

СОДЕРЖАНИЕ

Том 498, 2021

Комбинированное действие нейтронного и протонного излучений на рост солидной формы асцитной карциномы Эрлиха и отдаленные последствия у мышей

*В. Е. Балакин, О. М. Розанова, Е. Н. Смирнова, Т. А. Белякова,
А. Е. Шемяков, Н. С. Стрельникова* 221

Сравнение эффектов моделирования септопластики и синус-лифтинга у крыс на изменение вариабельности сердечного ритма

*С. Г. Драгунова, И. В. Решетов, Т. Ф. Косырева, А. Е. Северин, Г. В. Хамидулин,
П. Е. Шмаевский, А. Н. Иноземцев, В. И. Попадюк, И. В. Кастыро, Д. К. Юдин, Т. Ю. Юнусов,
В. К. Клейман, В. В. Багдасарян, С. И. Алиева, Р. В. Чудов, Н. Д. Кузнецов,
И. В. Пинигина, А. А. Скопич, М. Г. Костяева* 227

Температурная зависимость длительности флуоресценции триптофана как показатель динамики его микроокружения

*В. В. Горохов, Б. Н. Корватовский, П. П. Нокс, Н. П. Гришанова,
С. Н. Горячев, В. З. Пащенко, А. Б. Рубин* 233

Изоформы ТТК взаимодействуют с двумя участками белка Мер-1 *Drosophila melanogaster*

К. Ю. Халисова, И. С. Осадчий, П. Г. Георгиев, О. Г. Максименко 241

Новое массовое захоронение пещерных медведей (Carnivora, Ursidae, *Ursus Kanivetz Vereshchagin*, 1973) на Среднем Урале

П. А. Косинцев, Д. О. Гимранов, И. А. Лавров, А. В. Кисагулов 245

Рекомбинантный фрагмент экстрацеллюлярного домена десмоглеина 3 человека, слитый с Fc-фрагментом IgG1 человека, селективно сорбирует аутореактивные антитела из сывороток больных пузырчаткой

*Е. Н. Ларина, В. С. Карасев, М. В. Шпилева, Т. К. Алиев, О. П. Бочкова, А. Э. Карамова,
Д. С. Балабашин, Д. Г. Дерябин, Т. В. Бобик, И. В. Смирнов, А. А. Кубанов,
С. М. Староверов, А. Г. Габиров, М. П. Кирпичников* 249

Мутации гена резистентности *VCORC1* к антикоагулянтам у синантропных грызунов на урбанизированных территориях России

*А. Н. Мальцев, С. В. Рябов, В. В. Стахеев, Н. В. Панасюк, С. Н. Гашев,
Н. В. Сорокина, Ю. А. Баженов, Е. В. Котенкова* 254

Белок BEAF-32 напрямую взаимодействует с белками Z4/putzig и Chriz/Chromator у *Drosophila melanogaster*

Л. С. Мельникова, В. В. Молодина, М. В. Костюченко, П. Г. Георгиев, А. К. Головин 258

Лазерная микротомография зрелого ооцита человека в протоколе экстракорпорального оплодотворения

А. Г. Погорелов, Н. П. Макарова, Е. А. Калинина, А. И. Панаит, В. Н. Погорелова, Г. Т. Сухих 264

Синтез белка оболочки папилломавируса L1 аногенитального типа ВПЧ6
в растительной экспрессионной системе на основе плодов томата

Н. И. Рекославская, Р. К. Саяев, А. С. Столбиков

268

О природе влияния некоторых мицелиальных актинобактерий
на прорастание семян яровой пшеницы в почвах

С. А. Шоба, Т. А. Грачева, А. Л. Степанов, Г. Н. Федотов, И. В. Горепекин

275

Моноклональные антитела к белку PRAME замедляют развитие
PRAME-экспрессирующей опухоли

*О. Н. Солопова, Ю. П. Финашутина, Н. Н. Касаткина, Н. А. Лыжко, А. А. Турба,
Л. А. Кесаева, В. А. Мисюрин, А. В. Мисюрин, М. В. Ларина, Т. К. Алиев, М. П. Кирпичников*

279

CONTENTS

Vol. 498, 2021

Combined Effect of Neutron and Proton Radiations on the Growth of Solid Ehrlich Ascites Carcinoma and Remote Effects in Mice Soils

V. E. Balakin, O. M. Rozanova, E. N. Smirnova, T. A. Belyakova, A. E. Shemyakov, and N. I. Strelnikova 221

Comparison of the Effects of Septoplasty and Sinus Lifting Simulation in Rats on Changes in Heart Rate Variability

S. G. Dragunova, I. V. Reshetov, T. F. Kosyreva, A. E. Severin, G. V. Khamidulin, P. E. Shmaevsky, A. N. Inozemtsev, V. I. Popadyuk, I. V. Kastyro, D. K. Yudin, T. Yu. Yunusov, V. K. Kleyman, V. V. Bagdasaryan, S. I. Alieva, R. V. Chudov, N. D. Kuznetsov, I. V. Pinigina, A. A. Skopich, and M. G. Kostyaeva 227

Temperature Dependence of Tryptophan Fluorescence Lifetime as an Indicator of Its Microenvironment Dynamics

V. V. Gorokhov, B. N. Korvatovsky, P. P. Knox, N. P. Grishanova, S. N. Goryachev, V. Z. Pashchenko, and A. B. Rubin 233

TTK Isoforms Interact with Two Regions of the Mep-1 Protein of *Drosophila melanogaster*

K. Y. Khalisova, I. S. Osadchiy, P. G. Georgiev, and O. G. Maksimenko 241

New Mass Burial of Cave Bears (Carnivora, Ursidae, *Ursus kanivetz*, Vereshchagin, 1973) from the Middle Urals

P. A. Kosintsev, D. O. Gimranov, I. A. Lavrov, and A. V. Kisagulov 245

Recombinant Fragment of the Extracellular Domain of Human Desmoglein 3, Fused with the Fc-fragment of Human IgG1, Selectively Adsorbs Autoreactive Antibodies from the Sera of Pemphigus Patients

E. N. Larina, V. S. Karasev, M. V. Shpilevaya, T. K. Aliev, O. P. Bochkova, A. E. Karamova, D. S. Balabashin, D. G. Deryabin, T. V. Bobik, I. V. Smirnov, A. A. Kubanov, S. M. Staroverov, A. G. Gabibov, and M. P. Kirpichnikov 249

Mutations of the Gene Resistance to Anticoagulants *VCORC1* in Commensal Rodents in Urbanized Territories of Russia

A. N. Maltsev, S. V. Ryabov, V. V. Stakheev, N. V. Panasjuk, S. N. Gashev, N. V. Sorokina, Y. A. Bazhenov, and E. V. Kotenkova 254

The BEAF-32 Protein Directly Interacts with Z4/putzig and Chriz/Chromator Proteins in *Drosophila melanogaster*

L. S. Melnikova, V. V. Molodina, M. V. Kostyuchenko, P. G. Georgiev, and A. K. Golovnin 258

Laser Microtomography for IV Foocyte of Human

A. G. Pogorelov, N. P. Makarova, A. I. Panait, V. N. Pogorelova, and G. T. Sukhih 264

The Synthesis of Main Capsid Protein of Anogenital Type HPV6 L1 in Plant Expression System on the Base of Tomato Fruits

N. I. Rekoslavskaya, R. K. Salyaev, and A. S. Ctolbikov 268

On the Nature of the Influence of Some Mycelial Actinobacteria
on the Spring Wheat Seeds Germination in Soils

S. A. Shoba, T. A. Gracheva, A. L. Stepanov, G. N. Fedotov, and I. V. Gorepekin

275

Monoclonal Antibodies to PRAME Protein Slow the Development of PRAME-Expressing Tumour

*O. N. Solopova, Yu. P. Finashutina, N. N. Kasatkina, N. A. Lyzhko, A. A. Turba, L. A. Kesaeva,
V. A. Misyurin, A. V. Misyurin, M. V. Larina, T. K. Aliev, and M. P. Kirpichnikov*

279

УДК 577.3:599.323.4

КОМБИНИРОВАННОЕ ДЕЙСТВИЕ НЕЙТРОННОГО И ПРОТОННОГО ИЗЛУЧЕНИЙ НА РОСТ СОЛИДНОЙ ФОРМЫ АСЦИТНОЙ КАРЦИНОМЫ ЭРЛИХА И ОТДАЛЕННЫЕ ПОСЛЕДСТВИЯ У МЫШЕЙ

© 2021 г. Член-корреспондент РАН В. Е. Балакин^{1,*}, О. М. Розанова², Е. Н. Смирнова², Т. А. Белякова¹, А. Е. Шемяков^{1,2}, Н. С. Стрельникова¹

Поступило 28.01.2021 г.
После доработки 13.02.2021 г.
Принято к публикации 15.02.2021 г.

Изучено комбинированное действие двукратного облучения тонким сканирующим пучком протонов (ТСПП) в суммарной дозе 80 Гр и нейтронного излучения в дозе 5 Гр на рост солидной формы асцитной карциномы Эрлиха (АКЭ) и его отдаленные последствия у мышей-опухоленосителей. Обнаружено, что комбинированное облучение мышей нейтронами как до, так и после облучения ТСПП эффективно подавляло рост солидной АКЭ в течение месяца после воздействия. По частоте и тяжести лучевых поражений кожи, наблюдаемых у мышей через 15–40 сут, облучение нейтронами после ТСПП приводило к значительному улучшению этих показателей по сравнению с облучением только ТСПП, а облучение нейтронами до ТСПП оказалось более повреждающим, чем в других вариантах. Показано, что частота рецидивирования опухолей у мышей при комбинированном облучении значительно выше, а общая продолжительность жизни ниже по сравнению с мышами, облученными только ТСПП.

Ключевые слова: нейтронное излучение, тонкий сканирующий пучок протонов, гипофракционирование, асцитная карцинома Эрлиха, рецидивные опухоли, мыши

DOI: 10.31857/S2686738921030033

В настоящее время в мире протонная терапия (ПТ) успешно используется для лечения наиболее распространенных и сложных видов рака, особенно опухолей головного мозга и в педиатрии [1, 2]. Для дальнейшего развития ПТ разрабатываются методы и подходы усиления действия протонного излучения с помощью FLASH-терапии [3] наноэнхансеров [4], использования схем гипофракционирования [5, 6] и сочетанного действия с другими видами излучений, обладающими синергетическими или аддитивными свойствами [7]. Наиболее современной в ПТ является технология тонкого сканирующего пучка протонов (ТСПП), которая позволяет с большой точностью облучать опухоли и значительно снижать нагрузку на окружающие здоровые ткани. В по-

следние годы сформировалось представление о сложном клеточном строении злокачественных образований и присутствия в них опухолевых стволовых клеток (ОСК), обладающих способностью формировать опухоль и поддерживать ее рост. Многие факты указывают на то, что именно ОСК отвечают за радиорезистентность агрессивных опухолей и возникновение рецидивов после радиотерапии [8]. Излучения с высокими значениями линейной потери энергии, к которым относятся протоны, ионы углерода и нейтроны, способны преодолеть радиорезистентность ОСК за счет индукции в них нерепарируемых повреждений ДНК [9], что делает лечение злокачественных новообразований эффективным не только за счет подавления роста первичной опухоли, но и снижения частоты рецидивирования. В работах [10, 11] выявлена высокая эффективность нейтронов при лечении радиорезистентных и распространенных видов опухолей. В работе [12] по клоногенной активности клеток меланомы В-16 показано, что предварительное облучение нейтронами может усиливать действие фотонного излучения аддитивно или синергетически, а эффект зависит от соотношения доли нейтронов в суммарной дозе облучения.

¹ Физико-технический центр Федерального государственного бюджетного учреждения науки Физический институт им. П.Н. Лебедева РАН, Протвино, Россия

² Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт теоретической и экспериментальной биофизики РАН, Пуццо, Россия

*e-mail: balakin@ftcfian.ru

Ранее нами было высказано предположение, что появление рецидивных опухолей асцитной карциномы Эрлиха (АКЭ) у мышей после гипофракционированного облучения ТСПП в дозах 30 + 30 Гр и 40 + 40 Гр происходит за счет сохранения единичных, наиболее радиоустойчивых ОСК [13]. Поскольку существует достаточно экспериментальных доказательств о роли ОСК в развитии отсроченных вторичных опухолей как на месте первичной, так и в другой локализации [14], то для повышения эффективности ПТ необходимо усиление воздействия на ОСК и снижение частоты рецидивирования.

Целью настоящей работы было исследование сочетанного действия двукратного облучения тонким сканирующим пучком протонов (ТСПП) в суммарной дозе 80 Гр и нейтронного излучения в дозе 5 Гр на рост солидной формы АКЭ и его отдаленные последствия (продолжительность ремиссии, частота рецидивов, лучевые реакции кожи, средняя продолжительность жизни (СПЖ)) у мышей-опухоленосителей.

Эксперименты проводили на 8–9-недельных самцах мышей колонии SHK с массой тела 24–28 г, которых содержали в стандартных условиях вивария [15]. Для индукции солидной АКЭ мышам внутримышечно вводили 2×10^6 клеток в бедро левой задней лапы. Мыши с перевитыми опухолями были разделены на 4 группы по 15 животных: 1 – ТСПП двумя фракциями по 40 Гр через 24 ч; 2 – 5 Гр нейтронов + через 3 ч ТСПП двумя фракциями по 40 Гр через 24 ч; 3 – ТСПП двумя фракциями по 40 Гр через 24 ч + 5 Гр нейтронов через 3 ч после второй фракции протонов; 4 – контрольная, необлученные мыши с опухолями, подвергшиеся транспортировке к источникам излучений, анестезии и имитации условий облучения. Доза облучения нейтронами 5 Гр была выбрана с учетом величины относительной биологической эффективности (ОБЭ) непрерывных нейтронов на мышах и расчета доли нейтронов в суммарной дозе облучения около 15% для получения синергетического или аддитивного эффектов.

Локальное облучение мышей проводили на 5-й день после инокуляции АКЭ, когда опухолевый узел пальпировался у всех животных. Перед облучением мышей анестезировали ксилазин/золегилом. В качестве источника ТСПП использовали протонный синхротрон (Комплекс ПТ “Прометеус”, ФТЦ ФИАН, Протвино). Мышей индивидуально фиксировали на наклонной платформе в водном фантоме. Для установления объема облучения проводили конусно-лучевую компьютерную томографию мышей на встроенном в комплекс томографа и определяли объем опухоли у каждой мыши в специально разработанной трехмерной планирующей системе. Средний объ-

ем опухоли составил $0.45 \pm 0.025 \text{ см}^3$. Расчет дозы в заданном объеме проводили в программе планирования облучения, основанной на методе Монте-Карло с итеративной динамической оптимизацией по соотношению min/max дозы. Облучение опухоли проводили импульсно (длительность импульса 200 мс, 1 импульс в 2 с) с двух противоположных направлений, энергия протонов на выходе 96–104 МэВ, сигма пучка на входе в фантом 2.8–3.6 мм. Погрешность поглощенной дозы протонов составляла около 5%.

Источником нейтронов служил портативный нейтронный генератор непрерывного действия НГ-14 (МРНЦ им. А.Ф. Цыба – филиал ФГБУ “НМИРЦ” Минздрава России, Обнинск) с энергией нейтронов 14.1 МэВ. Для локального облучения мышей фиксировали на платформе таким образом, чтобы область опухоли находилась в поле облучения нейтронами. Погрешность определения поглощенной дозы составляла 12–15%.

