texas Red (возбуждение:  $575 \pm 10$  нм, регистрация:  $624 \pm 10$  нм). Клетки в двух каналах подсчитывали в программе ImageJ с использованием плагина Cell Counter. Краситель Hoechst проникает в клетки и связывается с ДНК, что позволяет оценить морфологию ядра. Напротив, краситель PI проникает только в



поврежденные или фиксированные клетки. При колокализации сигнала от Hoechst и PI, свидетельствующей о нарушении барьерной функции плазмалеммы, клетки рассматривались нами как погибшие, а фрагментированные, ярко светящиеся в синем (Hoechst) канале ядра свидетельствовали об апоптозе. Данные представляли в виде процента нежизнеспособных и апоптотических клеток от общего числа клеток в поле зрения. В эксперименте измеряли флуоресцентный сигнал от 300–600 клеток нейроглиальной культуры.

**Обработка результатов.** Для построения графиков и статистической обработки использовали программы OriginPro2019 и GraphPadPrizm8 с применением параметрического анализа one-way ANOVA (post hoc Turkey test). На графиках представлены репрезентативные кривые, количество клеток в одном эксперименте  $N = 100–140$ , количество однотипных экспериментов:  $n = 3–4$ . Данные в столбцах представлены как среднее значение  $\pm$  стандартное отклонение от среднего, статистически значимые различия при  $* p < 0.05$ .

## РЕЗУЛЬТАТЫ

**Дофамин подавляет глутамат-индуцированное увеличение  $[Ca^{2+}]_i$  в нейронах.** Ранее было показано, что дофамин способен подавлять увеличение уровня цитозольного кальция ( $[Ca^{2+}]_i$ ), возникающее в ответ на небольшие дозы глутамата (5 мкМ) [10]. В данной работе мы проверили, может ли дофамин защищать клетки от действия более высоких концентраций глутамата – 50 и 100 мкМ, которые являются токсичными для клеток. Мы оценили способность дофамина влиять на амплитуду кальциевого сигнала в ответ на глутамат с помощью разработанного ранее способа оценки модулирующего действия различных соединений на активность ионотропных рецепторов глутамата – NMDA-, AMPA- и KA-рецепторов [8]. Был использован протокол, при котором повторяющиеся кратковременные добавки агонистов рецепторов глутамата вызывают повторяющееся по форме и амплитуде повышение  $[Ca^{2+}]_i$ . В работе было показано, что дофамин в концентрации 50 мкМ способен снижать амплитуду кальциевого сигнала в ответ на вторую добавку 10 мкМ глутамата на 19%. Так, добавка глутамата на фоне дофамина составила  $81 \pm 13\%$  от первой добавки глутамата (на рис. 2а, 2в ответ на глутамат принят за 100%). В случае действия больших доз глутамата (100 и 50 мкМ) ответ при добавлении дофамина также снижался – на 28% ( $72 \pm 22\%$ ) (рис. 2б, 2в). Подобный эффект может приводить к предотвращению глутамат-индуцированной кальциевой перегрузки клеток и таким образом являться нейропротекторным в условиях эксайтотоксичности.

Для того чтобы выявить, какие именно рецепторы участвуют в данном эффекте, мы проверили, как дофамин влияет на амплитуду кальциевых сигналов, вызванных селективной активацией ионотропных рецепторов глутамата: NMDA-, AMPA- и KA-рецепторов. При этом NMDA-рецептор сам проницаем для ионов кальция, а активация AMPA- и KA-рецепторов в основном опосредована действием потенциал-зависимых кальциевых каналов [11]. Было показано, что дофамин подавляет активность NMDA-рецепторов, при этом не влияет на активность рецепторов каиноновой кислоты (KA-рецепторов) и AMPA-рецепторов. Были получены следующие значения: дофамин в концентрации 10 мкМ подавляет кальциевый сигнал, вызванный добавлением небольших доз (5 и 10 мкМ) NMDA на 23% ( $77 \pm 23\%$  относительно первого сигнала агониста, рис. 3а, 3б). При действии высоких концентраций NMDA (50 и 100 мкМ) дофамин подавляет ответ на добавку этого агониста на 15% (рис. 3б).

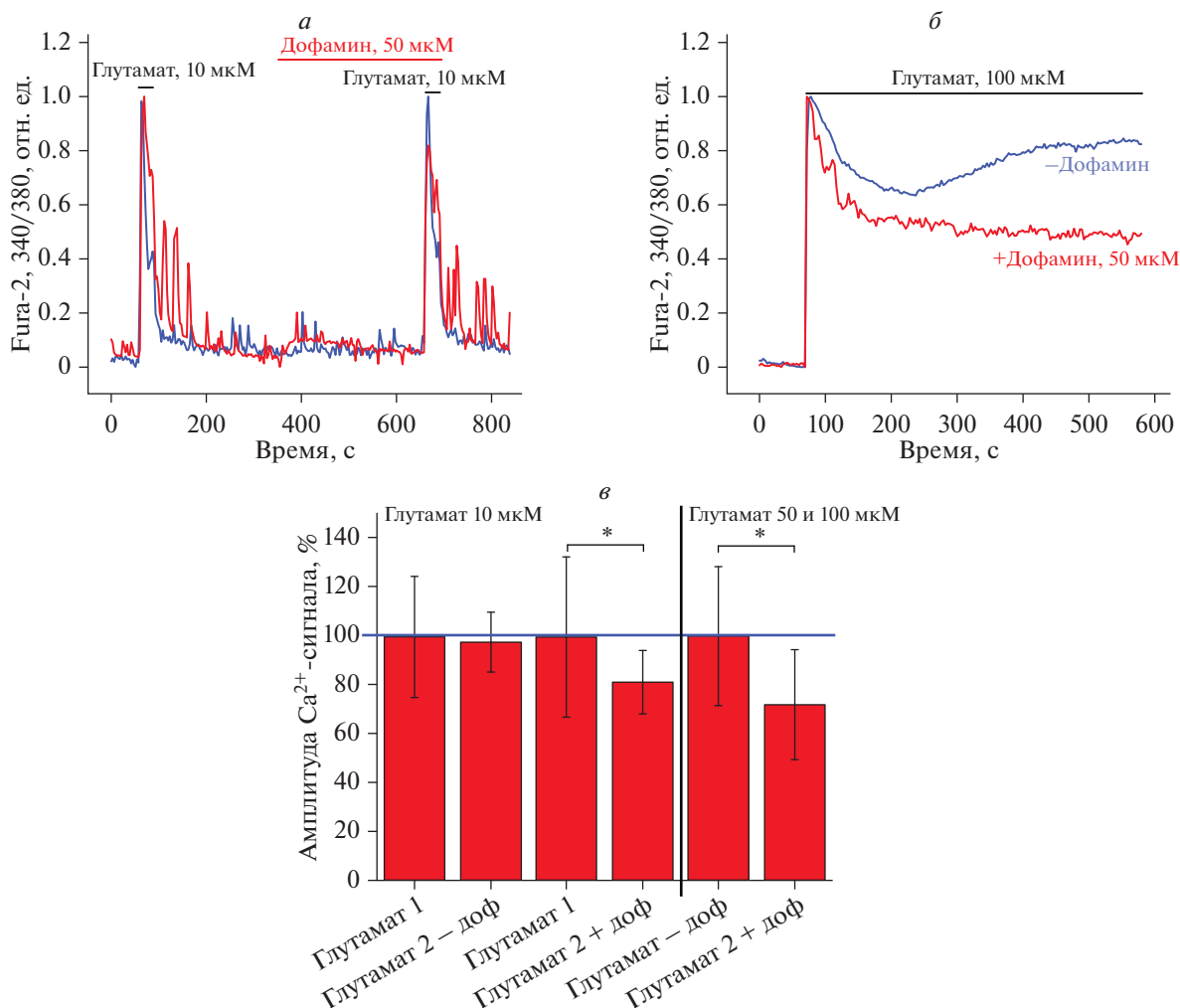
Было показано, что дофамин не уменьшает кальциевый сигнал в ответ на агонист KA-рецептора каиноновую кислоту (на фоне антагониста AMPA-рецептора GYKI-52466, KA + GYKI). Кальциевый ответ на вторую добавку составил  $101 \pm 22\%$  относительно первого сигнала (рис. 4а, 4б). Также дофамин не оказывает влияние на активность AMPA-рецепторов, поскольку добавление дофамина на фоне агониста AMPA-рецептора фторовиллардина (FW) не изменяло кальциевый ответ ( $98 \pm 13\%$ ) (рис. 4б, 4в). Для снятия десенситизации этих рецепторов эксперименты проводили в присутствии 200 мкг/мл конканавалина А (для KA-рецептора) или 5 мкМ циклотиазида (для AMPA-рецептора) [8].

Также мы проверили, изменяется ли амплитуда кальциевого ответа, вызванного активацией потенциал-зависимых кальциевых каналов (ПЗКК), в ответ на дофамин. Было показано, что добавление дофамина не влияет на амплитуду и характер кальциевых сигналов, возникающих под действием 35 мМ хлорида калия, активирующего ПЗКК (рис. 5а, 5б). Так, кальциевый сигнал в ответ на вторую добавку KCl составляет  $82 \pm 11\%$  относительно первой добавки, в присутствии дофамина это значение составляет  $80 \pm 10\%$ .

Таким образом, в работе было установлено, что при оценке амплитуд кальциевых сигналов в ответ на глутамат главной мишенью дофамина является NMDA-рецептор.

**Участие дофаминовых рецепторов.** Известно, что дофамин непосредственно подавляет активность NMDA-рецептора; его действие также может быть опосредовано активацией специфических дофаминовых рецепторов [4, 12].

Далее в работе мы проверили, способны ли антагонисты D1- и D2-подобных рецепторов предот-



**Рис. 2.** Влияние дофамина на амплитуду кальциевого сигнала в ответ на глутамат в нейронах. *а* – Повторяющиеся кальциевые сигналы в нейронах на кратковременные добавки 10 мкМ глутамата (синяя кривая) и влияние 50 мкМ дофамина на сигнал в клетках в ответ на добавку глутамата (красная кривая); нормировано относительно первой добавки глутамата. *б* – Кальциевый сигнал в ответ на 100 мкМ глутамата в присутствии (красная кривая) и в отсутствие дофамина (50 мкМ, синяя кривая); нормировано относительно ответа на глутамат. *в* – Амплитуда кальциевого сигнала в ответ на добавку глутамата 10 и 50–100 мкМ в отсутствие (–доф) и присутствии 50 мкМ дофамина (+доф). В случае действия 10 мкМ глутамата ответы на вторую добавку глутамата (Глутамат 2) представлены относительно ответов на первую добавку (Глутамат 1). В случае больших доз глутамата (50–100 мкМ) кальциевый ответ на глутамат совместно с дофамином (Глутамат+доф) представлен относительно ответа на глутамат без дофамина (Глутамат–доф). \*  $p < 0.05$ .

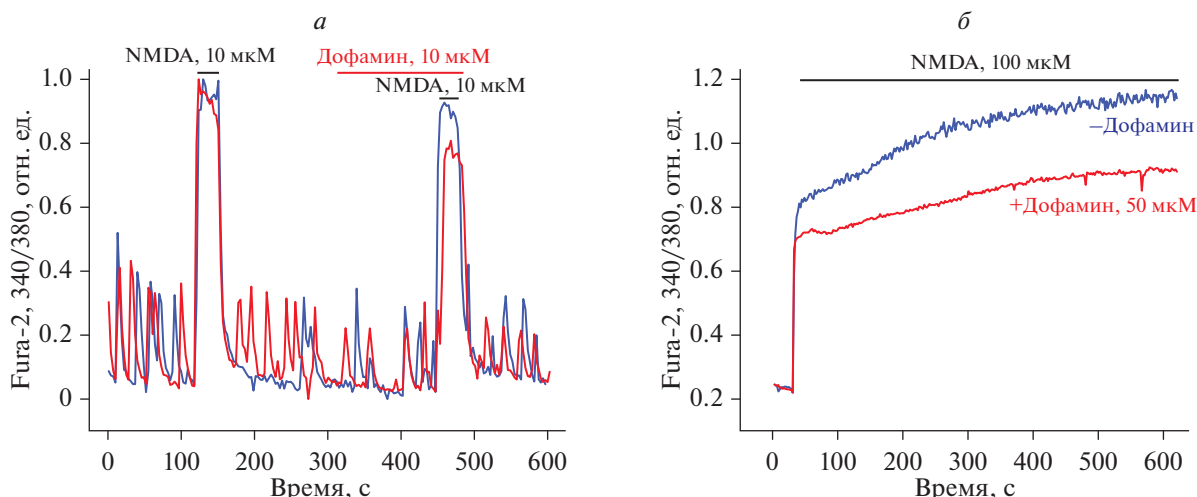
вращать эффект дофамина на NMDA-индуцированный кальциевый сигнал в нейронах. На рис. 6 показано, что эффект дофамина не предотвращается в присутствии блокатора дофаминовых рецепторов типа D1 SKF-83566 (50 мкМ), о чем свидетельствует понижение амплитуды кальциевого ответа при действии NMDA совместно с дофамином на фоне SKF-83566 ( $76 \pm 26\%$ , рис. 6а, 6в). Добавление агониста D1-рецептора SKF-38393 (50 мкМ) не приводит к значительному изменению кальциевого сигнала в ответ на NMDA ( $98 \pm 26\%$ , рис. 6а, 6в).

В случае действия ингибитора D2-рецептора L-741,626 (1 мкМ) не наблюдается эффект дофа-

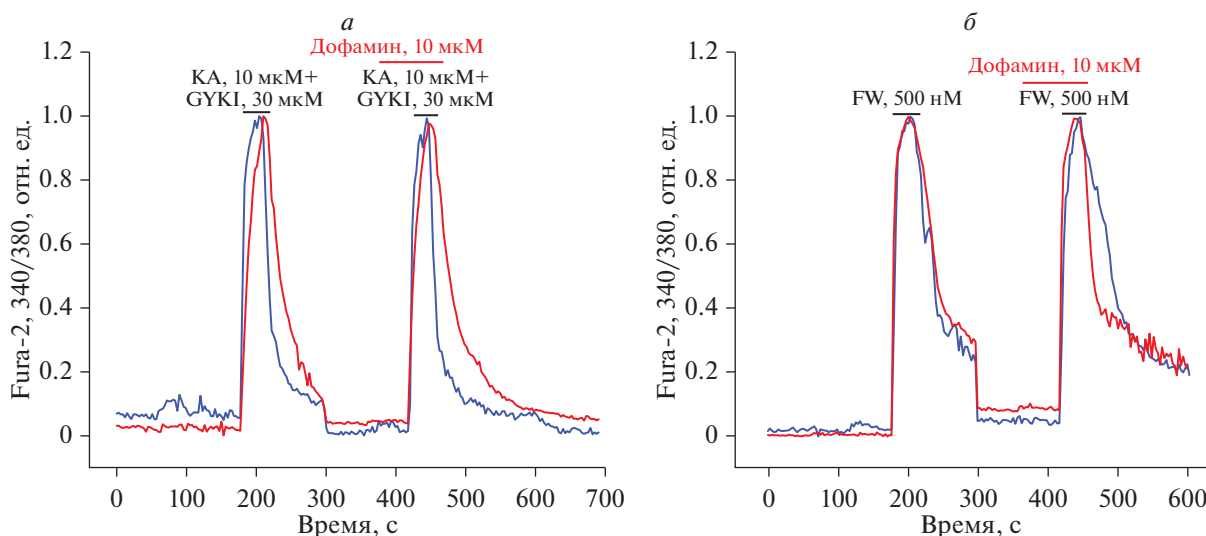
мина: кальциевый сигнал на вторую добавку NMDA составил  $100 \pm 28\%$  (рис. 6б, 6в), а добавление к клеткам агониста D2-рецептора Quinpirole (100 нМ) уменьшает кальциевый сигнал, вызванный NMDA ( $86 \pm 15\%$ , рис. 6б, 6в). Это говорит о том, что действие дофамина опосредовано активацией  $G_i$ -сопряженного рецептора D2.

Таким образом, стало понятно, что дофамин оказывает свое угнетающее действие на NMDA-рецептор через активацию D2-рецептора.

Ранее было показано, что эффект этого нейромедиатора может отменяться ингибиторами ГАМК<sub>A</sub>-рецепторов [13, 14]. В данной работе мы обнаружили, что 10 мкМ бикикулина (ингибито-



**Рис. 3.** Влияние дофамина на амплитуду кальциевого сигнала, вызванного NMDA в нейронах. *а* – Кальциевый сигнал в ответ на добавление 10 мкМ NMDA в отсутствие (синяя кривая) и в присутствии (красная кривая) 50 мкМ дофамина; нормировано относительно первой добавки NMDA. *б* – Кальциевый сигнал в ответ на добавление 100 мкМ NMDA в отсутствие (синяя кривая) и в присутствии (красная кривая) 50 мкМ дофамина.

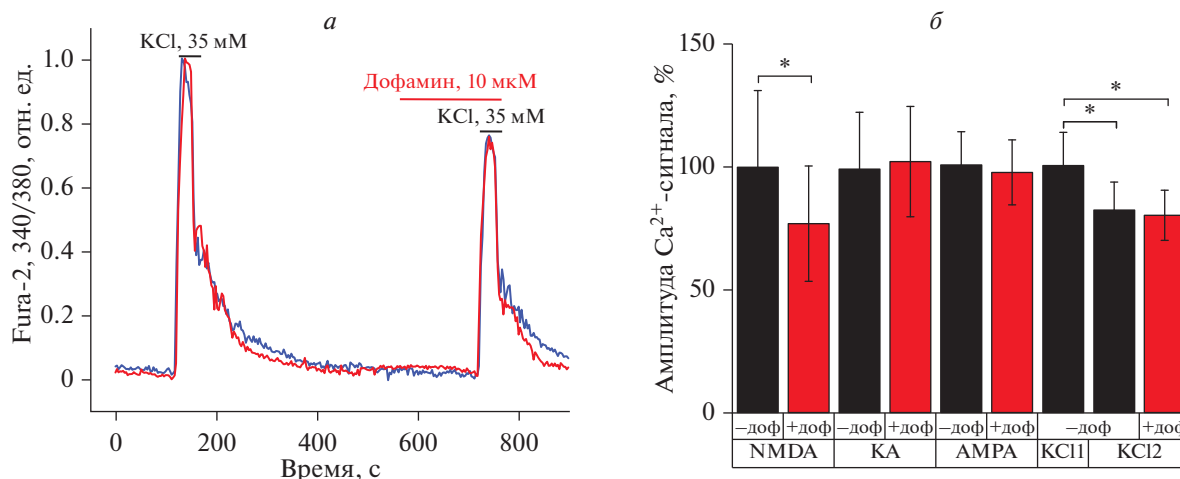


**Рис. 4.** Влияние дофамина на амплитуду кальциевого сигнала, вызванного активацией КА-и AMPA-рецепторов в нейронах. *а* – Кальциевый сигнал в ответ на добавление 10 мкМ каиновой кислоты (КА) совместно с 30 мкМ ГYKI в отсутствие (синяя кривая) и в присутствии (красная кривая) 50 мкМ дофамина; нормировано относительно первой добавки КА+ГYKI. *б* – Кальциевый сигнал в ответ на добавление 500 нМ фторвиллардина (FW) в отсутствие (синяя кривая) и в присутствии (красная кривая) 50 мкМ дофамина; нормировано относительно первой добавки FW.

ра ГАМК<sub>A</sub>-рецепторов) совместно с 10 мкМ дофамина не подавляют кальциевый сигнал в ответ на добавку NMDA (рис. 7).

**Дофамин защищает митохондрии от глутамат-индуцированной деполяризации.** Известно, что в основе токсического действия глутамата лежит увеличение уровня цитозольного кальция в нейронах, для которого характерна так называемая отложенная кальциевая дисрегуляция (ОКД), возникающая из-за подавления производства

АТФ в митохондриях и неспособности клеток поддерживать ионный гомеостаз. При этом характерным признаком является деполяризация митохондрий [2]. Мы проверили, влияет ли дофамин на глутамат-индуцированную деполяризацию митохондрий. Было показано, что в присутствии дофамина глутамат вызывает митохондриальную деполяризацию на  $15 \pm 7\%$  меньше, чем в контроле (рис. 8*а*, 8*б*). Так, в ответ на глутамат амплитуда изменения флуоресценции Rhodamine



**Рис. 5.** Влияние дофамина на амплитуду кальциевого сигнала, вызванного агонистами глутаматных рецепторов и KCl. *а* – Кальциевый сигнал в ответ на добавление 35 мМ KCl в отсутствие (синяя кривая) и в присутствии (красная кривая) 50 мкМ дофамина; нормировано относительно первой добавки KCl. *б* – Амплитуда кальциевых сигналов в ответ на добавки NMDA, KA, AMPA и KCl в отсутствие (черные столбцы, –доф) и в присутствии (красные столбцы) 50 мкМ дофамина (+доф) относительно первой добавки на агонист, KCl1 – первая добавка KCl, KCl2 – вторая добавка KCl, \*  $p < 0.05$ .

123 (Rh123) составила  $0.40 \pm 0.12$ , тогда как при предварительной обработке дофамином это значение было  $0.35 \pm 0.11$  (данные нормированы относительно сигнала в ответ на 2 мкМ FCCP, который вызывает полную деполяризацию митохондрий).

**Дофамин подавляет глутаматную эксайтотоксичность.** Для того чтобы подтвердить защитную роль дофамина в условиях действия токсических доз глутамата, мы провели эксперименты по исследованию выживаемости нейронов. Было показано, что глутамат в концентрации 100 мкМ вызывает гибель  $30.0 \pm 1.7\%$  нейронов в культуре при 24-часовом воздействии, что значительно превосходит данный показатель в контроле (клетки без воздействия –  $18.1 \pm 1.6\%$ ) (рис. 9). В случае, если в среде инкубации присутствует дофамин в концентрации 10 мкМ, количество поврежденных нейронов через 24 ч уменьшается на 53%. Так, этот показатель при совместном воздействии глутамата и дофамина составил  $14.2 \pm 1.6\%$ . Инкубация с дофамином значимо не влияла на количество поврежденных клеток относительно контроля ( $17.1 \pm 1.7\%$ ).

Таким образом, дофамин уменьшает глутамат-индуцированную деполяризацию митохондрий и улучшает жизнеспособность клеток в культуре, оказывая тем самым нейропротекторное действие на клетки.

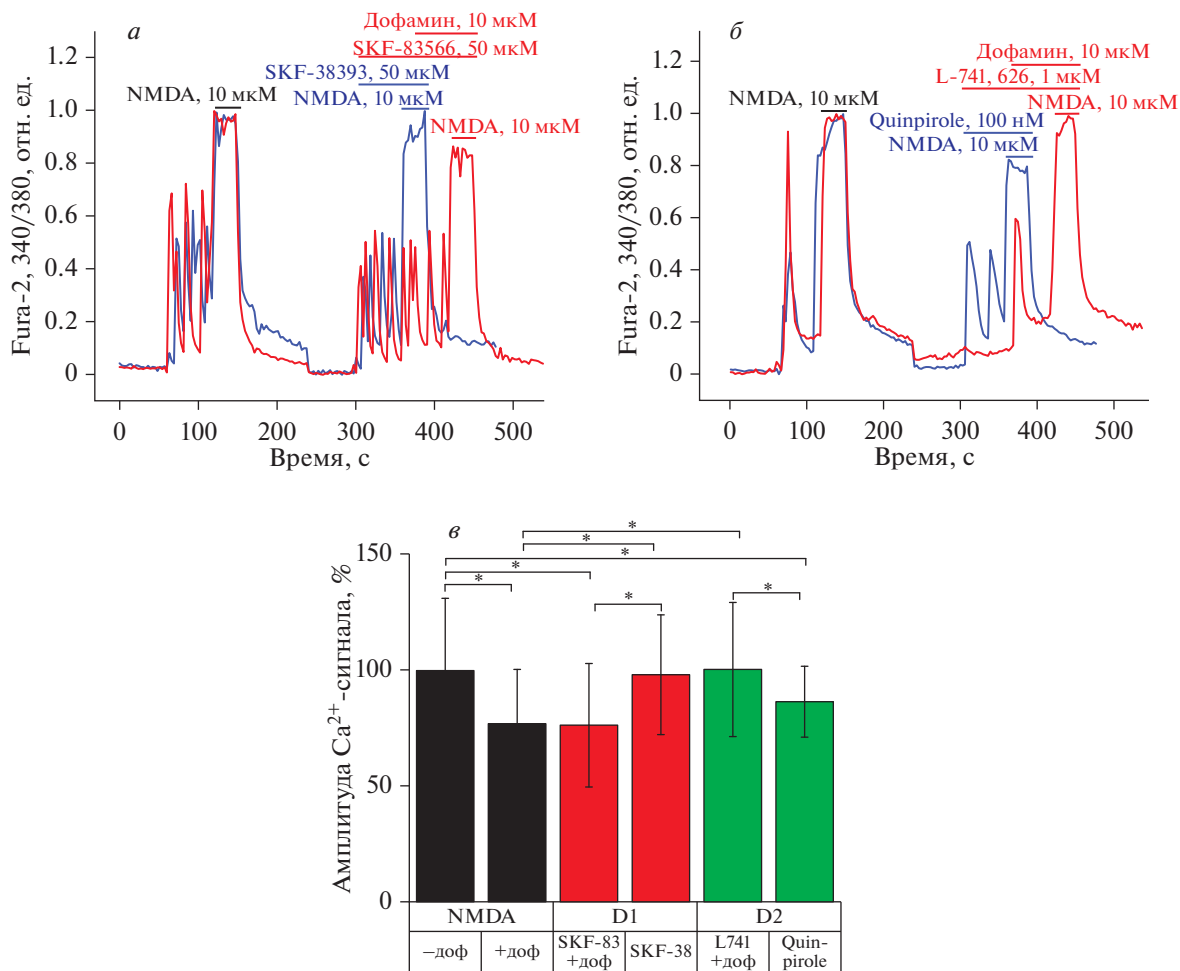
## ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

В данной работе с использованием методов флуоресцентной микроскопии и ингибиторного

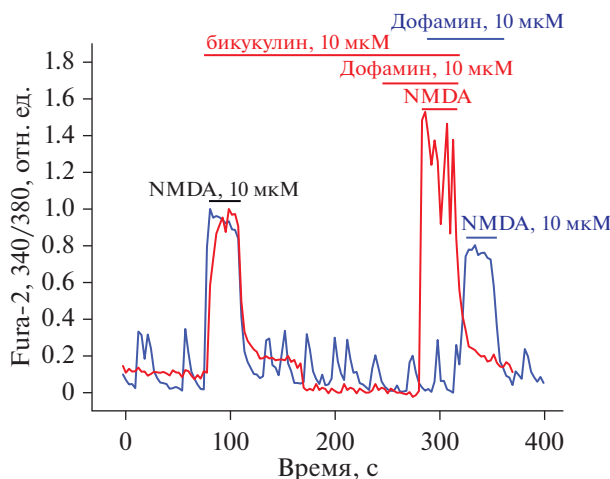
анализа показано, что дофамин способен проявлять нейропротекторные свойства против глутаматной токсичности на примере культуры нейронов гиппокампа. В частности, дофамин в концентрации 10 мкМ снижает амплитуду кальциевого ответа на глутамат, в первую очередь, за счет подавления активности NMDA-рецептора – одного из подтипов ионотропных рецепторов глутамата. Кроме того, дофамин препятствует развитию глутамат-индуцированной деполяризации митохондрий нейронов и увеличивает выживаемость нейронов в присутствии токсических доз глутамата. Этот эффект глутамата зависит от активности D2-рецепторов, но не зависит от D1-рецепторов дофамина. Также показано, что эффект дофамина на глутамат-индуцированные изменения исследованных клеточных параметров во многом определяется активацией ГАМКергической системы, поскольку эффект дофамина также зависит и от активности ГАМК<sub>A</sub>-рецептора [14]. Было показано, что исследуемый эффект дофамина чувствителен к антагонисту ГАМК<sub>A</sub>-рецептора – бикикулину, поскольку присутствие в среде инкубации 10 мкМ бикикулина полностью подавляет действие дофамина на NMDA-индуцированный кальциевый сигнал.

Можно предположить несколько возможных механизмов, через которые дофамин реализует свой защитный эффект.

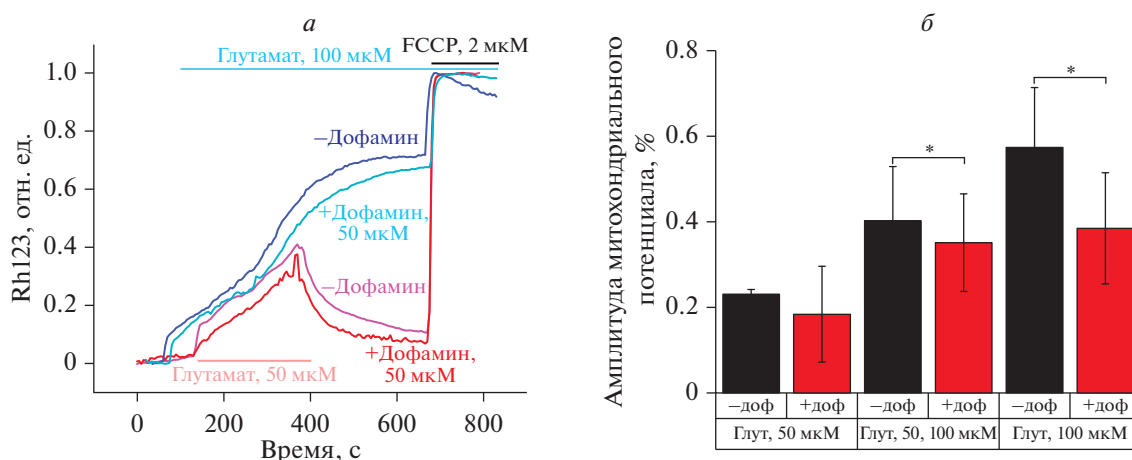
Во-первых, действие дофамина может проявляться за счет непосредственного взаимодействия с каналом NMDA-рецептора. В работах показано, что лиганды дофаминовых рецепторов, в том числе и сам дофамин, а также другие моно-



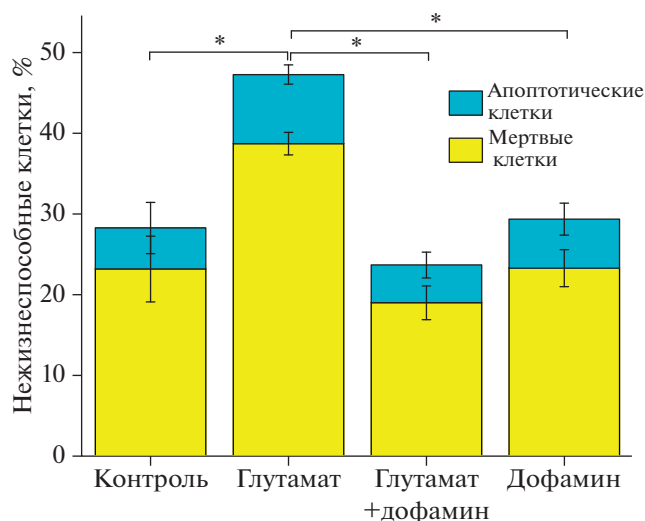
**Рис. 6.** Влияние агонистов и антагонистов D1- и D2-рецепторов на кальциевый ответ, вызванный NMDA. *а* – Кальциевый сигнал в ответ на 10 мкМ NMDA в присутствии 50 мкМ агониста D1-рецептора SKF-38393 (синяя кривая) и 50 мкМ блокатора D1-рецептора SKF-83588 совместно с дофамином (красная кривая); нормировано относительно первой добавки NMDA. *б* – Кальциевый сигнал в ответ на 10 мкМ NMDA в присутствии 100 нМ агониста D2-рецептора Quinpirole (красная кривая) и 1 мкМ блокатора D2-рецептора L-741,626 совместно с дофамином (синяя кривая); нормировано относительно первой добавки NMDA. *в* – Амплитуды кальциевых ответов, вызванных NMDA, в присутствии активаторов D1- и D2-рецепторов и их блокаторов совместно с дофамином (+доф) относительно первой добавки NMDA (100%). \*  $p < 0.05$ .