После облучения у животных регистрировали динамику роста АКЭ, лучевые реакции кожи, длительность ремиссии, частоту рецидивов АКЭ, СПЖ мышей-опухоленосителей. Динамику роста АКЭ определяли по объему опухоли дважды в неделю в течение месяца. Лучевые реакции кожи наблюдали согласно клинико-морфологической классификации Радиотерапевтической онкологической группы и Европейской организации по исследованию и лечению рака RTOG/EORTC-95 [16]. Статистическую оценку различий между группами, имеющими нормальное распределение, проводили с помощью t-критерия Стьюдента; в остальных случаях использовался непараметрический U-критерий Манна–Уитни. Для сравнения результатов эксперимента, где показатели выражались в долях, достоверность различий оценивали по критерию углового преобразования Фишера.

На рис. 1 показаны кривые роста АКЭ у мышей после облучения. При всех вариантах лучевого воздействия наблюдалось полное подавление роста первичной опухоли у мышей в течение месяца.

Ранее нами была показана высокая эффективность подавления роста опухолей у мышей при гипофракционированном облучении ТСПП в дозах 60 и 80 Гр [6]. И по критерию подавления роста АКЭ мы не могли ожидать модификации эффекта при комбинированном воздействии с нейтронами. Используемая нами модель тестирования новых схем радиотерапии позволяла на фоне подавления первичной опухоли в этом же временном периоде оценить кожные лучевые реакции, частота и тяжесть проявления которых влияют на общее состояние мышей-опухоленосителей в период ремиссии и могут участвовать в развитии более отдаленных последствий (время

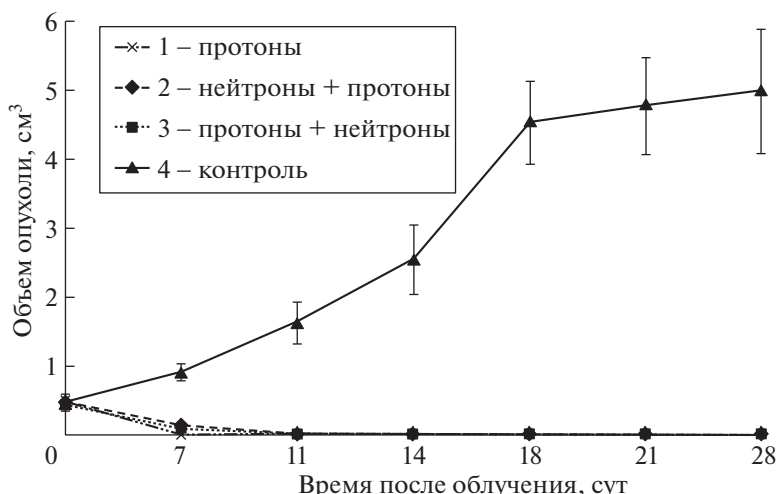


Рис. 1. Динамика роста АКЭ у мышей после облучения пучком протонов 40 + 40 Гр и их сочетанного воздействия с нейтронами в дозе 5 Гр. Данные представлены как среднее значение $\pm$ SD. $p \leq 0.01$ по сравнению с контролем.

появления рецидива, частоту рецидивов, продолжительность жизни).

У мышей оценивали тяжесть и течение лучевых поражений кожи в области облучения. Время латентного периода развития повреждений для всех групп было 10–12 сут. Во 2-й группе кожные реакции на 13-е сутки наблюдались у 100% мышей, в 1-й группе — у 70.8%, а в 3-й только у 43% мышей. Период проявления выраженных лучевых поражений кожи составлял 5–7 сут для всех групп, однако тяжесть кожных реакций была различна: во 2-й группе самая тяжелая 4-я степень поражений, характеризующаяся появлением язв и некрозов, наблюдалась у 87.5%, в 1-й группе — у 46%, а в 3-й только у 14% мышей. Кроме того, в 3-й группе, где наблюдали самую низкую частоту общего количества кожных реакций, у 29% мышей лучевые поражения не развивались более 1-й степени (умеренная эритема, эпиляция, сухой эпидермит). Различия по частоте встречаемости и тяжести протекания лучевых поражений между группами были статистически значимы ($p < 0.05$). В 3-й группе наблюдалась самая благополучная картина лучевых последствий: низкая доля мышей с поражениями кожи, большая часть которых была небольшой степени выраженности. По нескольким критериям повреждений кожи показано, что предварительное облучение нейтронами в дозе 5 Гр перед гипофракционированным ТСПП значительно усиливает эту категорию побочных последствий, что приводит к дополнительной интоксикации мышей, связанной с острым и хроническим воспалением, и может влиять на более отдаленные последствия.

Средняя продолжительность безрецидивного периода в 1-й группе составила 85 сут, а в группах с сочетанным воздействием срок ремиссии был

ниже и составлял 43 и 60 сут. СПЖ мышей без рецидивов в группах с сочетанным воздействием была меньше (118 и 124 сут) по сравнению с группой мышей, облученных только протонами (278 сут). Первые рецидивные опухоли у мышей во всех группах появлялись примерно через 35–45 сут после облучения, однако динамика гибели мышей с рецидивами в группах сочетанного воздействия резко отличалась: мыши гибли в течение следующих 2–3 мес по сравнению с группой, облученной только ТСПП, в которой этот период составил 10 мес (рис. 2).

На рис. 3 представлены кривые выживаемости мышей без рецидивов, выявлено, что в группах после сочетанного воздействия животные гибли значительно быстрее, чем при облучении только протонами, и максимальная продолжительность жизни во 2-й группе составила 7 мес, в 3-й группе — 11 мес, а в 1-й — 21 мес.

Таким образом, по критериям длительности ремиссии, частоты рецидивов и продолжительности жизни мышей-опухоленосителей показано, что дополнительное воздействие нейтронов как до, так и после гипофракционированного облучения ТСПП значительно ухудшает эти показатели эффективности терапии. Известно, что облучение опухолей такими частицами с высокой ЛПЭ, как нейтроны и ионы углерода, вызывает значительные радиационные повреждения в клетках, окружающих опухоль [17]. Ранее нами было показано при гипофракционированном облучении ТСПП разных объемов АКЭ, что облучение приводит к меньшей частоте рецидивирования у мышей по сравнению с объемом опухоли, который также рекомендован в клинической практике, но захватывает окружающие ткани с учетом

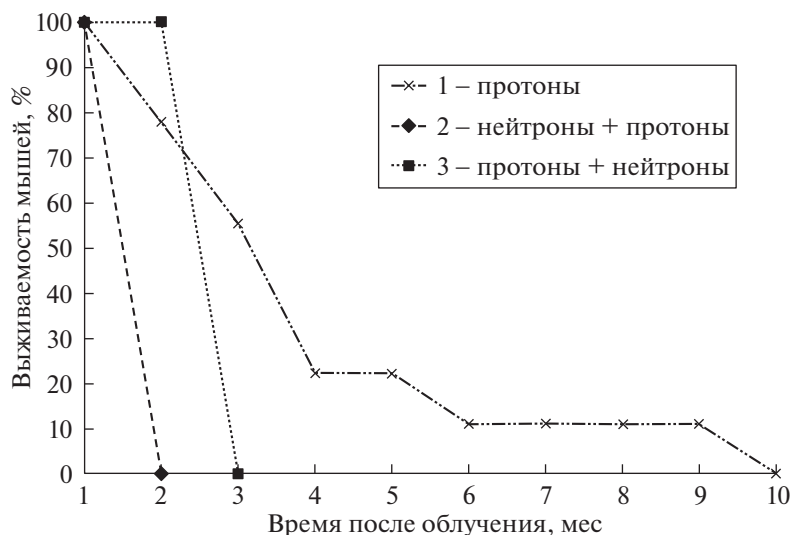


Рис. 2. Динамика гибели мышей с рецидивами после облучения протонами 40 + 40 Гр и их сочетанного воздействия с нейтронами в дозе 5 Гр.

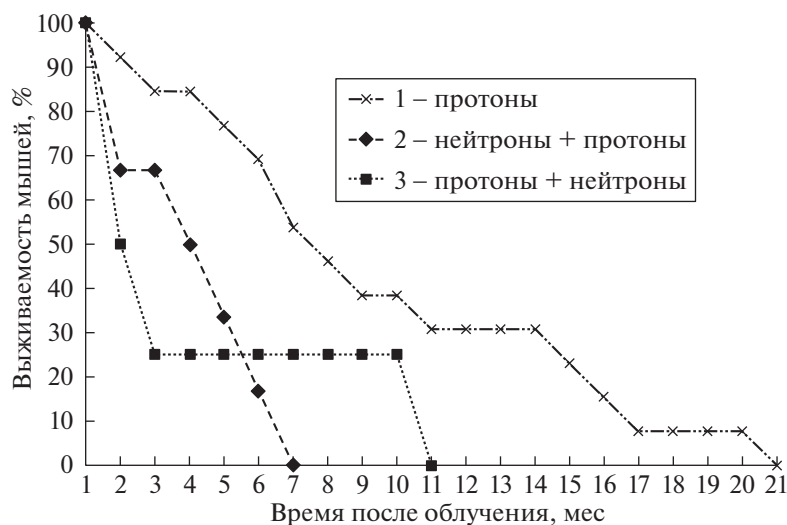


Рис. 3. Динамика гибели мышей без рецидивов после облучения протонами 40 + 40 Гр и их сочетанного воздействия с нейтронами в дозе 5 Гр.

сложных размеров опухоли, ее локализации или дыхания пациента [13]. В нашей работе, при облучении нейтронами в дозе 5 Гр был облучен большой объем здоровой ткани, находящийся за опухолью, что могло негативно сказаться на частоте рецидивирования опухоли и выживаемости мышей. Локальное облучение нейтронами опухоли в области бедренной кости мыши, в костном мозге которой находится в 7–8 раз больше миелокариот, чем в голени или предплечье, видимо, дополнительно угнетает кроветворение, что приводит к сокращению продолжительности жизни в группах после сочетанного облучения. Кроме того, возможно, эти эффекты обусловлены способ-

ностью нейтронов к прогрессирующему увеличению ОБЭ, обратно пропорциональному дозе, при котором падение дозы с расстоянием вдоль пучка нейтронов сопровождается более высокими значениями ОБЭ в нормальных тканях за пределами мишени [11].

Таким образом, в нашей работе было показано, что комбинированное облучение мышей нейтронами в дозе 5 Гр как до, так и после двукратного облучения ТСПП, эффективно подавляло рост солидной АКЭ в течение месяца после воздействия. По частоте и тяжести лучевых поражений кожи, наблюдаемых через 15–40 сут после терапии, облучение нейтронами после ТСПП приво-

дило к значительному улучшению этих показателей по сравнению с ТСПП, однако облучение нейтронами перед ТСПП оказалось более повреждающим, чем в других вариантах. В отдаленные сроки после комбинированного облучения у мышей-опухоленосителей было выявлено значительное ухудшение таких показателей, как частота рецидивирования и СПЖ. Значение последовательности воздействия излучений с разной ЛПЭ на индукцию биологических эффектов при сочетанном облучении также показано в работе по исследованию действия протонов и ионов углерода на выживаемость опухолевых клеток в культуре [18]. В работе [19] при сочетанном действии равных доз гамма-излучения и протонов (32 Гр) по критериям индукции патологических митозов, апоптотической гибели опухолевых клеток и снижения их пролиферативной активности показано усиление действия ТСПП.

Полученные в нашей работе результаты на модели контроля опухолевого роста АКЭ у мышей показывают, что регистрация как краткосрочных, так и отдаленных последствий, позволяет более полно оценить эффективность схем облучения, выявить разнонаправленный характер проявления реакций, системно подойти к преимуществам и недостаткам метода при выборе лечения опухоли в зависимости от локализации, размера, формы, близости к критическим органам, а также учесть возможный вклад лучевых повреждений кожи при выборе стратегии терапии. Используемый подход оценки противоопухолевой эффективности сочетанного действия излучений на животных может быть полезным для отработки новых схем лучевой терапии, расширения спектра клинических показаний и совершенствования ПТ.

ИСТОЧНИКИ ФИНАНСИРОВАНИЯ

Работа по исследованию комбинированного действия нейтронного и протонного излучения на рост солидной формы асцитной карциномы Эрлиха и отдаленные последствия у мышей выполнена на базе ФТЦ ФГБУН Физический институт им. П.Н. Лебедева и ФГБУН ИТЭБ РАН в рамках выполнения фундаментальных научных исследований по темам ГЗ при частичной финансовой поддержке договора НИР № 01/16 между ФТЦ ФИАН и ИТЭБ РАН.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Все применимые международные, национальные и институциональные принципы ухода и использования

животных при выполнении работы были соблюдены. Исследования проводили в соответствии с требованиями Федерации европейских научных ассоциаций по содержанию и использованию лабораторных животных в научных исследованиях (Federation of European laboratory animal science association, FELASA).

БЛАГОДАРНОСТИ

Авторы выражают благодарность А.А. Лычагину, С.Н. Корякину, Т.С. Хозяшевой — сотрудникам отдела радиационной биофизики МРНЦ им. А.Ф. Цыба — филиал ФГБУ «НМИЦ радиологии» Минздрава России, Обнинск за помощь в организации и проведении эксперимента по облучению нейтронами на оборудовании Центра.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Blanchard P., Gunn G., Lin A., Foote R.L., et al. Proton Therapy for Head and Neck Cancers // *Semin. Radiat. Oncol.* 2018. V. 28. № 1. P. 53–63.
2. Baliga S., Gandola L., Timmermann B., et al. Brain tumors: Medulloblastoma, ATRT, ependymoma // *Pediatr. Blood Cancer.* 2020. May 9.
3. Diffenderfer E., Verginadis I., Kim M., et al. Design, Implementation, and in Vivo Validation of a Novel Proton FLASH Radiation Therapy System // *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.* 2020. V. 106. № 2. P. 440–448.
4. Liu Y., Zhang P., Li F., et al. Metal-based NanoEnhancers for Future Radiotherapy: Radiosensitizing and Synergistic Effects on Tumor Cells // *Theranostics.* 2018. V. 8. № 7. P. 1824–1849.
5. Балакин В.Е., Шемяков А.Е., Заичкина С.И. и др. Гипофракционированное облучение солидной формы асцитной карциномы Эрлиха у мышей тонким сканирующим пучком протонов // *Биофизика.* 2016. Т. 61. № 4. С. 808–812.
6. Балакин В.Е., Заичкина С.И., Розанова О.М. и др. Протонное облучение мышей с асцитной карциномой Эрлиха // *Медицинская физика.* 2018. № 3. С. 24–30.
7. Ghaffari H., Beik J., Talebi A., et al. New physical approaches to treat cancer stem cells: a review // *Clin. Transl. Oncol.* 2018. V. 20. № 12. P. 1502–1521.
8. Li J., Fan W., Wang M., et al. Effects of mesenchymal stem cells on solid tumor metastasis in experimental cancer models: a systematic review and meta-analysis // *J. Transl. Med.* 2018. V. 16. № 113.
9. Chiblak S., Tang Z., Campos B., et al. Radiosensitivity of Patient-Derived Glioma Stem Cell 3-Dimensional Cultures to Photon, Proton, and Carbon Irradiation // *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.* 2016. V. 95. № 1. P. 112–119.
10. Гулидов И.А., Мардынский Ю.С., Цыб А.Ф. и др. Нейтроны ядерных реакторов в лечении злокачественных новообразований. Обнинск: МРНЦ РАМН, 2001.
11. Jones B. Clinical Radiobiology of Fast Neutron Therapy: What Was Learnt? // *Front. Oncol.* 2020. V. 10. № 1537.

12. Бекетов Е.Е., Исаева Е.В., Корякин С.Н. Зависимость эффективности одновременного воздействия гамма-квантов и нейтронов с энергией 14 МэВ от вклада плотноионизирующего компонента // Радиация и риск. 2012. Т. 21. № 3. С. 82–90.
13. Балакин В.Е., Шемяков А.Е., Заичкина С.И., и др. Отдаленные лучевые последствия после гипофракционированного облучения протонами солидной карциномы Эрлиха у мышей // Биофизика. 2017. Т. 62. № 1. С. 161–167.
14. Peitzsch C., Tyutyunnykova A., Pantel K., et al. Cancer stem cells: The root of tumor recurrence and metastases // Semin. Cancer Biol. 2017. V. 44. P. 10–24.
15. Smith J., van den Broek F., Martorell J., et al. Principles and practice in ethical review of animal experiments across Europe: summary of the report of the FELASA working group on ethical evaluation of animal experiments // Laboratory Animals. 2007. V. 41. № 2. P. 143–160.
16. Cox J., Stetz J., Pajak T. Toxicity criteria of the RTOG and EORTC // Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys. 1995. V. 31. № 5. P. 1341–1346.
17. Стрелин Г.С., Шмидт Н.К., Сильченко Н.Н., и др. Эффект экранирования части костного мозга при фракционированном облучении организма. Л: Медицина, 1978.
18. Troshina M., Koryakina E., Potetnya V., et al. The effect of combined proton and carbon ion irradiation on Chinese hamster B14-150 cells. In: Book of Abstracts. Eighth international conference on radiation in various fields of research; Virtual conference. 2020. P. 126.
19. Южаков В.В., Корчагина К.С., Фомина Н.К., и др. Действие G-излучения и сканирующего пучка протонов на морфофункциональные характеристики саркомы М-1 крыс // Радиация и риск. 2020. Т. 29. № 2. С. 101–114.

COMBINED EFFECT OF NEUTRON AND PROTON RADIATIONS ON THE GROWTH OF SOLID EHRlich ASCITES CARCINOMA AND REMOTE EFFECTS IN MICE SOILS

Corresponding Member of the RAS V. E. Balakin^{a, #}, O. M. Rozanova^b, E. N. Smirnova^b,
T. A. Belyakova^a, A. E. Shemyakov^{a, b}, and N. I. Strelnikova^a

^a Physical Technical Center, P.N. Lebedev Physical Institute of the Russian Academy of Sciences, Protvino, Russian Federation

^b Institute of Theoretical and Experimental Biophysics of the Russian Academy of Sciences, Pushchino, Russian Federation

[#]e-mail: balakin@frcfian.ru

The combined effect of the irradiation with a pencil beam scanning of protons (PBSP) at a total dose of 80 Gy and neutron radiation at a dose of 5 Gy on the growth of solid Ehrlich ascites carcinoma (EAC) and the remote effects in tumor-bearing mice has been studied. Combined irradiation of mice with neutrons before and after irradiation with PBSP, as well as irradiation only with PBSP, effectively suppressed the growth of solid EAC within one month. In terms of the frequency and severity of radiation-induced skin reactions of mice observed 15–40 days after therapy, neutron irradiation after the irradiation with PBSP showed better values of these parameters compared to only PBSP, however, exposure to neutrons before PBSP was more damaging compared to the other two options. It was also shown that the tumor relapse rate in the groups of animals with combined irradiation was higher, and the total lifespan was lower than the group of mice irradiation only PBSP.

Keywords: neutron radiation, pencil beam scanning of protons, hypofractionation, Ehrlich ascites carcinoma, tumor relapses, mice

УДК 612.811.4, 616.314-74, 612.861, 612.313.82, 612.897, 612.899, 57.054

СРАВНЕНИЕ ЭФФЕКТОВ МОДЕЛИРОВАНИЯ СЕПТОПЛАСТИКИ И СИНУС-ЛИФТИНГА У КРЫС НА ИЗМЕНЕНИЕ ВАРИАБЕЛЬНОСТИ СЕРДЕЧНОГО РИТМА

© 2021 г. С. Г. Драгунова¹, Академик РАН И. В. Решетов^{2,3}, Т. Ф. Косырева¹,
А. Е. Северин¹, Г. В. Хамидулин¹, П. Е. Шмаевский¹, А. Н. Иноземцев⁴,
В. И. Попадюк¹, И. В. Кастыро^{1,*}, Д. К. Юдин^{5,6}, Т. Ю. Юнусов⁷, В. К. Клейман¹,
В. В. Багдасарян¹, С. И. Алиева¹, Р. В. Чудов¹, Н. Д. Кузнецов¹,
И. В. Пинигина¹, А. А. Скопич¹, М. Г. Костяева¹

Поступило 02.02.2021 г.
После доработки 07.02.2021 г.
Принято к публикации 08.02.2021 г.

Проведено сравнение эффекта моделирования септопластики и синус-лифтинга у крыс на изменения частотной области вариабельности сердечного ритма. В раннем постоперационном периоде повышается низкочастотный компонент и снижается высокочастотный. Также увеличивается диапазон VLF. Это свидетельствует об увеличении активности симпатической нервной системы и сдвиге метаболизма под влиянием постхирургического воспаления.

Ключевые слова: септопластика, стресс, синус-лифтинг, вариабельность сердечного ритма

DOI: 10.31857/S2686738921030045

ВВЕДЕНИЕ

Хирургическая альтерация у биологических объектов в результате действия стрессорных факторов провоцирует дисбаланс вегетативной нервной системы (ВНС), которая в норме посредством симпатической (СНС) и парасимпатической (ПНС) нервных систем осуществляет контроль широкого спектра физиологических

функций. Хирургическое вмешательство вызывает болевой синдром, эмоциональную реакцию, раздражение, тревожность, беспокойство и др. Хирургические вмешательства в челюстно-лицевой области и полости носа (септопластика) могут влиять на активацию СНС и ПНС, а также на различные реакции сердца, вызванные регуляторным действием ВНС [1]. Одной из распространенных хирургических процедур среди стоматологических вмешательств является синус-лифтинг [6, 16, 17]. Имеются многочисленные морфологические исследования результатов проведения различных техник синус-лифтинга на окружающие ткани [8]. Так, имеются многочисленные данные гистологической оценки различных способов синус-лифтинга [8], однако исследований, посвященных физиологической оценке степени стрессогенности синус-лифтинга и сравнению этой манипуляции с другими хирургическими вмешательствами, в челюстно-лицевой области крайне мало.

Цель исследования: сравнить степень стрессогенности моделирования септопластики и синус-лифтинга на основании анализа вариабельности сердечного ритма у биологических объектов (крысы).

¹ ФГАОУ ВО Российский университет дружбы народов, Москва, Россия

² ФГАОУ ВО Первый Московский государственный медицинский университет им. И.М. Сеченова (Сеченовский университет), Москва, Россия

³ ФГБОУ ДПО Российская медицинская академия непрерывного профессионального образования, Москва, Россия

⁴ ФГБОУ ВО Московский университет имени М.В. Ломоносова, Москва, Россия

⁵ Московский университет им. С.Ю. Витте, Москва, Россия

⁶ ФГБУ НМИЦ радиологии Минздрава России, Москва, Россия

⁷ Городская клиническая больница № 40 ДЗМ, Москва, Россия

*e-mail: ikastyro@gmail.com

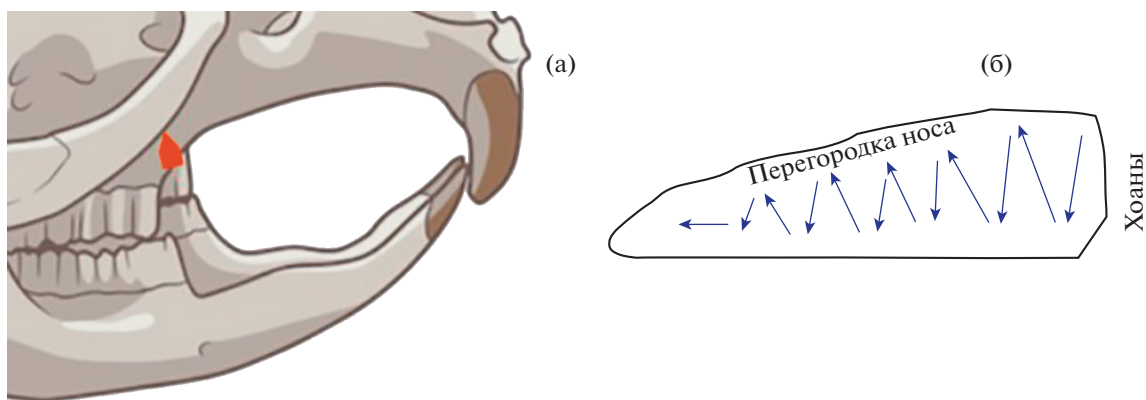


Рис. 1. Схема проведения моделирования синус-лифтинга (а) и септопластики (б). Красной стрелкой указано место повреждения кости, синими стрелками — направление скарификации слизистой перегородки носа.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Работа была проведена на 20 половозрелых крысах-самцах линии Wistar массой 205.25 ± 10.15 г. За 3 сут до операций всем животным под местной анестезией 2% раствором лидокаина и общей анестезией раствором золетила 50 (тилетамина гидрохлорид и золазепам гидрохлорид) (3 мг на 100 г массы тела крысы) устанавливались 3 металлических полукольца с округлыми наконечниками для последующей фиксации электродов. Через три дня после этого проводили запись электрокардиограммы (ЭКГ), после в этот же день проводили хирургические вмешательства. Для оценки состояния ВНС проводили спектральный анализ вариабельности сердечного ритма (ВСР) у крыс до операции, через 24 и 48 ч после моделирования септопластики и синус-лифтинга. Влияние гуморального и надсегментарного уровней регуляции ВСР оценивали при помощи анализа очень низкочастотного (VLF), а состояние ПНС и СНС — с помощью высокочастотного компонента сердечного ритма (HF) и низкочастотного компонента сердечного ритма (LF), соответственно, как процентное отношение каждого частотного показателя от их суммы, также оценивали отношение LF/HF (вагосимпатический индекс).

За 10 мин всем крысам до операции в целях общей анестезии внутривенно вводили раствор золетила 50 в дозировке 15 мг/кг. Моделирование септопластики (1-я группа, $n = 10$) проводили стандартным методом путем зигзагообразной скарификации слизистой оболочки полости носа (рис. 1а) [13, 14]. Синус-лифтинг (2-я группа, $n = 10$) осуществляли с использованием описанного выше анестезиологического пособия путем нарушения целостности костной структуры альвеолярного отростка с одной стороны микробором перед передним малым коренным зубом в сторону верхнечелюстной пазухи глубиной 2 мм и диамет-

ром 1 мм, при этом не повреждая ее слизистой оболочки (рис. 1б). Для оценки различий результатов до и после операции использовали критерий для связанных выборок Вилкоксона.

Исследования на животных проводили согласно требованиям “Правил проведения работ с использованием экспериментальных животных” (1984 г.) и “Европейской конвенции о защите позвоночных животных, используемых для экспериментов или в иных научных целях” (1986 г.). Исследования одобрены этическим комитетом МИ РУДН от 18.09.2020 (протокол № 1)

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Низкочастотный компонент. Согласно критерию Вилкоксона, достоверные различия с нормальными значениями ($45.04 \pm 2.77\%$) наблюдались во второй группе через 48 ч после операции ($48.96 \pm 3.7\%$) ($p < 0.01$). В 1-й группе, по сравнению 24-часовым измерением ($40.59 \pm 5.67\%$), через 48 ч LF достоверно вырос ($47.24 \pm 5.3\%$) после моделирования септопластики ($p < 0.05$). Аналогичные изменения наблюдались и во 2-й группе ($43.82 \pm 3.95\%$ и $48.96 \pm 3.69\%$ соответственно) ($p < 0.01$) (рис. 2а). Очень низкочастотный компонент, по сравнению с дооперационными данными ($55.61 \pm 3.88\%$), в 1-й группе достоверно был больше и через 24 ч ($62.09 \pm 3.22\%$) ($p < 0.01$), и через 48 ч после операции ($72.17 \pm 5.03\%$) ($p < 0.001$). Одновременно было отмечено его повышение и в динамике ($p < 0.01$). Во второй группе было отмечено повышение очень низкочастотного через 24 и 48 ч ($65.55 \pm 4.05\%$ и $70.98 \pm 3.58\%$ соответственно), по сравнению с нормой ($p < 0.001$) (рис. 2). Снижение показателей высокочастотного компонента было отмечено на второй день и в первой (23.06 ± 5.01) ($p < 0.001$), и во второй группах ($26.8 \pm 4.82\%$) ($p < 0.01$), по сравнению с нормой ($32.59 \pm 3.05\%$). По сравнению с первым днем группы моделирования септопластики ($33.96 \pm$

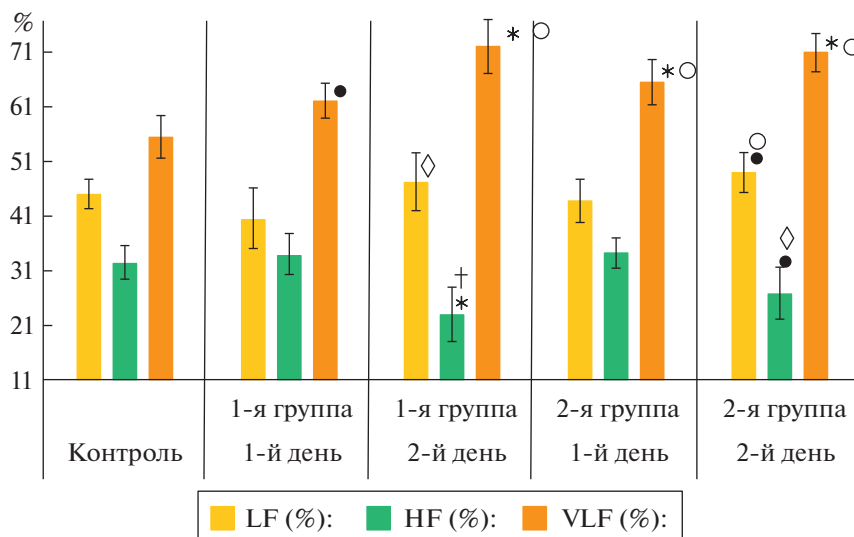


Рис. 2. Изменения относительной мощности частотной области ВСП у крыс (%) после моделирования септопластики и синус-лифтинга.

Примечание: * — достоверные различия между данными до и после операции внутри групп при $p < 0.001$; • — достоверные различия между данными до и после операции внутри групп при $p < 0.01$; † — достоверные различия между сроками наблюдения после операции внутри групп при $p < 0.001$; o — достоверные различия между сроками наблюдения после операции внутри групп при $p < 0.01$; ◇ — достоверные различия между сроками наблюдения после операции внутри групп при $p < 0.05$.

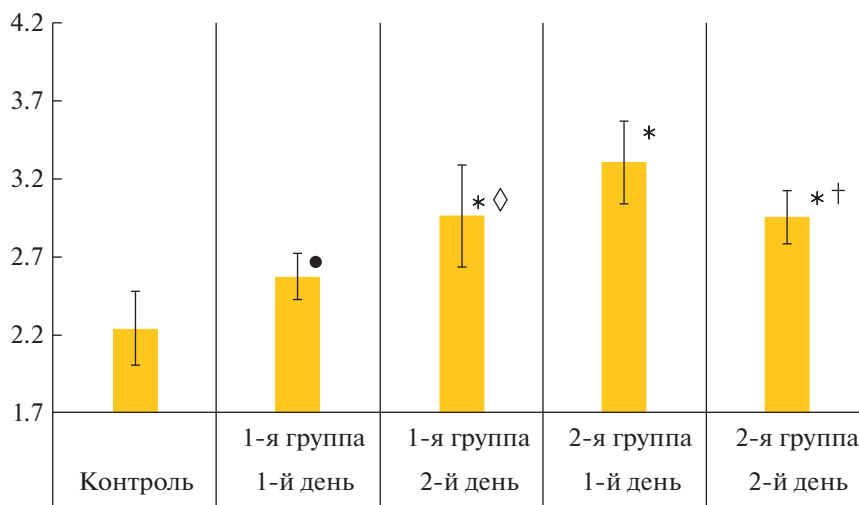


Рис. 3. Изменения LF/HF у крыс после моделирования септопластики и синус-лифтинга.