**Рис. 7.** Влияние активности ГАМК<sub>A</sub>-рецепторов на кальциевый ответ, вызванный NMDA. Кальциевый сигнал в ответ на 10 мкМ NMDA в присутствии 10 мкМ ингибитора ГАМК<sub>A</sub>-рецепторов бикукулина совместно с 10 мкМ дофamina (красная кривая) и в отсутствие бикукулина, но с дофамином (синяя кривая); нормировано относительно первой добавки NMDA.



**Рис. 8.** Влияние дофамина на глутамат-индуцированную деполаризацию митохондрий в нейронах гиппокампа крысы. *а* – Изменение флуоресценции родамина 123 (Rh123), вызванное 50 и 100 мкМ глутамата в присутствии (голубая и красная кривые) и в отсутствие (синяя и розовая кривые) 50 мкМ дофамина; нормировано относительно FССР. *б* – Амплитуда изменения митохондриального потенциала, вызванного кратковременной добавкой 50 и 100 мкМ глутамата (Глут, 50 мкМ и 100 мкМ) в отсутствие (черные столбцы, –доф) и в присутствии (красные столбцы) 50 мкМ дофамина (+доф), представленные данные соответствуют схеме эксперимента с отмывкой глутамата (*а* – красная и розовая кривые). \*  $p < 0.05$ .



**Рис. 9.** Влияние дофамина на выживаемость нейронов в нейроглиальной культуре гиппокампа крысы. Степень поврежденных клеток: мертвых (желтый) и апоптотических (голубой), относительно общего количества клеток в поле зрения (%) после 24 ч инкубации с 100 мкМ глутамата, 10 мкМ дофамина и с глутаматом и дофамином вместе. \*  $p < 0.05$  при сравнении всех нежизнеспособных клеток (мертвые + апоптотические).

амины, могут взаимодействовать с NMDA-рецептором, выступая как потенциал-зависимые блокаторы открытого состояния канала и имея сайт связывания внутри поры NMDA-рецептора [15, 16].

Во-вторых, дофамин через рецептор вызывает гиперполяризацию нейронов. Еще в 1986 году на нейронах прилежащего ядра (*nucleus accumbens*) было показано, что дофамин способен вызывать D1-рецептор-зависимую гиперполяризацию в большинстве нейронов; кроме того, наблюдали деполаризацию, опосредованную активацией D2-

рецепторов [17]. Наши эксперименты помогают расширить представления о механизмах этого взаимодействия нейротрансмиттеров. Так, одной из мишеней дофамина является именно D2-рецептор. Однако при блокировании двух типов рецепторов (D1- и D2-рецепторов) мы не видели отмену действия дофамина. Возможно, это связано с тем, что этот эффект опосредован не только этими типами рецепторов.

Также известно, что дофамин может влиять на AMPA-рецепторы, но это происходит на уровне модуляции их экстернализации. В этом случае до-

фамины активирует включение субъединиц GluR1 в плазматическую мембрану нейронов D1-рецептор-зависимым образом [18, 19]. Полученные нами данные о действии дофамина на кальциевые сигналы в ответ на активацию КА- и NMDA-рецепторов находятся в некотором противоречии с данными авторов [20]. В указанной работе было продемонстрировано, что хотя дофамин и защищает клетки от каинат-индуцированной нейротоксичности, но в этом эффекте не задействованы механизмы, связанные с модуляцией кальциевого гомеостаза. Более того, активность NMDA-рецептора вообще не регулировалась дофамином. В отличие от этого, мы обнаружили, что эффект дофамина связан с NMDA-рецептором, тогда как на кальциевый ответ при активации КА-рецептора дофамин не оказывал влияния.

### ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В работе показано, что дофамин обладает нейрорепротекторным действием против глутаматной нейротоксичности, поскольку добавление дофамина к культуре клеток гиппокампа снижает кальциевый ответ и митохондриальную деполяризацию, вызванные добавлением глутамата, и увеличивает количество жизнеспособных клеток после воздействия глутаматом. Мы также обнаружили, что дофамин, действуя через D2-подобные рецепторы, способен активировать NMDA-рецепторы и влиять на работу ГАМКергической системы.

**Конфликт интересов.** Авторы декларируют отсутствие явных и потенциальных конфликтов интересов, связанных с публикацией настоящей статьи.

**Источники финансирования.** Работа выполнена при поддержке Российского научного фонда (проект № 22-24-01043).

**Соответствие принципам этики.** Работу с лабораторными животными проводили в соответствии с положениями “Европейской конвенции о защите позвоночных животных, используемых для эксперимента и других научных целей” и “Руководством по работе с лабораторными животными ИБК РАН № 57 от 30.12.2011”.

### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Winklhofer K.F., Haass C. 2010. Mitochondrial dysfunction in Parkinson's disease. *Biochim. Biophys. Acta.* 1802 (1), 29–44. <https://doi.org/10.1016/j.bbadis.2009.08.013>
2. Khodorov B. 2004. Glutamate-induced deregulation of calcium homeostasis and mitochondrial dysfunction in mammalian central neurones. *Biophys. Mol. Biol.* 86 (2), 279–351. <https://doi.org/10.1016/j.pbiomolbio.2003.10.002>
3. Meldrum B.S. 2000. Glutamate as a neurotransmitter in the brain: Review of physiology and pathology. *J. Nutr.* 130 (4S), 1007S–15S. <https://doi.org/10.1093/jn/130.4.1007S>
4. Gasiorowska A., Wydrych M., Drapich P., Zdrozny M., Steczkowska M., Niewiadomski W., Niewiadomska G. 2021. The biology and pathobiology of glutamatergic, cholinergic, and dopaminergic signaling in the aging brain. *Front Aging Neurosci.* 13, 654931. <https://doi.org/10.3389/fnagi.2021.654931>
5. Wang M., Wong A.H., Liu F. 2012. Interactions between NMDA and dopamine receptors: A potential therapeutic target. *Brain Research.* 1476, 154–163. <https://doi.org/10.1016/j.brainres.2012.03.029>
6. Бережнов А.В., Кононов А.В., Федотова Е.И., Зинченко В.П. 2011. Способ выявления и характеристики лигандов ГАМК(А)-рецепторов с помощью кальций-чувствительных флуоресцентных зондов. *Биофизика.* 56 (4), 673–683.
7. Grynkiewicz G., Poenie M., Tsien R.Y. 1985. A new generation of Ca<sup>2+</sup> indicators with greatly improved fluorescence properties. *J. Biol. Chem.* 260 (6), 3440–3450.
8. Бережнов А.В., Кононов А.В., Федотова Е.И., Зинченко В.П. 2013. Применение системы анализа изображения для характеристики лигандов ионотропных глутаматных рецепторов в культуре нейронов. *Биол. мембраны.* 30 (3), 179–188.
9. Kahlert S., Zündorf G., Reiser G. 2008. Detection of de- and hyperpolarization of mitochondria of cultured astrocytes and neurons by the cationic fluorescent dye rhodamine 123. *J. Neurosci. Methods.* 171 (1), 87–92. <https://doi.org/10.1016/j.jneumeth.2008.02.0157>
10. Vaarmann A., Kovac S., Holmström K.M., Gandhi S., Abramov A.Y. 2013. Dopamine protects neurons against glutamate-induced excitotoxicity. *Cell Death Dis.* 4 (1), e455. <https://doi.org/10.1038/cddis.2012.194.9>
11. Ferreira I.L., Duarte C.B., Carvalho A.P. 1996. Ca<sup>2+</sup> influx through glutamate receptor-associated channels in retina cells correlates with neuronal cell death. *Eur. J. Pharmacol.* 302 (1–3), 153–162. [https://doi.org/10.1016/0014-2999\(96\)00044-1](https://doi.org/10.1016/0014-2999(96)00044-1)
12. Castro N.G., de Mello M.C., de Mello F.G., Aracava Y. 1999. Direct inhibition of the N-methyl-D-aspartate receptor channel by dopamine and (+)-SKF38393. *Br. J. Pharmacol.* 126 (8), 1847–1855. <https://doi.org/10.1038/sj.bjp.0702479>
13. Lau C.G., Takeuchi K., Rodenas-Ruano A., Takayasu Y., Murphy J., Bennett M.V., Zukin R.S. 2009. Regulation of NMDA receptor Ca<sup>2+</sup> signalling and synaptic plasticity. *Biochem. Soc. Trans.* 37 (Pt 6), 1369–1374. <https://doi.org/10.1042/BST0371369>
14. Berezhnov A.V., Fedotova E.I., Sergeev A.I., Teplov I.Y., Abramov A.Y. 2021. Dopamine controls neuronal spontaneous calcium oscillations via astrocytic signal. *Cell Calcium.* 94, 102359. <https://doi.org/10.1016/j.ceca.2021.102359>
15. Cui C., Xu M., Atzori M. 2006. Voltage-dependent block of N-methyl-D-aspartate receptors by dopamine D1 receptor ligands. *Mol. Pharmacol.* 70 (5), 1761–1770. <https://doi.org/10.1124/mol.106.028332>

16. Masuko T., Suzuki I., Kizawa Y., Kusama-Eguchi K., Watanabe K., Kashiwagi K., Igarashi K., Kusama T. 2004. Monoamines directly inhibit N-methyl-D-aspartate receptors expressed in *Xenopus* oocytes in a voltage-dependent manner. *Neurosci Lett.* **371** (1), 30–33. <https://doi.org/10.1016/j.neulet.2004.08.030>
17. Uchimura N., Higashi H., Nishi S. 1986. Hyperpolarizing and depolarizing actions of dopamine via D-1 and D-2 receptors on nucleus accumbens neurons. *Brain Res.* **375** (2), 368–372. [https://doi.org/10.1016/0006-8993\(86\)90760-2](https://doi.org/10.1016/0006-8993(86)90760-2)
18. Mangiavacchi S., Wolf M.E. 2004. D1 dopamine receptor stimulation increases the rate of AMPA receptor insertion onto the surface of cultured nucleus accumbens neurons through a pathway dependent on protein kinase A. *J. Neurochem.* **88** (5), 1261–1271. <https://doi.org/10.1046/j.1471-4159.2003.02248.x>
19. Sun X., Zhao Y., Wolf M.E. 2005. Dopamine receptor stimulation modulates AMPA receptor synaptic insertion in prefrontal cortex neurons. *J. Neurosci.* **25** (32), 7342–7351. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.4603-04.2005>
20. Amano T., Ujihara H., Matsubayashi H., Sasa M., Yokota T., Tamura Y., Akaike A. 1994. Dopamine-induced protection of striatal neurons against kainate receptor-mediated glutamate cytotoxicity in vitro. *Brain Res.* **655** (1–2), 61–69. [https://doi.org/10.1016/0006-8993\(94\)91597-0](https://doi.org/10.1016/0006-8993(94)91597-0)

## Dopamine Protects Neurons against Glutamate-Induced Excitotoxicity

E. I. Fedotova<sup>1, \*</sup>, A. Y. Abramov<sup>2, 3</sup>, A. V. Berezhnov<sup>1, \*\*</sup>

<sup>1</sup>*Institute of Cell Biophysics of the Russian Academy of Sciences, Pushchino, Moscow oblast, 142290 Russia*

<sup>2</sup>*Department of Clinical and Movement Neurosciences, UCL Queen Square Institute of Neurology, London, WC1N 3BG UK*

<sup>3</sup>*Cell Physiology and Pathology Laboratory, Orel State University, Orel, 302026 Russia*

\*e-mail: [delf-fenka@rambler.ru](mailto:delf-fenka@rambler.ru)

\*\*e-mail: [g\\_56@rambler.ru](mailto:g_56@rambler.ru)

Parkinson's disease is associated with neuronal loss in the midbrain and the resulting development of dopamine-deficient states. At the later stages of the disease, increased neuronal death is also observed in other parts of the brain. We hypothesized that dopamine may function as a glutamate antagonist, and dopamine deficiency may increase glutamate-induced excitotoxicity. Using rat hippocampal primary culture and fluorescence microscopy, we show that dopamine reduces the amplitude of calcium response evoked by the activation of NMDA receptors but does not affect calcium signals mediated by AMPA and KA receptors. Voltage-gated calcium channels are also unaffected by dopamine. It was shown that the effect of dopamine depends not only on NMDA receptors, but also on D2-type dopamine receptors and on the GABAA receptor. Dopamine reduced glutamate-induced mitochondrial depolarization and improved neuronal survival in the presence of toxic levels of glutamate. The data presented suggest a protective role of dopamine against glutamate toxicity.

**Keywords:** dopamine, glutamate, calcium, excitotoxicity, ionotropic glutamate receptors, neuroprotection



УДК 57.085.23,616.155.392.8

## МИЕЛОИДНАЯ ДИФФЕРЕНЦИРОВКА ПОВЫШАЕТ УСТОЙЧИВОСТЬ ЛЕЙКОЗНЫХ КЛЕТОК К TRAIL-ИНДУЦИРОВАННОЙ ГИБЕЛИ ПУТЕМ СНИЖЕНИЯ ЭКСПРЕССИИ РЕЦЕПТОРОВ DR4 И DR5

© 2022 г. Я. В. Ломовская<sup>a, \*</sup>, М. И. Кобякова<sup>a</sup>, А. С. Сенотов<sup>a</sup>, И. С. Фадеева<sup>a, b</sup>, А. И. Ломовский<sup>a</sup>, К. С. Краснов<sup>a, b</sup>, Д. Ю. Штатнова<sup>a, b</sup>, В. С. Акатов<sup>a, b</sup>, Р. С. Фадеев<sup>a, b</sup>

<sup>a</sup>Институт теоретической и экспериментальной биофизики РАН,  
Пушино, Московская обл., 142290 Россия

<sup>b</sup>Пушинский государственный естественно-научный институт,  
Пушино, Московская обл., 142290 Россия

\*e-mail: yannalomovskaya@gmail.com

Поступила в редакцию 18.04.2022 г.

После доработки 20.06.2022 г.

Принята к публикации 22.06.2022 г.

Изучение механизмов устойчивости опухолевых клеток к TRAIL-индуцированной гибели остается актуальной задачей, так как данный цитокин является важным высокоизбирательным молекулярным эффектором противоопухолевого иммунитета. В нашей работе показано, что у клеток лейкоза человека THP-1, HL-60 и K562 индукция экзогенными факторами миелоидной дифференцировки *in vitro* во всех направлениях миелопоэза, кроме эритроидоподобного, повышает устойчивость к TRAIL-индуцированной гибели, снижая экспрессию рецепторов DR4 и DR5 на клеточной поверхности. Было установлено также, что ONC201, туникамицин и SAHA (субериоиланилид гидроксамовой кислоты), способные вызывать повышение экспрессии DR5 у лейкозных клеток, подавляли их TRAIL-резистентность, индуцированную факторами дифференцировки. Полученные результаты представляют интерес для разработки препаратов и стратегий для повышения эффективности лечения миелоидных лейкозов.

**Ключевые слова:** лейкозные клетки, цитокин TRAIL, клеточная гибель, миелоидная дифференцировка, резистентность

DOI: 10.31857/S023347552206010X

### ВВЕДЕНИЕ

Цитокин TRAIL/Apo2L является важным молекулярным эффектором противоопухолевого иммунитета благодаря его высокоизбирательной способности индуцировать рецептор-опосредованную апоптотическую гибель опухолевых, но не здоровых клеток организма [1–6]. Однако возникновение TRAIL резистентности у части опухолевых клеток ограничивает потенциал противоопухолевого иммунитета и возможность использования этого цитокина в терапии злокачественных заболеваний [7, 8]. Формирование устойчивости у лейкозных клеток к противоопухолевому иммунитету, опосредованному действием TRAIL, может являться одной из основных причин прогрессии миелоидных лейкозов [8–11]. Поэтому на сегодняшний день актуальным является изучение механизмов, опосредующих снижение чувствительности лейкозных клеток к TRAIL-индуцированной гибели.

Ранее нами было показано, что лейкозные клетки в высокоплотных культурах, которые могут отражать условия клеточного микроокружения в нишах костного мозга, способны приобретать резистентность к TRAIL-индуцированной гибели на фоне формирования у них признаков, характерных для воспалительной активации [12] или макрофагоподобного фенотипа [13]. В то же время появление признаков дифференцировки у лейкозных клеток под воздействием экзогенных стимулов соотносится с формированием у них резистентности к TRAIL-опосредованному апоптозу [14, 15]. Это важно учитывать при использовании стратегий дифференцирующей терапии, так как обнаружено участие дифференцированных лейкозных клеток в рецидиве заболевания [16–18]. Кроме того, показана возможность возникновения устойчивости и рецидива миелоидного лейкоза, обусловленная формированием злокачественных высокодифференцированных опухолевых клонов, в том числе под воздействием используе-

мых в клинике химиопрепаратов [19–21]. Исходя из вышесказанного, можно предположить, что в условиях *in vivo* стрессовое микроокружение клеток в опухолях и/или действие на них противоопухолевых агентов различной природы может способствовать приобретению лейкозными клетками признаков дифференцировки, что сопряжено с усилением защиты лейкозных клеток от иммунной системы и с опухолевой прогрессией.

В данной работе мы исследовали влияние индукции дифференцировки лейкозных клеток линий THP-1, HL-60 и K562 в разных направлениях миелопоэза на их чувствительность к TRAIL-индуцированной гибели. В работе показано, что индукция моноцитарной, макрофагальной, гранулоцитарной, мегакариоцитарной, но не эритроидоподобной дифференцировки лейкозных клеток *in vitro* повышает их устойчивость к цитотоксическому действию лиганда TRAIL. Представлены данные об изменении экспрессии рецепторов DR4 и DR5 у лейкозных клеток в процессе миелоидной дифференцировки. Показана возможность подавления TRAIL-резистентности дифференцированных лейкозных клеток с помощью индукторов стресса эндоплазматического ретикула (ЭПР-стресса).

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

**Клеточные культуры.** В работе использовали клетки миелоидного лейкоза человека THP-1, HL-60, K562, полученные из ATCC (США). Клетки культивировали в среде RPMI 1640/F12 (Sigma, США) с добавлением 10% эмбриональной телячьей сыворотки (FBS) (Gibco, США), 80 мкг/мл гентамицина сульфата (Sigma), 20 мкг/мл дифлюкана (Pfizer, США) при 37°C, в условиях 5% содержания CO<sub>2</sub> в воздухе. Для индукции моноцитарной дифференцировки клетки THP-1 инкубировали с 1 мкМ транс-ретиноевой кислоты (ATRA) (Sigma) в течение 96 ч [22]. Для индукции макрофагальной дифференцировки клетки THP-1 инкубировали с 200 нМ форболового эфира (PMA) (Sigma) в течение 96 ч [23, 24]. Для индукции гранулоцитарной дифференцировки клетки HL-60 инкубировали с 1 мкМ ATRA в течение 96 ч, а также с 1.25% диметилсульфоксида (DMSO) (Sigma) в культуральной среде в течение 96 ч [25–27]. Для индукции мегакариоцитарной дифференцировки клетки K562 инкубировали с 10 нМ PMA в течение 96 ч [28–31]. Для индукции эритроидоподобной дифференцировки клетки K562 инкубировали с 1 мМ бутирата натрия (SB) в течение 168 ч, а также с 50 мкМ гемина (Hem) (Sigma) в течение 96 ч [32–35].

Тестирование клеточных культур на заражение микоплазмой проводили с помощью набора MycoFluor Mycoplasma Detection Kit (ThermoFisher

Scientific, США). Заражение культур клеток микоплазмой не выявлено.

Моноциты были получены из мононуклеарной фракции периферической крови здоровых доноров с использованием набора MojoSort Human Pan Monocyte Isolation Kit (BioLegend, США) в соответствии с рекомендациями производителя. Макрофаги получали из моноцитов периферической крови человека. Для этого моноциты культивировали в среде DMEM/F12 с добавлением 10% FBS, 40 мкг/мл гентамицина при 37°C, в условиях 5% содержания CO<sub>2</sub> в увлажненном воздухе. Культуральную среду заменяли на свежую через 3 дня после посева клеток с добавлением 2% FBS. Через 14 дней культивирования моноциты поляризовались в макрофаги, и их использовали в экспериментах. Коктейль ферментов Accutase (Sigma) применяли для отделения макрофагов от поверхности культурального пластика.

Гранулоциты были получены путем центрифугирования гепаринизированной периферической крови человека в градиенте плотности с использованием Ficoll-Paque PREMIUM 1.084 (Sigma), 1600g в течение 20 мин. После центрифугирования для выделения гранулоцитов из смеси с эритроцитами применялся буфер хлорида аммония для лизиса эритроцитов (0.155 мМ хлорид аммония; 10 мМ гидрокарбонат калия, 0.1 мМ EDTA с pH 7.4). Гранулоциты культивировали в полной ростовой среде RPMI/F12 с 10% FBS с добавлением антибиотиков при 37°C в условиях 5% содержания CO<sub>2</sub> в увлажненном воздухе.

Эритроциты и тромбоциты получали путем центрифугирования гепаринизированной периферической крови человека при 250g в течение 15 мин. Эритроциты отбирали из слоя осажденных эритроцитов, добавляли полную ростовую среду RPMI/F12 с 10% FBS и использовали в последующих экспериментах. Тромбоциты выделяли из слоя плазмы, образовавшегося после центрифугирования. Плазму разбавляли в соотношении 1 : 8 с фосфатно-солевым буфером (PBS) и центрифугировали 10 мин при 1200g [36]. Осадок тромбоцитов собирали в среду RPMI/F12 с 10% FBS и использовали в дальнейших экспериментах.

**Протокол получения белка izTRAIL.** Для получения растворимой тримерной формы белка izTRAIL был синтезирован мотив изолейциновой “молнии” и ген izTRAIL, которые были клонированы в плазмидный вектор pET101 (Novagen, США). Полученным вектором трансформировали клетки *E. coli* BL21 (DE3) и методом микробного синтеза с последующей очисткой металл-аффинной хроматографией получили тримерную форму izTRAIL с молекулярной массой около 80 кДа [6].

**Имунофенотипирование и анализ экспрессии рецепторов к TRAIL.** Для изучения экспрессии кластеров дифференцировки (CD) клетки соби-

рали из культуральных флаконов, отмывали в буфере для окрашивания клеток (BioLegend) путем центрифугирования при 300g 5 мин. Окрашивание проводили с использованием панели моноклональных антител (BioLegend): APC anti-human CD11b, FITC anti-human CD11c, anti-human CD14, PE anti-human CD36, FITC anti-human CD45, FITC anti-human CD163, FITC anti-human CD68, FITC anti-human CD66, PE anti-human CD284, PE anti-human CD68, PE anti-human CD41, PE anti-human CD61, PE anti-human CD235a, APC anti-human CD71, PE anti-human HLA-DR. Для анализа экспрессии TRAIL-рецепторов использовали: PE anti-human TRAIL-R1 (CD261) (BD Bioscience, США), APC anti-human CD262 (TRAIL-R2) (BioLegend), FITC Anti-human CD263 (TRAIL-R3) (BD Bioscience), PE anti-human CD264 (TRAIL-R4) (BioLegend). Для определения неспецифического связывания клетки окрашивали контрольными антителами изотипа: APC Mouse IgG1 k isotype Ctrl, FITC Mouse IgG1 k isotype Ctrl, PE Mouse IgG1 k isotype, PE Mouse IgG2a k isotype, APC Mouse IgG2a k isotype, полученными от BioLegend. Окрашивание проводили при комнатной температуре в темноте в течение 30 мин. После окрашивания клетки фиксировали 2% раствором параформальдегида. Анализ экспрессии CD проводили с помощью проточного цитометра BD Accuri C6 (BD Biosciences). Гистограммы экспрессии поверхностных маркеров формировали с помощью программы FlowJo v10 (BD Biosciences).

**Анализ фагоцитарной активности и ДНК цитометрия.** Фагоцитарную активность оценивали через 2 ч инкубации клеток в ростовой среде с добавлением 1 мг/мл pHrodo Green *Escherichia coli* (ThermoFisher Scientific). Для контроля неспецифического окрашивания клетки инкубировали с 10 мкг/мл цитохалазина D (Sigma) в течение 30 мин в CO<sub>2</sub>-инкубаторе, затем добавляли 1 мкг/мл pHrodo Green *E. coli* и продолжали инкубацию еще 2 ч. Флуоресценцию измеряли с помощью проточного цитометра BD Accuri C6. Распределение по фазам клеточного цикла оценивали с помощью анализа содержания ДНК на проточном цитометре. Для оценки содержания клеточной ДНК клетки суспендировали в PBS, фиксировали 70% этанолом и окрашивали 1 мкг/мл йодида пропидия (Sigma). Клеточный цикл анализировали с использованием программного обеспечения ModFit LT 4.1 (Verity Software House, США).

**Анализ окислительной активности и продукции гемоглобина.** Индуцируемую и конститутивную внутриклеточную окислительную активность оценивали с использованием зонда DCFH-DA (возбуждение: 485 нм, эмиссия: 530 нм). В начале клетки нагружали флуоресцентным зондом путем инкубирования в ростовой среде с 10 мкМ DCFH-DA в течение 15 мин. Далее для оценки индуци-

бельной окислительной активности часть клеток после нагрузки отмывали в холодном PBS и инкубировали в свежей среде с 500 нМ PMA в течение 30 мин. Параллельно для оценки конститутивной продукции АФК часть клеток после нагрузки отмывали в холодном PBS и инкубировали в отсутствие PMA в течение 30 мин. Затем клетки повторно отмывали в PBS и анализировали флуоресценцию с помощью проточного цитометра BD Accuri C6. Измерение гемоглобина в клетках K562 проводили по методике, описанной в статье [32]. Равные количества клеток промывали холодным PBS и лизировали в течение 20 мин в лизирующем буфере (0.2% Triton X-100 (Sigma) в PBS). Лизаты центрифугировали 15 мин при 1500g, 10 мкл супернатанта инкубировали с 2 мл раствора ТМБ (3,3',5,5'-тетраметилбензидин (Sigma-Aldrich, США); 5 мг/мл в ледяной уксусной кислоте) и с 2 мл 30% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> в течение 10 мин при комнатной температуре. Реакцию останавливали добавлением раствора 0.16 М серной кислоты. Адсорбцию измеряли при 450 нм с использованием планшетного спектрофлуориметра Infinite F200 (Tecan, Австрия). Содержание гемоглобина в пг на клетку рассчитывали по стандартной кривой гемоглобина и данные отображали как кратное увеличение по сравнению с уровнем гемоглобина в контрольных клетках K562.

**Анализ цитотоксичности izTRAIL.** Клетки высевали в 96-луночные планшеты в количестве  $5 \times 10^3$  клеток в 0.1 мл питательной среды на лунку. Препараты (izTRAIL, ONC201, SAHA (субероиланилидом гидроксамовой кислоты) и туникамицин) добавляли в культуры через 24 ч после посева клеток. Цитотоксичность препаратов и их сочетаний оценивали по соотношению количества живых клеток в опытной и контрольной (без препаратов) культурах через 24 ч после добавления препаратов. Количество живых клеток оценивали по восстановлению резазурина. Клеточные культуры инкубировали с резазурином (30 мкг/мл) в течение 4 ч при 37°C и 5% CO<sub>2</sub>, а затем измеряли интенсивность флуоресценции инкубационной среды при длине волны возбуждения 532 нм и поглощения 590 нм, используя планшетный спектрофлуориметр Infinity F200.

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

**Таблица 1.** Процент клеток, несущих CD-маркеры моноцитарно-макрофагальной дифференцировки, в культурах клеток THP-1 ATRA, THP-1PMA, THP-1, у моноцитов и макрофагов

CD	THP-1	THP-1ATRA	THP-1PMA	Моноциты	Макрофаги
Интегрин $\alpha$ M (CD11b)	—	<b>88 ± 1</b>	—	93 ± 1	90 ± 3
Интегрин $\alpha$ X (CD11c)	—	<b>48 ± 3</b>	<b>90 ± 1</b>	90 ± 2	66 ± 1
Корцептор LPS (CD14)	—	<b>26 ± 2</b>	<b>95 ± 1</b>	81 ± 2	47 ± 2
SCARB3 (CD36)	—	—	<b>20 ± 1</b>	95 ± 1	97 ± 1
PTPRC (CD45)	96 ± 8	99 ± 1	99 ± 1	99 ± 1	99 ± 1
Fc- $\gamma$ рецептор 1 (CD64)	95 ± 1	99 ± 1	<b>28 ± 4</b>	85 ± 1	55 ± 4
Макросиалин (CD68)	51 ± 3	<b>94 ± 4</b>	—	99 ± 1	95 ± 4
TLR4 (CD284)	—	<b>72 ± 9</b>	<b>15 ± 1</b>	49 ± 6	9 ± 1
Рецептор для гемоглобин-гаптоглобинового комплекса (CD163)	—	—	—	75 ± 1	—
MHC II (HLA-DR)	21 ± 1	<b>53 ± 5</b>	—	73 ± 1	59 ± 2

*Примечание.* Жирным шрифтом выделены показатели, достоверно отличающиеся от тех, что у THP-1.