Примечание: * — достоверные различия между данными до и после операции внутри групп при $p < 0.001$; • — достоверные различия между данными до и после операции внутри групп при $p < 0.01$; † — достоверные различия между сроками наблюдения после операции внутри групп при $p < 0.001$; ◇ — достоверные различия между сроками наблюдения после операции внутри групп при $p < 0.05$.

3.78%) ($p < 0.001$) и моделирования синус-лифтинга ($34.29 \pm 2.85\%$) ($p < 0.05$), на вторые постоперационные сутки было отмечено достоверное снижение высокочастотного компонента (рис. 2).

Вагосимпатический индекс, по сравнению с контролем (2.24 ± 0.24), в первой группе достоверно увеличивался в первый день (2.57 ± 0.15)

($p < 0.01$) и во второй день (2.96 ± 0.33) ($p < 0.01$). Во второй группе была также отмечена положительная динамика, по сравнению с нормой: 24 ч — 3.3 ± 0.27 ; 48 ч — 2.95 ± 0.17 ($p < 0.001$). Сравнивая динамику изменения LF/HF на протяжении послеоперационного периода, было отмечено, что через 48 ч в первой группе этот показатель досто-

верно увеличился ($p < 0.05$), а во второй группе, напротив, уменьшился ($p < 0.001$) (рис. 3).

ОБСУЖДЕНИЕ ПОЛУЧЕННЫХ РЕЗУЛЬТАТОВ

Хирургические манипуляции в челюстно-лицевой области приводят к изменениям вариабельности сердечного ритма [3]. Во избежание распространения постхирургического воспалительного процесса при моделировании синус-лифтинга в данном исследовании ставилась задача разрушить только костную ткань в области альвеолярного отростка верхней челюсти крыс и не повредить слизистую оболочку верхнечелюстных пазух, наличие которых у крыс в настоящее время не подвергается сомнению [2, 5].

Традиционно анализ ВСР в частотной области выявляет два или более пика: более низкую частоту (<0.15 Гц) и пик более высокой частоты (>0.15 Гц), которые, как правило, соотносят с симпатическим и парасимпатическим влиянием на сердечную деятельность соответственно [4]. Снижение HF по сравнению с LF и рост VLF, которые наблюдаются одновременно изменением поведения крыс в условиях стресса [13], можно объяснить эффектом постхирургического воспаления. Известно, что колебания HF-компонента тесно связаны с выбросом в кровеносное русло провоспалительных цитокинов через час после воздействия стрессового фактора [11]. Кроме того, показано, что неадекватное хирургической альтерации анестезиологическое пособие способствует повышенной активности именно ПНС [18]. На ранних сроках после септопластики в полости носа воспалительные реакции сопровождаются отеком слизистой оболочки, а это приводит к сужению носовых ходов и последующей гипоксемии, что, в свою очередь, увеличивает активность ПНС [15]. Однако при моделировании септопластики и синус-лифтинга в первые двое суток после операции произошло падение HF, вероятно, из-за развития классического стресс-ответа и развития депрессивно-подобного состояния [19].

Известно, что амплитуда VLF тесно связана с эмоциональным стрессом, а также VLF может показывать регуляцию метаболизма [4]. Тесная связь этого компонента ВСР с метаболизмом подтверждается полным параллелизмом между суточными изменениями концентрации адипоцитарного гормона лептина в сыворотке крови и суточными изменениями VLF-компонента ВСР [20].

Вагосимпатический индекс (LF/HF) показывает соотношение взаимодействия СНС и ПНС [10]. Однако существует мнение, что этот показатель не вполне точно отражает симпато-вагусный баланс из-за того, что ранее многими авторами не принималась во внимание его многофакторность LF и HF [7]. Существуют и другие данные, показывающие, что вагосимпатический индекс все-таки может отражать состояние баланса вегетативной нервной системы. Так, при фибромиалгии увеличение LF/HF соответствует сдвигу ВНС к доминированию симпатического отдела или к уменьшению роли парасимпатического, что вполне согласуется с природой вегетативной функции при фибромиалгии [12]. Можно предположить, что снижение соотношения LF/HF на второй день после операции во второй группе свидетельствует о меньшей воспалительной реакции, а также, по сравнению с первой группой, отсутствии других альтерирующих факторов — большая площадь операционного поля, уменьшение носовых ходов, сенсорная депривация обонятельного анализатора [13, 14].

Ранее было показано, что моделирование септопластики у крыс провоцирует появление тревожно-депрессивного состояния, что проявляется изменениями в поведении животных [13, 14]. Так же известно, что хирургическая альтерация в челюстно-лицевой области приводит к изменениям в цитоархитектонике пирамидного слоя гиппокампа, росту апоптоза нейронов в аммониевом роге гиппокампа [14], выраженным местным воспалительным реакциям депрессивного состояния, что проявляется изменениями в поведении животных [9]. Кроме того, моделирование септопластики в раннем послеоперационном периоде провоцирует увеличение активности симпатической нервной системы [13, 14], что согласуется с данными, полученными в настоящем исследовании.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Хирургическая травматизация перегородки носа и верхней челюсти у крыс в раннем послеоперационном периоде вызывает сдвиг вегетативной нервной системы в сторону ее симпатического компонента. Что косвенно свидетельствует о возникновении острого стресс-ответа, наличии депрессивно-тревожного состояния, увеличении мобилизации высших вегетативных центров и росте влияния нейрогуморального и метаболического уровней регуляции. Степень стрессогенности моделирования септопластики и синус-лифтинга у крыс в раннем послеоперационном периоде одинаково выражена.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Баевский Р.М., Иванов Г.Г., Чирейкин Л.В., Гаврилушкин А.П., Довгалецкий П.Я., Кукушкин Ю.А., Миронова Т.Ф., Прилуцкий Д.А., Семенов А.В., Федоров В.Ф., Флейшман А.Н., Медведев М.М. Анализ variability сердечного ритма при использовании различных электрокардиографических систем (часть 1). // Вестник аритмологии. 2002. № 24. С. 65–87.
2. Едранов С.С. Экспериментальная модель травмы и посттравматической реорганизации слизистой оболочки верхнечелюстного синуса. Российский стоматологический журнал. 2012. № 6. С. 7–12.
3. Попадюк В.И., Кастыро И.В., Ермакова Н.В., Торшин В.И. Септопластика и тонзиллэктомия: сравнение эффективности местных анестетиков с позиций острого стресс-ответа. Вестник оториноларингологии. 2016; 81(3): 7–11. Popadyuk V.I., Kastyro I.V., Ermakova N.V., Torshin V.I. Septoplasty and tonsillectomy: acute stress response as a measure of effectiveness of local anesthetics. // Vestn Otorinolaringol. 2016. V. 8. № 1(3). P. 7–11.
4. Agadzhanian N.A., Batotsyrenova T.E., Severin A.E., Semenov Y.N., Sushkova L.T., Gomboeva N.G. Comparison of specific features of the heart rate variability in students living in regions with different natural and climatic conditions. // Human Physiology. 2007. V. 33. № 6. P. 715–719.
5. Alvites R.D., Caseiro A.R., Pedrosa S.S., Branquinho M.E., Varejão A.S.P., Maurício A.C. The Nasal Cavity of the Rat and Mouse-Source of Mesenchymal Stem Cells for Treatment of Peripheral Nerve Injury. // The Anatomical Record. 2018. V. 301. P. 1678–1689.
6. Aragonese Lamas J.M., Gómez Sánchez M., Cuadrado González L., Suárez García A., Aragonese Sánchez J. Vertical Bone Gain after Sinus Lift Procedures with Beta-Tricalcium Phosphate and Simultaneous Implant Placement-A Cross-Sectional Study. // Medicina. 2020. V. 56. P. 609.
7. Billman G.E. The LF/HF ratio does not accurately measure cardiac sympatho-vagal balance. // Frontiers in Physiology. 2013. V. 20. № 4. P. 26.
8. Dard M. Animal models for experimental surgical research in implant dentistry. In: BALLO A.: Implant dentistry research guide: basic, transitional and experimental clinical research. // Nova Science Publishers, Inc., Hauppauge NY. USA. 2012. P. 167–190.
9. Dolgalev A.I., Svyatoslavov D.S., Pout V.A., Reshetov I.V., Kastyro I.V. Effectiveness of the Sequential Use of Plastic and Titanium Implants for Experimental Replacement of the Mandibular Defect in Animals using Preliminary Digital Design. // Doklady Biochemistry and Biophysics. 2021. V. 496. P. 36–39.
10. Eckberg D.L. Sympathovagal balance: a critical appraisal. // Circulation. 1997. V. 96. P. 3224–3232.
11. Goebel M.U., Mills P.J., Irwin M.R., Ziegler M.G. Interleukin-6 and tumor necrosis factor-alpha production after acute psychological stress, exercise, and infused isoproterenol: differential effects and pathways. // Psychosom Med. 2000. V. 62. P. 591–598.
12. Kang J.H., Kim J.K., Hong S.H., Lee C.H., Choi B.Y. Heart Rate Variability for Quantification of Autonomic Dysfunction in Fibromyalgia. // Ann Rehabil Med. 2016. V. 40. № 2. P. 301–309.
13. Kastyro I.V., Inozemtsev A.N., Shmaevsky P.E., Khamidullin G.V., Torshin V.I., Kovalenko A.N., Pryanikov P.D., Guseinov I.I. The impact of trauma of the mucous membrane of the nasal septum in rats on behavioral responses and changes in the balance of the autonomic nervous system (pilot study) // J. Phys.: Conf. Ser. 2020. V. 1611 (012054).
14. Kastyro I.V., Reshetov I.V., Khamidullin G.V., Shmaevsky P.E., Karpukhina O.V., Inozemtsev A.N., Torshin V.I., Ermakova N.V., Popadyuk V.I. The Effect of Surgical Trauma in the Nasal Cavity on the Behavior in the Open Field and the Autonomic Nervous System of Rats. // Doklady Biochemistry and Biophysics. 2020. V. 492. P. 121–123.
15. Kim E.J., Pellman B., Kim J.J. Stress effects on the hippocampus: a critical review. // Learn Mem. 2015. V. 22. Iss. 9. P. 411–416.
16. Mello Lima J.F., Melo de Matos J.D., Santos Í.K.S., de Oliveira A.J.A.G., de Vasconcelos J.E.L., Zogheib L.V., Sartorelli de Castro D. Maxillary sinus lift surgery techniques: a literature review maxillary sinus lift surgery techniques: a literature review maxillary sinus lift surgery techniques: a literature review. // Int. J. Adv. Res. 2017. V. 5. № 8. P. 832–844.
17. Pinchasov G., Juodzbalys G. Graft-Free Sinus Augmentation Procedure: a Literature Review. // Journal of Oral and Maxillofacial Research. 2014. V. 5. № 1. P. 1.
18. Popadyuk V.I., Kastyro I.V., Ermakova N.V., Torshin V.I. Septoplasty and tonsillectomy: acute stress response as a measure of effectiveness of local anesthetics. // Vestn. Otorinolaringol. 2016. V. 81. Iss. 3. P. 7–11.
19. Sturman O., Germain P.L., Bohacek J. Exploratory rearing: a context- and stress-sensitive behavior recorded in the open-field test. // Stress. 2018. V. 2. Iss. 5. P. 443–452.
20. Takabatake N., Nakamura H., Minamihaba O., Inage M., Inoue S., Kagaya S., Michiyasu Y., Tomoike H. A Novel Pathophysiological Phenomenon in Cachexic Patients with Obstructive Pulmonary Disease: the Relationship between the Circadian Rhythm of Circulating Leptin and Very Low Frequency Component of Heart Rate Variability. // Am. J. Respir. Crit. Care Med. 2001. V. 163. P. 1314–1319.

COMPARISON OF THE EFFECTS OF SEPTOPLASTY AND SINUS LIFTING SIMULATION IN RATS ON CHANGES IN HEART RATE VARIABILITY

S. G. Dragunova^a, Academician of the RAS I. V. Reshetov^{b,c}, T. F. Kosyreva^a, A. E. Severin^a, G. V. Khamidulin^a, P. E. Shmaevsky^a, A. N. Inozemtsev^d, V. I. Popadyuk^a, I. V. Kastyro^{a,#}, D. K. Yudin^{e,f}, T. Yu. Yunusov^g, V. K. Kleyman^a, V. V. Bagdasaryan^a, S. I. Alieva^a, R. V. Chudov^a, N. D. Kuznetsov^a, I. V. Pinigina^a, A. A. Skopich^a, and M. G. Kostyaeva^a

^a Peoples' Friendship University of Russia (RUDN University), Moscow, Russian Federation

^b I.M. Sechenov First Moscow State Medical University (Sechenov University), Moscow, Russian Federation

^c Russian Medical Academy of Continuous Professional Education, Moscow, Russian Federation

^d Lomonosov Moscow State University, Moscow, Russian Federation

^e Moscow University S.Yu. Witte, Moscow, Russian Federation

^f National Medical Research Center for Radiology, Moscow, Russian Federation

^g City Clinical Hospital No. 40 of the Moscow Department of Health, Moscow, Russian Federation

[#] e-mail: ikastyro@gmail.com

A comparison was made of the effect of septoplasty and sinus lifting simulation in rats on changes in the frequency domain of heart rate variability. In the early postoperative period, the low-frequency component increases, and the high-frequency component decreases. The VLF range is also increased. This indicates an increase in the activity of the sympathetic nervous system and a shift in metabolism under the influence of post-surgical inflammation.

Keywords: septoplasty, stress, sinus lift, heart rate variability

УДК 577

ТЕМПЕРАТУРНАЯ ЗАВИСИМОСТЬ ДЛИТЕЛЬНОСТИ ФЛУОРЕСЦЕНЦИИ ТРИПТОФАНА КАК ПОКАЗАТЕЛЬ ДИНАМИКИ ЕГО МИКРООКРУЖЕНИЯ

© 2021 г. В. В. Горохов^{1,*}, Б. Н. Корватовский¹, П. П. Нокс¹,
Н. П. Гришанова¹, С. Н. Горячев¹, В. З. Пашенко¹,
член-корреспондент РАН А. Б. Рубин¹

Поступило 08.12.2020 г.
После доработки 29.01.2021 г.
Принято к публикации 05.02.2021 г.

Исследованы спектрально-кинетические характеристики флуоресценции молекулы триптофана в водном растворе и в составе белка (альбумин) в диапазоне температур от -170 до 25°C . Для объяснения наблюдаемых изменений в спектрах и длительности флуоресценции триптофана от температуры использована модель переходов между возбужденным и основным состояниями с привлечением состояния с переносом заряда, которая учитывает нелинейный характер динамики этих переходов. В данных процессах важную роль играют взаимодействие молекул триптофана с его микроокружением, а также перестройки в системе водородных связей водно-белковой матрицы, окружающей молекулу триптофана.

Ключевые слова: триптофан, флуоресценция, водородные связи, молекулярная динамика

DOI: 10.31857/S2686738921030057

Изучение влияния температуры на активность функциональных белков давно является одним из важнейших подходов для выяснения физико-химических механизмов их работы [1]. Для исследования внутримолекулярной конформационной динамики белков, тесно связанной с их функциональной активностью, в качестве природного внутреннего индикатора широко используется флуоресценция триптофановых остатков в составе белков. Источником информации о характере внутримолекулярной динамики ближайшего окружения возбужденной молекулы триптофана (Trp), в том числе о роли водородных связей в этом окружении, являются зависимости от температуры спектров и длительности флуоресценции Trp в воде и в составе белка [2–5]. Роль водородных связей как в структурно-динамическом устройстве белков в целом, так и в определении ими спектрально-кинетических характери-

стик внутренних триптофанилов в частности, до настоящего времени остается актуальной темой исследований [1, 5]. Кинетика затухания флуоресценции Trp в растворе, а также в составе пептидов и белков многокомпонентна. В зависимости от типа растворителя, pH, наблюдают 2–3 компоненты кинетики флуоресценции триптофана с временами от сотен пикосекунд до ~ 10 нс. В белках также регистрируют 2–3-компонентную кинетику флуоресценции Trp в аналогичном временном интервале [5–9].

Время жизни возбужденных электронных состояний при разных температурах во многом обусловлено процессом переноса электрона с индольного кольца возбужденной молекулы Trp на амидные группы основного скелета молекулы либо в систему водородных связей (H-связей), образованную между молекулами Trp и их окружением [10]. В последнем случае перенос электрона сопровождается образованием состояния с переносом заряда (Charge Transition State, CTS) [9]. Сольватация возбужденных молекул за счет взаимодействия с ближайшим окружением может инду-

¹ Московский государственный университет
имени М.В. Ломоносова, Москва, Россия
*e-mail: Gorokhgeron149@gmail.com

цировать сдвиги их спектров поглощения и флуоресценции в зависимости от температуры [5, 11].

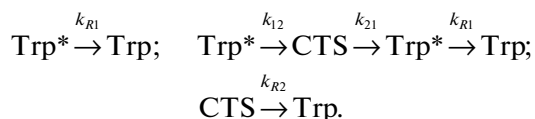
В работе [12] методом квазиупругого рассеяния нейтронов определены три основных температурных области, определяющих динамику протонов водородных связей в водно-белковой среде. В области I ($T < -150^\circ\text{C}$) происходят чисто гармонические колебания протонов около равновесных положений, в области II ($-150^\circ\text{C} \leq T < -30^\circ\text{C}$) динамика водно-белковой среды характеризуется скачкообразной диффузией протонов вдоль Н-связей в пикосекундном диапазоне. В температурной области III ($T > -30^\circ\text{C}$) динамика водно-белковой среды определяется более медленными масштабными движениями крупных молекулярных фрагментов [12].

В водном растворе Тгр в температурной области III формируется стабильный цвиттерионный комплекс Н-связей молекулы Тгр с водным окружением [13]. В белке вокруг образовавшегося цвиттерионного комплекса формируется водная оболочка с частично упорядоченными Н-связями за счет их взаимодействия с полярными группами пептидных связей Тгр [12, 13]. В электронно-возбужденном состоянии молекулы Тгр может происходить дополнительное упорядочивание Н-связей за счет увеличения их жесткости [13]. В результате в достаточно упорядоченной системе Н-связей может образоваться квазизона проводимости, в которой электрон, находящийся на индольном кольце возбужденной молекулы Тгр, делокализуется и затем может перейти на N—H группы пептидных связей с образованием CTS [13]. Данный эффект возможен при достаточно низких температурах, причем скорость переноса электрона от индольного кольца Тгр* в систему водородных связей должна увеличиваться при понижении температуры. При высоких температурах за счет тепловых колебаний молекул квазизона проводимости разрушается, а перенос электрона с индольных колец на амидные группы будет проходить по термоактивационному механизму. В температурной области II возможно также дополнительное упорядочивание Н-связей аналогично структурному фазовому переходу в сегнетоэлектрических кристаллах с Н-связями типа сегнетовой соли [14]. Этот процесс может происходить при таких низких температурах, когда взаимодействие диполей Н-связей молекул воды достаточно велико для их взаимного упорядочивания, но энергия теплового движения еще слишком мала, чтобы вызвать их разупорядочивание. В результате этого происходит диффузионный перескок протонов по Н-связям [12], что приводит к образованию суммарного дипольного момента в окрестности Тгр*, электрическое поле которого вызывает эффект дополнительной сольватации возбужденной молекулы Тгр. В результате за счет кулоновского взаимодействия Тгр* с ди-

полями Н-связей происходит сильный красный сдвиг спектра флуоресценции в водном растворе.

Ранее мы исследовали температурную зависимость флуоресценции триптофана в разных растворителях и рассмотрели возможность использования состояния с переносом заряда для описания процессов дезактивации возбужденного состояния молекулы Тгр [9]. В настоящей работе разработана адекватная физическая модель переходов молекулы Тгр между возбужденным и основными состояниями с привлечением состояния с переносом заряда. Именно включение CTS в процесс дезактивации приводит к возникновению нелинейной динамики этих переходов. Для подтверждения модели были детально изучены температурные зависимости многокомпонентного свечения молекул Тгр в водном растворе и в составе белка (бычий сывороточный альбумин), также приготовленного в водном растворе. При этом особый акцент сделан на выяснение роли динамики водородных связей ближайшего окружения триптофана, а также на изучение особенностей спектральных и кинетических характеристик его флуоресценции в широком диапазоне изменений температуры.

Согласно схеме электронных переходов в молекуле Тгр, показанной на рис. 1, кинетика затухания флуоресценции Тгр имеет двухкомпонентный характер.



Дезактивация возбужденного состояния триптофана происходит по двум каналам — с испусканием флуоресценции (k_{f1}) и безызлучательной ре-

лаксацией (k_{r1}) в основное состояние $S^* \xrightarrow{k_{R1}} S_0$, ($k_{R1} = k_{f1} + k_{r1}$), а также с переходом в промежуточное состояние (состояние с переносом заряда, CTS) $\text{Тгр}^* \rightarrow \text{Тгр}^+\text{R}^-$ со скоростью k_{12} , рекомбинирующего затем со скоростью k_{21} обратно в S^* состояние: $S^* \xrightarrow{k_{12}} \text{CTS} \xrightarrow{k_{21}} S^* \xrightarrow{k_{R1}} S_0$. Согласно [13], помимо обратного перехода в S^* состояние распад CTS также может происходить с испусканием флуоресценции и безызлучательной релаксацией

в основное состояние ($\text{CTS} \xrightarrow{k_{R2}} S_0$) ($k_{R2} = k_{f2} + k_{r2}$). Двухкомпонентное свечение Тгр* характеризуется двумя спектральными формами S1 и S2, присутствующими в разложении спектра флуоресценции с различными временами жизни (рис. 2). Мы предполагаем, что форма S1 в спектре флуоресценции Тгр соответствует излучательному переходу S^* состояния в основное состояние, тогда

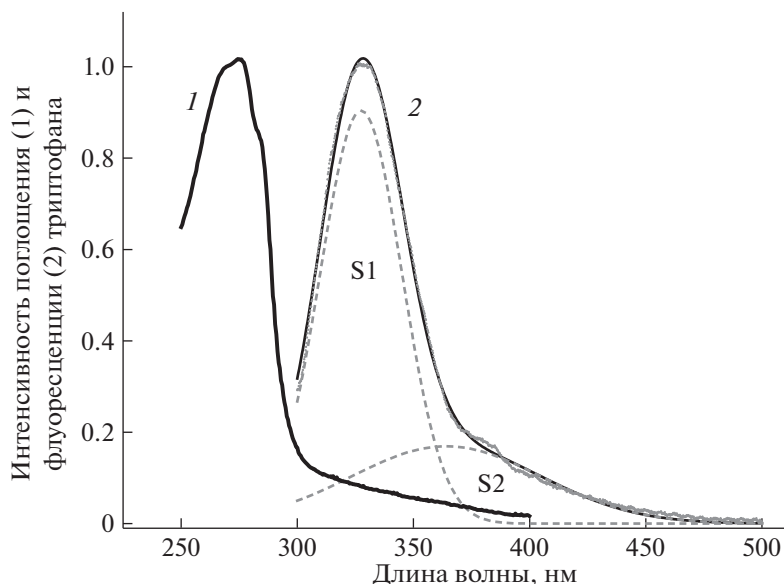


Рис. 2. Спектры поглощения (1) и флуоресценции (2) триптофана в водном растворе при комнатной температуре. Приведено разложение спектра флуоресценции Тгр на две гауссовы компоненты (формы) S1 и S2.

ния импульсов — 10 МГц, время накопления сигнала — 30 с. Таким образом, регистрируя трехмерное (t , λ , I) изображение свечения триптофанилов, мы могли измерять кинетики затухания флуоресценции для любого спектрального канала в области 286–423 нм. Кроме того, система регистрации позволяла воспроизвести спектры флуоресценции образца в любой момент времени после его возбуждения импульсом света. Образец при измерениях находился в охлаждаемой жидким азотом кювете, температуру которой контролировали с помощью термодпары. Время охлаждения до -180°C составляло ~ 10 мин, скорость последующего нагревания — 5–7 град/мин.

Аппроксимацию кинетических кривых суммой экспонент, свернутых с аппаратной функцией системы регистрации, проводили с учетом того, что дезактивация Тгр* протекает с образованием промежуточного состояния с переносом заряда Тгр⁺Р⁻ (CTS). Составив и решив систему дифференциальных уравнений, описывающих переходы в молекуле Тгр (рис. 1), мы получили выражения для населенностей n_1 и n_2 , констант скоростей затухания компонент k_1 , k_2 и, соответственно, длительности τ_1 и τ_2 двух компонент разложения в кинетике затухания флуоресценции. Эти выражения имеют вид:

$$n_1(t) = a_1 e^{-k_1 t} + a_2 e^{-k_2 t}; \quad n_2(t) = b_1 e^{-k_1 t} + b_2 e^{-k_2 t};$$

$$\begin{cases} k_1 = \frac{1}{2}(g_1 + g_2 + \sqrt{(g_1 - g_2)^2 + 4k_{12}k_{21}}) \\ k_2 = \frac{1}{2}(g_1 + g_2 - \sqrt{(g_1 - g_2)^2 + 4k_{12}k_{21}}) \end{cases} \quad (1)$$

$$\tau_1 = 1/k_1, \quad \tau_2 = 1/k_2;$$

где $g_1 = k_{R_1} + k_{12}$; $g_2 = k_{21} + k_{R_2}$.

Для a_1 , a_2 , b_1 , b_2 выражения имеют следующий вид:

$$\begin{aligned} a_1 &= \frac{k_1 - g_2}{k_1 - k_2}; & a_2 &= \frac{g_2 - k_2}{k_1 - k_2}; \\ b_1 &= \frac{-k_{12}}{k_1 - k_2}; & b_2 &= \frac{k_{12}}{k_1 - k_2}. \end{aligned}$$

Из данных выражений следует, что $a_1 + a_2 = 1$; $b_2 = -b_1$.

Обозначения параметров в уравнении (1) указаны в подписи к рис. 1.

Согласно уравнениям (1), если в некоторой области температур значение $\tau_1 = 1/k_1$ уменьшается за счет увеличения в (1) подкоренного выражения, то значение τ_2 в этой же области будет увеличиваться. Это должно приводить к антибатному характеру температурных зависимостей длительности короткой и длинной компонент кинетики флуоресценции Тгр в водном растворе в данной температурной области.

Ход экспериментальной температурной зависимости длительности τ_1 и τ_2 для двух компонент

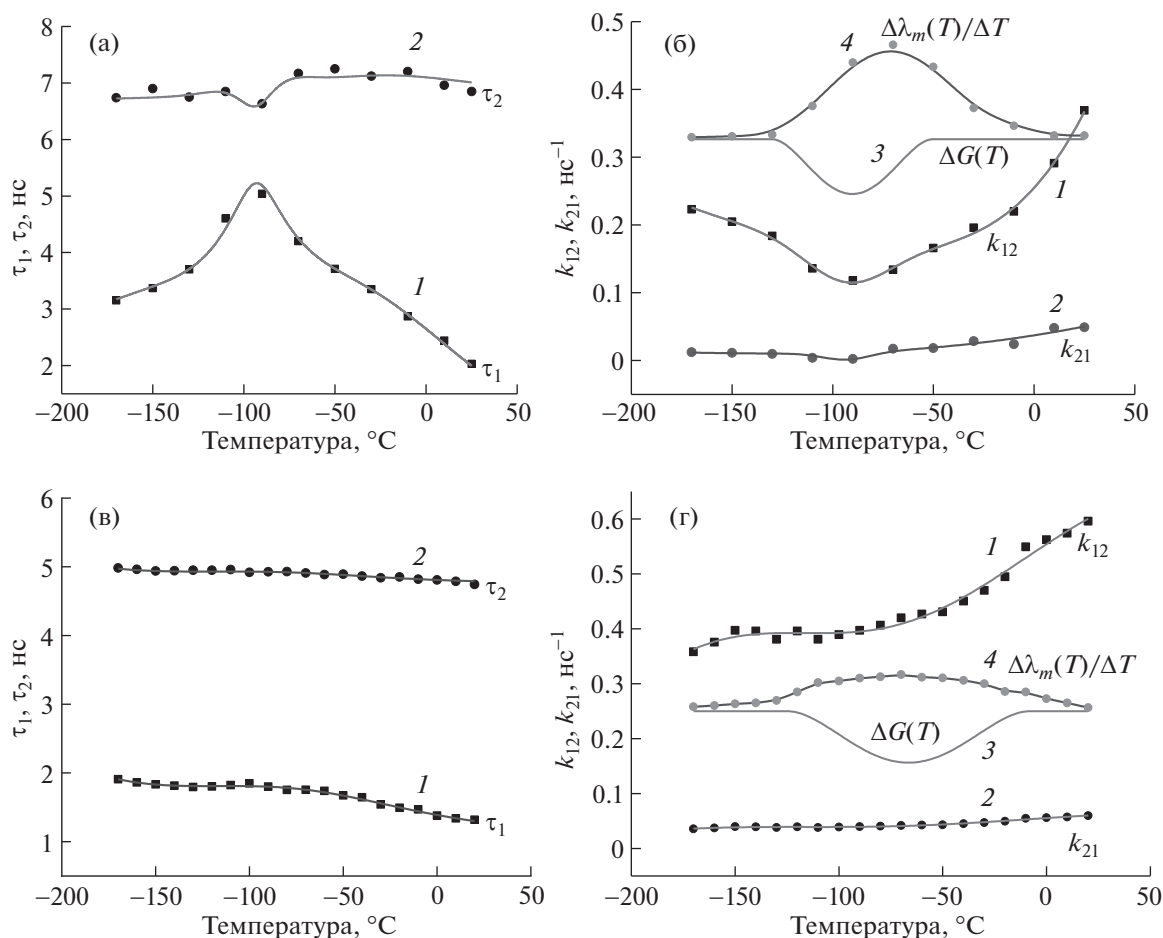


Рис. 3. (а) — температурная зависимость τ_1 быстрого (1) и τ_2 медленного (2) компонентов кинетики затухания флуоресценции триптофана в водном растворе; (б) температурная зависимость констант скорости k_{12} образования состояния с переносом заряда $\text{Trp}^* \rightarrow \text{Trp}^+\text{R}^-$ (1) и k_{21} обратного перехода $\text{Trp}^+\text{R}^- \rightarrow \text{Trp}^*$ в возбужденное состояние триптофана (2); (3) — температурная зависимость $\Delta G(T)$ для триптофана в водном растворе; (4) — температурная зависимость скорости сольватационного сдвига $\Delta\lambda_m(T)/\Delta T$ спектра флуоресценции триптофана в водном растворе; (в) — температурная зависимость τ_1 быстрого (1) и τ_2 медленного (2) компонентов кинетики затухания флуоресценции триптофана в составе альбумина; (г) — температурная зависимость констант скорости k_{12} образования состояния с переносом заряда $\text{Trp}^* \rightarrow \text{Trp}^+\text{R}^-$ (1) и k_{21} обратного перехода $\text{Trp}^+\text{R}^- \rightarrow \text{Trp}^*$ в возбужденное состояние триптофана в составе альбумина (2). (3) — температурная зависимость $\Delta G(T)$ для триптофана в составе альбумина; (4) — температурная зависимость скорости сольватационного сдвига спектра флуоресценции $\Delta\lambda_m(T)/\Delta T$ триптофана в альбумине. Сплошные линии на (а), (б), (в), (г) получены в результате аппроксимации температурных зависимостей времен затухания τ_1 , τ_2 и констант скорости k_{12} , k_{21} .