## РЕЗУЛЬТАТЫ

### *Результаты иммунофенотипирования лейкозных клеток линий THP-1, HL-60, K562, дифференцированных экзогенными факторами*

Миелопоэз заключается в дифференцировке миелоидных клеток в моноцитарном, макрофагальном, гранулоцитарном, эритроидном и мегакариоцитарном направлениях. Ряд экзогенных факторов могут индуцировать формирование в лейкозных клетках признаков дифференцировки в указанных направлениях. Каждое направление дифференцировки характеризуется определенным набором поверхностных маркеров и формированием специфических функций у клеток. Важнейшим показателем дифференцировки является изменение иммунофенотипа, т.е. приобретение специфических поверхностных маркеров — кластеров дифференцировки (CD). Иммунофенотипирование клеток THP-1ATRA и THP-1PMA проводили по 10 основным маркерам моноцитарно-макрофагальной дифференцировки в сравнении с контрольными клетками THP-1, моноцитами и макрофагами (табл. 1). Клетки THP-1ATRA являлись положительными по основным моноцитарным маркерам CD11b, CD11c, CD14, CD284, которые отсутствовали у контрольных клеток THP-1. Процент CD68+ популяции у клеток THP-1ATRA не отличался от моноцитов. Также процент HLA-DR+ клеток THP-1ATRA увеличился до 53 ± 5% относительно 21 ± 1% у контрольных клеток. Все клетки THP-1ATRA, так же как и моноциты, являлись CD68+ в отличие от контрольных клеток THP-1, у которых только 51 ± 3% клеток несли данный маркер. Нужно отметить, что у клеток THP-1ATRA также возрастал уровень экспрессии CD64 в пересчете на клетку, что выражалось в увеличении средней интенсивности флуоресценции (СИФ) с 1465 ± 43 произ-

вольных единиц (далее пр. ед.) у THP-1 до 30264 ± 2113 пр. ед. у THP-1ATRA. Также наряду с увеличением числа клеток THP-1ATRA, несущих CD68 и HLA-DR, возрастал уровень экспрессии этих маркеров в пересчете на одну клетку с 2700 ± 172 пр. ед. до 20546 ± 3420 пр. ед. и с 814 ± 54 пр. ед. до 3756 ± 213 пр. ед. соответственно по сравнению с контрольными клетками THP-1. В отличие от контрольных клеток THP-1 клетки THP-1PMA имели маркеры CD11c, CD14, CD36, CD284, что также характерно для макрофагов (табл. 1). Процент CD11c+, а также CD14+ клеток в популяции THP-1PMA был больше, чем у макрофагов. Экспрессия CD36 отсутствовала у контрольных клеток THP-1 и появлялась у THP-1PMA, однако процент CD36+ клеток в популяции THP-1PMA был ниже, чем у макрофагов. В свою очередь, процент CD284+ клеток у THP-1PMA был небольшим и близок к тому, что выявлялся у макрофагов. Таким образом, клетки THP-1ATRA и THP-1PMA имели различный иммунофенотип, но у обоих клеточных вариантов наблюдалось появление дифференцировочных маркеров, характерных для моноцитарной и макрофагальной дифференцировки соответственно.

Иммунофенотип клеток HL-60DMSO и HL-60ATRA был характерным для гранулоцитоподобных клеток (табл. 2). У этих клеток появлялись маркеры CD11b, CD11c и увеличивалась субпопуляция клеток, несущих CD66, в сравнении с контрольными клетками HL-60. Сильнее всего менялся иммунофенотип клеток, обработанных ATRA. Процент клеток CD11b+ и CD66+ у них достоверно не отличался от соответствующих значений для гранулоцитов и включал почти всю популяцию клеток. Количество положительных по CD11c клеток HL-60ATRA было почти в 4 раза больше в сравнении с клетками HL-60DMSO,

**Таблица 2.** Процент клеток, несущих CD-маркеры гранулоцитарной дифференцировки, в культурах клеток HL-60DMSO и HL-60ATRA, HL-60 и у гранулоцитов

CD	HL-60	HL-60DMSO	HL-60ATRA	Гранулоциты
Интегрин $\alpha$ M (CD11b)	–	78 $\pm$ 3	95 $\pm$ 1	99 $\pm$ 1
Интегрин $\alpha$ X (CD11c)	–	12 $\pm$ 1	43 $\pm$ 4	94 $\pm$ 1
СЕАСАМ3 (CD66)	41 $\pm$ 1	74 $\pm$ 10	90 $\pm$ 5	99 $\pm$ 1

**Таблица 3.** Процент клеток, несущих CD-маркеры мегакариоцитарной дифференцировки в культурах клеток K562PMA, K562 и у тромбоцитов

CD	K562	K562 PMA	Тромбоциты
Интегрин $\alpha$ IIb (CD41)	–	20 $\pm$ 1	99 $\pm$ 1
Интегрин $\beta$ 3 (CD61)	–	86 $\pm$ 2	98 $\pm$ 2

**Таблица 4.** Процент клеток, несущих CD-маркеры эритроидной дифференцировки в культурах клеток K562Hem, K562SB, K562 и у эритроцитов

CD	K562	K562Hem	K562SB	Эритроциты
Рецептор трансферрина (CD71)	88 $\pm$ 9	74 $\pm$ 4	97 $\pm$ 1	–
Гликофорин А (CD235a)	99 $\pm$ 1	93 $\pm$ 3	97 $\pm$ 1	100

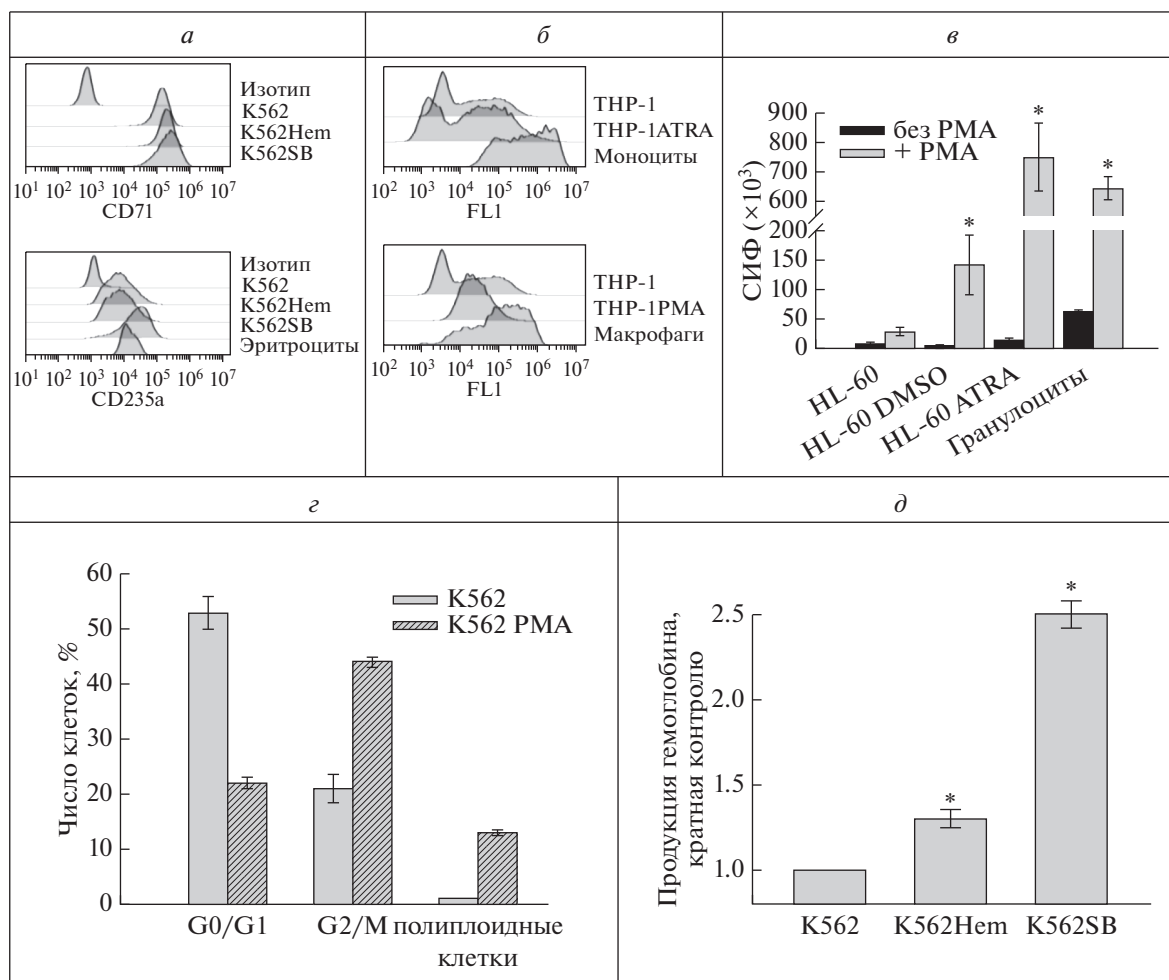
43  $\pm$  4% и 12  $\pm$  1% соответственно. На клетках HL-60DMSO выявлялась более высокая представленность исследуемых маркеров в сравнении с контрольными клетками HL-60, но меньшая, чем на клетках HL-60ATRA и гранулоцитах (данные не представлены). Таким образом, хотя клетки HL-60DMSO и HL-60ATRA имели одинаковый гранулоцитоподобный иммунофенотип, степень представленности CD11b, CD66 и CD11 на клетках и процент клеток, положительных по этим маркерам, были выше у клеток HL-60ATRA, что может указывать на более выраженный дифференцированный иммунофенотип этих клеток.

Мегакарицитоподобная дифференцировка сопровождалась появлением у клеток K562PMA двух главных маркеров мегакариоцитов и зрелых тромбоцитов – CD41 и CD61 [37], которые полностью отсутствовали у контрольных клеток (табл. 3).

Экспрессия эритроидного маркера CD71 присуща всем клеткам эритроидного ростка, кроме самой зрелой формы – эритроцитов, а наличие CD235a характерно для всех эритроидных клеток, начиная с проэритробластов [38]. Мы показали, что популяция как дифференцированных клеток K562Hem и K562SB, так и контрольных клеток K562 несли данные маркеры (табл. 4). Однако представленность этих CD маркеров, выраженная в пр. ед. СИФ, на дифференцированных клетках была выше и отличалась от того, что было у контрольных клеток. Наибольшее значение СИФ как для CD71, так и для CD235a среди исследуемых вариантов имели клетки K562SB

(рис. 1а). Таким образом, иммунофенотип дифференцированных клеток K562SB и K562Hem выражал маркеры эритроподобной дифференцировки.

Было также обнаружено, что лейкозные клетки в процессе миелоидной дифференцировки приобретают специфические функциональные маркеры. Фагоцитоз является одной из основных функций моноцитов и макрофагов, а наличие в клетках THP-1ATRA и THP-1PMA мембранных рецепторов CD14 и CD284, входящих в состав мультимолекулярного рецепторного комплекса, распознающего липополисахарид клеточной стенки бактерий, указывает на потенциальную способность данных клеток осуществлять фагоцитоз. Для клеток THP-1ATRA и THP-1PMA была обнаружена высокая фагоцитарная активность по отношению к комплексам pHrodo Green *E. coli*, сопоставимая с моноцитами и макрофагами, что отражено на гистограммах (рис. 1б). Для гранулоцитов была показана высокая индуцируемая окислительная активность, что также характерно для клеток HL-60DMSO и HL-60ATRA, в отличие от недифференцированных клеток HL-60 (рис. 1в). Помимо многоядерности, для мегакарицитоподобных клеток K562PMA была характерна полиплоидность, что отражается в увеличении количества ДНК в клетках и является маркером мегакариоцитов (рис. 1з). Основным функциональным маркером эритроидных клеток является продукция гемоглобина [38], и у дифференцированных клеток K562Hem, а также у K562SB она была в несколько раз выше, чем у



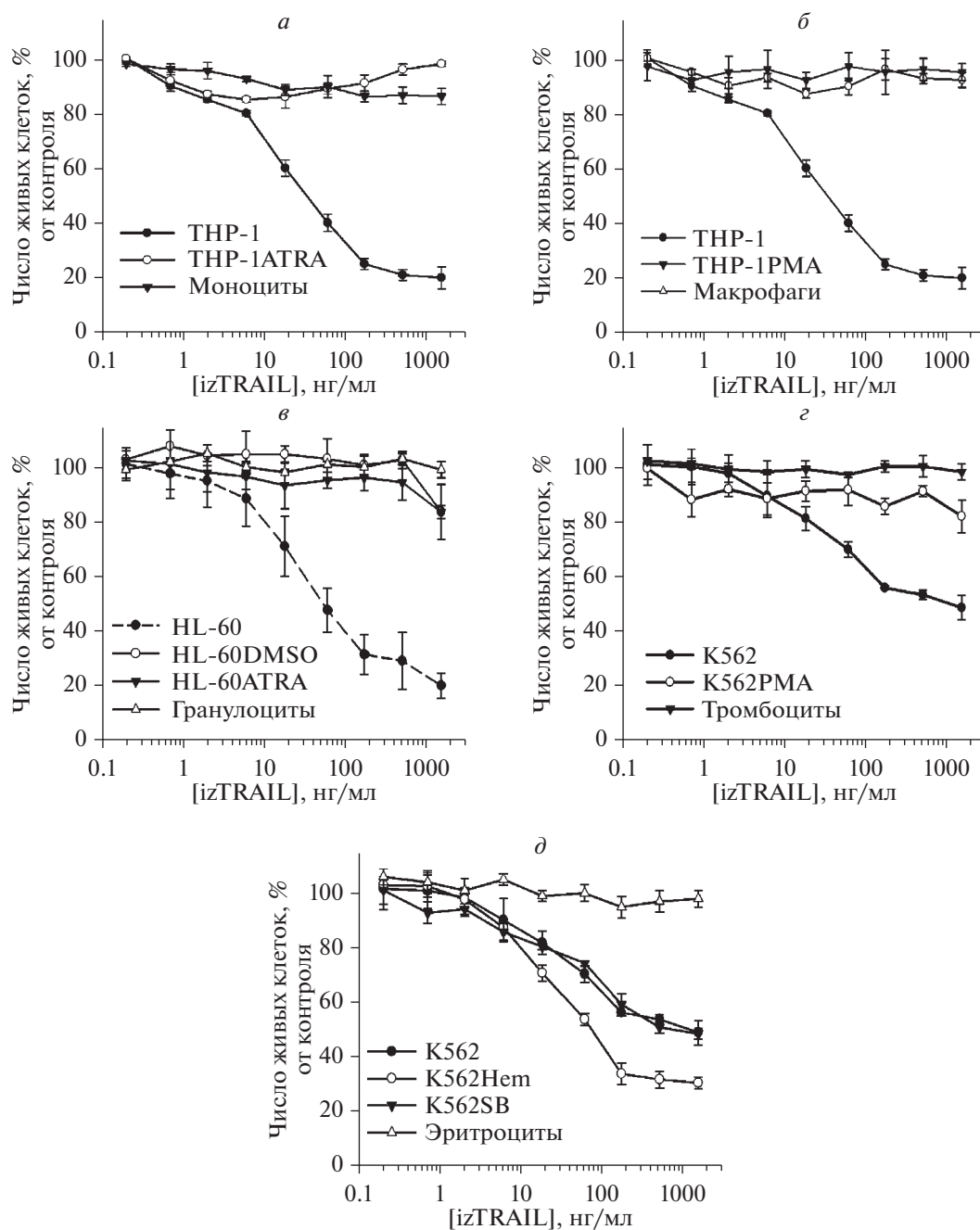
**Рис. 1.** *а* – Гистограммы экспрессии CD71 и CD235a на клетках K562, K562Hem и K562SB, окрашенных антителами, конъюгированными с флуорохромами. *б* – Гистограммы указанных на рисунке клеток после фагоцитирования ими флуоресцентных комплексов рHgo do Green *E. coli*, представленные гистограммы являются репрезентативными для трех независимых экспериментов. *в* – Конститутивная и PMA-индуцибельная окислительная активность указанных клеток. СИФ – средняя интенсивность флуоресценции клеток, окрашенных зондом DCFH-DA, выраженная в произвольных единицах (пр. ед.). *г* – Процент популяции клеток K562 и K562PMA в G0 и G1 (G0/G1), G2 и M (G2/M) фазах клеточного цикла, а также содержащих количество ДНК больше, чем в G2/M фазах (полиплоидные клетки). Окраска иодидом пропидия; *д* – Продукция гемоглобина клетками K562Hem и K562SB, выраженная как кратная таковой для контрольных клеток K562. \* –  $p < 0.05$  по сравнению с клетками K562.

контрольных клеток (рис. 2д). У K562Hem продукция Hb была выше в  $1.36 \pm 0.03$  раза, чем у клеток K562, а у клеток K562SB – в  $2.45 \pm 0.04$  раза, что указывает на более выраженный эритроидоподобный фенотип клеток K562SB.

*Дифференцировка лейкозных клеток экзогенными факторами во всех миелоидных направлениях, кроме эритроидного, сопровождается повышением их устойчивости к TRAIL-индуцированной гибели*

Было установлено, что приобретение моноцитарно-макрофагальных черт у клеток THP-1 сопровождается снижением их чувствительности к TRAIL-индуцированной гибели. Не было обнаружено токсического действия белка izTRAIL да-

же в высоких концентрациях (до 1.5 мкг/мл) на клетки THP-1ATRA и моноциты, что свидетельствует об их TRAIL-резистентности (рис. 2а). Аналогично, дифференцировка в макрофагоподобном направлении сопровождалась формированием TRAIL-резистентности в клетках THP-1PMA. Такая же полная TRAIL-резистентность была характерна для макрофагов (рис. 2б). Чувствительность клеток HL-60 к действию izTRAIL также изменилась после их гранулоцитоподобной дифференцировки. Клетки HL-60DMSO и HL-60ATRA приобрели резистентность к TRAIL-индуцированной гибели (рис. 2в). При максимальной используемой концентрации izTRAIL (1.5 мкг/мл)  $84 \pm 10\%$  клеток HL-60DMSO и  $83 \pm 2\%$  клеток HL-60ATRA являлись нечувстви-



**Рис. 2.** Цитотоксическое действие izTRAIL на дифференцированные (см. материалы и методы) и не дифференцированные лейкозные клетки, указанные на рисунке.

тельными к izTRAIL, что примерно в 4 раза больше в сравнении с клеточными культурами HL-60, в которых было только  $20 \pm 1\%$  TRAIL-нечувствительных клеток.

Клетки K562 обладали повышенной в сравнении с THP-1 и HL-60 устойчивостью к TRAIL-индуцированной гибели. Для них концентрация полумаксимального ингибирования (IC50) белка izTRAIL составила 1.5 мкг/мл, т.е. максимальную используемую дозу (рис. 2г). Дифференцирован-

ные клетки K562PMA, как и тромбоциты, были TRAIL-резистентным (рис. 2з). В то же время дифференцировка в эритроподобном направлении клеток K562 не способствовала повышению их TRAIL-устойчивости (рис. 2д). Клетки K562, обработанные гемином, стали более чувствительны к izTRAIL. При концентрации белка izTRAIL 1.5 мкг/мл процент живых клеток в культурах K562Hem был равен  $30 \pm 2\%$ , а для контрольных

культур K562 и для K562SB он равнялся  $52 \pm 4\%$  (рис. 2д).

Таким образом, наши результаты показывают повышение TRAIL-устойчивости лейкозных клеток при их дифференцировке во всех миелоидных направлениях, кроме эритроидоподобного.

*Дифференцировка лейкозных клеток по всем миелоидным направлениям, кроме эритроидного, сопровождается снижением доли клеток, несущих DR4 и DR5*

Известно, что изменение экспрессии рецепторов к TRAIL на клетках влияет на их чувствительность к цитотоксическому действию данного цитокина [1, 8]. Поэтому мы изучили, как дифференцировка в миелоидном направлении лейкозных клеток влияет на экспрессию TRAIL-рецепторов. Было обнаружено, что изменение TRAIL-чувствительности у дифференцированных клеток согласуется с представленностью на них проапоптотических TRAIL-рецепторов DR4 и DR5. Экспрессия антиапоптотических рецепторов TRAIL (DcR1 и DcR2) отсутствовала во всех исследованных типах клеток. Мы проанализировали процент субпопуляций, несущих TRAIL-рецепторы DR4 и DR5 (DR4+/DR5+), только DR4 (DR4+/DR5-) или только DR5 (DR4-/DR5+), а также не несущих ни один из этих рецепторов (DR4-/DR5-), во всех дифференцированных линиях клеток и сравнили их с контрольными (недифференцированными) клетками, а также с соответствующими дифференцированными клетками организма. Для этого проводили окрашивание клеток совместно антителами к DR4 и DR5 и анализировали сдвиг цитограммы флуоресценции этой популяции относительно клеток, окрашенных двумя контрольными изотипами. Было обнаружено, что в популяции THP-1ATRA по сравнению с THP-1 наблюдалось значительное ( $p < 0.05$ ), более чем в 3 раза, снижение количества дважды позитивных клеток DR4+/DR5+ (с  $67 \pm 3\%$  до  $15 \pm 6\%$  соответственно), а также уменьшение популяции DR4+/DR5- с  $22 \pm 2\%$  до  $11 \pm 1\%$  (рис. 3а). У моноцитов полностью отсутствовали рецепторы DR5. Наиболее значимо было увеличение дважды негативной популяции DR4-/DR5- у клеток THP-1ATRA (более чем в 10 раз) в сравнении с THP-1, у которых только  $6 \pm 1\%$  клеток не имели ни DR4, ни DR5. У моноцитов процент популяции DR4-/DR5- также был намного больше ( $>17$  раз), чем у THP-1 клеток. У макрофагоподобных клеток THP-1PMA и макрофагов было выявлено полное отсутствие популяции DR4+/DR5+. У клеток THP-1PMA полностью отсутствовали рецепторы DR4. Большинство клеток THP-1PMA ( $85 \pm 1\%$ ), а также макрофагов ( $98 \pm 1\%$ ) не имели проапоптотических рецепторов (рис. 3б).

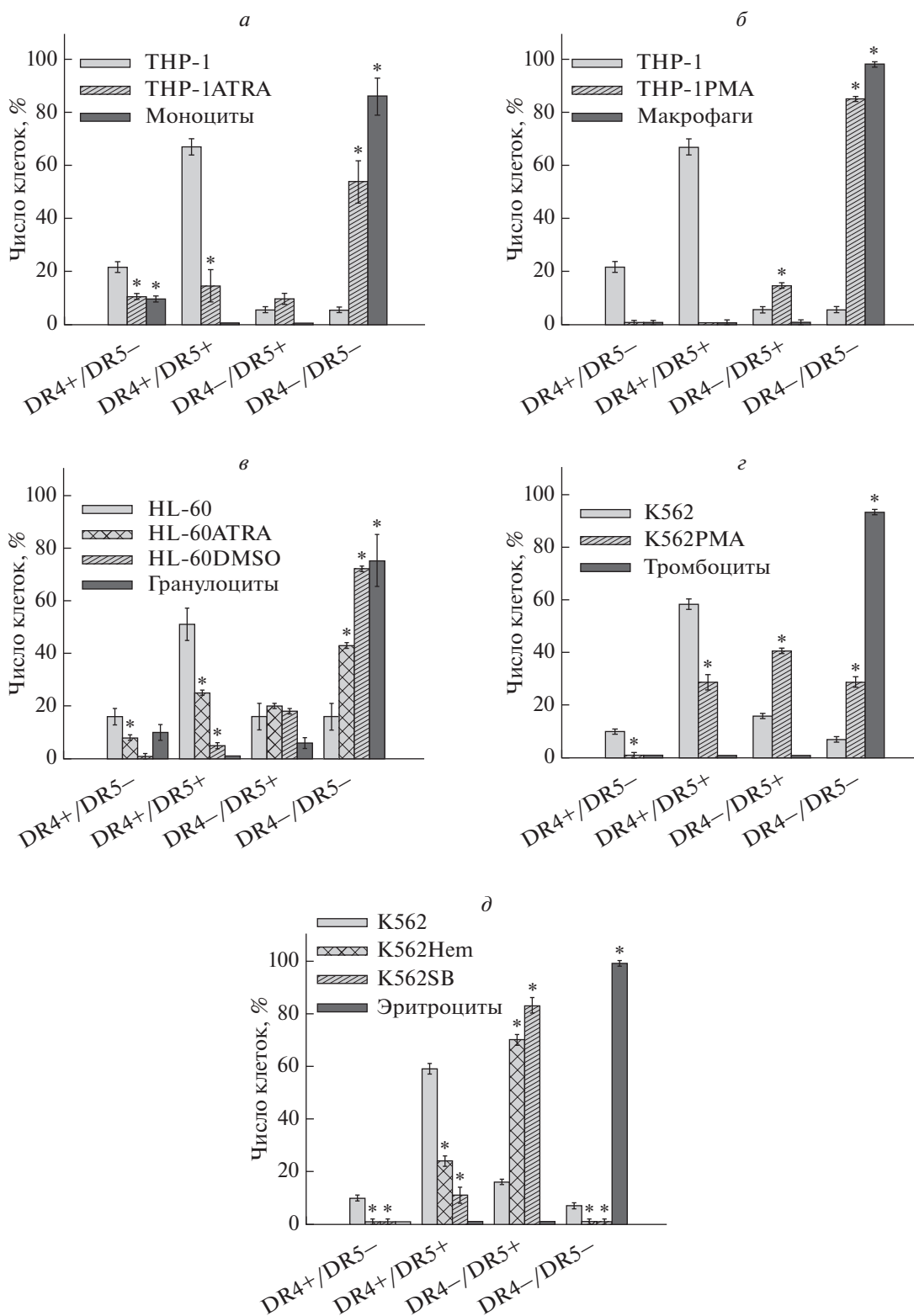
При гранулоцитоподобной дифференцировке мы также обнаружили потерю рецепторов DR4 и DR5 (рис. 3в). Было установлено, что для  $75 \pm 10\%$  гранулоцитов характерно одновременное отсутствие обоих рецепторов на клетках. Тенденция к увеличению дважды негативной DR4-/DR5- популяции наблюдалась у HL-60DMSO ( $72 \pm 1\%$ ) и у HL-60ATRA ( $43 \pm 1\%$ ). У контрольных клеток HL-60 данная популяция составляла только  $16 \pm 5\%$ , а большинство клеток ( $51 \pm 6\%$ ) несли оба рецептора DR4 и DR5 на своей мембране. У клеток HL-60ATRA популяция DR4+/DR5+ была вдвое меньше, чем у контрольных клеток, а у HL-60DMSO она составляла всего  $5 \pm 1\%$  относительно общего числа.

У мегакариоцитоподобных клеток K562PMA также наблюдалось изменение в экспрессии DR4 и DR5. Мы выявили, что в клеточной культуре K562PMA был снижен процент DR4+/DR5+ и повышен процент DR4-/DR5- клеток в сравнении с контрольными K562. Так, субпопуляция клеток DR4+/DR5+ у K562PMA составила  $29 \pm 3\%$ , а у контрольных K562 – в 2 раза больше,  $59 \pm 2\%$ . Вместе с тем, процент дважды негативных клеток DR4-/DR5- составил  $29 \pm 2\%$  в популяции K562PMA и  $7 \pm 1\%$  у клеток K562 (рис. 3г). Литературные данные показывают наличие у тромбоцитов экспрессии DR4 и DR5 [39, 40], однако мы не обнаружили популяций, несущих данные рецепторы, что согласуется с полной резистентностью тромбоцитов к izTRAIL.

Дифференцировка клеток K562 в эритроидоподобном направлении также сопровождалась изменением в экспрессии DR4 и DR5, что отражено на рис. 3д. Обнаружено достоверное снижение количества клеток популяции DR4+/DR5+ в 2.5 раза у K562Het и в 5 раз у K562SB в сравнении с контрольными клетками. Вместе с тем, выявлено увеличение процента клеток, несущих только DR5 у дифференцированных клеток. Так, популяция DR4-/DR5+ составила  $70 \pm 2\%$  у клеток K562Het,  $83 \pm 3\%$  у клеток K562SB и достоверно меньшую величину  $16 \pm 1\%$  у контрольных клеток K562 (рис. 3д). Популяция клеток, не несущих ни один из апоптотических рецепторов к TRAIL, полностью отсутствовала у обоих вариантов дифференцированных клеток, а у контрольных клеток K562 составила всего  $7 \pm 1\%$ .

Таким образом, повышение устойчивости к TRAIL-индуцированной гибели у лейкозных клеток, дифференцированных во всех миелоидных направлениях, кроме эритроидоподобного, сопровождалось снижением экспрессии проапоптотических TRAIL-рецепторов на клеточной поверхности.





**Рис. 3.** Процент клеток, которые экспрессируют TRAIL-рецепторы DR4 и DR5 (DR4+/DR5+), только DR4 (DR4+/DR5-) или только DR5 (DR4-/DR5+) или ни DR4, ни DR5 (DR4-/DR5-): *а* – в популяциях THP-1, THP-1ATRA и моноцитов; *б* – в популяциях THP-1PMA в сравнении с THP-1 и макрофагами; *в* – в популяциях HL-60DMSO и HL-60ATRA в сравнении с HL-60 и гранулоцитами; *г* – в популяциях клеток K562PMA и K562 в сравнении с тромбоцитами; *д* – в клетках K562Hem, K562SB в сравнении с K562 и эритроцитами; \* –  $p < 0.05$  по сравнению с соответствующими контрольными клетками.

*Индукторы ЭПР-стресса повышают чувствительность дифференцированных лейкозных клеток к TRAIL-индуцированной гибели*

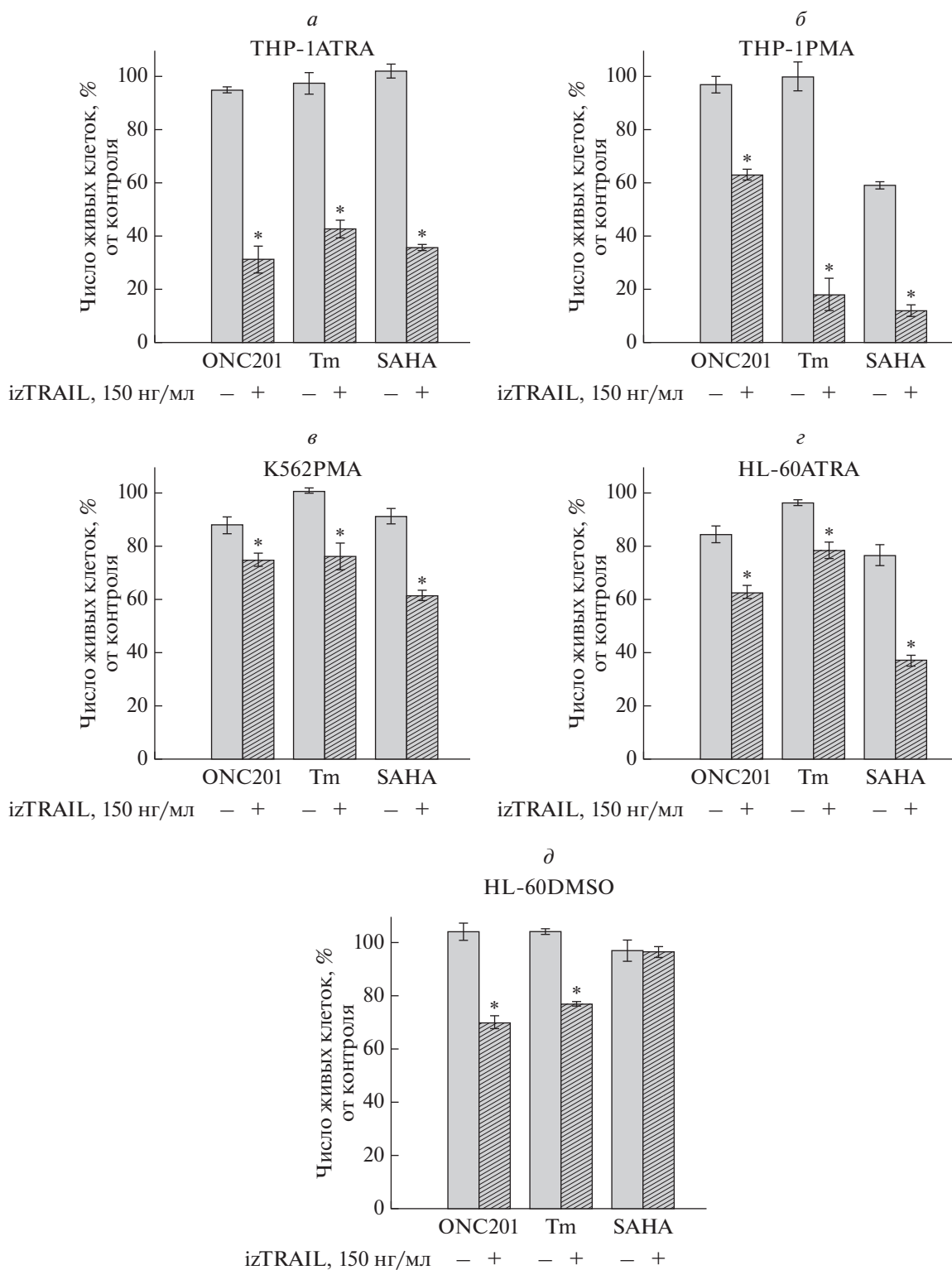
Мы показали, что миелоидная дифференцировка лейкозных клеток в моноцитоподобном, макрофагоподобном, гранулоцитоподобном и мегакарицитоподобном, но не в эритроидоподобном, направлениях сопровождалась приобретением устойчивости к TRAIL-индуцированной гибели и снижением экспрессии рецепторов DR4 и DR5. Следовательно, сама представленность проапоптотических TRAIL-рецепторов может опосредовать устойчивость к TRAIL у лейкозных клеток при миелоидной дифференцировке. Мы оценили возможность применения препаратов, вызывающих ЭПР-стресс (ONC201, туникамицин и SAHA), для сенситизации дифференцированных лейкозных клеток к цитотоксическому действию TRAIL, так как известна их способность индуцировать экспрессию DR5 [41–43]. Были подобраны такие концентрации данных веществ, которые наряду с минимальной токсичностью, оказываемой на лейкозные клетки, вызывали наиболее выраженный цитотоксический эффект при совместном применении с izTRAIL. Было установлено, что все три препарата достоверно повышали чувствительность моноцитоподобных клеток ТНР-1АТРА к действию izTRAIL (рис. 4а). При совместном применении izTRAIL и ONC201, 69 ± 5% этих клеток были чувствительны к TRAIL-индуцированной гибели. Аналогично, совместное применение izTRAIL с туникамицином или с SAHA индуцировало гибель 57 ± 3% и 64 ± 1% клеток ТНР-1АТРА соответственно (рис. 4а). Также применение этих индукторов ЭПР-стресса повышало чувствительность макрофагоподобных клеток ТНР-1РМА к TRAIL-опосредованной гибели (рис. 4б). Наибольший эффект сенситизации этих макрофагоподобных клеток к izTRAIL оказал туникамицин. Его применение более чем в 5 раз увеличило цитотоксичность izTRAIL, уменьшив количество живых клеток с 96 ± 4% до 18 ± 6%. Наименьший эффект оказал ONC201, который уменьшил TRAIL-устойчивость клеток ТНР-1РМА в 1.5 раза. Применение SAHA в 8 раз повысило чувствительность клеток ТНР-1РМА к izTRAIL, однако для этого потребовалось добавить SAHA в слаботоксичной концентрации. В отношении мегакарицитоподобных клеток К562 SAHA оказал наиболее значимый эффект сенситизации к TRAIL-индуцированной гибели среди применяемых препаратов. SAHA снизил количество TRAIL-резистентных клеток К562РМА с 92 ± 5% до 62 ± 2% в популяции (рис. 4в). Эффект ONC201 и туникамицина был менее значимым. Количество TRAIL-устойчивых клеток К562РМА при применении ONC201 снизилось до 75 ± 2%, а при воздействии туникамицина – до 76 ± 5% клеток. Гранулоцито-

подобные HL-60АТРА и HL-60DMSO клетки отвечали на сенситизацию к izTRAIL различными индукторами ЭПР-стресса по-разному. SAHA оказал выраженный сенсibiliзирующий эффект к TRAIL у клеток HL-60АТРА. Применение этого агента увеличило число чувствительных к TRAIL клеток до 63 ± 2%, а использование ONC201 и туникамицина повысило чувствительность только у 38 ± 2% и 21 ± 3% клеток HL-60АТРА соответственно (рис. 4з). SAHA не оказал какого-либо эффекта на чувствительность клеток HL-60DMSO (рис. 4д). На данные гранулоцитоподобные клетки близкий сенсibiliзирующий эффект оказали ONC201 и туникамицин. После их применения 31 ± 2% и 23 ± 1% клеток соответственно приобрели чувствительность к TRAIL-индуцированной гибели.

Таким образом, мы выявили, что использование индукторов ЭПР-стресса, модулирующих экспрессию TRAIL рецепторов, способствовало повышению чувствительности клеток, дифференцированных в миелоидном направлении. Это указывает на то, что приобретение устойчивости к TRAIL-индуцированной гибели данных клеток может быть связано с изменением экспрессии TRAIL-рецепторов.

*Индукторы ЭПР-стресса повышают экспрессию DR5 у лейкозных клеток, дифференцированных в миелоидном направлении*

Для оценки механизма сенситизации дифференцированных лейкозных клеток к TRAIL-индуцированной гибели было выполнено исследование влияния препаратов ONC201, туникамицина и SAHA на представленность рецепторов DR4 и DR5 на этих клетках. Оказалось, что эффект сенситизации к TRAIL-индуцированной гибели указанными агентами сочетался с повышением экспрессии рецептора DR5 на всех исследованных лейкозных клетках, дифференцированных в миелоидном направлении (рис. 5). Причем у всех клеток наблюдалась тенденция увеличения числа популяции DR4–/DR5+ и снижения количества дважды негативных DR4–/DR5– клеток. У моноцитоподобных клеток ТНР-1АТРА туникамицин вызвал достоверное повышение процента DR4–/DR5+ клеток (с 10 ± 2% до 45 ± 1%) и уменьшение популяции DR4–/DR5– клеток (с 54 ± 8% до 30 ± 5% клеток) (рис. 5а). Эффекты, оказываемые ONC201 и SAHA на экспрессию DR4 и DR5 в клетках ТНР-1АТРА, были менее выражены, чем у туникамицина. Хорошо выраженный и схожий эффект повышения экспрессии DR4 и DR5 на макрофагоподобных клетках ТНР-1РМА оказали туникамицин и SAHA, но не ONC201 (рис. 5б). Туникамицин и SAHA повышали процент DR4–/DR5+ клеток ТНР-1РМА с 40 ± 5% в контроле (без ингибиторов) до 70 ± 1%



**Рис. 4.** Сенсibilизация дифференцированных лейкозных клеток к цитотоксическому действию izTRAIL индукторами ЭПР-стресса. *а* – THP-1ATRA совместно со 100 мкМ ONC201, 3.3 мкМ туникамицина (Tm) и 100 мкМ SAHA; *б* – THP-1PMA совместно со 100 мкМ ONC201, 1 мкМ туникамицина (Tm) и 33 мкМ SAHA; *в* – K562PMA совместно со 100 мкМ ONC201, 3.3 мкМ туникамицина (Tm) и 33 мкМ SAHA; *г* – HL-60ATRA совместно с 10 мкМ ONC201, 3.3 мкМ туникамицина (Tm) и 100 SAHA; *д* – HL-60DMSO совместно с 10 мкМ ONC201, 1.1 мкМ туникамицина (Tm) и 11 мкМ SAHA; \* –  $p < 0.05$  по сравнению с эффектом только индуктора ЭПР-стресса.

и  $63 \pm 3\%$  (с ингибиторами) соответственно и уменьшали процент DR4<sup>-</sup>/DR5<sup>-</sup> клеток с  $50 \pm 4\%$  в контроле до  $28 \pm 2\%$  и  $35 \pm 2\%$  соответственно. Аналогично, достоверно значимый эффект на экспрессию DR4 и DR5 у мегакариоцитоподобных клеток K562PMA оказали туникамицин и SAHA в противоположность ONC201 (рис. 5б). Туникамицин и SAHA повысили в 2 раза количество клеток K562PMA, несущих только DR5, с  $41 \pm 1\%$  в контроле до  $81 \pm 2\%$  и  $82 \pm 2\%$  соответственно. В то же время данные препараты уменьшили процент DR4<sup>-</sup>/DR5<sup>-</sup> клеток K562PMA более чем в 2 раза, с  $29 \pm 2\%$  до  $12 \pm 2\%$  и  $11 \pm 1\%$  соответственно. Применение индукторов ЭПР-стресса также отразилось в изменении экспрессии DR5 у гранулоцитоподобных клеток HL-60ATRA и HL-60DMSO. У клеток HL-60ATRA наибольший эффект на экспрессию рецепторов оказал туникамицин (рис 5з). Туникамицин индуцировал в культуре клеток HL-60ATRA увеличение популяции DR4<sup>-</sup>/DR5<sup>+</sup> почти в 4 раза, с  $20 \pm 1\%$  до  $71 \pm 1\%$  клеток, а также уменьшение популяции дважды негативных клеток с  $43 \pm 1\%$  до  $18 \pm 1\%$ . В клетках HL-60DMSO все три препарата оказали одинаковый эффект на экспрессию DR5, а именно повысили количество клеток DR4<sup>-</sup>/DR5<sup>+</sup> почти в 3 раза и уменьшили число DR4<sup>-</sup>/DR5<sup>-</sup> клеток более чем в 1.5 раза (рис. 5д).

Полученные результаты указывают на то, что механизм повышения TRAIL-устойчивости лейкозных клеток, дифференцированных в миелоидном направлении, связан с уменьшением представленности на них рецепторов DR4 и DR5. В свою очередь, препараты ONC201, туникамицин, а также SAHA способствуют подавлению TRAIL-резистентности дифференцированных в миелоидном направлении лейкозных клеток, повышая экспрессию проапоптотического TRAIL-рецептора DR5 на клеточной поверхности.

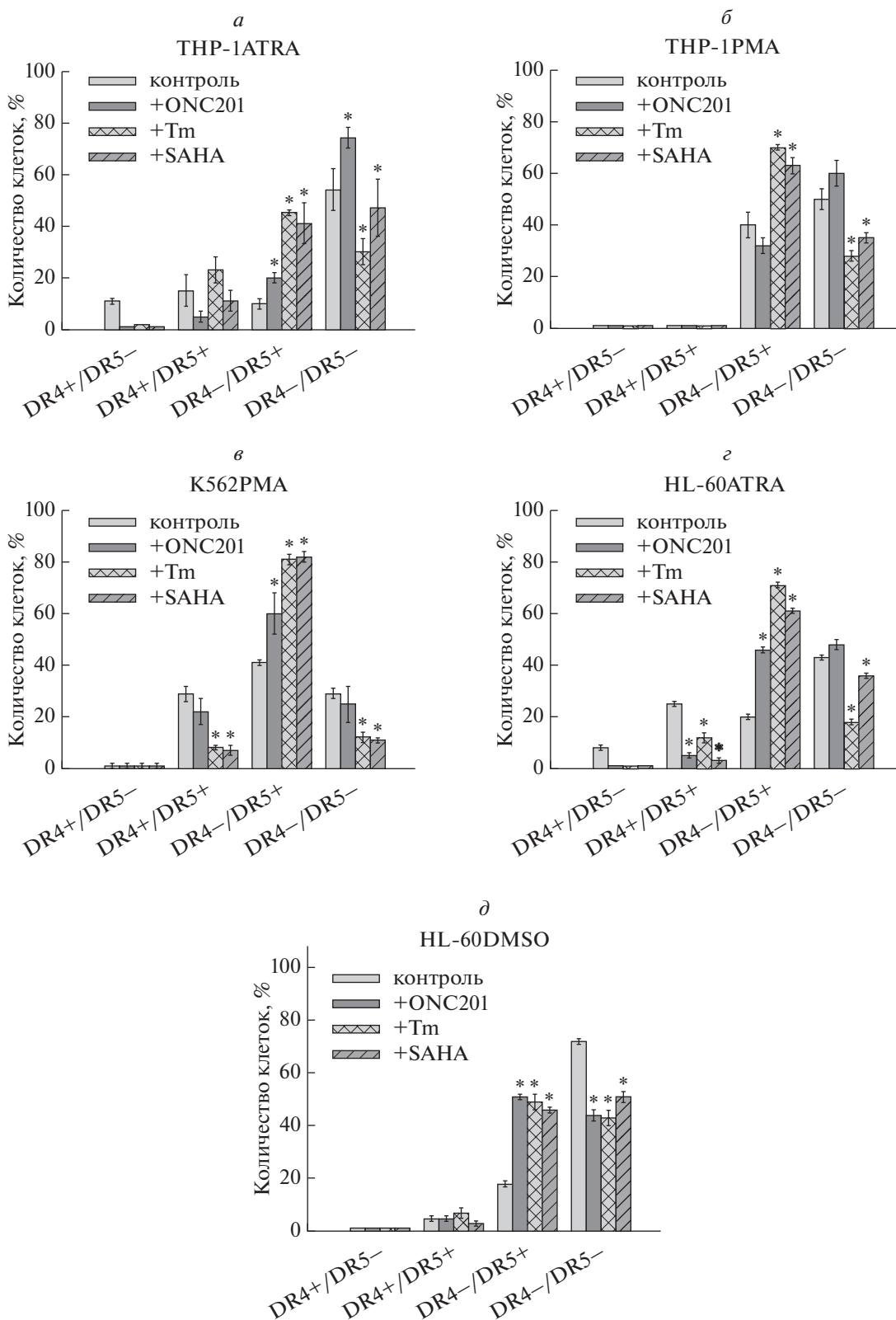
## ОБСУЖДЕНИЕ

Литературные данные о способности лейкозных клеток *in vivo* дифференцироваться с приобретением более “злокачественного” фенотипа [16, 18–21], а также о подавлении TRAIL-чувствительности дифференцированных лейкозных клеток [13–15] предполагают участие механизма дифференцировки лейкозных клеток в повышении их резистентности к TRAIL-индуцированной гибели.

На различных моделях дифференцировки лейкозных клеток *in vitro* в работе установлено, что повышение устойчивости к TRAIL-индуцированной гибели характерно для лейкозных клеток, дифференцированных во всех исследуемых направлениях миелопоэза, кроме эритроидоподобного, независимо от индуцирующего агента. Помимо этого мы обнаружили тенденцию к умень-

шению экспрессии рецепторов DR4 и DR5, а также увеличение числа клеток, не несущих ни один из проапоптотических TRAIL-рецепторов, во всех дифференцированных лейкозных клетках, кроме эритроидоподобных. Можно сказать, что дифференцировка в эритроидоподобном направлении сопровождалась перераспределением экспрессии TRAIL-рецепторов внутри популяции DR4/DR5-позитивных клеток, так как число клеток в популяции DR4<sup>+</sup>/DR5<sup>+</sup> снижалось наряду с увеличением числа клеток, обладающих только DR5. Это согласуется с повышением чувствительности к TRAIL у клеток K562 при дифференцировке геминном, что опосредуется снижением уровня экспрессии cFLIP [44]. Отсутствие эффекта повышения TRAIL-устойчивости при эритроидоподобной дифференцировке клеток K562 может быть связано с особой ролью TRAIL как физиологического ингибитора эритропоэза. Известно, что присутствие рецептора эритропоэтина (EpoR) на клеточной мембране может повышать устойчивость эритроидных клеток к действию TRAIL независимо от экспрессии DR4 и DR5 через Epo-зависимую регуляцию внутриклеточного уровня протеинкиназы Cε (PKCε), которая влияет на экспрессию модулятора апоптоза BCL-2 [45, 46]. В то же время, экспрессия рецепторов DR4 и DR5 остается важной для негативной регуляции эритропоэза через TRAIL-опосредованную активацию ERK 1/2-зависимого сигнального пути. Так, у зрелых эритробластов совместно со снижением экспрессии EpoR уменьшается также экспрессия DR4 и DR5, что приводит к формированию TRAIL-резистентности [47, 48]. Таким образом, для эритроидной дифференцировки свойственно снижение чувствительности к TRAIL, однако эта тенденция не постоянна и не всегда коррелирует со снижением проапоптотических TRAIL-рецепторов. По-видимому, фенотип клеток K562 при обработке бутиратом натрия или геминном не обладает достаточно высокой степенью дифференцировки, нужной для формирования резистентности к TRAIL-индуцированной гибели.

В связи с полученными результатами о зависимости экспрессии DR4 и DR5 от степени дифференцировки лейкозных клеток мы оценили возможность повышения TRAIL-чувствительности лейкозных клеток посредством стимуляции на них экспрессии проапоптотических TRAIL-рецепторов. Было выявлено, что такие вещества, как ONC201, туникамицин и SAHA, достоверно повышали чувствительность к цитотоксическому действию TRAIL у дифференцированных лейкозных клеток, увеличивая процент клеток, несущих рецепторы DR5, совместно со снижением популяции клеток DR4<sup>-</sup>/DR5<sup>-</sup>, которые заведомо являются резистентными к TRAIL. При всех вариантах миелоидной дифференцировки туникамицин



**Рис. 5.** Влияние индукторов ЭПР-стресса на процент субпопуляций клеток, которые экспрессируют TRAIL-рецепторы DR4 и DR5 (DR4+/DR5+), только DR4 (DR4+/DR5-) или только DR5 (DR4-/DR5+) или ни DR4, ни DR5 (DR4-/DR5-): а – TNP-1ATRA, 100 мкМ ONC201, 3.3 мкМ туникамицина (Тм) и 100 мкМ SAHA; б – TNP-1PMA, 100 мкМ ONC201, 1 мкМ Тм и 33 мкМ SAHA; в – K562PMA, 100 мкМ ONC201, 3.3 мкМ Тм и 33 мкМ SAHA; г – HL-60ATRA, 10 мкМ ONC201, 3.3 мкМ Тм и 100 мкМ SAHA; д – HL-60ATRA, 10 мкМ ONC201, 1.1 мкМ Тм и 11 мкМ SAHA. \* –  $p < 0.05$  в сравнении с контролем (без индуктора).

наиболее значительно повышал экспрессию DR5. Известны перекрестные взаимодействия между UPR (unfolded protein response) сигнальным путем, который запускает ЭПР-стресс, и DR-сигналингом [49]. Например, сенсibilизирующее к TRAIL действие туникамицина связано с вызванной ЭПР-стрессом PERK- и CHOP-опосредованной индукцией экспрессии DR5 [41, 42, 50, 51]. Повышение экспрессии DR5 при действии ONC201 и SAHA связано с активацией транскрипционных факторов ATF4, CHOP, Foxo3a, которые являются регуляторами транскрипции гена DR5 [43, 54–57], в том числе через запуск ЭПР-стресса [52, 53]. Возможность подавления TRAIL-резистентности лейкозных клеток, имеющих дифференцированный фенотип, с помощью применения индукторов ЭПР-стресса представляет интерес для разработки стратегий повышения чувствительности лейкозных клеток к TRAIL-опосредованному иммунному надзору и для создания препаратов на основе рекомбинантных белков TRAIL.

Таким образом, полученные результаты показывают, что дифференцировка лейкозных клеток в миелоидном направлении, за исключением эритроидоподобного, повышает их TRAIL-резистентность, подавляя экспрессию рецепторов DR4 и DR5 на их поверхности, а индукторы экспрессии рецепторов DR5 способны подавлять TRAIL-резистентность дифференцированных лейкозных клеток.

**Благодарности.** Авторы выражают благодарность А.В. Чеканову за предоставление препаратов белка izTRAIL. Работа выполнена с использованием приборов ЦКП ИТЭБ РАН.

**Конфликт интересов.** Авторы заявляют об отсутствии конфликтов интересов.

**Источники финансирования.** Исследование выполнено при финансовой поддержке РФФИ в рамках научных проектов №№ 20-34-90061 и 20-34-90062.

**Соответствие принципам этики.** Все процедуры, выполненные в исследовании с участием людей, соответствуют этическими стандартами институционального и/или 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.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Buchsbaum D.J., Zhou T., Lobuglio A.F. 2006. TRAIL receptor-targeted therapy. *Future Oncol.* **2** (4), 493–508. <https://doi.org/10.2217/14796694.2.4.493>
- Chamuleau M.E., Ossenkoppelle G.J., van Rhenen A., van Dreunen L., Jirka S.M., Zevenbergen A. 2011. High TRAIL-R3 expression on leukemic blasts is associated with poor outcome and induces apoptosis-resistance which can be overcome by targeting TRAIL-R2. *Leuk. Res.* **35** (6), 741–749. <https://doi.org/10.1016/j.leukres.2010.12.032>
- Kaufmann S.H., Steensma D.P. 2005. On the TRAIL of a new therapy for leukemia. *Leukemia.* **19** (12), 2195–2202. <https://doi.org/10.1038/sj.leu.2403946>
- Thapa B., Kc R., Uludag H. 2020. TRAIL therapy and prospective developments for cancer treatment. *J. Control. Release.* **326**, 335–349. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2020.07.013>
- Snajdauf M., Havlova K., Vachtenheim J.Jr., Ozaniak A., Lischke R., Bartunkova J., Smrz D., Strizova Z. 2021. The TRAIL in the treatment of human cancer: An update on clinical trials. *Front Mol. Biosci.* **8**, 628332. <https://doi.org/10.3389/fmolb.2021.628332>
- Fadeev R., Chekanov A., Solovieva M., Bezborodova O., Nemtsova E., Dolgikh N., Fadeeva I., Senotov A., Kobayakova M., Evstratova Y., Yakubovskaya R., Akatov V. 2019. Improved anticancer effect of recombinant protein izTRAIL combined with sorafenib and peptide iRGD. *Int. J. Mol. Sci.* **20** (3), 525. <https://doi.org/10.3390/ijms20030525>
- Testa U. 2010. TRAIL/TRAIL-R in hematologic malignancies. *J. Cell Biochem.* **110** (1), 21–34. <https://doi.org/10.1002/jcb.22549>
- Riccioni R., Pasquini L., Mariani G., Saulle E., Rossini A., Diverio D., Pelosi E., Vitale A., Chierichini A., Cedrone M., Foà R., Lo Coco F., Peschle C., Testa U. 2005. TRAIL decoy receptors mediate resistance of acute myeloid leukemia cells to TRAIL. *Haematologica.* **90** (5), 612–624.
- Austin R., Smyth M.J., Lane S.W. 2016. Harnessing the immune system in acute myeloid leukaemia. *Crit. Rev. Oncol. Hematol.* **103**, 62–77. <https://doi.org/10.1016/j.critrevonc.2016.04.020>
- Sag D., Ayyildiz Z.O., Gunalp S., Wingender G. 2019. The role of TRAIL/DRs in the modulation of immune cells and responses. *Cancers (Basel).* **11** (10), 1469. <https://doi.org/10.3390/cancers11101469>
- Cheng J., Hylander B.L., Baer M.R., Chen X., Repasky E.A. 2006. Multiple mechanisms underlie resistance of leukemia cells to Apo2 Ligand/TRAIL. *Mol. Cancer Ther.* **5** (7), 1844–1853. <https://doi.org/10.1158/1535-7163.MCT-06-0050>
- Kobayakova M.I., Evstratova Y.V., Senotov A.S., Lomovsky A.I., Minaichev V.V., Zvyagina A.I., Solovieva M.E., Fadeeva I.S., Akatov V.S., Fadeev R.S. 2021. Appearance of signs of differentiation and pro-inflammatory phenotype in acute myeloid leukemia cells THP-1 at their increased TRAIL resistance in cell aggregates *in vitro*. *Biochemistry (Moscow), Supplement Series A: Membrane and Cell Biology.* **15** (1), 97–105. <https://doi.org/10.1134/S1990747821010050>
- Lomovskaya Y.V., Kobayakova M.I., Senotov A.S., Lomovsky A.I., Minaychev V.V., Fadeeva I.S., Shtatnova D.Y., Krasnov K.S., Zvyagina A.I., Akatov V.S., Fadeev R.S. 2022. Macrophage-like THP-1 cells derived from high-density cell culture are resistant to

- TRAIL-induced cell death via down-regulation of death-receptors DR4 and DR5. *Biomolecules*. **12** (2), 150.  
<https://doi.org/10.3390/biom12020150>
14. Evstratova Y.V., Kobayakova M.I., Novikova V.V., Senotov A.S., Akatov V.S., Fadeev R.S. 2019. Monocyte-macrophage differentiation suppresses the expression of proapoptotic receptors to Apo2L/TRAIL and increases resistance to TRAIL-induced apoptosis. *Biophysics*. **64**, 729–731.  
<https://doi.org/10.1134/S0006350919050038>
  15. Shiiki K., Yoshikawa H., Kinoshita H., Takeda M., Ueno A., Nakajima Y., Tasaka K. 2000. Potential mechanisms of resistance to TRAIL/Apo2L-induced apoptosis in human promyelocytic leukemia HL-60 cells during granulocytic differentiation. *Cell Death Differ*. **7** (10), 939–946.  
<https://doi.org/10.1038/sj.cdd.4400727>
  16. Bamezai S., Buske C. 2019. Cutting Off Leukemogenesis: Hydra-like plasticity of mature leukemic cells. *Cell Stem Cell*. **25** (2), 167–168.  
<https://doi.org/10.1016/j.stem.2019.07.005>
  17. McKenzie M.D., Ghisi M., Oxley E.P., Ngo S., Cimmino L., Esnault C., Liu R., Salmon M.J., Bell C.C., Ahmed N., Erlichster M., Witkowski T.M., Liu J.G., Chopin M., Dakic A., Simankowicz E., Pomilio G., Vu T., Krsmanovic P., Su S., Tian L., Baldwin M.T., Zalcenstein A.D., DiRago L., Wang S., Metcalf D., Johnstone W.R., Croker A.B., Lancaster I.G., Murphy J.A., Naik H.S., Nutt L.S., Pospisil V., Schroeder T., Wall M., Dawson A.M., Wei H.A., de Thé H., Ritchie E.M., Zuber J., Dickins A.R. 2019. Interconversion between tumorigenic and differentiated states in acute myeloid leukemia. *Cell Stem Cell*. **25** (2), 258–272.  
<https://doi.org/10.1016/j.stem.2019.07.001>
  18. Ngo S., Oxley E.P., Ghisi M., Garwood M.M., McKenzie M.D., Mitchell H.L., Kanellakis P., Susanto O., Hickey M.J., Perkins A.C., Kile B.T., Dickins R.A. 2021. Acute myeloid leukemia maturation lineage influences residual disease and relapse following differentiation therapy. *Nat. Commun*. **12** (1), 6546.  
<https://doi.org/10.1038/s41467-021-26849-w>
  19. Boyd A.L., Aslostovar L., Reid J., Ye W., Tanasijevic B., Porras D.P., Shapovalova Z., Almakadi M., Foley R., Leber B., Xenocostas A., Bhatia M. 2019. Identification of chemotherapy-induced leukemic-regenerating cells reveals a transient vulnerability of human AML recurrence. *Cancer Cell*. **34** (3), 483–498.  
<https://doi.org/10.1016/j.ccell.2018.08.007>
  20. Pei S., Pollyea D.A., Gustafson A., Stevens B.M., Minhajuddin M., Fu R., Riemondy A.K., Gillen E.A., Sheridan M.R., Kim J., Costello C.J., Amaya L.M., Inguava A., Winters A., Ye H., Krug A., Jones L.C., Adane B., Khan N., Ponder J., Schowinsky J., Abbott D., Hammes A., Myers R.J., Ashton M.J., Nemkov T., D'Alessandro A., Gutman A.J., Ramsey E.H., Savona R.M., Smith A.C., Jordan T.C. 2020. Monocytic subclones confer resistance to venetoclax-based therapy in patients with acute myeloid leukemia. *Cancer Discov*. **10** (4), 536–551.  
<https://doi.org/10.1158/2159-8290.CD-19-0710>
  21. Kuusanmaki H., Leppä A.M., Polonen P., Kontro M., Dufva O., Deb D., Yadav B., Brück O., Kumar A., Everaus H., Gjertsen T.B., Heinäniemi M., Porkka K., Mustjoki S., Heckman A.C. 2020. Phenotype-based drug screening reveals association between venetoclax response and differentiation stage in acute myeloid leukemia. *Haematologica*. **105** (3), 708–720.  
<https://doi.org/10.3324/haematol.2018.214882>
  22. Drach J., Lopez-Berestein G., McQueen T., Andreeff M., Mehta K. 1993. Induction of differentiation in myeloid leukemia cell lines and acute promyelocytic leukemia cells by liposomal all-trans-retinoic acid. *Cancer Research*. **53** (9), 2100–2104.
  23. Daigneault M., Preston J.A., Marriott H.M., Whyte M.K., Dockrell D.H. 2010. The identification of markers of macrophage differentiation in PMA-stimulated THP-1 cells and monocyte-derived macrophages. *PLoS One*. **5** (1), e8668.  
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0008668>
  24. Forrester M.A., Wassall H.J., Hall L.S., Cao H., Wilson H.M., Barker R.N., Vickers A.M. 2018. Similarities and differences in surface receptor expression by THP-1 monocytes and differentiated macrophages polarized using seven different conditioning regimens. *Cell Immunol*. **332**, 58–76.  
<https://doi.org/10.1016/j.cellimm.2018.07.008>
  25. Newburger P.E., Chovaniec M.E., Greenberger J.S., Cohen H.J. 1979. Functional changes in human leukemic cell line HL-60. A model for myeloid differentiation. *J. Cell Biol*. **82** (2), 315–322.  
<https://doi.org/10.1083/jcb.82.2.315>
  26. Tasseff R., Jensen H.A., Congleton J., Dai D., Rogers K.V., Sagar A., Bunaciu R.P., Yen A., Varner J.D. 2017. An effective model of the retinoic acid induced HL-60 differentiation program. *Sci. Rep*. **7** (1), 14327.  
<https://doi.org/10.1038/s41598-017-14523-5>
  27. Baxter S.S., Carlson L.A., Mayer A.M., Hall M.L., Fay M.J. 2009. Granulocytic differentiation of HL-60 promyelocytic leukemia cells is associated with increased expression of Cul5. *In Vitro Cell Dev. Biol. Anim*. **45** (5–6), 264–274.  
<https://doi.org/10.1007/s11626-008-9163-4>
  28. Huang R., Zhao L., Chen H., Yin R.H., Li C.Y., Zhan Y.Q., Zhang J.H., Ge C., Yu M., Yang X.M. 2014. Megakaryocytic differentiation of K562 cells induced by PMA reduced the activity of respiratory chain complex IV. *PLoS One*. **9** (5), e96246.  
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0096246>
  29. Kim K.W., Kim S.H., Lee E.Y., Kim N.D., Kang H.S., Kim H.D., Chung B.S., Kang C.D. 2001. Extracellular signal-regulated kinase/90-KDA ribosomal S6 kinase/nuclear factor-kappa B pathway mediates phorbol 12-myristate 13-acetate-induced megakaryocytic differentiation of K562 cells. *J. Biol. Chem*. **276** (16), 13186–13191.  
<https://doi.org/10.1074/jbc.M008092200>
  30. Nurhayati R.W., Ojima Y., Nomura N., Taya M. 2014. Promoted megakaryocytic differentiation of K562 cells through oxidative stress caused by near ultraviolet irradiation. *Cell Mol. Biol. Lett*. **19** (4), 590–600.  
<https://doi.org/10.2478/s11658-014-0215-3>
  31. Herrera R., Hubbell S., Decker S., Petruzzelli L. 1998. A role for the MEK/MAPK pathway in PMA-induced