в кинетике флуоресценции Trp в водном растворе показан на рис. 3а. Видно, что температурные зависимости времен затухания короткой и длинной компонент флуоресценции τ_1 и τ_2 имеют немонотонный характер: в частности, в области температуры около -90°C наблюдается максимум τ_1 и минимум τ_2 . Из рис. 3б видно, что температурная зависимость константы скорости перехода k_{12} в области $T < -125^\circ\text{C}$ носит безактивационный характер: с увеличением температуры k_{12} уменьшается пропорционально величине $1/\sqrt{T_K}$, где T_K —

абсолютная температура. Для Trp в водной среде образование квазилоны проводимости системы Н-связей может происходить уже при температуре $T < -125^\circ\text{C}$, что приводит к безактивационному переносу электрона на амидные группы по системе Н-связей. Наоборот, при $T > -90^\circ\text{C}$ с ростом температуры происходит термоактивационное увеличение константы скорости k_{12} . Адекватная аппроксимация экспериментальной температурной зависимости k_{12} во всей исследованной области температур обеспечивается при условии

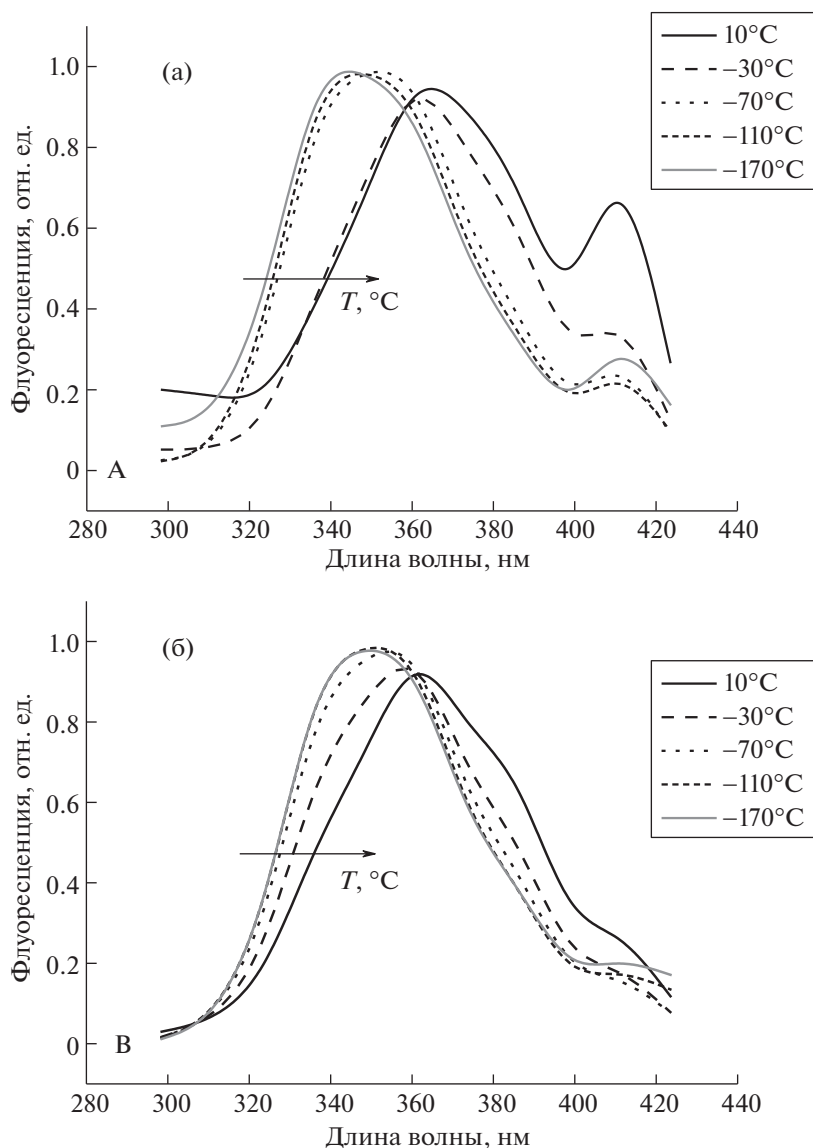


Рис. 4. Спектры флуоресценции триптофана в водном растворе (а) и в составе альбумина (б), полученные при импульсном лазерном возбуждении при температуре от -170 до 20°C . Стрелкой показано направление сольватационного сдвига спектров от низкой температуры (-170°C) до комнатной (20°C).

зависимости свободной энергии перехода ΔG от температуры в области $-125^\circ\text{C} \dots -50^\circ\text{C}$ (рис. 3б).

В области температур $T > -125^\circ\text{C}$ реализуется другой, термоактивационный механизм переноса электрона в сетку Н-связей, когда происходит размораживание и перестройка упорядоченных Н-связей. В результате взаимодействия электрического поля возникающего дипольного момента системы элементарных ячеек Н-связей с электрическим полем возбужденной молекулы Тгр происходит ее дополнительная сольватация.

Этот эффект приводит к уменьшению свободной энергии перехода $\Delta G(T)$ в данной области температур (рис. 3, кривая 3) и одновременно к

соответствующему сдвигу максимума флуоресценции Тгр в длинноволновую область (рис. 3б, кривая 4). Как видно из рис. 3б, 3г, в температурных областях $-125^\circ\text{C} < T < -50^\circ\text{C}$ для раствора Тгр в воде и в области температур $-25^\circ\text{C} < T < -10^\circ\text{C}$ для триптофана в альбумине, также растворенного в воде, происходит некоторое уменьшение константы скорости k_{12} переноса электрона. Для Тгр в растворе возникает минимум значения k_{12} (-90°C) (рис. 3б, кривая 1), максимум величины τ_1 (-93°C) (рис. 3а, кривая 1), а также минимум значения τ_2 (-93°C) (рис. 3а, кривая 2) в ходе температурных зависимостей величин этих параметров. Одновременно наблюдается антибатное по-

ведение температурных зависимостей значений τ_1 и τ_2 для Тгр в водном растворе (рис. 3а). Для альбумина в воде минимум параметра k_{12} и соответствующий максимум τ_1 не наблюдаются из-за меньшей величины дополнительного сольватационного сдвига $\Delta G(T)$ (рис. 3г, кривая 4). Как для Тгр в воде при $T > -50^\circ\text{C}$, так и в водном растворе альбумина при $T > -10^\circ\text{C}$ за счет тепловых флуктуаций происходит частичное разупорядочивание системы водородных связей, что приводит к исчезновению эффекта уменьшения ΔG (рис. 3б, 3г, кривые 3). При этом согласно термоактивационному механизму переноса электрона скорость переноса электрона k_{12} в этой области увеличивается с ростом температуры (рис. 3б, 3г, кривые 1).

Температурная зависимость константы скорости k_{21} (рис 3б, 3г, кривые 2) хорошо аппроксимируется соотношением Аррениуса: $k_{21} = k_{12}\exp(-\Delta G/k_B T_K)$, где k_B — постоянная Больцмана, T_K — абсолютная температура.

Максимальное уменьшение величины $\Delta G(T)$ в диапазонах температур от -125 до -50°C для Тгр в воде (рис. 3б) и от -125 до -10°C для водного раствора альбумина (рис. 3г) происходит за счет кулоновского взаимодействия диполей Н-связей с возбужденным состоянием Тгр. Оно достигает максимального значения около 60 см^{-1} для триптофана в водном растворе и около 25 см^{-1} для альбумина (рис. 3б, 3г).

Для водного раствора триптофана в составе альбумина в температурной области $T < -100^\circ\text{C}$ безактивационный перенос электрона не наблюдается (рис. 3в, 3г). Причиной этому служит недостаточное упорядочивание системы Н-связей при замораживании. Как следствие, не происходит образования квазипроводящей зоны между индольным кольцом и амидными группами. Соответственно, наблюдаемый эффект сольватации возбужденного состояния в альбумине в два раза более слабый. Этот вывод прямо подтверждается тем, что “красный” сдвиг спектров флуоресценции в исследованной температурной области примерно в два раза меньше, чем для триптофана в воде (рис. 4а и 4б, рис. 3б и 3г, кривые 4). Мы считаем, что обнаруженное различие в спектрах флуоресценции объясняется большим расстоянием системы Н-связей от молекулы Тгр, фиксированной в белковой структуре по сравнению с молекулой Тгр в водном растворе. На возможность такого эффекта указывалось, например, в [5].

Таким образом, полученные результаты подтверждают существенное влияние состояния водородных связей на микроконформационную динамику белка, тестируемую с помощью флуоресцентных характеристик (форма и положение спектра, длительность свечения) молекулы трип-

тофана. Необходимая информация о механизмах протекающих при этом процессов может быть получена путем сравнительного анализа температурных зависимостей параметров флуоресценции триптофана в воде и в нативном белке. Все эти результаты имеют принципиальное значение для физической интерпретации получаемых в эксперименте данных о зависимости функциональной активности белка от деталей его структурно-динамического состояния.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Rubin A.B. // Fundamentals of biophysics. 1st ed, Wiley-Scrivener; 2014.
2. Dashnau J.L., Zelent B., Vanderkooi J.M. // Biophys. Chem. 2005. V. 114. P. 71–83.
3. Schlamadinger D.E., Gable J.E., Kim J.E. // J. Phys. Chem. B. 2009. V. 113. P. 14769–14778.
4. Reshetnyak Y.K., Burstein E.A. // Biophys. J. 2001. V. 81. P. 1710–1734.
5. Lakowicz J.R. // Principles of fluorescence spectroscopy. 3rd ed., Springer. New York. 2006.
6. Szabo A.G., Rayner D.M. // J. Am. Chem. Soc. 1980. V. 102. P. 554–563.
7. Adams P.D., Chen Y., Ma K. et al. // J. Am. Chem. Soc. 2002. V. 124. P. 9278–9286.
8. Ross J.A., Jameson D.M. // Photochem. Photobiol. Sci. 2008. V. 7. P. 1301–1312.
9. Knox P.P., Gorokhov V.V., Korvatovsky B.N. et al. // J. Photochem. Photobiol. A: Chemistry. 2020. V. 393. P. 112435.
10. Han K.L., Zhao G.J. Hydrogen Bonding and Transfer in the Excited State. John Wiley & Sons Ltd. Chichester. UK. 2011.
11. Knox P.P., Lukashev E.P., Gorokhov V.V. et al. // J. Photochem. Photobiol. B: Biology. 2018. V. 189. P. 145–151.
12. Doster W., Settles M. // Biochim. et Biophys. Acta. 2005. V. 1749. P. 173–186.
13. Liu H., Zhang H., Jin B. // Spectrochim. Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy. 2013. V. 106. P. 54–59.
14. Blinc R., Zeks B. // Soft Modes in Ferroelectrics and Antiferroelectrics. American Elsevier Publishing Company. Inc. New York. 1974.
15. Vandewal K. // Annu. Rev. Phys. Chem. 2016. V. 67. P. 113–146.
16. Renger Th. // Phys. Rev. Lett. 2004. V. 93. P. 188101–188104.

TEMPERATURE DEPENDENCE OF TRYPTOPHAN FLUORESCENCE LIFETIME AS AN INDICATOR OF ITS MICROENVIRONMENT DYNAMICS

**V. V. Gorokhov^{a,#}, B. N. Korvatovsky^a, P. P. Knox^a, N. P. Grishanova^a, S. N. Goryachev^a,
V. Z. Pashchenko^a, and Corresponding Member of the RAS A. B. Rubin^a**

^a *Lomonosov Moscow state University, Moscow, Russia*

[#]*e-mail: Gorokhgiceron149@gmail.com*

The spectral-kinetic characteristics of the fluorescence of the tryptophan molecule in an aqueous solution and in the albumin were studied in the temperature range from -170°C to 25°C . To explain the observed changes in the spectra and the tryptophan fluorescence lifetime with temperature, a model of transitions between the excited and ground states involving a charge-transfer state was used, which takes into account the nonlinear nature of the dynamics of these transitions. In these processes, an important role plays the interaction of tryptophan molecules with its microenvironment, as well as rearrangements in the system of hydrogen bonds of the water-protein matrix surrounding the tryptophan molecule.

Keywords: tryptophan, fluorescence, hydrogen bonds, molecular dynamics

УДК 575.22:595.773.4

ИЗОФОРМЫ ТТК ВЗАИМОДЕЙСТВУЮТ С ДВУМЯ УЧАСТКАМИ БЕЛКА MER-1 *DROSOPHILA MELANOGASTER*

© 2021 г. К. Ю. Халисова¹, И. С. Осадчий¹,
академик РАН П. Г. Георгиев¹, О. Г. Максименко^{1,*}

Поступило 13.01.2021 г.
После доработки 06.03.2021 г.
Принято к публикации 06.03.2021 г.

Белок ТТК дрозофилы участвует в процессах клеточной дифференцировки и представлен двумя изоформами, ТТК69 и ТТК88, которые имеют общий N-концевой ВТВ домен и различные С-концевые последовательности. Ранее было показано, что ТТК69 репрессирует активность энхансеров и промоторов за счет рекрутирования на хроматин консервативного среди высших эукариот NURD-комплекса. В составе NURD-комплекса дрозофилы был найден белок Мер-1, который взаимодействует с С-концевым районом ТТК69. В настоящем исследовании с помощью дрожжевой двугибридной системы нами были картированы взаимодействующие участки белков ТТК и Мер-1. В уникальных С-концевых участках изоформ ТТК были определены районы, способные взаимодействовать одновременно с двумя участками белка Мер-1. Полученные результаты демонстрируют, что несмотря на низкую гомологию С-концевых районов, изоформы ТТК сохраняют способность взаимодействовать с двумя консервативными участками белка Мер-1, что предполагает функциональную значимость такого взаимодействия.

Ключевые слова: NURD-комплекс, репрессия транскрипции, белок-белковые взаимодействия

DOI: 10.31857/S2686738921030069

Ген *tramtrack* (ТТК) был исходно идентифицирован как негативный регулятор раннего эмбриогенеза [1, 2]. Ген кодирует две изоформы, ТТК69 и ТТК88, которые отличаются по С-концевому домену, включающему два цинковых пальца С2Н2-типа [3]. Изоформа ТТК69 участвует в регуляции транскрипции в процессе эмбриогенеза, определяет закладку и развитие нервной системы, спецификацию мышечных клеток, развитие трахеи [4, 5]. Изоформа ТТК88 определяет закладку фоторецепторов и сенсорных органов на более поздних этапах развития дрозофилы [5, 6]. Изоформы ТТК имеют N-концевой ВТВ-домен, который формирует гомо-мультимерные комплексы и также может взаимодействовать с ВТВ-доменами других регуляторных факторов дрозофилы [7].

Ранее было показано, что изоформа ТТК69 может рекрутировать на регуляторные элементы консервативный среди высших эукариот NURD-

комплекс за счет взаимодействия с белком Мер-1 [8]. NURD-комплекс локализуется в области энхансеров и промоторов и выполняет до конца неисследованные функции в негативной регуляции транскрипции [9]. Предполагается, что ТТК репрессирует транскрипцию, участвуя в рекрутировании на регуляторные элементы NURD-комплекс. Целью настоящего исследования стало исследование взаимодействия изоформ ТТК69 и ТТК88 с одним из компонентов NURD-комплекса, Мер-1.

Ранее было показано [10], что специфичный для изоформы ТТК69 район (392–500 а.о.) взаимодействует с Мер-1. Для уточнения участка взаимодействия между белками была использована дрожжевая двугибридная система, успешно примененная для исследования взаимодействий между ТТК69 и Мер-1 в предыдущей работе [10].

В первую очередь было исследовано взаимодействие между полноразмерными белками, так как ранее было описано взаимодействие только для изоформы ТТК69, а ТТК88 оставалась практически неизученной. В результате нами было не только подтверждено взаимодействие между ТТК69 и Мер-1, но и показано взаимодействие с Мер-1 изоформы ТТК88 (рис. 1).

¹ Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт биологии гена Российской академии наук (ИБГ РАН), Москва, Россия

*e-mail: maksog@mail.ru

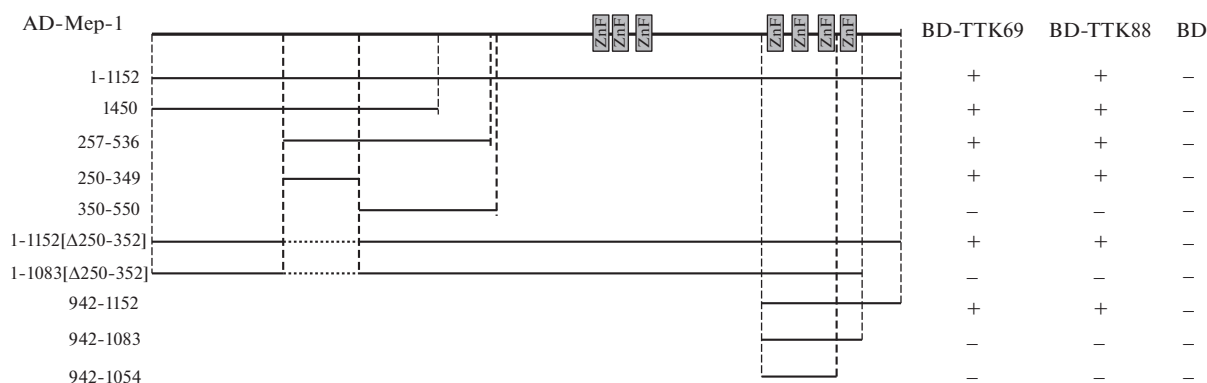


Рис. 1. Определение в составе белка Мер-1 участка взаимодействия с изоформами ТТК в дрожжевой двугибридной системе. Фрагменты Мер-1 были соединены с активационным доменом GAL4 (AD), белки ТТК69 и ТТК88 — с ДНК-связывающим доменом GAL4 (BD). На схеме показано расположение в молекуле белка Мер-1 цинковых пальцев С2Н2-типа прямоугольниками, линии отражают различные фрагменты белка, аминокислотные остатки соответствующих фрагментов указаны слева. Результаты представлены в колонках справа, где + и — означают наличие или отсутствие взаимодействия соответственно. В качестве отрицательного контроля использовали ДНК-связывающий (BD) домен белка GAL4.

Для картирования района в составе белка Мер-1, с которым взаимодействуют изоформы ТТК, на основе вектора для дрожжевой двугибридной системы были получены различные делеционные производные гена *mer-1*, кодирующие отдельные части белка. Белок Мер-1 из известных доменов содержит два кластера цинковых пальцев С2Н2-типа — между 681 и 766 а.о. (3 С2Н2-домена) и между 949 и 1083 а.о. (4 С2Н2-домена). В результате проведенного анализа было показано, что обе изоформы ТТК взаимодействуют с ранее описанной частью белка Мер-1, расположенной между 257 и 536 а.о. (рис. 1). Более точное картирование в дрожжевой двугибридной системе позволило локализовать участок в 100 а.о. (250—349) Мер-1, ответственный за данное взаимодействие. Этот участок Мер-1 высоко консервативен среди видов *Drosophila*, но имеет сравнительно небольшую гомологию при сравнении с другими представителями двукрылых.

Неожиданно оказалось, что делеция 250—349 а.о. в полном белке Мер-1 не нарушает взаимодействие с изоформами ТТК (рис. 1). Этот результат дал основание предполагать, что в белке Мер-1 присутствует второй домен, участвующий в установлении данного взаимодействия. При одновременной делеции 250—349 а.о. и С-концевой части белка Мер-1 взаимодействие с изоформами ТТК исчезает. Этот результат свидетельствует о том, что второй взаимодействующий участок расположен в С-концевой части белка Мер-1, который содержит четыре цинковых пальца С2Н2-типа и неструктурированный район длиной 69 а.о. между 1083 и 1152 а.о. (рис. 1). Для более точного картирования участка, участвующего во взаимодей-

ствии, были созданы производные, экспрессирующие разные делеционные производные в С-концевом домене (942—1152 а.о.) белка Мер-1. Результаты, полученные в дрожжевой двугибридной системе, показали, что изоформы ТТК эффективно взаимодействуют с локализованным С-концевым районом (69 а.о.) белка Мер-1. Стоит отметить, что этот район белка Мер-1 является консервативным среди всех насекомых.

Следующей задачей было картирование взаимодействующих с Мер-1 участков в составе изоформ ТТК (рис. 2).

Согласно [10] во взаимодействии с Мер-1 участвует район 392—500 а.о. изоформы ТТК69. Нами был подтвержден этот результат (рис. 2а). Параллельно мы определили, что в составе изоформы ТТК88 с Мер-1 взаимодействует район между 500 и 642 а.о. (рис. 2б). Неожиданно оказалось, что один и тот же район у изоформ ТТК обеспечивает взаимодействие с обеими участками Мер-1. Интересно, что взаимодействующие с Мер-1 участки в составе ТТК69 и ТТК88 практически не содержат протяженных областей гомологии и не имеют выраженных структурных особенностей (рис. 2в). Белки с ВТВ-доменами представлены у большинства животных, при этом каждый ген может кодировать много изоформ, у которых ВТВ-домен — общий, а варибельная часть возникает путем множественных дупликаций одного и того же экзона, которые становятся альтернативными частями разных изоформ. В процессе эволюции данные экзоны сильно разошлись, в результате варибельные части изоформ начинают выполнять разные функции. У изоформ ТТК такие участки тоже сильно разошлись и при сравнении можно выявить только единич-

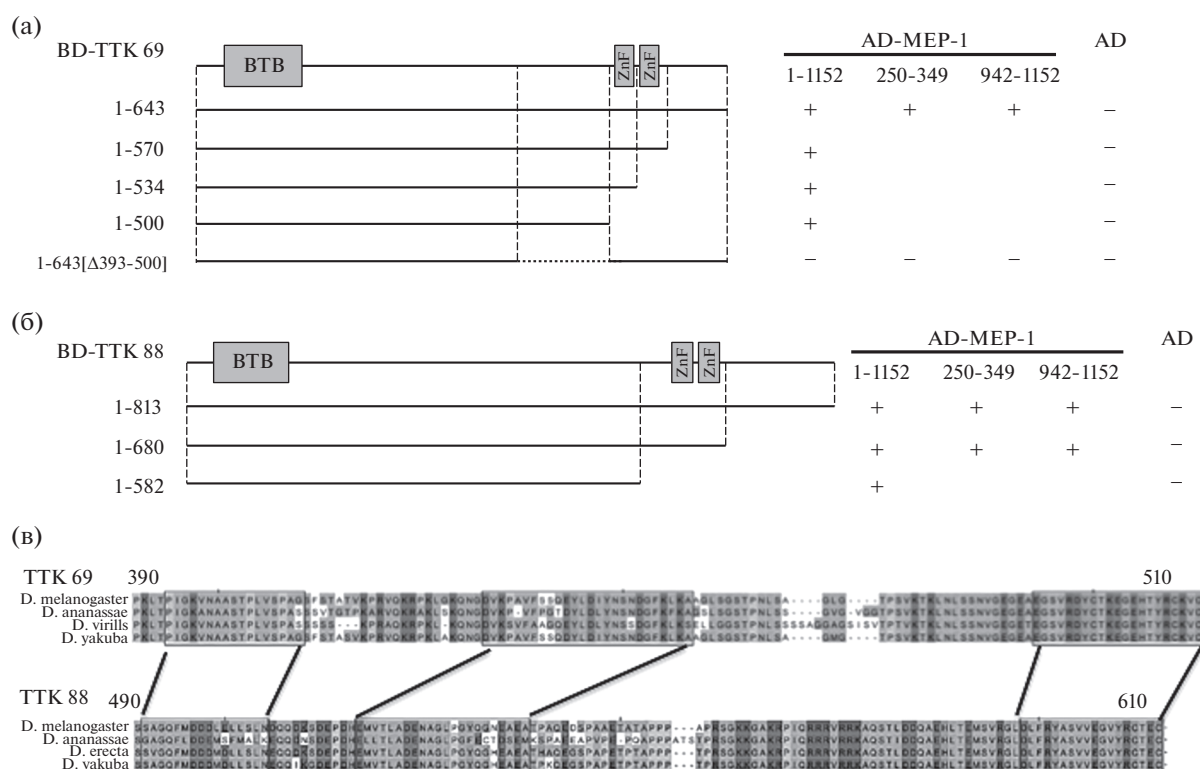


Рис. 2. Определение в составе белков ТТК69 (а) и ТТК88 (б) участков взаимодействия с белком Мер-1 в дрожжевой двугибридной системе. На схеме прямоугольниками показано расположение в молекулах белков ТТК69 и ТТК88 BTB-домена и цинковых пальцев С2Н2-типа. Остальные обозначения аналогичны Рис. 1. (в) Сравнение участков белков ТТК69 и ТТК88, прилегающих к цинковым пальцам и необходимых для взаимодействия с Мер-1. Рамками и линиями показаны участки, предположительно имеющие общее происхождение.

ные совпадающие аминокислоты в составе дуплицированного экзона. Поэтому тот факт, что несмотря на отсутствие выраженной гомологии (рис. 2в), участки двух изоформ ТТК сохранили взаимодействие с Мер-1 говорит о важности данного взаимодействия в процессе функционирования обеих изоформ ТТК.

Наличие двух взаимодействующих с изоформами ТТК участков в составе Мер-1 увеличивает специфичность и эффективность рекрутирования NURD-комплекса на хроматиновые мишени. Различные функции изоформ ТТК определяются их уникальными С-концевыми районами, которые отвечают за специфичность связывания каждой из изоформ с определенными регуляторными элементами. При этом С-концевые домены при отсутствии выраженной гомологии сохранили способность взаимодействовать с одними и теми же участками Мер-1. Таким образом, полученные результаты демонстрируют, что взаимодействие ТТК с Мер-1 является важным в процессе рекрутирования NURD-комплекса и репрессии транскрипции целевых генов.

ИСТОЧНИК ФИНАНСИРОВАНИЯ

Исследование выполнено за счет Российского фонда фундаментальных исследований, грант № 18-04-01272.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Harrison S.D., Travers A.A. // EMBO J. 1990. V. 9. P. 207–216.
2. Brown J.L., Wu C. // Development. 1993. V. 117. P. 45–58.
3. Read D., Manley J.L. // EMBO J. 1992. V. 11. P. 1035–1044.
4. Ciglar L., Girardot C., Wilczyński B., et al. // Development. 2014. V. 141. P. 2633–2643.
5. Badenhorst P., Finch J. T., Travers A.A. // Mech. Dev. 2002. V. 117. P. 87–101.
6. Lai Z.C., Harrison S.D., Karim F., et al. // Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 1996. V. 93. P. 5025–5030.
7. Bonchuk A., Denisov S., Georgiev P., et al. // J Mol Biol. 2011. V. 412. P. 423–436.
8. Kunert N., Wagner E., Murawska M., et al. // EMBO J. 2009. V. 28. P. 533–544.
9. Bracken A.P., Brien G.L., Verrijzer C.P. // Genes Dev. 2019. V. 33. P. 936–959.
10. Reddy B.A., Bajpe P.K., Bassett A., et al. // Mol Cell Biol. 2010. V. 30. P. 5234–5244.

TTK ISOFORMS INTERACT WITH TWO REGIONS OF THE MEP-1 PROTEIN OF *DROSOPHILA MELANOGASTER*

K. Y. Khalisova^a, I. S. Osadchiy^a, Academician of the RAS P. G. Georgiev^a, and O. G. Maksimenko^{a, #}

^a *Institute of Gene Biology RAS, Moscow, Russian Federation*

[#]*e-mail: maksog@mail.ru*

The *Drosophila* TTK protein is involved in the processes of cell differentiation and is represented by two isoforms, TTK69 and TTK88, which have a common N-terminal BTB domain and different C-terminal sequences. Earlier, it was shown that TTK69 represses the activity of enhancers and promoters by recruiting a conserved among higher eukaryotes NURD complex to chromatin. The Mep-1 protein was found in the NURD-complex of *Drosophila*, and this protein can interact with the C-terminal region of TTK69. In the present study, using the yeast two-hybrid system, we mapped the interacting regions of the TTK and Mep-1 proteins. We identified regions in the unique C-terminal regions of TTK isoforms that can interact simultaneously with two regions of the Mep-1 protein. The results demonstrate that, despite the low homology of the C-terminal regions, the TTK isoform retains the ability to interact with two conserved regions of the Mep-1 protein, which suggests the functional significance of this interaction.

Keywords: NURD complex, transcriptional repression, protein-protein interactions

УДК 599.742.2. (569.742.2): 551.793 (470.5)

НОВОЕ МАССОВОЕ ЗАХОРОНЕНИЕ ПЕЩЕРНЫХ МЕДВЕДЕЙ (CARNIVORA, URSIDAE, *URSUS KANIVETZ* VERESHCHAGIN, 1973) НА СРЕДНЕМ УРАЛЕ

© 2021 г. П. А. Косинцев^{1,*}, Д. О. Гимранов¹, И. А. Лавров², А. В. Кисагулов¹

Представлено академиком РАН А. В. Лопатиным

Поступило 02.02.2021 г.

После доработки 09.02.2021 г.

Принято к публикации 10.02.2021 г.

Изучены костные остатки пещерного медведя из нового местонахождения в пещере Прокошева на Среднем Урале (58°13' с.ш., 58°12' в.д.). Есть кости всех отделов скелета, все кости целые и на них нет следов деятельности человека или животных. Все они принадлежат большому пещерному медведю (*Ursus kanivetzi* Vereshchagin, 1973). По образцу нижней челюсти взрослой особи получена методом AMS радиоуглеродная дата 53375 ± 765 BP, $IGAN_{AMS}-8632$. Кости принадлежат минимум 18 особям, среди которых 4 особи в возрасте около 1 года, по 1 особи в возрасте около 2 лет и около 3 лет и 12 особей старше 4 лет. Самцам принадлежало 3 черепа и самкам — 7 черепов. Анализ показал, что местонахождение относится к тафономическому типу “естественное кладбище” животных. Это первое на Урале “естественное кладбище” большого пещерного медведя, найденное *in situ*, не тронутое человеком.