- cell cycle arrest: modulation of megakaryocytic differentiation of K562 cells. *Exp. Cell Res.* **238** (2), 407–414. <https://doi.org/10.1006/excr.1997.3847>
32. Zhang D., Cho E., Wong J. 2007. A critical role for the co-repressor N-CoR in erythroid differentiation and heme synthesis. *Cell Res.* **17** (9), 804–814. <https://doi.org/10.1038/cr.2007.72>
  33. Huo X.F., Yu J., Peng H., Du Z.W., Liu X.L., Ma Y.N., Zhang X., Zhang Y., Zhao H., Zhang J. 2006. Differential expression changes in K562 cells during the hemin-induced erythroid differentiation and the phorbol myristate acetate (PMA)-induced megakaryocytic differentiation. *Mol. Cell Biochem.* **292** (1–2), 155–167. <https://doi.org/10.1007/s11010-006-9229-0>
  34. Shariati L., Modaress M., Khanahmad H., Hejazi Z., Tabatabaiefar M.A., Salehi M., Modarressi H.M. 2016. Comparison of different methods for erythroid differentiation in the K562 cell line. *Biotechnol. Lett.* **38** (8), 1243–1250. <https://doi.org/10.1007/s10529-016-2101-8>
  35. Witt O., Sand K., Pekrun A. 2000. Butyrate-induced erythroid differentiation of human K562 leukemia cells involves inhibition of ERK and activation of p38 MAP kinase pathways. *Blood.* **95** (7), 2391–2396. <https://doi.org/10.1182/blood.V95.7.2391>
  36. Burzynski L.C., Pugh N., Clarke M.C.H. 2019. Platelet isolation and activation assays. *Bio Protoc.* **9** (20), e3405. <https://doi.org/10.21769/BioProtoc.3405>
  37. Lannutti B.J., Blake N., Gandhi M.J., Reems J.A., Drachman J.G. 2005. Induction of polyploidization in leukemic cell lines and primary bone marrow by Src kinase inhibitor SU6656. *Blood.* **105** (10), 3875–3878. <https://doi.org/10.1182/blood-2004-10-3934>
  38. Koury M.J., Sawyer S.T., Brandt S.J. 2002. New insights into erythropoiesis. *Curr. Opin. Hematol.* **9** (2), 93–100. <https://doi.org/10.1097/00062752-200203000-00002>
  39. Li J., Xia Y., Bertino A.M., Coburn J.P., Kuter D.J. 2000. The mechanism of apoptosis in human platelets during storage. *Transfusion.* **40** (11), 1320–1329. <https://doi.org/10.1046/j.1537-2995.2000.40111320.x>
  40. Wu L.S., Wang X.W., He W., Ma X.T., Wang H.Y., Han M., Li B. 2019. TRAIL inhibits platelet-induced colorectal cancer cell invasion. *J. Int. Med. Res.* **47** (2), 962–972. <https://doi.org/10.1177/0300060518820785>
  41. Martin-Perez R., Niwa M., Lopez-Rivas A. 2012. ER stress sensitizes cells to TRAIL through down-regulation of FLIP and Mcl-1 and PERK-dependent up-regulation of TRAIL-R2. *Apoptosis.* **17** (4), 349–363
  42. Guo X., Meng Y., Sheng X., Guan Y., Zhang F., Han Z., Kang Y., Tai G., Zhou Y., Cheng H. 2017. Tunicamycin enhances human colon cancer cells to TRAIL-induced apoptosis by JNK-CHOP-mediated DR5 upregulation and the inhibition of the EGFR pathway. *Anticancer Drugs.* **28** (1), 66–74. <https://doi.org/10.1097/CAD.0000000000000431>
  43. Nakata S., Yoshida T., Horinaka M., Shiraiishi T., Wakada M., Sakai T. 2004. Histone deacetylase inhibitors upregulate death receptor 5/TRAIL-R2 and sensitize apoptosis induced by TRAIL/APO2-L in human malignant tumor cells. *Oncogene.* **23** (37), 6261–6271. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1207830>
  44. Hietakangas V., Poukkula M., Heiskanen K.M., Karvinen J.T., Sistonen L., Eriksson J.E. 2003. Erythroid differentiation sensitizes K562 leukemia cells to TRAIL-induced apoptosis by downregulation of c-FLIP. *Mol. Cell Biol.* **23** (4), 1278–1291. <https://doi.org/10.1128/MCB.23.4.1278-1291.2003>
  45. Mirandola P., Gobbi G., Ponti C., Sponzilli I., Cocco L., Vitale M. 2006. PKCepsilon controls protection against TRAIL in erythroid progenitors. *Blood.* **107** (2), 508–513. <https://doi.org/10.1182/blood-2005-07-2676>
  46. Vitale M., Gobbi G., Mirandola P., Ponti C., Sponzilli I., Rinaldi L., F A Manzoli A.F. 2006. TNF-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL) and erythropoiesis: A role for PKC epsilon. *Eur. J. Histochem.* **50** (1), 15–18.
  47. Secchiero P., Melloni E., Heikinheimo M., Mannisto S., Di Pietro R., Iacone A., Zauli G. 2004. TRAIL regulates normal erythroid maturation through an ERK-dependent pathway. *Blood.* **103** (2), 517–522. <https://doi.org/10.1182/blood-2003-06-2137>
  48. De Maria R., Zeuner A., Eramo A., Domenichelli C., Bonci D., Grignani F., Srinivasula S.M., Alnemri E.S., Testa U., Peschle C. 1999. Negative regulation of erythropoiesis by caspase-mediated cleavage of GATA-1. *Nature.* **401** (6752), 489–493. <https://doi.org/10.1038/46809>
  49. Lafont E. 2020. Stress management: Death receptor signalling and cross-talks with the unfolded protein response in cancer. *Cancers (Basel).* **12** (5), 1113. <https://doi.org/10.3390/cancers12051113>
  50. Jung Y.H., Lim E.J., Heo J., Kwon T.K., Kim Y.H. 2012. Tunicamycin sensitizes human prostate cells to TRAIL-induced apoptosis by upregulation of TRAIL receptors and downregulation of cIAP2. *Int. J. Oncol.* **40** (6), 1941–1948. <https://doi.org/10.3892/ijo.2012.1402>
  51. Glab J.A., Doerflinger M., Nedeva C., Jose I., Mboogo G.W., Paton J.C., Paton W.A., Kueh J.A., Herold J.M., Huang C.D., Segal D., Brumatti G., Puthalakath H. 2017. DR5 and caspase-8 are dispensable in ER stress-induced apoptosis. *Cell Death Differ.* **24** (5), 944–950. <https://doi.org/10.1038/cdd.2017.53>
  52. Yu L., Xie R., Tian T., Zheng L., Tang L., Cai S., Ma Z., Yang T., Han B., Yang Q. 2019. Suberoylanilide hydroxamic acid upregulates histone acetylation and activates endoplasmic reticulum stress to induce apoptosis in HepG2 liver cancer cells. *Oncol. Lett.* **18** (4), 3537–3544. <https://doi.org/10.3892/ol.2019.10705>
  53. Prabhu V.V., Morrow S., Rahman Kawakibi A., Zhou L., Ralff M., Ray J., Jhaveri A., Ferrarini I., Lee Y., Parker C., Zhang Y., Borsuk R., Chang W., Honeyman N.J., Tavora F., Carneiro B., Raufi A., Huntington K., Carlsen L., Louie A., Safran H., Seyhan A.A., Tarapore S.R., Schalop L., Stogniew M., Allen E.J., Oster W., El-Deiry S.W. 2020. ONC201 and imipridones: Anti-cancer compounds with clinical efficacy. *Neoplasia.* **22** (12), 725–744. <https://doi.org/10.1016/j.neo.2020.09.005>
  54. Schuler S., Fritsche P., Diersch S., Arlt A., Schmid R.M., Saur D., Schneider G. 2010. HDAC2 attenuates



- TRAIL-induced apoptosis of pancreatic cancer cells. *Mol. Cancer*. **9**, 80.  
<https://doi.org/10.1186/1476-4598-9-80>
55. Cao H., Cheng Y., You L., Qian J., Qian W. 2013. Homoharringtonine and SAHA synergistically enhance apoptosis in human acute myeloid leukemia cells through upregulation of TRAIL and death receptors. *Mol. Med. Rep.* **7** (6), 1838–1844.  
<https://doi.org/10.3892/mmr.2013.1440>
56. Allen J.E., Crowder R.N., El-Deiry W.S. 2015. First-in-class small molecule ONC201 induces DR5 and cell death in tumor but not normal cells to provide a wide therapeutic index as an anti-cancer agent. *PLoS One*. **10** (11), e0143082.  
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0143082>
57. Zhang Y., Zhou L., Safran H., Borsuk R., Lulla R., Tapinos N., Seyhan A.A., El-Deiry W.S. EZH2i EPZ-6438 and HDACi vorinostat synergize with ONC201/TIC10 to activate integrated stress response, DR5, reduce H3K27 methylation, ClpX and promote apoptosis of multiple tumor types including DIPG. *Neoplasia*. **23** (8), 792–810.  
<https://doi.org/10.1016/j.neo.2021.06.007>

## Myeloid Differentiation Increases Resistance of Leukemic Cells to TRAIL-Induced Death by Reducing the Expression of DR4 and DR5 Receptors

Ya. V. Lomovskaya<sup>1, \*</sup>, M. I. Kobyakova<sup>1</sup>, A. S. Senotov<sup>1</sup>, I. S. Fadeeva<sup>1, 2</sup>, A. I. Lomovsky<sup>1</sup>, K. S. Krasnov<sup>1, 2</sup>, D. Yu. Shtatnova<sup>1, 2</sup>, V. S. Akatov<sup>1, 2</sup>, R. S. Fadeev<sup>1, 2</sup>

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

<sup>2</sup>*The Federal State Budget Educational Institution of Higher Education Pushchino State Institute of Natural Science, Pushchino, Moscow oblast, 142290 Russia*

\*e-mail: [yannalomovskaya@gmail.com](mailto:yannalomovskaya@gmail.com)

Studying the mechanisms of resistance of tumor cells to TRAIL-induced death remains an urgent task, since this cytokine is an important highly selective molecular effector of antitumor immunity. Our work has shown that human leukemia cells THP-1, HL-60, and K562, as a result of induction of myeloid differentiation in them by exogenous factors in vitro in all directions of myelopoiesis, except for erythroid, increase their resistance to TRAIL-induced death by reducing the expression of receptors DR4 and DR5 on the cell surface. It was also found that ONC201, tunicamycin, and SAHA (hydroxamic acid suberoylanilide), capable of inducing an increase in DR5 expression on leukemia cells, suppressed their TRAIL resistance induced by differentiation factors. The results obtained are of interest for the development of drugs and strategies to improve the effectiveness of the treatment of myeloid leukemia.

**Keywords:** leukemic cells, cytokine TRAIL, cell death, myeloid differentiation, resistance

УДК 615.015:616-002.1

## ВЛИЯНИЕ ГИМАНТАНА НА АКТИВНОСТЬ ФОСФОЛИПАЗЫ A2 И УРОВЕНЬ ЦИКЛООКСИГЕНАЗЫ-2 ПРИ ЭКССУДАТИВНОМ ВОСПАЛЕНИИ

© 2022 г. Е. А. Иванова<sup>а, \*</sup>, Н. Н. Золотов<sup>а</sup>, А. И. Матюшкин<sup>а</sup>, Т. А. Воронина<sup>а</sup><sup>а</sup>НИИ фармакологии им. В.В. Закусова, Москва, 125315 Россия

\*e-mail: iwanowaea@yandex.ru

Поступила в редакцию 13.01.2022 г.

После доработки 08.02.2022 г.

Принята к публикации 11.02.2022 г.

Воспаление – защитно-приспособительная реакция организма, многие триггеры и медиаторы которой воздействуют на рецепторы, локализованные на клеточной мембране. Поэтому соединения, изменяющие свойства клеточной мембраны, могут влиять на воспалительный процесс. В проведенном исследовании оценено влияние производного адамантана N-(2-адамантил)-гексаметиленмина гидрохлорида (гимантана) на фосфолипазу A2 (КФ 3.1.1.4., ФЛА2) – фермент, под действием которого из фосфолипидов образуется предшественник простагландинов и лейкотриенов арахидоновая кислота, и циклооксигеназу-2 (КФ 1.14.99.1., ЦОГ-2), под действием которой при воспалении из арахидоновой кислоты образуются провоспалительные простагландины. Установлено, что при остром экссудативном воспалении у мышей гимантан снижает повышенную активность ФЛА2, но не влияет на уровень ЦОГ-2. Мы также показали, что курсовое превентивное применение препарата в течение 10 дней (1 раз в день) как при внутрибрюшинном введении (10 мг/кг), так и на кожном нанесении в лекарственной форме для наружного применения (5% гель) способствует усилению противовоспалительного эффекта гимантана, что может быть обусловлено его влиянием на запуск воспалительного процесса и вследствие этого на активность ФЛА2.

**Ключевые слова:** производные адамантана, гимантан, фосфолипаза A2, циклооксигеназа-2, экссудативное воспаление, мышцы

**DOI:** 10.31857/S0233475522060068

### ВВЕДЕНИЕ

Воспаление является защитно-приспособительной реакцией организма в ответ на повреждение тканей и/или действие патогенного раздражителя. Хотя воспаление направлено на локализацию и уничтожение патогенных факторов, участвующие в воспалительном ответе медиаторы и клетки могут вызвать повреждение здоровых тканей [1, 2]. Многие рецепторы триггеров воспаления (несколько Toll-подобных рецепторов) и медиаторов воспаления (простагландинов, лейкотриенов, интерлейкинов и хемокинов) локализованы на клеточной мембране. Структурно-функциональное состояние мембранно-рецепторных комплексов обеспечивается липидными рафтами [3]. Оказывая действие на фосфолипиды клеточной мембраны, в частности изменяя их жирнокислотный состав, можно влиять на липидные рафты и способность белков перемещаться в плоскости мембраны и, следовательно, на запуск воспалительного процесса [4]. Ряд вторичных мессенджеров, таких как лизофосфоли-

пиды, диацилглицерин и способные проявлять противовоспалительную активность эноканнабиноиды, образуется из фосфолипидов клеточной мембраны, а высвобождаемые из фосфолипидов полиненасыщенные жирные кислоты служат субстратом для циклооксигеназы (ЦОГ), липооксигеназы (ЛОГ) и цитохрома P450. Образующиеся из арахидоновой кислоты под действием ЦОГ и ЛОГ соответственно простагландины и лейкотриены являются хорошо описанными медиаторами воспаления [4].

Соединения, обладающие активностью в отношении клеточных мембран, могут влиять на воспалительную реакцию. Так, производное карбонильного углеводорода адамантана N-(2-адамантил)-гексаметиленмина гидрохлорид (гимантан) проявляет мембранотропные свойства, в частности, повышает заряд мембран эритроцитов [5] и обладает противовоспалительной активностью. Противовоспалительная активность гимантана выявлена на моделях острого экссудативного воспаления как при однократном внутрибрюшинном

введении [6, 7], так и на кожном нанесении в лекарственной форме для наружного применения (5% гель) [8].

Цель данной работы состояла в исследовании способности гимантана влиять на активность фосфолипазы А2 (КФ 3.1.1.4., ФЛА2) и уровень ЦОГ-2 (КФ 1.14.99.1.) при экссудативном воспалении, а также в оценке его действия на вызванный конканавалином А отек лапы у мышей при внутрибрюшинном введении раствора субстанции гимантана и на кожном нанесении гимантана в лекарственной форме для наружного применения при однократном и курсовом (10 дней) применении.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

**Животные.** Использовали половозрелых аутобредных мышей-самцов массой 26–29 г, полученных из питомника лабораторных животных филиала “Столбовая” ФГБУН НЦБМТ ФМБА. Организацию и проведение работ осуществляли в соответствии с ГОСТ 33216–2014 “Руководство по содержанию и уходу за лабораторными животными. Правила содержания и ухода за лабораторными грызунами и кроликами”, ГОСТ 33215–2014 “Руководство по содержанию и уходу за лабораторными животными. Правила оборудования помещений и организации процедур” и Директивой 2010/63/EU Европейского парламента и Совета Европейского союза от 22 сентября 2010 года по охране животных, используемых в научных целях. Проведение экспериментов одобрено Комиссией по биомедицинской этике ФГБНУ “НИИ фармакологии имени В.В. Закусова”.

**Дозы, способы введения.** Гимантан (субстанция) синтезирован и предоставлен химико-технологической лабораторией ФГБНУ “НИИ фармакологии имени В.В. Закусова”; лекарственная форма гимантана для наружного применения (5% гель, состав: гимантан – 2.5 г, гидроксипропилметилцеллюлоза – 1.0 г, нипагин – 0.075 г, нипазол – 0.025 г, диметилсульфоксид – 5.0 г, вода очищенная до 50.0 г) разработана и предоставлена лабораторией готовых лекарственных форм ФГБНУ “НИИ фармакологии имени В.В. Закусова”.

**Модель уксусного перитонита у мышей.** Уксусный перитонит у мышей моделировали путем внутрибрюшинного введения 1% раствора уксусной кислоты (из расчета 1 мл раствора на 100 г массы тела) [9]. Гимантан в дозе 20 мг/кг вводили внутрибрюшинно за 40 мин до индукции воспаления. Также за 40 мин до введения раствора уксусной кислоты мышам контрольных групп – группе пассивного контроля (мышам которой не вводили раствор уксусной кислоты, а вместо него вводили эквивалентный объем растворителя –

физиологического раствора) и группе активного контроля (мышам вводили раствор уксусной кислоты) внутрибрюшинно вводили растворитель – физиологический раствор в объеме 10 мл/кг массы тела. Через 3 ч после введения раствора уксусной кислоты или физиологического раствора мышам подвергали эвтаназии методом цервикальной дислокации и в брюшную полость животных вводили 3 мл натрий-фосфатного буфера (4°C, pH 7.4), делали легкий массаж брюшной стенки и собирали перитонеальную жидкость. Супернатант перитонеальной жидкости получали центрифугированием при 5000 об/мин в течение 15 мин на центрифуге-встряхивателе медицинской СМ-70М-07 с 36-местным универсальным угловым ротором (производитель – ELMi лабораторное оборудование) и до проведения биохимического исследования хранили при температуре –20°C.

**Модель отека, вызванного конканавалином А, у мышей.** Отек лапы у мышей вызывали субплантарным введением (в подушечку задней стопы) раствора конканавалина А (Кон А, Sigma-Aldrich) в дозе 100 мкг/20 г массы тела (концентрация раствора 5 мг/мл), в контралатеральную конечность мышам вводили эквивалентный объем изотонического раствора натрия хлорида [10]. Через 1 ч после введения Кон А мышам подвергали эвтаназии методом цервикальной дислокации, определяли массу задних лап и подсчитывали индекс реакции воспаления ( $I_p$ ) по формуле:

$$I_p = (P_{оп} - P_к) \times 100\% / P_к,$$

где  $P_{оп}$  – масса стопы задней лапы, в подушечку которой вводили Кон А,  $P_к$  – масса стопы задней лапы, в подушечку которой вводили изотонический раствор натрия хлорида.

В ФГБНУ “НИИ фармакологии имени В.В. Закусова” разработана лекарственная форма гимантана для наружного применения, и ее использование у грызунов с моделями экссудативного воспаления лап позволяет оценить действие изучаемого производного адамантана при непосредственном нанесении в область повреждения тканей. Ввиду этого в эксперимент по оценке действия гимантана на выраженность экссудативной воспалительной реакции у мышей с вызванным Кон А отеком лапы включены группы мышей, которым гимантан как вводили внутрибрюшинно, так и наносили в виде лекарственной формы для наружного применения накожно на заднюю лапу животных.

Оценку влияния гимантана при внутрибрюшинном введении и наружном нанесении в виде 5% гелевой лекарственной формы на вызванное Кон А воспаление проводили в двух экспериментах при превентивном применении препарата: однократном или курсовом (10 дней), при кото-

ром последнее применение препарата осуществляли за 1 ч до индукции воспаления. В первом эксперименте изучали противовоспалительное действие гимантана при однократном внутрибрюшинном введении в дозах 10 и 20 мг/кг или при однократном нанесении на лапу 5% геля; во втором опыте гимантан вводили внутрибрюшинно в дозе 10 мг/кг или наносили наружно (5% гель) ежедневно 1 раз в сутки в течение 10 дней. Животным контрольных групп обеих экспериментальных серий внутрибрюшинно вводили физиологический раствор однократно или в течение 10 дней соответственно схеме применения препаратов. В день проведения экспериментов гимантан животным вводили внутрибрюшинно или наносили наружно в виде 5% геля за 1 ч до субплантарного введения раствора Кон А.

**Определение активности фосфолипазы A<sub>2</sub> (ФЛА2) в перитонеальном экссудате.** Определение активности ФЛА2 осуществляли флуориметрически. В качестве субстрата для ФЛА2 использовали умбеллифериларахидонат (Sigma-Aldrich, США). Гидролиз субстрата регистрировали по приросту флуоресценции при 460 нм (возбуждение при 380 нм) на микропланшетном ридере Varioscan LUX (ThermoFisher, США). Интенсивность флуоресценции коррелировала с количеством образующегося 7-гидроксикумарина. Количество гидролизованного субстрата определяли по калибровочной кривой, построенной по стандарту 7-гидроксикумарина. Субстрат готовили, смешивая 0.1 мкМ умбеллифериларахидоната с 0.9 мкМ 1-олеоил-2-стеароил-*sn*-3-фосфохолином в хлороформе. Растворитель удаляли в токе азота. Липидную пленку ресуспендировали до конечной концентрации в 1 мл 10 мМ буферного раствора HEPES (pH 7.0), содержащего 0.1 мМ EDTA, и смесь обрабатывали ультразвуком (22 кГц, ультразвуковой дезинтегратор УЗДН-1 У 4.2 № 242-1974, ТУ 25-05-1375-73, СССР) в течение 3–5 мин. Полученную суспензию разводили в 10 раз перед использованием в 1 мл буфера, содержащего 50 мМ Трис-НСl (pH 8.0), 0.1 мМ EDTA, 1.1 мМ CaCl<sub>2</sub> при 30°C в микропланшетном ридере. Скорость сольволиза умбеллифериларахидоната мониторируют в течение 2–3 мин до начала реакции, которую запускали добавлением 100 мкл перитонеальной жидкости. Скорость ферментативной реакции рассчитывали после вычитания скорости сольволиза. Реакцию останавливали добавлением 5 мМ EGTA, 1 мМ дитиотреитола и 10 мМ глицерина с последующей обработкой ультразвуком [11].

**Определение уровня ЦОГ-2 в перитонеальном экссудате.** Определение уровня ЦОГ-2 в перитонеальном экссудате у мышей осуществляли методом иммуноферментного анализа, используя набор фирмы Calbiochem (CBA053), на микроплан-

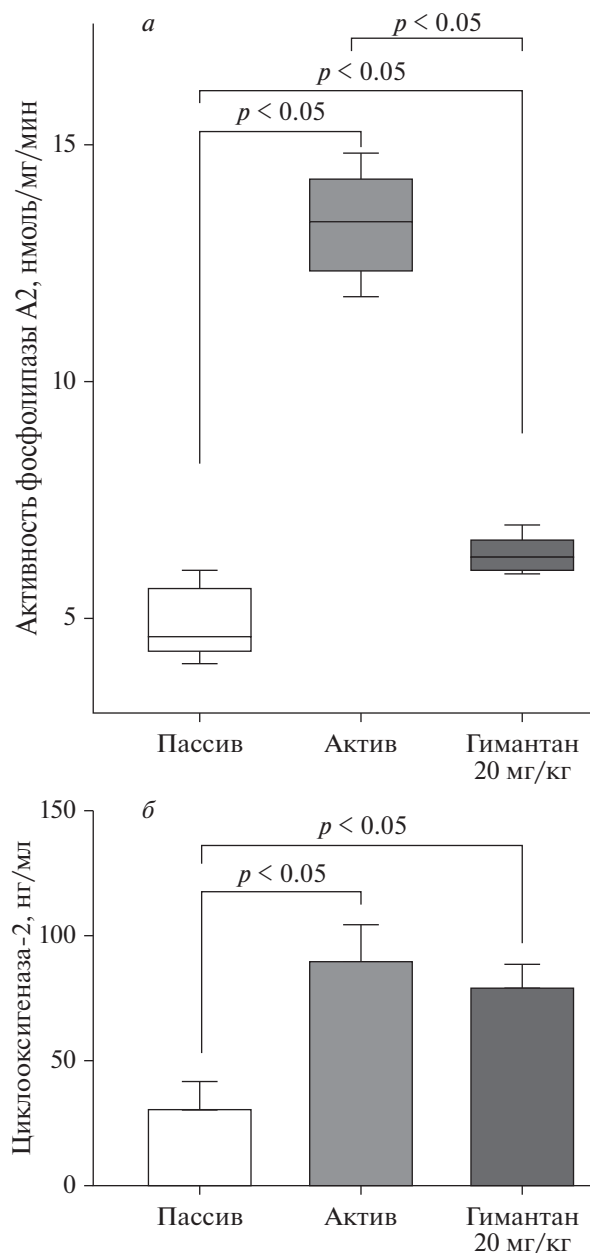
шетном ридере Varioscan LUX (ThermoFisher). Набор фирмы Calbiochem (CBA053) включает в себя 96-гнездный микропланшет, покрытый моноклональными анти-ЦОГ-2 антителами (Sigma-Aldrich), конъюгаты козьего антимышиного IgG, пероксидазу и специальный раствор для остановки реакции. Стандарты и образцы добавляют в ячейки, где ЦОГ-2 связывается с антителами. Добавление субстрата для пероксидазы 5,5'-тетраметилбензидина (Sigma-Aldrich) приводит к образованию синей окраски. Реакцию останавливают специальным раствором, содержащим 0.1 н серную кислоту.

Измеряли оптическую плотность при 450 нм с длиной волны сравнения 595 нм на микропланшетном ридере Varioscan LUX (ThermoFisher). Уровень ЦОГ-2 вычисляли по стандартной кривой, выполненной для стандарта рекомбинантной ЦОГ-2 (Sigma-Aldrich). При определении количества фермента в исследуемых образцах использовали 100 мкл перитонеальной жидкости (приблизительно 2–5 мг/мл общего белка).

**Статистическую обработку результатов** экспериментов проводили с помощью языка программирования R версии 3.5.1 [12]. Нормальность распределения данных проверяли критерием Шапиро–Уилка с последующей оценкой межгруппового равенства дисперсий критерием Бартлетта. При наличии нормального распределения в группах и равенства дисперсий для дальнейшей статистической обработки использовали дисперсионный анализ (ANOVA) и критерий Ньюмена–Кейлса, при их отсутствии – критерий Краскела–Уоллиса и критерий Манна–Уитни. Различия между группами считали статистически значимыми при  $p \leq 0.05$ . Результаты на рисунках представлены в зависимости от использования параметрических или непараметрических методов анализа: в случае применения параметрической статистики – как среднее  $\pm$  стандартное отклонение; в случае анализа непараметрическими методами – в виде боксплотов. Рисунки выполнены с помощью программы GraphPad Prism V. 8.4.3.

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Полученные ранее экспериментальные данные свидетельствуют о том, что гимантан, как и ингибирующие ЦОГ нестероидные противовоспалительные препараты, эффективен на моделях экссудативного воспаления [5–8]. Поэтому в проводимом нами исследовании активность ФЛА2, уровень ЦОГ-2 и влияние гимантана на эти показатели оценивали у мышей с укусным перитонитом – моделью острого экссудативного воспаления, позволяющей получить для анализа достаточный объем биологического материала – перитонеального экссудата. Результаты проведенного эксперимента свидетельствуют о том,



**Рис. 1.** Влияние гимантана на активность фосфолипазы А2 (а) и уровень циклооксигеназы-2 (б) в перитонеальном экссудате мышей с уксусным перитонитом. а – Данные представлены в виде боксплотов (нормальность распределения в группах и/или равенство дисперсий отсутствовали); б – данные представлены в виде среднего значения и стандартного отклонения (нормальное распределение в группах, равенство дисперсий соблюдалось). Пассив – “Пассивная группа”, группа мышей, которым не вводили раствор уксусной кислоты, а вместо него вводили эквивалентный объем растворителя – физиологического раствора. Актив – “Активная группа”, группа мышей, которым внутрибрюшинно вводили 1% раствор уксусной кислоты. Гимантан 20 мг/кг – группа мышей с уксусным перитонитом, которым за 40 мин до его индукции внутрибрюшинно вводили гимантан в дозе 20 мг/кг. В каждой группе по 8 мышей.

что активность ФЛА2 в перитонеальном экссудате мышей группы “Активный контроль”, собранном через 3 ч после внутрибрюшинного введения им раствора уксусной кислоты (время, когда экссудативное воспаление у мышей с этой моделью максимально выражено), возросла в 2.9 раза по сравнению с показателем в группе животных без уксусного перитонита (группа “Пассивный контроль”). Гимантан при внутрибрюшинном введении в эффективной на этой модели дозе 20 мг/кг снижал повышенную при воспалении активность ФЛА2 в 2.1 раза (рис. 1а). Уровень ЦОГ-2 в перитонеальном экссудате мышей с уксусным перитонитом повысился в 2.9 раза, но гимантан не оказал значимого влияния на этот показатель (рис. 1б).

Ранее было установлено, что гимантан в дозе 20 мг/кг (внутрибрюшинно) снижает повышенный при воспалении уровень продуктов свободнорадикального окисления (СРО) липидов, реагирующих с 2-тиобарбитуровой кислотой (ТБК), в перитонеальном экссудате мышей с гликогеновым перитонитом и крыс с уксусным перитонитом [5]. Гимантан снижает экссудативное воспаление у крыс с каррагинановым отеком лапы как при внутрибрюшинном введении в дозе 20 мг/кг, так и при местном нанесении на заднюю лапу в лекарственной форме для наружного применения (5% гель). При этом гимантан в виде 5% геля выражено (на 62%) снижает повышенный уровень ТБК-активных продуктов СРО липидов в гомогенатах мягких тканей лап крыс с каррагинановым отеком, превосходя по этой способности гимантан при внутрибрюшинном введении [8]. Гимантан влияет на уровень ТБК-активных продуктов СРО липидов и в условиях других моделей патологических состояний у животных. Так, он уменьшает повышенный уровень продуктов СРО липидов в структурах головного мозга мышей С57BL/6 с 1-метил-4-фенил-1,2,3,6-тетрагидропиридин-индуцированным паркинсоническим синдромом и аутбредных крыс с 6-гидроксидофамин-индуцированным паркинсоническим синдромом [13]. Кроме того, установлено, что гимантан снижает уровень малонового диальдегида в системе аскорбат-зависимого СРО липидов в гомогенате печени интактных крыс [14].

Выраженность воспалительной реакции зависит не только от уровня и активности ЦОГ, но и от количества ее субстрата арахидоновой кислоты в составе клеточных мембран. Так, установлено, что потребление эйкозапентаеновой и докозагексаеновой кислот приводит к увеличению их содержания в составе фосфолипидов мембран клеток, и это происходит в основном за счет снижения в них арахидоновой кислоты [1]. Хотя эйкозапентаеновая кислота, как и арахидоновая кислота, является субстратом ЦОГ, ЛОГ и цитохрома Р450, из-за структурных различий этих кислот из нее образуются эйкозаноиды, которые зачастую

обладают меньшей биологической активностью, чем продуцируемые из арахидоновой кислоты [15–17]. Кроме того, известно, что эйкозапентаеновая и докозагексаеновая кислоты способны ингибировать метаболизм арахидоновой кислоты и экспрессию ЦОГ-2 [18, 19].

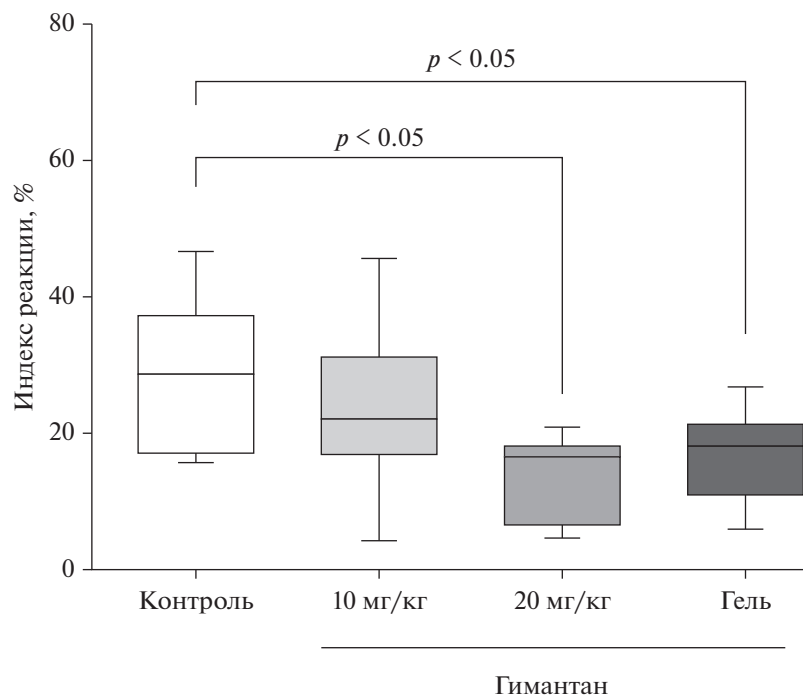
В отсутствие влияния на ЦОГ-2 гимантан снижал повышенную при воспалении активность ФЛА2 в перитонеальном экссудате мышей с укусным перитонитом. Подавлением активности ФЛА2 достигается уменьшение продукции субстрата ЦОГ – арахидоновой кислоты и, соответственно, обеспечивающих развитие воспалительной реакции простагландинов и лейкотриенов [20]. Гимантан является низкоаффинным неконкурентным блокатором NMDA-рецепторов [21, 22], которые локализованы в том числе в энтеральной нервной системе [23, 24] и на лимфоцитах [25–27]. ФЛА2 относится к кальций-зависимым ферментам [28], поэтому способность гимантана влиять на повышенную при воспалении активность ФЛА2 может быть обусловлена снижением входа кальция в клетки за счет блокады NMDA-рецепторов.

Гимантан обладает высокой липофильностью и проявляет мембранотропные свойства [5]. Обладающие мембранотропной активностью соединения могут влиять на воспалительный процесс [4], поэтому представляет интерес изучение влияния гимантана при превентивном однократном и курсовом применении на экссудативное воспаление с целью выявления усиления его противовоспалительного эффекта при курсовом применении. Например, влияние на состав фосфолипидов мембран уже упоминаемых выше эйкозапентаеновой и докозагексаеновой кислот зависит как от дозы, так и от длительности их потребления [4, 29, 30]. Для реализации этой задачи в качестве модели экссудативного воспаления выбрана модель отека лапы у мышей, вызванного субплантарным введением Кон А. Ранее было установлено, что гимантан при однократном внутрибрюшинном введении в дозах 10, 20 и 40 мг/кг снижает выраженность вызванного Кон А отека лапы у мышей и повышенный в их крови уровень интерлейкина 6 (ИЛ-6) [7]. Так как повышение экспрессии ИЛ-6 может происходить за счет ее стимуляции простагландином E2 [31], снижение уровня ИЛ-6 в крови мышей с воспалением после введения им гимантана объясняется влиянием препарата на повышенную при экссудативном воспалении активность ФЛА2, отвечающей за образование предшественника простагландинов – арахидоновой кислоты.

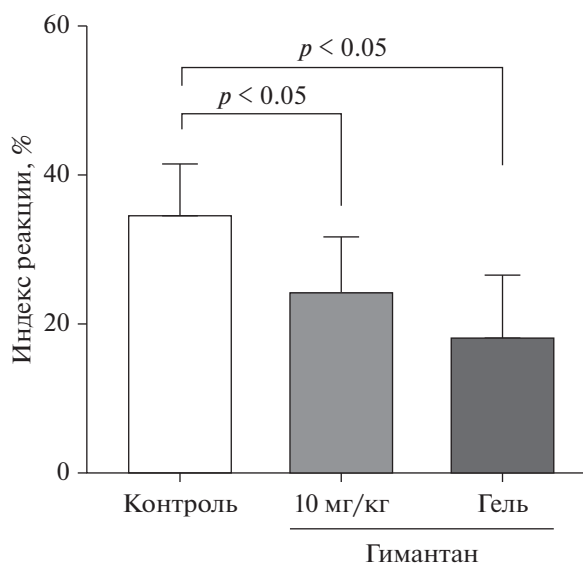
При изучении влияния однократного превентивного применения гимантана на воспаление лапы у мышей установлено, что при внутрибрюшинном введении препарат оказывает дозозави-

симый противовоспалительный эффект. Гимантан в дозе 10 мг/кг значимого влияния на вызванный Кон А отек лапы мышей не оказывал, а в дозе 20 мг/кг подавлял его выраженность на 41.5% по сравнению с контрольной группой животных ( $p < 0.05$ ). Эффективность гимантана в лекарственной форме для наружного применения не отличалась от эффективности препарата при внутрибрюшинном введении в дозе 20 мг/кг: при однократном нанесении 5% геля гимантана выраженность отека снижалась на 36.5% (рис. 2). Ранее было показано, что гимантан при внутрибрюшинном введении в дозе 10 мг/кг способен снижать вызванный Кон А отек лап у мышей линии СВА (масса 18–20 г) [7]. Отсутствие значимого влияния гимантана при внутрибрюшинном введении в дозе 10 мг/кг в этом исследовании мы объясняем тем, что у аутбредных мышей (масса 26–29 г) развилось более выраженное воспаление, чем в проведенном ранее опыте на мышах линии СВА.

Эксперименты по изучению влияния курсового превентивного применения гимантана на выраженность вызванного Кон А отека лап у мышей показали, что у животных контрольной группы развилось более выраженное воспаление, чем у контрольных животных в эксперименте, оценивающим влияние однократного применения препарата. Об этом свидетельствует увеличение индекса реакции воспаления от 28.6 до 34.8 (рис. 2, 3). Несмотря на это, превентивное курсовое (ежедневно, 1 раз в день) внутрибрюшинное введение гимантана в дозе 10 мг/кг в течение 10 дней привело к усилению его антиэкссудативного эффекта по сравнению с однократным введением в этой дозе: препарат значимо снижал выраженность отека лапы у мышей на 29.5% по сравнению с контрольной группой. При курсовом превентивном применении гимантана в лекарственной форме для наружного применения было зафиксировано более выраженное снижение воспаления лапы у мышей – на 47.2% по сравнению с контрольной группой, что мы связываем с большей концентрацией действующего вещества в зоне повреждения тканей (рис. 3). Известно, что NMDA-рецепторы расположены на немиелинизированных аксонах в области дермоэпидермального соединения [32], и при воспалении количество сенсорных аксонов, на которых локализованы ионотропные глутаматные рецепторы, увеличивается [33]. Кроме того, установлено, что при воспалении усиление чувствительности к механическим и тепловым раздражителям обусловлено повышением активности NMDA-рецепторов [34]. Поэтому противовоспалительный эффект гимантана при вызванном Кон А отеке лап мышей, более выраженный при нанесении гимантана в лекарственной форме для наружного применения, вероятно, в том числе объясняется снижением повышенной при воспалении активности ФЛА2



**Рис. 2.** Влияние гимантана при однократном внутривнутрибрюшинном введении и наружном нанесении гелевой лекарственной формы на заднюю конечность на вызванный конканавалином А отек стопы у мышей. Контроль — группа мышей с вызванным конканавалином А отеком стопы. В каждой группе 11–12 животных. Индекс реакции (%) рассчитывали по формуле, приведенной в разделе “Материалы и методы”. Данные представлены в виде боксплотов (нормальность распределения в группах и/или равенство дисперсий отсутствовали).



**Рис. 3.** Влияние гимантана при внутривнутрибрюшинном введении и наружном нанесении гелевой лекарственной формы на заднюю конечность в течение 10 дней на вызванный конканавалином А отек стопы у мышей. Контроль — группа мышей с вызванным конканавалином А отеком стопы. В каждой группе 11–12 животных. Индекс реакции (%) рассчитывали по формуле, приведенной в разделе “Материалы и методы”. Данные представлены в виде среднего значения и стандартного отклонения (нормальное распределение в группах, равенство дисперсий соблюдалось).

вследствие уменьшения поступления кальция в клетки поврежденных тканей при блокаде гимантаном NMDA-рецепторов.

Таким образом, результаты экспериментов по оценке влияния превентивного однократного и курсового применения гимантана при внутривнутрибрюшинном введении и наружном нанесении в лекарственной форме для наружного применения на острое экссудативное воспаление свидетельствуют о том, что курсовое превентивное применение препарата способствует усилению его противовоспалительного эффекта.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Оценено влияние производного адамантана N-(2-адамантил)-гексаметиленмина гидрохлорида (гимантана) на повышенные при остром экссудативном воспалении активность фосфолипазы A2 и уровень циклооксигеназы-2 у мышей. Установлено, что гимантан не влияет на повышенный при воспалении уровень циклооксигеназы-2, но снижает повышенную активность фосфолипазы A2. Зарегистрированное в проведенном исследовании влияние гимантана на активность фосфолипазы A2 расширяет представление о его механизме действия. Наряду с этим изучено противовоспалительное действие гимантана при однократном и курсовом превентивном применении.

нии на выраженность острого экссудативного воспаления лап у мышей. Установлено, что курсовое превентивное применение препарата в течение 10 дней (1 раз в день) как при внутрибрюшинном введении, так и на кожном нанесении в лекарственной форме для наружного применения способствует усилению его противовоспалительного эффекта.

**Конфликт интересов.** Авторы декларируют отсутствие явных и потенциальных конфликтов интересов, связанных с публикацией настоящей статьи.

**Источники финансирования.** Работа выполнена в рамках Госзадания по теме № 0521-2019-0007.

**Соответствие принципам этики.** Все применимые международные принципы ухода и использования животных были соблюдены. Проведение экспериментов одобрено Комиссией по биомедицинской этике ФГБНУ “НИИ фармакологии имени В.В. Закусова”.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Calder P.C., Albers R., Antoine J.-M., Blum S., Bourdet-Sicard R., Ferns G.A., Folkerts G., Friedmann P.S., Frost G.S., Guarner F., Løvik M., Macfarlane S., Meyer P. D., M'Rabet L., Serafini M., van Eden W., van Loo J., Vas Dias W., Vidry S., Winklhofer-Roob B.M., Zhao J. 2009. Inflammatory disease processes and interactions with nutrition. *Br. J. Nutr.* **101** (Suppl. 1), S1–S45.
2. Calder P.C., Ahluwalia N., Albers R., Bosco N., Bourdet-Sicard R., Haller D., Holgate S.T., Jönsson L.S., Latulippe M.E., Marcos A., Moreines J., M'Rini C., Müller M., Pawelec G., van Neerven R.J.J., Watzl B., Zhao J. 2013. A consideration of biomarkers to be used for evaluation of inflammation in human nutritional studies. *Br. J. Nutr.* **109** (Suppl. 1), S1–S34.
3. Sviridov D., Mukhamedova N., Miller Y. I. 2020. Lipid rafts as a therapeutic target. *J. Lipid. Res.* **61** (5), 687–695.
4. Calder P. 2020. N-3 PUFA and inflammation: From membrane to nucleus and from bench to bedside. *Proc. Nutr. Soc.* **79** (4), 404–416.
5. Матюшкин А.И., Иванова Е.А., Золотов Н.Н., Воронина Т.А. 2019. Мембранотропные и антиоксидантные свойства гимантана. *Эксперим. и клин. фармакол.* **82** (4), 28–31.
6. Иванова Е.А., Капица И.Г., Непоклонов А.В., Кокшенев И.И., Вальдман Е.А., Воронина Т.А. 2013. Противовоспалительная активность гимантана на моделях периферического воспаления и нейровоспаления, индуцированного липополисахаридом. *Хим.-фарм. журн.* **47** (10), 12–15.
7. Таллерова А.В., Иванова Е.А., Капица И.Г., Коваленко Л.П., Вальдман Е.А., Воронина Т.А. 2013. Влияние противопаркинсонического препарата гимантан на уровень цитокинов в эксперименте. *Иммунология.* **34** (5), 254–257.
8. Матюшкин А.И., Иванова Е.А., Золотов Н.Н., Воронина Т.А. 2020. Противовоспалительные свойства гимантана в лекарственной форме для наружного применения на моделях каррагенанового и декстрансульфатного отеков у крыс. *Эксперим. клин. фармакол.* **83** (5), 29–32.
9. Шварц Г.Я., Сюбаев Р.Д. 2012. Методические рекомендации по изучению нестероидных противовоспалительных лекарственных средств. В кн: *Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных средств*. Под общ. ред. Миронова А.Н. Часть 1. М.: Гриф и К, с. 746–758.
10. Коваленко Л.П., Федосеева В.Н., Дурнев А.Д., Иванова А.С., Мастернак Т.Б., Миронов А.Н., Арзамасцев Е.В., Гуськова Т.А., Жоголева И.Б., Верстакова О.Л., Радченко Л.У. 2012. Методические рекомендации по изучению аллергизирующих свойств лекарственных средств. В кн: *Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных средств*. Под общ. ред. Миронова А.Н. Часть 1. М.: Гриф и К, с. 51–63.
11. Huang Z., Laliberté F., Tremblay N.M., Weech P.K., Street I. P. 1994. Continuous fluorescence-based assay for the human high-molecular-weight cytosolic phospholipase A2. *Anal. Biochem.* **222** (1), 110–115.
12. Chan V.K.C. 2018. Data analysis using R programming. *Adv. Exp. Med. Biol.* **1082**, 47–122.
13. Иванова Е.А., Капица И.Г., Золотов Н.Н., Вальдман Е.А., Непоклонов А.В., Колясникова К.Н., Воронина Т.А. 2016. Влияние гимантана на уровень продуктов перекисного окисления липидов в головном мозге при экспериментальном паркинсоническом синдроме. *Фармакокинетика и фармакодинамика.* **3**, 9–12.
14. Вальдман Е.А. Разработка фармакологического средства патогенетической терапии паркинсонизма на основе анализа механизмов действия производных аминокислот. Дис. ... докт. мед. наук. М.: НИИ фармакологии РАМН, 2001.
15. Goldman D.W., Pickett W.C., Goetzl E.J. 1983. Human neutrophil chemotactic and degranulating activities of leukotriene B5 (LTB5) derived from eicosapentaenoic acid. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **117** (1), 282–288.
16. Lee T.H., Mencia-Huerta J.-M., Shih C., Corey E.J., Lewis R.A., Austen K.F. 1984. Characterization and biological properties of 5,12-dihydroxy derivatives of eicosapentaenoic acid, including leukotriene-B5 and the double lipoxygenase product. *J. Biol. Chem.* **259** (4), 2383–2389.
17. Bagga D., Wang L., Farias-Eisner R., Glaspy J.A., Reddy S.T. 2003. Differential effects of prostaglandin derived from ω-6 and ω-3 polyunsaturated fatty acids on COX-2 expression and IL-6 secretion. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **100** (4), 1751–1756.
18. Lee S.A., Kim H.J., Chang K.C., Baek J.C., Park J.K., Shin J.K., Choi W.J., Lee J.H., Paik W.Y. 2009. DHA and EPA down-regulate COX-2 expression through suppression of NF-κB activity in LPS-treated human umbilical vein endothelial cells. *Korean J. Physiol. Pharmacol.* **13** (4), 301–307.
19. Baker E.J., Valenzuela C.A., De Souza C.O., Yaqoob P., Miles E.A., Calder P.C. 2020. Comparative anti-inflammatory effects of plant- and marine-derived omega-3 fatty acids explored in an endothelial cell line. *Bio-*



- chim. Biophys. Acta Mol. Cell Biol. Lipids.* **1865** (6), 158662.
20. Murakami M., Nakatani Y., Atsumi G.I., Inoue K., Kudo I. 2017. Regulatory functions of phospholipase A2. *Crit. Rev. Immunol.* **37** (2–6), 127–195.
  21. Елшанская М.В., Соболевский А.И., Вальдман Е.А., Ходоров Б.И. 2001. *Эксперим. клин. фармакол.* **64** (1), 18–21.
  22. Воронина Н.А., Лисина О.Ю., Красильникова И.А., Кучеряну В.Г., Капица И.Г., Воронина Т.А., Сурин А.М. 2021. Влияние гимантана на изменения  $Ca^{2+}$  и  $Na^{+}$ , вызванные активацией NMDA-каналов в культивируемых нейронах мозга крысы. *Нейрохимия.* **8** (1), 3–13.
  23. Suckow S.K., Caudle R.M. 2009. NMDA receptor subunit expression and PAR2 receptor activation in colospinal afferent neurons (CANs) during inflammation induced visceral hypersensitivity. *Mol. Pain.* **5**, 54.
  24. Golovynska I., Beregova T.V., Falalyeyeva T.M., Stepanova L.L., Golovynskiy S., Qu J., Ohulchanskyi T.Y. 2018. Peripheral N-methyl-D-aspartate receptor localization and role in gastric acid secretion regulation: Immunofluorescence and pharmacological studies. *Sci. Rep.*, **8**, 7445.
  25. Boldyrev A.A., Kazey V.I., Leinsoo T.A., Mashkina A.P., Tyulina O.V., Johnson P., Tuneva J.O., Chittur S., Carpenter D.O. 2004. Rodent lymphocytes express functionally active glutamate receptors. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **324** (1), 133–139.
  26. Miglio G., Varsaldi F., Lombardi G. 2005. Human T lymphocytes express N-methyl-D-aspartate receptors functionally active in controlling T cell activation. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **338** (4), 1875–1883.
  27. Orihara K., Odemuyiwa S.O., Stefura W.P., Iarraza R., HayGlass K.T., Moqbel R. 2017. Neurotransmitter signaling via NMDA receptors leads to decreased T helper type 1-like and enhanced T helper type 2-like immune balance in humans. *Immunology.* **153** (3), 368–379.
  28. Murakami M., Kudo I. 2002. Phospholipase A2. *J. Biochem.* **131** (3), 285–292.
  29. Browning L.M., Walker C.G., Mander A.P., West A.L., Madden J., Gambell J.M., Young S., Wang L., Jebb S.A., Calder P.C. 2012. Incorporation of eicosapentaenoic and docosahexaenoic acids into lipid pools when given as supplements providing doses equivalent to typical intakes of oily fish. *Am. J. Clin. Nutr.* **96** (4), 748–758.
  30. Rees D., Miles E.A., Banerjee T., Wells S.J., Roynette C.E., Wahle K.W., Calder P.C. 2006. Dose-related effects of eicosapentaenoic acid on innate immune function in healthy humans: A comparison of young and older men. *Am. J. Clin. Nutr.* **83** (2), 331–342.
  31. Cho J.-S., Han I.-H., Lee H.R., Lee H.-M. 2014. Prostaglandin E2 induces IL-6 and IL-8 production by the EP receptors/Akt/NF- $\kappa$ B pathways in nasal polyp-derived fibroblasts. *Allergy Asthma Immunol. Res.* **6** (5), 449–457.
  32. Coggeshall R.E., Carlton S.M. 1998. Ultrastructural analysis of NMDA, AMPA, and kainate receptors on unmyelinated and myelinated axons in the periphery. *J. Comp. Neurol.* **391** (1), 78–86.
  33. Carlton S.M., Coggeshall R.E. 1999. Inflammation-induced changes in peripheral glutamate receptor populations. *Brain Res.* **820** (1–2), 63–70.
  34. Du J., Zhou S., Coggeshall R.E., Carlton S.M. 2003. N-methyl-D-aspartate-induced excitation and sensitization of normal and inflamed nociceptors. *Neuroscience.* **118** (2), 547–562.

## Effect of Hemantane on Phospholipase A2 Activity and Cyclooxygenase-2 Level in Exudative Inflammation

E. A. Ivanova<sup>1, \*</sup>, N. N. Zolotov<sup>1</sup>, A. I. Matyushkin<sup>1</sup>, T. A. Voronina<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Research Zakusov Institute of Pharmacology, Moscow, 125315 Russia

\*e-mail: iwanowaea@yandex.ru

Inflammation is a protective and adaptive reaction, and many triggers and mediators of inflammation act on receptors localized on the cell membrane. Therefore, factors affecting the cell membrane can disrupt pro-inflammatory signaling. Previously we found that an adamantane derivative, N-(2-adamantyl)-hexamethyleneimine hydrochloride (hemantane), has membranotropic and anti-inflammatory effects. In this study we evaluate the effect of hemantane on phospholipase A2 (EC 3.1.1.4., PLA2), an enzyme that converts phospholipids to arachidonic acid, precursor of prostaglandins, and on cyclooxygenase-2 (EC 1.14.99.1., COX-2), which produces pro-inflammatory prostaglandins from arachidonic acid during inflammation. We found that in acute exudative inflammation in mice, hemantane reduces increased PLA2 activity but does not affect the level of COX-2. Based on the hypothesis that compounds with membranotropic activity can affect inflammatory signaling, we evaluated the effect of a preventive course and a single dose of hemantane on the severity of exudative inflammation in order to determine whether its anti-inflammatory effect is enhanced when administered as a course. A preventive course of the drug administered over 10 days (once daily) either intraperitoneally (10 mg/kg) or by cutaneous application as a topical dosage form (5% gel) was found to enhance its anti-inflammatory effect, which may be due to its effects on the initiation of inflammatory signaling and, consequently, on the activity of PLA2.

**Keywords:** adamantane derivatives, hemantane, phospholipase A2, cyclooxygenase-2, exudative inflammation, mice

УДК 612.014.464:577(115.3+151+352.38):57.085.1:616-006

## ДЕЙСТВИЕ ОЗОНА НА ЖИРНОКИСЛОТНЫЙ СОСТАВ И СВОБОДНОРАДИКАЛЬНУЮ АКТИВНОСТЬ В ТКАНЯХ КРЫС ПРИ ОПУХОЛЕВОМ РОСТЕ

© 2022 г. Т. П. Кулагина<sup>a, \*</sup>, Е. С. Жукова<sup>b</sup>, А. В. Ариповский<sup>c</sup>,  
Т. Г. Щербатюк<sup>b, d</sup>, А. Б. Гапеев<sup>a</sup>

<sup>a</sup>Институт биофизики клетки РАН, ФИЦ ПНЦБИ РАН, Пущино,  
Московская обл., 142290 Россия

<sup>b</sup>«Нижегородский научно-исследовательский институт гигиены и профпатологии» Роспотребнадзора,  
г. Нижний Новгород, 603005 Россия

<sup>c</sup>Научно-производственная компания «А-БИО»,  
Пущино, Московская обл., 142290 Россия

<sup>d</sup>Пущинский государственный естественно-научный институт,  
Пущино, Московская обл., 142290 Россия

\*e-mail: tpkulagina@rambler.ru

Поступила в редакцию 04.06.2022 г.

После доработки 19.07.2022 г.

Принята к публикации 21.07.2022 г.

Исследовано влияние озонированного физиологического раствора (ОФР) с концентрацией озона в озono-кислородной смеси 400 мкг/л, вводимого внутривенно крысам-самцам стока *Sprague Dawley*, на жирнокислотный состав тимуса, плазмы крови, печени и холангиокарциномы РС-1. Обнаружено, что воздействие ОФР на интактных зрелых животных приводит к достоверному увеличению содержания олеиновой кислоты, суммарного количества мононенасыщенных и полиненасыщенных жирных кислот, а также общего количества жирных кислот в тканях тимуса. Воздействие ОФР на опухоленосителей вызывало увеличение содержания насыщенных и полиненасыщенных жирных кислот, а также увеличение количества полиненасыщенной линолевой кислоты в тканях тимуса. В плазме крови опухоленосителей увеличивалось содержание докозагексаеновой кислоты, сопровождавшееся снижением количества пальмитиновой и пальмитолеиновой кислот. После воздействия на опухоленосителей ОФР количество докозагексаеновой кислоты снижалось до уровня интактных животных. Изменений количества жирных кислот в печени и опухолевой ткани не происходило ни в одном варианте исследования. Наличие опухоли у животных приводило к снижению активности каталазы в печени. Воздействие ОФР приводило к еще большему снижению активности каталазы в печени интактных животных и опухоленосителей. Количество малонового диальдегида увеличивалось в эритроцитах животных с опухолью и после воздействия на них ОФР. В печени количество малонового диальдегида снижалось после воздействия ОФР на опухоленосителей. Предполагается, что воздействие ОФР, как и развитие опухоли, запускают стресс-индуцированные тканеспецифичные реакции в организме крыс, вызывая изменения жирнокислотного состава и активности антиоксидантных ферментов.

**Ключевые слова:** опухоль, озон, жирные кислоты, антиоксидантные ферменты, малоновый диальдегид

DOI: 10.31857/S0233475522060093

### ВВЕДЕНИЕ

Поиск методов и подходов для лечения онкологических заболеваний остается важнейшей проблемой биологии и медицины. Поэтому поиск противоопухолевых соединений, не оказывающих тяжелых побочных эффектов, возникающих при радио- и химиотерапии, является важной задачей. Общей чертой опухолевых клеток является их способность переориентировать метабо-

лизм для поддержания энергетического и пластического гомеостаза, направленного на рост, деление и выживание. Особый интерес представляет исследование метаболизма жирных кислот (ЖК) при онкогенезе, поскольку помимо своей главной роли в качестве структурных компонентов мембран, ЖК являются важными вторичными мессенджерами, а также служат источниками энергии [1]. Трансформированные опухолевые клетки

с различной степенью злокачественности имеют различающиеся липидные профили и различную чувствительность к окислительному стрессу, в том числе к перекисному окислению липидов (ПОЛ) [2]. Активные формы кислорода (АФК) играют важную роль в качестве сигнальных и регуляторных молекул на физиологическом уровне в зависимости от их концентрации в тканях [3–5]. Чувствительность опухолевых клеток к повышенному содержанию АФК может быть использована для нарушения клеточных механизмов самоадаптации и индукции гибели опухоли [6, 7]. В связи с обнадеживающими результатами озонотерапии и терапии монооксидом азота в лечении пациентов с COVID-19 [8] возрастает мотивация к широкому использованию медицинских газов и интерес к изучению механизмов их действия. Ранее было показано, что озонированный физиологический раствор (ОФР) избирательно влияет на организм и опухоль в зависимости от сроков роста опухоли и концентрации озона в озono-кислородной смеси [9]. Озон, являясь мощным окислителем, влияет на про-антиоксидантный баланс организма [9].

Целью работы является определение жирнокислотного состава, содержания малонового диальдегида (МДА), активности антиоксидантных ферментов супероксиддисмутазы (СОД) и каталазы в органах и тканях животных при опухолевом росте и при воздействии на животных опухоленосителей озона в виде ОФР. Определение изменений ЖК при действии озона в комплексе с другими параметрами (содержание МДА, активность антиоксидантных ферментов) составляет новизну настоящего исследования.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

**Подготовка животных.** В исследованиях использовали аутбредных крыс-самцов стока *Sprague Dawley* в возрасте 3–8 месяцев. Животные содержались в стандартных условиях вивария с естественным освещением при свободном доступе к полнорационному корму и питьевой воде. Животные были разделены на 4 группы ( $n \geq 7$ ): “интактные”, “интактные + ОФР”, “опухоленосители”, “опухоленосители + ОФР”. В качестве модели неоплазии использовали холангиоцеллюлярный рак РС-1 (коллекция ФГБУ “Национальный медицинский исследовательский центр онкологии им. Н.Н. Блохина” Минздрава России, г. Москва). Опухоль для инокуляции брали на 14-е сутки развития. Перевивку проводили 25% взвесью клеток опухоли в растворе Хенкса (ПанЭко, Россия), прививочная доза составила 100 мг на крысу. Инокулом карциномы РС-1 вводили в мышцы голени крысы так, чтобы опухолевые узлы развивались в бассейне кровоснабжения бедренной артерии [10]. После перевивки наблюдали за ростом опухоли, в опыт отбирали

крыс с развившимися опухолями, достигшими среднего объема 3–5 см<sup>3</sup>.

Действие озона осуществляли введением ОФР в течение 10 суток (5 воздействий через сутки) интактным животным или опухоленосителям, начиная с 10-х суток после перевивки опухолевого штамма [11]. Внутривентриально вводили по 0.5 мл ОФР (сразу после барботирования изотонического 0.9% раствора хлорида натрия (Мосфарм, Россия) озono-кислородной смесью) с концентрацией озона в озono-кислородной смеси 400 мкг/л, получаемой с помощью медицинского озонатора “ТЕОЗОН” (РФЯЦ ВНИИЭФ, Россия), как описано ранее [11].

**Подготовка препаратов.** Забор образцов крови, тканей тимуса, печени и опухолевого узла для исследования проводили, как описано ранее [12]. Контролем служили аналогичные образцы тканей интактных животных. Образцы тканей промывали в охлажденном во льду изотоническом 0.9% растворе хлорида натрия, гомогенизировали в этом же растворе, отбирали образцы для определения жирнокислотного состава. В качестве антикоагулянта при заборе крови (~5 мл) использовали 200 мкл 10% раствора EDTA (PanReas AppliChem, Испания). Плазму крови получали осаждением форменных элементов крови при 1000g. Количество МДА определяли в эритроцитах, плазме крови, тканях печени и опухоли по содержанию тиобарбитуровой [11]. Активность СОД и каталазы определяли в эритроцитах, ткани печени и опухоли по реакции восстановления нитросинего тетразолия (Диаэм, Россия) и на основе изменения оптической плотности в области поглощения пероксида водорода [11]. Активность ферментов выражали в единицах активности на 1 г гемоглобина (Hb) или ткани. Содержание гемоглобина в эритроцитах определяли гемиглобинцианидным методом с помощью коммерческого диагностического набора “Гемоглобин Агат” (Агат-Мед, Россия).

**Определение жирнокислотного состава.** Суммарное количество (свободных и этерифицированных) ЖК в образцах тканей определяли методом газовой хроматографии на аналитическом газовом хроматографе GC 3900 (Varian, США), как описано ранее [12]. Для дериватизации 100 мкл образца помещали в стандартные пробирки для работы под давлением, добавляли 100 мкл раствора внутреннего стандарта в метаноле (маргаиновая кислота, 320 мкг/мл) и высушивали в ротационно-вакуумном концентраторе (Savant Instruments, США) при комнатной температуре в течение 30–60 мин. Сапонификацию и метилирование проводили в термоблоке (Lab Line, США). Экстрагированные в гексановую фазу метиловые эфиры жирных кислот определяли методом газовой хроматографии на аналитическом га-

зовом хроматографе GC 3900 с пламенно-ионизационным детектором (температура детектора 260°C). Для разделения метиловых эфиров жирных кислот использовали кварцевую капиллярную колонку (15 м × 0.25 мм × 0.3 мкм) с привитой неподвижной фазой SupelcoWax10 (Supelco, США). Концентрацию индивидуальных ЖК в образцах определяли с использованием внутреннего стандарта (с предварительным вычислением соответствующих калибровочных коэффициентов из хроматограмм смеси определяемых ЖК с маргариновой кислотой (C17:0) (Sigma, США).

**Статистическая обработка.** Все эксперименты выполнены по протоколу “слепого контроля”, когда экспериментатор, проводивший измерения, не знал, какие воздействия были использованы. Статистический анализ проводили с использованием однофакторного дисперсионного анализа (ANOVA) и критерия множественного сравнения Стьюдента–Ньюмена–Кейлса при нормальном распределении данных по тесту Колмогорова–Смирнова. Для парного сравнения групп данных использовали *t*-критерий Стьюдента ( $p < 0.05$ ).

## РЕЗУЛЬТАТЫ

Масса экспериментальных животных достоверно не изменялась во всех группах в течение всего периода исследования и к концу экспериментов в среднем составила 472 г. Воздействие ОФР не влияло на массу тимусов интактных животных (табл. 1). Наличие опухоли достоверно снижало массу тимусов крыс. Однако воздействии ОФР не оказывало влияния на массу тимусов у опухоленосителей (табл. 1). Сравнение жирнокислотного состава в тимусе у интактных молодых и интактных зрелых животных выявило достоверное увеличение количества ЖК с возрастом ( $p < 0.05$  по *t*-критерию Стьюдента) (табл. 1). Воздействие ОФР на интактных зрелых животных привело к достоверному увеличению содержания олеиновой кислоты, суммарного количества мононенасыщенных ЖК (МНЖК: пальмитолеиновая + олеиновая + вакценовая + эйкозеновая) и полиненасыщенных ЖК (ПНЖК: линолевая + эйкозодиеновая + дигомо-γ-линоленовая + арахиноновая + докозагексаеновая), а также общего количества ЖК в тканях тимуса. Наличие опухоли индуцировало увеличение всех классов ЖК в тканях тимуса. Возрастало количество устойчивых к перекисному окислению насыщенных ЖК (НЖК) и МНЖК – пальмитиновой, стеариновой и олеиновой кислот. Воздействие ОФР на опухоленосителей вызывало дополнительное увеличение содержания этих ЖК. Наблюдалось преимущественное увеличение НЖК и МНЖК, а также увеличение количества полиненасыщенной линолевой кислоты в тканях тимуса (табл. 1).

После воздействия на интактных животных ОФР не обнаружено достоверных изменений количества ЖК в плазме крови (табл. 2). Однако в плазме крови опухоленосителей и после воздействия на них ОФР происходило снижение содержания пальмитиновой и пальмитолеиновой кислот, а также увеличение количества докозагексаеновой кислоты (табл. 2).

В табл. 3 представлены данные по жирнокислотному составу ткани печени интактных животных и опухолевой ткани животных-опухоленосителей. В печени крыс не обнаружено изменений жирнокислотного состава при опухолевом росте. При воздействии ОФР на интактных животных и опухоленосителей количество ЖК также не изменялось. ОФР не влиял на количество ЖК в опухолевой ткани, где суммарное количество НЖК и МНЖК, устойчивых к перекисному окислению, практически в 2 раза превышало суммарное количество ПНЖК (табл. 3).

Контролем ПОЛ и окислительного стресса служило количество МДА в исследованных тканях. Количество МДА достоверно возрастало в эритроцитах животных-опухоленосителей и после воздействия на них ОФР (табл. 4). В печени опухоленосителей после воздействия на них ОФР происходило снижение количества МДА (табл. 4). Определение активности СОД в эритроцитах, печени и опухолевом узле не выявило изменений ее активности ни в одной из экспериментальных групп (табл. 5). Однако происходило достоверное снижение активности каталазы в печени животных и в опухолевой ткани после воздействия ОФР (табл. 5).

## ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Тимус является центральным органом иммунной системы, обеспечивающим Т-клеточный иммунитет [13]. Обнаружено, что тимус у крыс в возрасте 1 месяца был менее чувствителен к АФК, чем у крыс в возрасте от 3 до 7 месяцев [14]. Эта чувствительность коррелировала с количеством ПНЖК и антиоксидантов в тимусе. Возрастная инволюция тимуса сопровождается снижением количества тимоцитов и замещением ткани тимуса жировой тканью [15, 16]. Вероятно, наличие опухоли в организме крыс потенцирует процесс инволюции тимуса, о чем свидетельствует достоверное снижение его массы по сравнению с интактными животными (табл. 1). Увеличение жировой ткани в тимусе, по-видимому, объясняет повышение количества ЖК в тимусе опухоленосителей (табл. 1). Полагают, что окислительный стресс способствует атрофии тимуса [17]. Увеличение устойчивой к перекисному окислению олеиновой кислоты в тимусе при воздействии ОФР на интактных животных (табл. 1) может быть обусловлено ее защитным действием от АФК. В экс-

**Таблица 1.** Жирнокислотный состав (в мкг/мг ткани) и масса тимусов 3- и 8-месячных крыс в норме и после воздействия на 8-месячных крыс ОФР

Жирная кислота	Интактные			Опухоленосители	
	3 мес.	8 мес.	8 мес. + ОФР	8 мес.	8 мес. + ОФР
Пальмитиновая (C16:0)	1.95 ± 0.11	2.65 ± 0.24 <sup>a</sup>	3.36 ± 0.15	4.14 ± 0.42*	6.00 ± 0.84* <sup>^#</sup>
Стеариновая (C18:0)	1.05 ± 0.04	1.51 ± 0.10 <sup>a</sup>	0.95 ± 0.06	2.23 ± 0.25*	2.43 ± 0.29* <sup>^#</sup>
Пальмитолеиновая (C16:1, n-7)	0.20 ± 0.02	0.25 ± 0.06	0.41 ± 0.03	0.46 ± 0.08	1.10 ± 0.26*
Олеиновая (C18:1, n-9)	1.31 ± 0.12	2.33 ± 0.34 <sup>a</sup>	4.21 ± 0.26*	4.56 ± 0.65*	7.58 ± 0.93* <sup>^#</sup>
Вакценовая (C18:1, n-7)	0.30 ± 0.01	Следовые количества			
Эйкозеновая (C20:1, n-9)	0.092 ± 0.005	Следовые количества			
Линолевая (C18:2, n-6)	0.83 ± 0.07	1.31 ± 0.21	1.93 ± 0.16	3.21 ± 0.73	5.77 ± 1.27* <sup>^#</sup>
Эйкозодиеновая (C20:2, n-6)	0.105 ± 0.004	Следовые количества			
Дигомо-γ-линоленовая (C20:3, n-6)	0.070 ± 0.009	Следовые количества			
Арахидоновая (C20:4, n-6)	1.33 ± 0.05	1.80 ± 0.03 <sup>a</sup>	2.03 ± 0.03	1.95 ± 0.17	1.96 ± 0.19
Докозагексаеновая (C22:6, n-3)	0.23 ± 0.01	0.41 ± 0.05 <sup>a</sup>	0.36 ± 0.04	0.55 ± 0.07	0.55 ± 0.08
НЖК	3.01 ± 0.14	4.16 ± 0.32 <sup>a</sup>	4.31 ± 0.17	6.37 ± 0.59*	8.43 ± 1.08* <sup>^#</sup>
МНЖК	1.91 ± 0.15	2.47 ± 0.41	4.62 ± 0.29*	5.02 ± 0.72*	8.68 ± 1.50* <sup>^#</sup>
ПНЖК	2.57 ± 0.12	3.52 ± 0.26 <sup>a</sup>	4.32 ± 0.17*	5.71 ± 0.76*	8.28 ± 1.10* <sup>^#</sup>
Сумма	7.49 ± 0.40	10.15 ± 0.98 <sup>a</sup>	13.25 ± 0.59*	17.10 ± 2.00*	25.39 ± 3.55* <sup>^#</sup>
Масса тимусов, мг	465 ± 21*	338 ± 14	327 ± 18	239 ± 30*	243 ± 30*

Примечание. Представлены средние значения и величины стандартных ошибок.

<sup>a</sup> $p < 0.05$  по сравнению с группой интактных крыс возрастом 3 мес. по  $t$ -критерию Стьюдента; \* $p < 0.03$  по сравнению с группой интактных крыс возрастом 8 мес., <sup>^</sup> $p < 0.03$  по сравнению с группой опухоленосителей возрастом 8 мес., <sup>#</sup> $p < 0.03$  по сравнению с группой интактных крыс возрастом 8 мес. после воздействия ОФР по критерию Стьюдента–Ньюмена–Кейлса ( $n \geq 7$ ).

**Таблица 2.** Содержание ЖК (в мкг/мл) в плазме крови у животных различных экспериментальных групп

Жирная кислота	Интактные	Интактные + ОФР	Опухоленосители	Опухоленосители + ОФР
Пальмитиновая (C16:0)	4.72 ± 0.20	4.54 ± 0.36	3.97 ± 0.15*	3.52 ± 0.29* <sup>^#</sup>
Стеариновая (C18:0)	2.33 ± 0.33	2.27 ± 0.34	2.42 ± 0.23	2.42 ± 0.37
Пальмитолеиновая (C16:1, n-7)	0.56 ± 0.10	0.45 ± 0.07	0.26 ± 0.03*	0.30 ± 0.08*
Олеиновая (C18:1, n-9)	3.62 ± 0.49	3.43 ± 0.38	3.23 ± 0.28	2.88 ± 0.24
Линолевая (C18:2, n-6)	4.70 ± 0.37	4.44 ± 0.49	4.55 ± 0.19	4.32 ± 0.37
Арахидоновая (C20:4, n-6)	5.25 ± 0.42	6.57 ± 0.44	5.10 ± 0.52	4.65 ± 0.41
Докозагексаеновая (C22:6, n-3)	0.137 ± 0.008	0.167 ± 0.020	0.218 ± 0.026*	0.139 ± 0.026 <sup>^</sup>
НЖК	7.05 ± 0.31	6.81 ± 0.72	6.38 ± 0.22	5.93 ± 0.53
МНЖК	4.18 ± 0.69	3.88 ± 0.41	3.49 ± 0.26	3.18 ± 0.32
ПНЖК	10.09 ± 0.29	11.17 ± 0.91	9.45 ± 0.57	8.41 ± 0.76
Сумма	21.32 ± 0.60	21.86 ± 0.80	19.78 ± 0.74	17.52 ± 1.38

Примечание. Представлены средние значения и величины стандартных ошибок.

\* $p < 0.03$  – достоверные отличия по сравнению с интактными крысами, <sup>^</sup> $p < 0.03$  по сравнению с группой опухоленосителей, <sup>#</sup> $p < 0.03$  по сравнению с группой “Интактные + ОФР” по критерию Стьюдента–Ньюмена–Кейлса ( $n \geq 7$ ).

периментах *in vitro* показана способность олеиновой кислоты сохранять морфологию, внутриклеточный антиоксидантный статус и активность метаболических ферментов эритроцитов, которые были повреждены фенилгидразином, вызывающим окислительный стресс [18]. Однако при

облучении крыс ионизирующей радиацией, вызывающей образование АФК, атрофия тимуса сопровождалась повышенной активностью фосфолипазы D, активирующей олеиновую кислоту [19]. Возможно, при воздействии ОФР на интактных животных в тимусе происходят два противополо-

**Таблица 3.** Содержание ЖК (в мкг/мг ткани) в ткани печени интактных животных и в опухолевой ткани животных-опухоленосителей, в том числе после воздействия ОФР

Жирная кислота	Печень	Печень (интактные + ОФР)	Опухолевая ткань	Опухолевая ткань + ОФР
Пальмитиновая (С16:0)	4.84 ± 0.35	4.94 ± 0.50	0.43 ± 0.06	0.34 ± 0.04
Стеариновая (С18:0)	4.60 ± 0.39	4.27 ± 0.28	0.32 ± 0.05	0.26 ± 0.03
Пальмитолеиновая (С16:1, n-7)	0.26 ± 0.02	0.29 ± 0.03	0.04 ± 0.01	0.03 ± 0.01
Олеиновая (С18:1, n-9)	2.10 ± 0.38	2.89 ± 0.54	0.30 ± 0.05	0.23 ± 0.03
Вакценовая (С18:1, n-7)	0.52 ± 0.03	0.60 ± 0.03	0.21 ± 0.03	0.18 ± 0.02
Линолевая (С18:2, n-6)	4.49 ± 0.53	5.84 ± 0.85	0.29 ± 0.05	0.22 ± 0.03
α-Линоленовая (С18:3, n-3)	0.08 ± 0.01	0.09 ± 0.01	Следовые количества	Следовые количества
Эйкозодиеновая (С20:2, n-6)	0.09 ± 0.04	0.08 ± 0.02	0.05 ± 0.01	0.03 ± 0.01
Дигомо-γ-линоленовая (С20:3, n-6)	0.13 ± 0.04	0.10 ± 0.02	0.03 ± 0.01	0.02 ± 0.01
Арахидоновая (С20:4, n-6)	5.68 ± 0.34	5.07 ± 0.21	0.24 ± 0.03	0.19 ± 0.02
Докозапентаеновая (С22:5, n-3)	0.032 ± 0.013	0.032 ± 0.012	Следовые количества	Следовые количества
Докозагексаеновая (С22:6, n-3)	0.22 ± 0.04	0.23 ± 0.03	0.10 ± 0.02	0.09 ± 0.01
НЖК	9.44 ± 0.70	9.17 ± 0.70	0.75 ± 0.10	0.60 ± 0.07
МНЖК	2.82 ± 0.35	3.77 ± 0.54	0.55 ± 0.08	0.44 ± 0.06
ПНЖК	10.72 ± 0.76	11.43 ± 0.94	0.71 ± 0.12	0.55 ± 0.07
Сумма	22.98 ± 1.73	24.37 ± 2.20	2.01 ± 0.30	1.59 ± 0.20

Примечание. Представлены средние значения и величины стандартных ошибок ( $n \geq 7$ ).

**Таблица 4.** Содержание МДА (в мкМ) в тканях и органах интактных животных и животных-опухоленосителей при воздействии ОФР

Ткань, орган	Интактные	Интактные + ОФР	Опухоленосители	Опухоленосители + ОФР
Плазма крови	4.5 ± 0.4	4.2 ± 0.5	5.1 ± 0.4	6.3 ± 0.9
Эритроциты	39.5 ± 4.3	48.1 ± 6.8	69.7 ± 9.6*	65.6 ± 7.4*
Печень	20.2 ± 1.7	17.1 ± 1.0	16.6 ± 1.8	13.9 ± 1.4*
Опухоль	—	—	3.8 ± 0.2	3.5 ± 0.1

Примечание. \* $p < 0.02$  – отличия достоверны по сравнению с интактными крысами по критерию Стьюдента–Ньюмена–Кейлса ( $n \geq 7$ ).

**Таблица 5.** Активность СОД и каталазы в тканях и органах интактных животных и животных-опухоленосителей при воздействии ОФР

Ткань, орган	Интактные		Интактные + ОФР		Опухоленосители		Опухоленосители + ОФР	
	СОД	каталаза	СОД	каталаза	СОД	каталаза	СОД	каталаза
Эритроциты, ед. акт/г Нв	307.1 ± 36.2	23.2 ± 3.3	243.3 ± 51.4	17.0 ± 3.7	258.7 ± 47.7	25.0 ± 1.8	256.5 ± 39.2	26.8 ± 3.7
Печень, ед. акт/г	17.0 ± 2.9	0.98 ± 0.11	14.0 ± 1.7	0.33 ± 0.04*	16.5 ± 2.7	0.50 ± 0.06*	18.0 ± 4.1	0.29 ± 0.04*^
Опухоль, ед. акт/г	—	—	—	—	11.0 ± 1.4	2.5 ± 0.3	13.2 ± 2.6	1.5 ± 0.2^

Примечание. \* $p < 0.01$  – отличия достоверны по сравнению с интактными крысами, ^ $p < 0.03$  – отличия достоверны по сравнению с опухоленосителями по критерию Стьюдента–Ньюмена–Кейлса ( $n \geq 7$ ).

ложных процесса (с одной стороны, активация инволюции тимуса, а с другой – усиление защитного действия от озона вследствие увеличения количества МНЖК) с преобладанием апоптоза тимоцитов и дополнительным увеличением жировой ткани в тимусе. В пользу этого предположения свидетельствует увеличение количества НЖК и МНЖК при опухолевом росте и при воздействии на опухоленосителей ОФР, сопровождающееся снижением массы тимуса вследствие его атрофии (табл. 1).

Увеличение содержания линолевой кислоты в тимусе животных-опухоленосителей после воздействия ОФР (табл. 1) может быть связано с активацией цитолитической и цитостатической активности Т-клеток и макрофагов. Показано, что введение линолевой кислоты интраперитонеально мышам с лимфомой замедляло рост лимфомы и метастазирование [20]. При этом в спленоцитах повышалось образование IL-2 и IFN $\gamma$  и снижалась выработка IL-4 и IL-6. Однако на клетках гладкой мускулатуры артерий человека [21] и гладкомышечных клетках кишечника человека при болезни Крона [22] показано, что в условиях окислительного стресса линолевая кислота значительно увеличивала продукцию IL-8 и количество метаболитов арахидоновой кислоты. Полагают, что IL-8 способен оказывать разнонаправленное влияние на активацию и функциональную деятельность разных субпопуляций Т-клеток, в том числе и опосредовать иммуносупрессивный эффект на регуляторные Т-клетки [23]. Вероятно, что при воздействии на опухоленосителей ОФР линолевая кислота может, как замедлять рост опухоли, так и снижать иммунную функцию тимуса.

Полагают, что содержание ЖК в плазме крови опухоленосителей обусловлено их высвобождением из жировой ткани благодаря липид-мобилизирующему фактору, продуцируемому опухолевыми клетками. Скорость окисления ЖК плазмы у опухоленосителей, по-видимому, зависит от типа опухоли [24, 25] и от стадии опухолевого роста. Показано, что количество пальмитиновой кислоты обратно коррелировало с наличием аденомы толстой кишки человека [26]. Но для пальмитолевой кислоты наблюдалась прямая корреляция. Авторы связывают увеличение количества пальмитолевой кислоты в плазме крови с активацией стеарол-КоА-десатуразы n-7. Сниженное количество пальмитолевой кислоты в плазме крови наблюдалось у пациентов с неходжкинской лимфомой при прогрессировании заболевания [27]. Возможно, снижение количества пальмитолевой кислоты в плазме крови опухоленосителей (табл. 2) объясняется отсутствием активации стеарол-КоА-десатуразы n-7 при данном типе опухоли. Полагают, что при каждом типе опухоли имеется свой собственный набор ЖК

в плазме крови [28–30]. Обнаруженное нами увеличение в плазме крови количества докозагексаеновой кислоты (табл. 2), обладающей противоопухолевыми свойствами [31, 32], возможно, обусловлено защитной реакцией организма опухоленосителей на рост опухоли. Снижение количества докозагексаеновой кислоты, имеющей 6 двойных связей, до уровня интактных животных при воздействии на опухоленосителей ОФР (табл. 2), вероятно, объясняется защитной реакцией опухоленосителей от повреждающего действия избыточного ПОЛ [33].

Отсутствие изменений количества МДА в плазме крови (табл. 4) может быть связано со стадией роста опухоли и степенью ее злокачественности. У онкологических пациентов с меланомой уровень МДА в плазме крови был повышен [34]. Наблюдалось достоверное увеличение уровня МДА в сыворотке крови собак с опухолью по сравнению с клинически здоровыми животными [35]. Повышенный уровень МДА в эритроцитах животных (табл. 4) обусловлен характерным для них высоким уровнем ПОЛ [36], поскольку эритроцитам свойственна функция транспорта кислорода. Значимое повышение уровня МДА в эритроцитах после воздействия ОФР на опухоленосителей (табл. 4), по-видимому, обусловлено усилением ПОЛ. У пациентов с меланомой ПОЛ в эритроцитах наблюдалось только на поздней стадии заболевания при наличии метастазов [36]. Повышение уровня МДА в эритроцитах при наличии опухоли, вероятно, связано со снижением активности глутатионпероксидазы. Увеличение уровня МДА при снижении активности глутатионпероксидазы наблюдалось в эритроцитах крови у пациентов с раком молочной железы [37], в эритроцитах больных миелоидным лейкозом [38]. Снижение активности глутатионпероксидазы происходило при раке яичников [39] и при раке шейки матки [40]. Вероятно, уровень ПОЛ и активности ферментов антиоксидантной защиты в эритроцитах также зависят от типа опухоли и стадии опухолевого роста [41, 42]. Снижение уровня МДА в печени (табл. 4) может быть связано с развитием окислительного стресса под действием ОФР [43], который, вероятно, активирует в печени антиоксидантные ферменты. Воздействие ОФР, как и развитие опухоли, запускают универсальные стресс-индуцированные тканеспецифические реакции в организме крыс. Показано, что в ответ на острые стрессоры различной модальности (эмоционально-болевого, гипо- и гипероксия) обычно наблюдается усиление перекисного окисления липидов и белков в различных органах и тканях. Для печени половозрелых крыс характерно снижение содержания МДА в ответ на воздействие стресс-факторов [44, 45]. Это можно объяснить высоким адаптационным потенциалом антиоксидантной системы защиты в печени у особой ре-

продуктивного возраста, в том числе с участием глутатионпероксидазы [45].

Отсутствие изменений количества ЖК и активности СОД в печени на данной стадии роста опухоли и под влиянием ОФР (табл. 5) свидетельствуют об отсутствии нарушений регуляции синтеза ЖК в этот период. Полагают, что активность СОД в клетках определяется общим состоянием всей окислительно-восстановительной системы, как в норме, так и при опухолевом росте [46]. Обнаруженное нами уменьшение активности каталазы в печени животных-опухоленосителей (табл. 5) совпадает с ранее полученными литературными данными [47, 48]. Авторы показали, что снижение экспрессии гена каталазы наблюдалось независимо от тканевого или видового происхождения трансплантированных опухолей. Удаление имплантированной опухоли приводило к восстановлению экспрессии гена каталазы до нормального уровня. В наших экспериментах снижение активности каталазы было более выраженным при воздействии ОФР как на интактных животных, так и на опухоленосителей (табл. 5). Такое снижение активности каталазы в печени интактных животных и животных с опухолью после воздействия ОФР может быть обусловлено снижением пула молекул фермента в связи с нейтрализацией большого количества АФК. Уменьшение количества МДА в печени опухоленосителей после действия ОФР свидетельствует о снижении ПОЛ. Вероятно, активность ферментов антиоксидантной системы клеток печени способна справляться с окислительным стрессом на данной стадии роста опухоли.

Мы не обнаружили достоверных изменений жирнокислотного состава в опухолевой ткани под влиянием ОФР. Одним из важных метаболических признаков опухолевых клеток является нарушение регуляции липидного обмена. Для них характерно усиление синтеза ЖК *de novo*, увеличение поглощения липидов и активация липолиза. Жирные кислоты участвуют в различных аспектах образования и прогрессии опухоли [49, 50]. Одним из преимуществ повышенной скорости липогенеза *de novo* в опухолевых клетках является синтез НЖК и МНЖК, которые по своей природе более стабильны, чем ПНЖК, поскольку они содержат меньше двойных связей, более подверженных ПОЛ. Опухолевые клетки с более высоким содержанием НЖК менее восприимчивы к окислительному стрессу [51].

Специфичность повреждения опухолевых клеток, вероятно, достигается за счет их локального окислительно-восстановительного состояния. Показано, что уровень активности антиоксидантных ферментов изменяются при опухолевом росте [52]. Вероятно, повышенное количество устойчивых к перекисному окислению НЖК и МНЖК по срав-

нению с ПНЖК и состояние антиоксидантной системы в опухолевых клетках препятствует модификации их мембран (нарушению плотности их липидного бислоя), что затрудняет проникновение АФК внутрь клеток и снижает уровень окислительных повреждений ДНК и белков [53]. Снижение активности каталазы в опухолевом узле при воздействии ОФР на опухоленосителей может быть связано, как и в печени, с подавлением экспрессии гена каталазы. На клетках гепатоцеллюлярной карциномы показано, что длительное воздействие АФК индуцировало метилирование CpG-острова II на промоторе гена каталазы и подавляло экспрессию гена на уровне транскрипции [54]. Гиперметилирование CpG-острова II снижало уровень экспрессии мРНК каталазы и белка. Возможно, для данного типа опухоли и стадии ее роста доза ОФР оказалась недостаточной для нарушения клеточных механизмов самоадаптации и индукции гибели опухолевых клеток под действием АФК [6, 7].

Таким образом, обнаружено, что воздействие ОФР на интактных крыс и животных-опухоленосителей приводит к достоверному изменению содержания ЖК и активности антиоксидантных ферментов в различных органах и тканях. Полученные результаты свидетельствуют об увеличении количества ЖК, устойчивых к перекисному окислению при воздействии ОФР, а также об изменении количества ЖК в органах и тканях животных-опухоленосителей, роль которых недостаточно изучена при опухолевом росте. Изменения жирнокислотного состава в тканях и проантиоксидантного баланса организма при действии озона, вероятно, зависят от типа опухоли и стадии опухолевого роста.

**Конфликт интересов.** Авторы декларируют отсутствие явных и потенциальных конфликтов интересов, связанных с публикацией настоящей статьи.

**Соответствие принципам этики.** Все применимые международные, национальные и/или институциональные принципы ухода и использования животных были соблюдены.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Koundouros N., Pouligiannis G. 2020. Reprogramming of fatty acid metabolism in cancer. *Br. J. Cancer*. **122**, 4–22.
2. Rodrigues C., Milkovic L., Bujak I.T., Tomljanovic M., Soveral G., Cipak Gasparovic A. 2019. Lipid profile and aquaporin expression under oxidative stress in breast cancer cells of different malignancies. *Oxid. Med. Cell Longev.* **11**, 2061830. <https://doi.org/10.1155/2019/2061830>
3. Fang Y.-Z., Yang S., Wu G. 2002. Free radicals, antioxidants, and nutrition. *Nutrition*. **18**, 872–879.



4. Holmstrom K.M., Finkel T. 2014. Cellular mechanisms and physiological consequences of redox-dependent signaling. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **15**, 411–421.
5. Yan L.J. 2014. Positive oxidative stress in aging and aging-related disease tolerance. *Redox Biol.* **2C**, 165–169.
6. Trachootham D., Alexandre J., Huang P. 2009. Targeting cancer cells by ROS-mediated mechanisms: A radical therapeutic approach? *Nat. Rev. Drug Discov.* **8**, 579–591.
7. Liu C., Cao Y., Cheng Y., Wang D., Xu T., Su L., Zhang X., Dong H. 2020. An open source and reduce expenditure ROS generation strategy for chemodynamic/photodynamic synergistic therapy. *Nat. Commun.* **11**, 1735.
8. Ranaldi G.T., Villani E.R., Franza L. 2020. Rationale for ozone-therapy as an adjuvant therapy in COVID-19: A narrative review. *Med. Gas. Res.* **10**, 134–138.
9. Аলেখина С.П., Шербатюк Т.Г. 2003. Озонотерапия: клинические и экспериментальные аспекты. Нижний Новгород: Издательский дом “Литера”. 240 с.
10. Андропова Н.В., Волконский М.В., Калишьян М.С., Трещалина Е.М. 2012. Методика внутриартериальной инфузии крысам с внутримышечно трансплантированной опухолью. *Росс. биотерапевт. журн.* **11**, 19–21.
11. Shcherbatyuk T.G., Zhukova (Plekhanova) E.S., Nikitina Ju.V., Gapeyev A.B. 2020. Oxidative modification of proteins in the tissues of rats with growing tumors under the ozone-photodynamic treatment. *Bio-physica.* **65**, 319–326.
12. Kulagina T.P., Aripovsky A.V., Gapeyev A.B. 2012. Changes in fatty acid composition of thymus cells, liver, blood plasma, and muscle tissue in mice with solid Ehrlich carcinoma. *Biochemistry (Moscow).* **77**, 187–193.
13. Wang W., Thomas R., Sizova O., Su D.-M. 2020. Thymic function associated with cancer development, relapse, and antitumor immunity – A mini-review. *Front. Immunol.* **11**, 773.
14. Galli M.C., Cabrini L., Caboni F., Cipollone, M., Landi L. 1994. Peroxidation potential of rat thymus during development and involution. *Comp. Biochem. Physiol. Pharmacol. Toxicol. Endocrinol.* **107**, 435–440.
15. Lynch H.E., Goldberg G.L., Chidgey A., Van den Brink M.R., Boyd R., Sempowski G.D. 2009. Thymic involution and immune reconstitution. *Trends Immunol.* **30**, 366–373.
16. Shanley D.P., Aw D., Manley N.R., Palmer D.B. 2009. An evolutionary perspective on the mechanisms of immunosenescence. *Trends Immunol.* **30**, 374–381.
17. Barbouti A., Vasileiou P.V.S, Evangelou K., Vlasis K.G., Papoudou-Bai A., Gorgoulis V.G., Kanavaros P. 2020. Implications of oxidative stress and cellular senescence in age-related thymus involution. *Oxid. Med. Cell Longev.* **2020**, 7986071. <https://doi.org/10.1155/2020/7986071>
18. Banerjee A., Dey T., Ghosh A.K., Mishra S., Bandyopadhyay D., Chattopadhyay A. 2020. Insights into the ameliorative effect of oleic acid in rejuvenating phenylhydrazine induced oxidative stress mediated morphofunctionally dismantled erythrocytes. *Toxicol. Rep.* **7**, 1551–1563.
19. Lee Y., Song S.-M., Park S.H., Kim S., Koh E.-H., Choi M.S., Choi M.-U. 2002. Elevation of oleate-activated phospholipase D activity during thymic atrophy. *Immunol.* **107**, 435–443.
20. Salem M.L. 2005. Systemic treatment with n-6 polyunsaturated fatty acids attenuates EL4 thymoma growth and metastasis through enhancing specific and non-specific anti-tumor cytolytic activities and production of TH1 cytokines. *Int. Immunopharmacol.* **5**, 947–960.
21. Leik C.E., Walsh S.W. 2005. Linoleic acid, but not oleic acid, upregulates production of interleukin-8 by human vascular smooth muscle cells via arachidonic acid metabolites under conditions of oxidative stress. *J. Soc. Gynecol. Investig.* **12**, 593–598.
22. Alzoghaibi M.A., Walsh S.W., Willey A., Yager D.R., Fowler A.A. 3rd, Graham M.F. 2004. Linoleic acid induces interleukin-8 production by Crohn’s human intestinal smooth muscle cells via arachidonic acid metabolites. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* **286**, G528–G537.
23. Меняйло М.Е., Малашенко В.В., Шмаров В.А., Газатова Н.Д., Мелашенко О.Б., Гончаров А.Г., Селедцова Г.В., Селедцов В.И. 2017. Роль интерлейкина-8 в непосредственной регуляции функциональной активности Т-лимфоцитов, *Мед. иммунология.* **19**, 529–536.
24. Kannan R., Gan-Elepano M., Baker N. 1990. Reduced suppression of plasma saturated fatty acid mobilization and oxidation by feeding in lymphoma-bearing mice. *Cancer Res.* **50**, 2221–2227.
25. Lin C., Blank W., Cerian, R.L., Baker N. 1992. Effect of human mammary MX-1 tumor on plasma free fatty acids in fasted and fasted-refed nude mice. *Lipids.* **27**, 33–37.
26. Pickens C.A., Lane-Elliot A., Comstock S.S., Fenton J.I. 2016. Altered saturated and monounsaturated plasma phospholipid fatty acid profiles in adult males with colon adenomas. *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.* **25**, 498–506.
27. Cvetković Z., Vučić V., Cvetković B., Karadžić I., Ranić M., Glibetić M. 2013. Distribution of plasma fatty acids is associated with response to chemotherapy in non-Hodgkin’s lymphoma patients. *Med. Oncol.* **30**, 741.
28. Baró L., Hermoso J.C., Núñez M.C., Jiménez-Rios, J.A., Gil A. 1998. Abnormalities in plasma and red blood cell fatty acid profiles of patients with colorectal cancer. *Br. J. Cancer.* **77**, 1978–1983.
29. Murphy R.A., Bureyko T.F., Mourtzakis M., Chu Q.S., Clandinin M.T., Reiman T., Mazurak V.C. 2012. Aber-

- rations in plasma phospholipid fatty acids in lung cancer patients. *Lipids*. **47**, 363–369.
30. Qiu J.F., Zhang K.L., Zhang X.J., Hu Y.J., Li P., Shang C.Z., Wan J.B. 2015. Abnormalities in plasma phospholipid fatty acid profiles of patients with hepatocellular carcinoma. *Lipids*. **50**, 977–985.
  31. Newell M., Baker K., Postovit L.M., Field C.J. 2017. A critical review on the effect of docosahexaenoic acid (DHA) on cancer cell cycle progression. *Int. J. Mol. Sci.* **18**, E1784.
  32. Kuban-Jankowska A., Gorska-Ponikowska M., Sahu K.K., Kostrzewa T., Wozniak M., Tuszyński J. 2019. Docosahexaenoic acid inhibits PTP1B phosphatase and the viability of MCF-7 breast cancer cells. *Nutrients* **11**, E2554.
  33. Song E.A., Kim H. 2016. Docosahexaenoic acid induces oxidative DNA damage and apoptosis, and enhances the chemosensitivity of cancer cells. *Int. J. Mol. Sci.* **17**, E1257.
  34. Santos Bernardes S., de Souza-Neto F.P., Pasqual Melo G., Guarnier F.A., Marinello P.C., Cecchini R., Cecchini A.L. 2016. Correlation of TGF- $\beta$ 1 and oxidative stress in the blood of patients with melanoma: A clue to understanding melanoma progression? *Tumour Biol.* **37**, 10753–10761.
  35. Macotpet A., Suksawat F., Sukon P., Pimpakdee K., Pattarapanwichien E., Tangrassameeprasert R., Boonsiri P. 2013. Oxidative stress in cancer-bearing dogs assessed by measuring serum malondialdehyde. *BMC Vet. Res.* **9**, 101.
  36. McMillan D.C., Jensen C.B., Jollow D.J. 1998. Role of lipid peroxidation in dapsone-induced hemolytic anemia. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **287**, 868–876.
  37. Kangari P., Zarnoosheh Farahany T., Golchin A., Ebadollahzadeh S., Salmaninejad A., Mahboob S.A., Nourazarian A. 2018. enzymatic antioxidant and lipid peroxidation evaluation in the newly diagnosed breast cancer patients in Iran. *Asian Pac. J. Cancer Prev.* **19** (12), 3511–3515.
  38. Đikić D., Bogdanović A., Marković D., Mitrović-Ajtić O., Subotički T., Diklić M., Vukotić M., Dragojević T., Živković E., Santibanez J.F., Čokić V.P. 2022. Inflammation promotes oxidative and nitrosative stress in chronic myelogenous leukemia. *Biomolecules*. **12** (2), 247.  
<https://doi.org/10.3390/biom12020247>
  39. Sutkowy P., Czuczejko J., Małkowski B., Szewczyk-Golec K., Łopatto R., Maruszak M., Woźniak A. 2021. Redox state and lysosomal activity in women with ovarian cancer with tumor recurrence and multiorgan metastasis. *Molecules*. **26** (13), 4039.  
<https://doi.org/10.3390/molecules26134039>
  40. Kolanjiappan K., Manoharan S., Kayalvizhi M. 2002. Measurement of erythrocyte lipids, lipid peroxidation, antioxidants and osmotic fragility in cervical cancer patients. *Clin. Chim. Acta.* **326** (1–2), 143–149.
  41. Hristozov D., Gadjeva V., Vlaykova T., Dimitrov G. 2001. Evaluation of oxidative stress in patients with cancer. *Arch. Physiol. Biochem.* **109**, 331–336.
  42. Cobanoglu U., Demir H., Duran M., Şehitogullari A., Mergan D., Demir C. 2010. Erythrocyte catalase and carbonic anhydrase activities in lung cancer. *Asian Pac. J. Cancer Prev.* **11**, 1377–1382.
  43. Kasymova G.G. 2006. Effect of ronkoleukin on nitric oxide and lipid peroxidation indices in hepatocarcinogenesis. *Lik Sprava*. **7**, 41–45.
  44. Чумакова А.С., Нестеров Ю.В., Турченко Н.В. 2014. Возрастные особенности свободнорадикальных процессов в печени и легких крыс на фоне стрессов различной модальности. *Естественные науки*. **4**, 76–82.
  45. Жукова Е.С., Кашина А.Ю., Иркаева А.М. 2020. Современные аспекты лечения профессиональной онкопатологии: перспективы применения медицинского озона для коррекции свободнорадикального гомеостаза. *Медицина труда и промышленная экология*. **60**, 767–770.
  46. Che M., Wang R., Li X., Wang H.Y., Zheng X.F.S. 2016. Expanding roles of superoxide dismutases in cell regulation and cancer. *Drug Discov. Today*. **21**, 143–149.
  47. Lucke B., Berwick M. 1954. Catalase activity of liver and kidney in frogs with spontaneous renal carcinoma. *J. Exp. Med.* **100**, 125–133.
  48. Yamaguchi Y., Sato K., Endo H. 1992. Depression of catalase gene expression in the liver of tumor bearing nude mice. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **89**, 1084–1089.
  49. Liu Q., Luo Q., Halim A., Song G. 2017. Targeting lipid metabolism of cancer cells: A promising therapeutic strategy for cancer. *Cancer Lett.* **401**, 39–45.
  50. Yu X.H., Ren X.H., Liang X.H., Tang Y.L. 2018. Roles of fatty acid metabolism in tumorigenesis: Beyond providing nutrition. *Mol. Med. Rep.* **18**, 5307–5316.
  51. Rysman E., Brusselmans K., Scheys K., Timmermans L., Derua R., Munck S., Van Veldhoven P.P., Waltregny D., Daniëls V.W., Machiels J., Vanderhoydonc F., Smans K., Waelkens E., Verhoeven G., Swinnen J.V. 2010. De novo lipogenesis protects cancer cells from free radicals and chemotherapeutics by promoting membrane lipid saturation. *Cancer Res.* **70**, 8117–8126.
  52. Oberley T.D. 2002. Oxidative damage and cancer. *Am. J. Pathol.* **160**, 403–408.
  53. Van der Paal J., Neyts E.C., Verlaack C.C.W., Bogaerts A. 2016. Effect of lipid peroxidation on membrane permeability of cancer and normal cells subjected to oxidative stress. *Chem. Sci.* **7**, 489–498.
  54. Min J.Y., Lim S.O., Jung G. 2010. Downregulation of catalase by reactive oxygen species via hypermethylation of CpG island II on the catalase promoter. *FEBS Lett.* **284**, 2427–2432.

## Effect of Ozone on the Fatty Acid Composition and Free Radical Activity in Rat Tissues during Tumor Growth

T. P. Kulagina<sup>1, \*</sup>, E. S. Zhukova<sup>2</sup>, A. V. Aripovsky<sup>3</sup>, T. G. Shcherbatyuk<sup>2, 4</sup>, A. B. Gapeyev<sup>1</sup>

<sup>1</sup>*Institute of Cell Biophysics of the Russian Academy of Sciences, Pushchino, Moscow oblast, 142290 Russia*

<sup>2</sup>*Nizhny Novgorod Research Institute of Hygiene and Occupational Pathology, Nizhny Novgorod, 603005 Russia*

<sup>3</sup>*Research and Production Company "A-Bio", Pushchino, Moscow oblast, 142290 Russia*

<sup>4</sup>*Pushchino State Institute of Natural Science, Pushchino, Moscow oblast, 142290 Russia*

\*e-mail: [tpkulagina@rambler.ru](mailto:tpkulagina@rambler.ru)

The effect of ozonized saline (OS) with an ozone concentration in the ozone–oxygen mixture of 400 µg/L, administered intraperitoneally to male Sprague Dawley rats, on the fatty acid composition of the thymus, blood plasma, liver, and solid PC-1 cholangiocarcinoma was studied. It was found that in intact animals OS caused a significant increase in the content of oleic acid, the total amount of monounsaturated and polyunsaturated fatty acids, as well as the total amount of fatty acids in thymus tissues. In tumor-bearing rats OS caused an increase in the content of saturated and polyunsaturated fatty acids, as well as an increase in the amount of polyunsaturated linoleic acid in thymus tissues. In the blood plasma of tumor carriers, the content of docosahexaenoic acid increased, while the content of palmitic and palmitoleic acids decreased. After exposure of tumor carriers to OS, the amount of docosahexaenoic acid decreased to the level of intact animals. There were no changes in the content of fatty acids in the liver and tumor tissue in any of the studied groups. The decrease in catalase activity in the liver was found in tumor-bearing rats. Treatment with OS led to an even greater decrease in catalase activity in the liver of intact animals and tumor carriers. The amount of malondialdehyde increased in the erythrocytes of tumor-bearing rats and after their treatment with OS. The amount of malondialdehyde decreased in the liver after treatment of tumor carriers to OS. We suppose that the treatment with OS, as well as tumor development in rats, triggers stress-induced tissue-specific reactions such as changes in the fatty acid composition and activity of antioxidant enzymes.

**Keywords:** tumor, ozone, fatty acids, antioxidant enzymes, malonic dialdehyde

## ПРАВИЛА ДЛЯ АВТОРОВ

DOI: 10.31857/S0233475519020087

### ОБЩАЯ ИНФОРМАЦИЯ

Журнал *Биологические мембраны* публикует статьи, обзоры и краткие сообщения, освещающие различные, прежде всего физико-химические и молекулярные аспекты функционирования клеток и клеточных систем. Приоритетными являются работы в области клеточной и молекулярной мембранологии и биофизики, а также работы, в которых представлены клеточные и молекулярные аспекты физиологии, фармакологии, иммунологии и медицины. Журнал принимает как экспериментальные, так и теоретические работы в указанных направлениях.

Приветствуются экспериментальные работы, в которых исследуются связь между структурой и функцией мембран, молекулярные механизмы мембранного транспорта, рецепторные системы и внутриклеточная сигнализация, клеточные функции и клеточные патологии, ассоциированные с плазматической мембраной клеток (рецепторы, ионные каналы, экзоцитоз, эндоцитоз, фагоцитоз, межклеточные контакты и др.) и с мембранами внутриклеточных структур (биоэнергетика, фотосинтез, ядерно-цитоплазматические отношения, апоптоз,  $Ca^{2+}$ -сигнализация и др.).

Предпочтение отдается теоретическим работам, в которых рассматриваются физико-химические свойства мембранных систем в рамках моделей различного уровня детализации, моделируются структура и динамика молекулярных систем, функционирующих в биологических мембранах и в клетке в целом, предлагаются математические модели сигнальных и регуляторных процессов, обеспечивающих жизнедеятельность клеток и клеточных систем.

Английская версия журнала называется “Biochemistry (Moscow), Supplement Series A: Membrane and Cell Biology” и распространяется издательством Springer (<http://www.springer.com>).

**Типы публикаций.** Основным типом публикаций является исследовательская статья, в которой представлены результаты оригинальных экспериментальных и теоретических работ. Рукопись должна преимущественно содержать новые, ранее не опубликованные данные. Допускается использование собственных, уже представленных материалов, если таковые были опубликованы в виде краткого сообщения или тезисов доклада. Ссылка на предварительное сообщение обязательна.

Новые, приоритетные данные, требующие срочного опубликования, могут быть напечатаны в кратком виде в разделе *Краткие сообщения*. Целесообразность такой внеочередной публикации долж-

на быть обоснована в письме, направляемом Главному редактору автором для корреспонденции. В случае принятия такая работа может быть опубликована в течение 3–4 месяцев.

Журнал публикует *обзоры* и *мини-обзоры*, отражающие существующие представления и важнейшие достижения в области мембранологии, биофизики и биологии клетки, молекулярной и клеточной физиологии, иммунологии и медицины.

Отправляя рукопись в журнал, автор гарантирует, что соответствующий материал (в оригинале или в переводе на другие языки или с других языков) ранее нигде не публиковался и не находится на рассмотрении для публикации в других журналах. Журнал поддерживает стандарты публикационной этики (<https://www.pleiades.online/ru/authors/publication-ethics/>) и просит авторов размещать в статье необходимую информацию, связанную с их соблюдением (<https://www.pleiades.online/ru/authors/guidlines/reference-information/>).

Рукописи необходимо отправлять через Издательский портал <https://publish.sciencejournals.ru/> или по электронной почте на адрес редакции: [biomembranes2010@gmail.com](mailto:biomembranes2010@gmail.com).

### ТРЕБОВАНИЯ К ОФОРМЛЕНИЮ СТАТЕЙ

**Формат статей.** Рукопись должна быть написана либо на русском, либо на английском языке. Текст печатается шрифтом Times New Roman (12 pt), через 1.5 интервала, с полями 3 см слева и 2.5 см сверху, справа и снизу. Объем исследовательской статьи (включая аннотацию, основной текст, таблицы, список литературы и подписи к рисункам) не должен превышать 8000 слов и 8 рисунков, обзора — 12000 слов и 8 рисунков, мини-обзора — 4000 слов и 3 рисунка, краткого сообщения — 2000 слов и 1 рисунок. Правила оформления рукописи размещены на сайте <https://www.pleiades.online/ru/authors/guidlines/prepare-electronic-version/>.

Рукопись надлежит представлять в электронном виде. Следует присылать единый прикрепленный файл, не превышающий 15 Мб, в формате MS Word (\*.doc), содержащий текст, таблицы и рисунки (обычно черно-белые) в последовательности, изложенной ниже. При необходимости файлы рекомендуются сжимать в стандарте *WinZip* или *WinRAR*. Цветные иллюстрации принимаются по согласованию с редакцией.

**Сопроводительные документы.** Рукопись статьи должна сопровождаться: (а) письмом-направлением от автора для корреспонденции, в котором констати-

руется, что данная работа (название, авторы) направляется для опубликования в журнале *Биологические мембраны* и что все авторы согласны с направлением статьи в журнал; (б) заполненными бланками договоров о передаче авторского права на использование материалов для русской и английской версий журнала. Бланки договоров размещены на сайтах <https://www.sciencejournals.ru> и <https://www.pleiades.online>. В случае отклонения статьи договор в силу не вступает.

Сопроводительные документы принимаются в электронном виде. Письмо-направление от учреждения с подписью руководителя и печатью, заполненные и подписанные бланки договоров и титульная страница статьи (см. ниже) с подписями всех авторов сканируются и посылаются ([biomembranes2010@gmail.com](mailto:biomembranes2010@gmail.com)) в формате jpeg или pdf.

При наличии в авторском коллективе зарубежных соавторов их согласие индивидуально подтверждается письмом, посылаемым в редакцию по электронной почте ([biomembranes2010@gmail.com](mailto:biomembranes2010@gmail.com)) на имя Главного редактора.

**Порядок представления материалов.** При оформлении статьи необходимо придерживаться следующего порядка.

**Титульная страница:**

- индекс УДК (в левом верхнем углу);
- заглавие статьи (не более 150 знаков без пробелов);
- инициалы и фамилии авторов;
- полное название учреждения(ий), почтовый индекс, город, страна;
- инициалы и фамилия автора для корреспонденции с указанием почтового адреса, контактного телефона, факса, электронного адреса;

• ключевые слова (3–6);

• количество слов в основном тексте;

• количество таблиц;

• количество рисунков;

• подписи всех авторов.

**Основной текст:**

- индекс УДК (в левом верхнем углу);
- заглавие статьи (не более 150 знаков, не считая интервалы);

• инициалы и фамилии авторов;

• полное название учреждения(ий), почтовый индекс, город, страна;

• аннотация (до 300 слов)

• ключевые слова (3–6);

• введение

• материалы и методы;

• результаты;

• обсуждение (или результаты и обсуждение)

• благодарности (отдельный абзац без заголовка)

• таблицы (каждая на отдельной странице);

- подписи к рисункам (на отдельной странице);
- список цитированной литературы (на отдельной странице);

• резюме на английском языке или на русском, если основной текст представлен на английском (до 300 слов, на отдельной странице);

• рисунки (пронумерованные, каждый на отдельной странице).

Расположение основных материалов теоретической работы произвольно, хотя следует в целом придерживаться последовательности, изложенной выше. Уравнения должны быть напечатаны предпочтительно с помощью Microsoft Equation Editor. Не рекомендуется использование символов корней, вместо них должны использоваться дробные показатели степени. Двоеточие не должно использоваться как знак деления. Уравнения должны нумероваться с правой стороны в скобках. Символы должны быть определены при первом упоминании в тексте.

Математические модели должны быть представлены таким образом, чтобы для широкого круга читателей было понятно, какая система (молекулярная, клеточная и др.) или процесс моделируется, каковы исходные постулаты модели и целесообразность ее использования для описания процесса или системы, а также ограничения модели. Методы решения уравнений модели должны быть описаны в деталях, достаточных для их воспроизведения. Коммерческие программы и используемые в них алгоритмы должны быть упомянуты. Основополагающие детали вывода уравнений и/или их решения могут быть представлены в Приложении, помещаемом в конце работы.

**Аннотация** (не более 300 слов) обязательна для статьи (обзора) и должна давать ясное представление о сути работы, объектах и методах исследования, основных результатах и сделанных выводах.

Раздел **Материалы и методы** должен содержать информацию о методах исследования, достаточную для их ясного понимания и воспроизведения. Методы, описанные ранее, могут быть представлены в краткой форме и должны сопровождаться адекватными ссылками. Необходимо указывать квалификацию и источник основных реактивов; название (в оригинальной транскрипции) фирмы-изготовителя реактивов/оборудования и страна приводятся в скобках (Serva, Германия). Используемые статистические методы обработки данных, графические программы и т.п. также должны быть указаны.

**Таблицы** (и рисунки) нумеруются в порядке упоминания их в тексте. Каждая таблица должна иметь заголовок и, если необходимо, краткие пояснения к представленным данным (условия эксперимента, число экспериментов и т.п.).

**Рисунки** должны быть выполнены с разрешением не менее 300 dpi и в масштабе, допускающем их двукратное уменьшение без потери качества. В сложных рисунках со множественными

панелями каждую следует пометить курсивной буквой (*a, b, в ...*). На графиках следует использовать стандартные символы (▲ ▼ ● ○ ◆ □ ■). В нижней части рисунка необходимо указать его порядковый номер и фамилию первого автора.

Электронные версии штриховых рисунков и полутонных фотографий должны представляться в формате JPEG или TIFF.

**Цитирование литературы.** Ссылка на цитируемую работу дается в тексте цифрой в квадратных скобках (нумерация в порядке цитирования). Если ссылка на работу есть в таблице или в подписи к рисунку, ей присваивается порядковый номер, соответствующий расположению данного материала в тексте статьи.

Авторы несут полную ответственность за правильность цитирования работ. Последние должны быть либо опубликованными, либо принятыми в печать. Ссылки на тезисы докладов, диссертации, авторские свидетельства следует приводить только, если они являются единственным источником. Цитирования типа “неопубликованные данные” или “персональное сообщение” не должны включаться в список литературы, но допускаются в тексте (например, Прутков К.Ф., персональное сообщение). При этом предполагается, что авторы получили разрешение на цитирование в какой-либо форме.

Список цитированной литературы должен оформляться следующим образом:

#### **Статья в журнале**

Карпушев А.В., Павлов Т.С., Старушенко А.В. 2009. Регуляция эпителиальных натриевых каналов (ENaC) малыми G-белками и фосфатидилинозитидами. *Биол. мембраны*. **26** (4), 265–279.

Takeuchi H., Imanaka Y., Hirono H., Kurahashi T. 2003. Cross-adaptation between olfactory responses induced by two-subgroups of odorant molecules. *J. Gen. Physiol.* **122**, 255–264.

#### **Книга**

Владимиров Ю.А., Добрецов Г.Е. 1980. Флуоресцентные зонды в исследовании биологических мембран. М.: Наука. 320 с.

Hille B. 1992. *Ionic channels of excitable membranes*. 2nd ed. Sunderland: Sinauer Associates, Inc. 607 p.

#### **Статья в книге**

Леднев В.В. 1977. Исследование структуры актинсодержащих нитей методом дифракции рентгеновских лучей. В кн.: *Молекулярная и клеточная биофизика*. Ред. Франк Г.М. М.: Наука, с. 164–172.

Keating M.T. 1995. Molecular genetics of the long QT syndrome. In: *Ion channels and genetic diseases*. Eds Dawson D.C., Frizzell R.A. New York: The Rockefeller University Press, p. 53–60.

#### **Статья, принятая в печать**

Додонова С.О., Крупенина Н.А., Булычев А.А. 2010. Подавление  $H^+$ -проводимости плазмалеммы на фоне высокой активности  $H^+$ -насоса в клетках *Chara* под действием дитиотреитола. *Биол. мембраны* (в печати).

Во многих международных журналах статьи, принятые в печать, публикуются в электронном виде до выхода бумажной версии. При этом статьи идентифицируются с использованием DOI (digital object identifier), и их следует цитировать в оригинальном формате:

Komaki S., Abe T, Coutuer S., Inze D., Russinova E., Hashimoto T 2010. Nuclear-localized subtype of end-binding 1 protein regulates spindle organization in *Arabidopsis*. *J. Cell Sci.* doi 10.1242/jcs.062703

Если работы, которые цитировались как *в печати*, были опубликованы на момент получения корректуры, авторы должны внести необходимые исправления в список литературы.

**Сокращения и аббревиатуры.** Стандартные сокращения, рекомендованные комиссией по биохимической номенклатуре IUPAC-IUB (*Eur. J. Biochem.* 1977, **74** (1), 1–6), могут быть использованы непосредственно. Нестандартные сокращения химических соединений, сокращения общего характера разрешается вводить лишь в случае многократного употребления. Их следует ввести (в скобках) при первом же использовании сложного словосочетания в основном тексте статьи, например: активные формы кислорода (АФК).

Аббревиатуры или формулы химических соединений, употребляемые как прилагательные, пишутся через дефис: ИК-спектроскопия, ЖК-состояние,  $Na^+$ -форма, ОН-группа, но группа ОН.

**Размерности** отделяются от цифры пробелом (100 кПА, 77 К), кроме градусов, процентов и промилле: 90°, 20°C (для градусов Цельсия 20°C, а не 20°), 45%, 10‰. Дробные размерности: 58 Дж/моль, 10 моль/л. Для более сложных размерностей допускается использование степеней, в том числе отрицательных; символы различных размерностей должны быть отделены пробелом: 9.8 м/с<sup>2</sup> или 9.8 м с<sup>-2</sup>, 37 Дж моль<sup>-1</sup> град<sup>-1</sup>. Единообразие написания размерностей в рукописи является обязательным.

При перечислении, а также в числовых интервалах размерность приводится лишь для последнего числа (10–30 Дж/моль, 22–25°C), за исключением угловых градусов (5°–10°, а не 5–10°). Размерности переменных пишутся через запятую (*E*, кДж/моль).

**Специальные символы и цифры.** Для печати специальных символов (греческие буквы, математические символы, графические символы и т.п.) следует использовать функцию *Insert Symbol* в редакторе *Microsoft Word*. Десятичные доли в числах отделяются точкой (3.14, а не 3,14).

**Репринты.** После выхода журнала издательство высылает авторам бесплатно PDF-файлы русской и английской версии статьи.

**Адрес редакции:** 117997, Москва, ул. Миклухо-Маклая, 16/10, Институт биоорганической химии РАН, корп. 32, комн. 411, редакция журнала *Биологические мембраны*. Телефон редакции: 8(499)724-80-89. E-mail: biomembranes2010@gmail.com.

## ПРИЛОЖЕНИЕ 1

Сокращения часто употребляемых слов и терминов

БЛМ	Бислойные (бимолекулярные) липидные мембраны	н.	Нормальный (раствор)
<i>втор-</i>	Вторичный	ОЕ	Оптическая единица
ВЭЖХ	Высокоэффективная жидкостная хроматография	ПААГ	Полиакриламидный гель
ГЖХ	Газожидкостная хроматография	п. о.	Пары оснований
ед. акт.	Единица активности	т. п. о.	Тысяча пар оснований
ИК	Инфракрасный	т. кип.	Температура кипения
КД	Круговой дихроизм	т. пл.	Температура плавления
КР	Комбинационное рассеяние	<i>трет-</i>	Третичный
КССВ	Константа спин-спинового взаимодействия	ТСХ	Хроматография в тонком слое
МЕ	Международная единица	УФ	Ультрафиолетовый
<i>м-, о-, п-</i>	<i>мета-, орто-, пара-</i>	ЭПР	Электронный парамагнитный резонанс
<i>н</i>	Нормальный (изомер)	ЯМР	Ядерный магнитный резонанс

## ПРИЛОЖЕНИЕ 2

Стандартные обозначения некоторых тривиальных названий химических соединений

ДНК	Дезоксирибонуклеиновая кислота	FAD	Флавинадениндинуклеотид
ДНКаза	Дезоксирибонуклеаза	FCCP	Карбонилцианид-4-трифторметокси-фенилгидразон
РНК	Рибонуклеиновая кислота	FMN	Флавиномононуклеотид
РНКаза	Рибонуклеаза	GA	Грамицидин А
Трис	Трис(оксиметил)аминометан	Gpp(NH)p	Гуанозин-5'-(β,γ-имидо)трифосфат
ADP	Аденозин-5'-дифосфат	HEPES	4-(2-Гидроксиэтил)-1-пиперазинэтансульфоновая кислота
AMP	Аденозин-5'-фосфат	MES	2-(N-морфолино)этансульфоновая кислота
сAMP	Аденозин-3',5'-циклофосфат	MOPS	3-(N-морфолино)пропансульфоновая кислота
ANS	1-Анилинафталин-8-сульфонат	NAD, NAD <sup>+</sup> , NADH	Никотинамидадениндинуклеотид и его окисленная и восстановленная формы
АТФ	Аденозин-5'-трифосфат	NADP, NADP <sup>+</sup> , NADPH	Никотинамидадениндинуклеотид-фосфат и его окисленная и восстановленная формы
АТФ-аза	Аденозинтрифосфатаза	P <sub>i</sub>	Неорганический фосфат
СССР	Карбонилцианид- <i>м</i> -хлорфенилгидразон	PP <sub>i</sub>	Неорганический пирофосфат
СМ-целлюлоза	Карбоксиметилцеллюлоза	poly(A)	(3'-5')Поли(адениловая кислота)
Con A	Конканавалин А	POPOP	1,4-Бис[2-(5-фенил)оксазолил]бензол
DCC	N,N'-дициклогексилкарбодимид	PPO	2,5-Дифенилоксазол
DEAE-целлюлоза	Диэтиламиноэтилцеллюлоза	SDS	Додецилсульфат натрия
EDTA	Этилендиаминтетрауксусная кислота	TAPS	3-{[2-Гидрокси-1,1-бис(гидрокси-метил)этил]амино}-1-пропансульфоновая кислота
EGTA	Этиленгликольбис(β-аминоэтиловый эфир)-N,N'-тетрауксусная кислота		

## ПРИЛОЖЕНИЕ 3

Символы для некоторых физических и химических величин и единицы их измерения

Символ	Величина	Единица измерения
$m$	Масса	г, мг, мкг и т.д.
$M$	Молекулярная масса	Да <sup>а</sup> (дальтон)
$M_r$	Относительная молекулярная масса	безразмерная
$c_B$ или [B]	Концентрация вещества В	М (моль/л), mM и т.д.
$n$	Количество вещества	моль, нмоль, мкмоль и т.д.
$s$	Коэффициент седиментации	S (сведберг, $10^{-13}$ с)
$T$	Термодинамическая температура	К <sup>б</sup> (кельвин)
$t$	Температура по Цельсию	°C
$E$	Энергия	Дж или кал (4.1868 Дж)
$P$	Давление	Па (паскаль), или атм (101325 Па), или мм рт. ст. (133.2 Па)
$I$	Ионная сила	М, mM и т.д.
$I$	Интенсивность излучения	безразмерная
$A$	Поглощение <sup>в</sup> ( $-\lg I/I_0$ )	безразмерная
$\epsilon$	Молярный коэффициент поглощения <sup>г</sup>	М <sup>-1</sup> см <sup>-1</sup>
$\lambda$	Длина волны	нм
Le	Радиоактивность (излучательная способность)	Бк (беккерель, с <sup>-1</sup> ) или Ки ( $3.7 \times 10^{10}$ Бк)
$t$	Время	с (не сек), мин, ч (не час), сут (не сутки)
$V$	Объем	дм <sup>3</sup> (л), см <sup>3</sup> (мл), мкл и т.д.
$K$	Константа равновесия	моль/л
$K_m$	Константа Михаэлиса	М, mM
$K_s$	Субстратная константа	То же
$K_i$	Константа ингибирования	»
$k$	Константа скорости	с <sup>-1</sup> или М <sup>-1</sup> с <sup>-1</sup>
$k_{\text{кат}}$	Каталитическая константа	с <sup>-1</sup>
$v$	Скорость превращения	моль/с
$V$ или $V_{\text{max}}$	Максимальная скорость	моль л <sup>-1</sup> с <sup>-1</sup>
$h$ или $n_H$	Коэффициент Хилла	безразмерный
$U$	Напряжение	В (вольт)
$I$	Сила тока	А (ампер)
$C$	Емкость	Ф (фарада)
$R$	Сопротивление	Ом
$G$	Проводимость	См (сименс)
$\Delta\mu_{H^+}$	Градиент электрохимического потенциала	В (вольт)
$\Delta\psi$	Разность электрических потенциалов на мембране	В (вольт)
$E$ , или $V_m$ , или $\Delta\phi$	Мембранный потенциал	В (вольт)

<sup>а</sup> 1/12 массы чистого изотопа <sup>12</sup>C.<sup>б</sup> He °K.<sup>в</sup> Англ. "absorbance" – поглощательная способность.<sup>г</sup> Термин "экстинкция" употреблять не рекомендуется.