Ключевые слова: большой пещерный медведь, *Ursus kanivetzi*, поздний плейстоцен, Урал, пещера, тафономия

DOI: 10.31857/S2686738921030070

Массовые захоронения без участия человека (тафономический тип “естественные кладбища”) крупных хищных млекопитающих в позднем плейстоцене редки. Известны такие захоронения пещерных львов (*Panthera leo spelaea* Goldfuss, 1810) [1–3], волков [3], малого пещерного медведя (*U. savini* Andrews, 1922) [4, 5] и бурого медведя (*U. arctos* L., 1758) [6–9]. Самыми распространенными местонахождениями подобного типа являются захоронения в пещерах большого пещерного медведя (*Ursus spelaeus sensu lato*), которые образовались в результате гибели животных во время зимней спячки [10]. Изучение местонахождений этого типа позволяет получить уникальную информацию об экологии и биологии видов.

На Урале известно несколько пещер с большим количеством костей пещерных медведей [11]. Целостность тафоценозов во всех этих пещерах была нарушена деятельностью человека до начала их научного изучения. Пещера Прокошева, о которой пойдет речь в данной публикации,

является новым “кладбищем” пещерных медведей. Уникальность этого местонахождения в том, что тафоценоз в ней находится *in situ*, так как до ее открытия часть пещеры с захоронением пещерных медведей не посещалась человеком. Поэтому мы имеем возможность изучить не нарушенную структуру тафоценоза “естественное кладбище” пещерного медведя. Пещера названа в честь археолога Н.А. Прокошева, исследовавшего пещеры на р. Чусовая в 1930–е годы и погибшего на Великой Отечественной войне.

Пещера Прокошева расположена на Среднем Урале, в бассейне р. Чусовая (58°13' с.ш., 58°12' в.д.). Она имеет карстовое происхождение и смешанный тип строения [12]: коридор длиной 100 м, который заканчивается обрывом глубиной 8 м и далее переходит в большой грот с ответвлениями. Пол грота покрыт известняковыми глыбами и валунами с заполнением суглинком коричневого цвета, который имеет вязкую консистенцию. “Кладбище” находится в большом гроте. Кости медведей лежат на поверхности пола и частично или полностью погружены в суглинок. По поверхности пола кости распределены относительно равномерно. Анатомически связанные кости отсутствуют. На полу грота следов пребывания людей нет.

¹ Институт экологии растений и животных УрО РАН, Екатеринбург, Россия

² Ассоциация спелеологов Урала, Кунгур, Россия

*e-mail: kpa@ipae.uran.ru

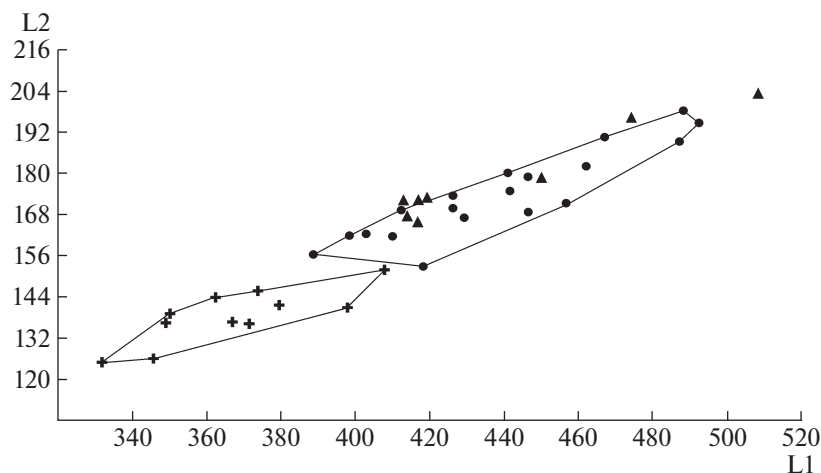


Рис. 1. Отношение общей длины черепа (L1) к лицевой длине черепа (L2) пещерных медведей (мм).
+ — малый пещерный медведь, • — большой пещерный медведь, ▲ — черепа медведей из пещеры Прокошева.

Кости собраны с поверхности пола. Из глины они не извлекались. Собрано 64 кости пещерного медведя (коллекция музея ИЭРиЖ УрО РАН, № 2726): 13 черепов, 3 нижних челюсти, 9 изолированных зубов, 2 позвонка, 5 ребер, 1 лопатка, 4 тазовых кости, 3 плечевых, 2 лучевых, 6 локтевых, 3 бедренных, 5 больших берцовых, 3 тарзальных кости, 3 метаподии и 2 фаланги. Все кости целые, но у части черепов и костей посткраниального скелета имеются небольшие разрушения в результате действия конденсированной влаги. На костях нет следов погрызов животными и от орудий человека.

Возраст фауны

Все костные остатки медведей имеют одинаковую окраску и степень фоссилизации. По образцу нижней челюсти взрослой особи получена методом AMS радиоуглеродная дата 53375 ± 765 BP $IGAN_{AMS}-8632$. Это соответствует началу морской изотопной стадии 3 или началу брянского (Moershoofd) интерстадиала [13]. Степень фоссилизации не противоречит этой дате.

Таксономическая принадлежность

Череп имеет крутой изгиб в области лба, что характерно для пещерных медведей и не характерно для бурых медведей [14]. Зубы (P4, M1 и M2) без дополнительных бугорков, свойственных малому пещерному медведю. В то же время на P4 присутствует бугорок на внутренней стороне метаподии, образуя поперечный гребень, что также отличает черепа из пещеры Прокошева от черепов малого пещерного медведя [14]. Морфометрические данные показывают, что изучаемые черепа по размерам больше черепов малого пещер-

ного медведя и медведя Денингера и соответствуют большому пещерному медведю (рис. 1). Таким образом, по морфологическим и морфометрическим признакам черепа из пещеры Прокошева принадлежат большому пещерному медведю (*U. kanivetz* Vereshchagin, 1973).

Возрастной состав

Определение возрастной структуры погибших особей проводили по комплексу признаков: стадии прорезывания зубов, прирастанию эпифизов и размерам трубчатых костей [11, 15, 16]. Взрослым особям (старше 4 лет) принадлежит 36 костей: 11 черепов, 2 нижние челюсти, 9 изолированных зубов, позвонки, 2 ребра, лопатка, 2 тазовых кости, 2 плечевых кости, 3 локтевых кости, лучевая, большая берцовая и пяточная кости минимально от 12 особей. Особям в возрасте около 3 лет принадлежит 1 метаподия. Особям в возрасте около 2 лет принадлежат: нижняя челюсть и бедренная кость, минимально от 1 особи. Особям в возрасте около 1 года принадлежат: 2 черепа, 2 тазовые кости, плечевая, лучевая, 2 локтевых, 2 бедренных и 4 больших берцовых кости минимально от 4 особей. Кости принадлежат минимально 18 особям, из которых 12 взрослые. В составе выборки представлены все возрастные группы за исключением группы “новорожденные”. Промежуток между гибелью животных около 1 года, т.е. они гибли в пещере 1 раз в год, во время зимней спячки.

Половой состав

Самцы и самки пещерного медведя хорошо различаются по наибольшим размерам верхних и нижних клыков — клыки у самцов значительно

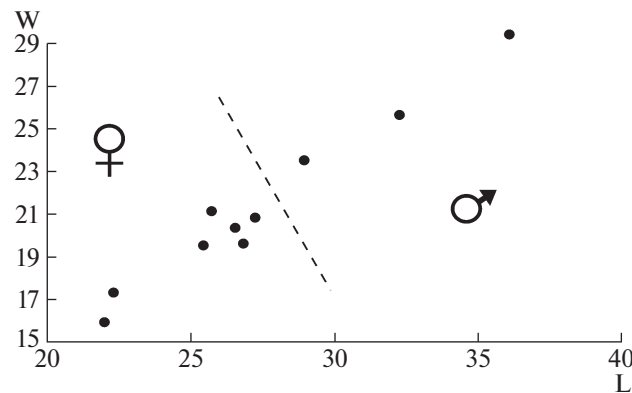


Рис. 2. Отношение длины альвеолы верхнего клыка (L) к ширине альвеолы верхнего клыка (W) пещерных медведей из пещеры Прокошева (мм).

крупнее [17]. По размерам альвеол верхних клыков (C1) был построен график соотношения наибольшей длины (L) и наибольшей ширины (W) альвеол (рис. 2). Выборка черепов разделилась на группы. Группу с большими размерами альвеол составляют самцы, а группу с меньшими размерами — самки. Самцам принадлежало 3 черепа и самкам — 7 черепов. Полученные результаты показывают, что в пещере погибали и самцы, и самки. Самок погибло значительно больше, чем самцов. Преобладание самок над самцами среди погибших особей также было уставлено для пещер Игнатьевская, Тайн и Геологов 3 на Урале [11].

Изученная выборка имеет небольшой объем и сильно смещенный состав. В ней преобладают кости краниального скелета. Это отражает специфику состава костных остатков на поверхности пола. После гибели животных их кости погружались в рыхлые отложения, имеющие вязкую консистенцию. На поверхности оставались наиболее объемные кости (черепа) и кости, в силу случайных причин не погребенные в отложения. Очевидно, что практически все кости погибших особей находятся в рыхлых отложениях пещеры.

В выборке представлены остатки самцов и самок и всех возрастных групп, кроме новорожденных. Гибель животных в пещере происходила 1 раз в год. Есть кости всех отделов скелета, все кости целые и на них нет следов деятельности человека или животных. Все это показывает, что местонахождение относится к тафономическому типу “естественное кладбище” животных, погибших во время зимней спячки. В изученной выборке представлены остатки минимум 18 особей, что позволяет предполагать гибель в пещере нескольких десятков особей.

ИСТОЧНИК ФИНАНСИРОВАНИЯ

Работа выполнена при финансовой поддержке гранта Российского научного фонда (проект № 20-74-00041).

БЛАГОДАРНОСТИ

Благодарим О.И. Тимофееву, В.А. Смирнова, М.В. Игнатьева, В.А. Тагильцева, А.И. Грачева, А.В. Дудакова за помощь в исследовании пещеры.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Merriam J.C., Stock C. The Felidae of Rancho La Brea // Carnegie Institution of Washington Publication. 1932. V. 422. P. 1–232.
2. Гимранов Д.О., Котов В.Г., Румянцев М.М., и др. Крупнейшее в Северной Евразии захоронение пещерных львов // Доклады академии наук. 2018. Т. 482. С. 234–237.
3. Верещагин Н.К. Хищные (Carnivora) из бинагадинского асфальта // Труды Естественно-исторического музея им. Г. Зардаби. 1951. Вып. IV. С. 28–140.
4. Верещагин Н.К. Кизеловская пещера — ловушка зверей на Среднем Урале // Труды Зоологического ин-та АН СССР. 1982. Т. 111. С. 37–44.
5. Gimranov D.O., Kosintsev P.A. Quaternary large mammals from the Imanay Cave // Quaternary International. 2020. V. 546. P. 125–134.
6. Косинцев П.А., Бачура О.П. Массовое захоронение позднплейстоценовых бурых медведей (*Ursus arctos* L., 1758) на Северном Урале // Доклады академии наук. 2015. Т. 462. С. 249–251.
7. Черский И.Д. Об ископаемой фауне Нижнеудинской пещеры // Труды Санкт-Петербургского общества естествоиспытателей. Серия 4: зоологическая. 1888. Вып. 19. С. 66–70.
8. Crégut E., Fosse P., Argant A., et al. Holocene brown bears (*Ursus arctos* L.) in natural traps: exceptional sites of Mont Ventoux (Vaucluse, France) // Cadernos Lab-

- oratorium Xeolóxico de Laxe Coruña. 2001. V. 26. P. 325–340.
9. Васильев С.К., Гребнев И.Е. Морфология костей скелета голоценового бурого медведя (*Ursus arctos* L., 1758) Кузнецкого Алатау // Енисейская провинция. Альманах. 2009. Вып. 4. С. 68–76.
 10. Kurten B. Leaf and death of the Pleistocene cave bear, a study in paleoecology // Acta Zoologica Fennica. 1958. V. 90. P. 1–59.
 11. Косинцев П.А., Воробьев А.А. Биология большого пещерного медведя (*Ursus spelaeus* Ros. et Hein.) на Урале. Ю.А. Розанов (ред.). В кн.: Мамонт и его окружение: 200 лет изучения. М.: Геос, 2001. С. 266–278.
 12. Оводов Н.Д. Палеофаунистическое изучение пещер. Общие методы изучения истории современных экосистем М.: Наука, 1979. С. 102–128.
 13. Rasmussen S.O., Bigler M., Blockley S.P., et al. A stratigraphic framework for abrupt climatic changes during the Last Glacial period based on three synchronized Greenland ice-core records: refining and extending the INTIMATE event stratigraphy // Quaternary Science Reviews. 2014. V. 106. P. 14–28.
 14. Барышников Г.Ф. Медвежьи (Carnivora, Ursidae). Фауна России и сопредельных стран. Млекопитающие. Т. I. Вып. 5. СПб.: Наука, 2007. 541 с.
 15. Клевезаль Г.А. Принципы и методы определения возраста млекопитающих. М.: Наука, 2007. 283 с.
 16. Fosse P., Crégut-Bonnoure E. Ontogeny/growth of (sub)modern brown bear (*Ursus arctos*) skeleton: A guideline to appraise seasonality for cave bear (*Ursus spelaeus*) sites? // Quaternary International. 2014. V. 339–340. P. 275–288.
 17. Kurten B. Sex dimorphism and size trends in the cave bear, *Ursus spelaeus* Rosenmüller and Heinroth // Acta Zoologica Fennica. 1955. V. 90. P. 1–48.

NEW MASS BURIAL OF CAVE BEARS (CARNIVORA, URSIDAE, *URSUS KANIVETZ*, VERESHCHAGIN, 1973) FROM THE MIDDLE URALS

P. A. Kosintsev^{a, #}, D. O. Gimranov^a, I. A. Lavrov^a, and A. V. Kisagulov^a

^a Institute of Plant and Animal Ecology, Ural Branch, Russian Academy of Sciences, Yekaterinburg, Russian Federation

^b Association of Ural Cavers, Kungur, Russian Federation

[#]e-mail: kpa@ipae.uran.ru

Presented by academician of the RAS A.V. Lopatin

Remains of a cave bear from a new location in the Prokoshev cave in the Middle Urals (58°13'с.ш., 58°12'в.д.) were studied. There are bones of all parts of the skeleton, bones are intact and there are no traces of human or animal activity on them. They all belong to the cave bear (*Ursus kanivetz* Vereshchagin, 1973). An AMS radiocarbon date of 53375 ± 765 BP, $IGAN_{AMS}-8632$, was obtained from a specimen of the lower jaw of an adult. The bones belonged to at least 18 individuals, including 4 individuals about 1 year old, 1 each about 2 years old and about 3 years old, and 12 individuals over 4 years old. Males belonged to 3 skulls and females to 7 skulls. The analysis showed that the locality belongs to the taphonomic type of “natural cemetery” of animals. This is the first “natural cemetery” of the cave bear in the Urals, found *in situ*, untouched by man.

Keywords: cave bear, *Ursus kanivetz*, Late Pleistocene, Ural, cave, taphonomy

УДК 57.083.3

РЕКОМБИНАНТНЫЙ ФРАГМЕНТ ЭКСТРАЦЕЛЛЮЛЯРНОГО ДОМЕНА ДЕСМОГЛЕИНА 3 ЧЕЛОВЕКА, СЛИТЫЙ С Fc-ФРАГМЕНТОМ IgG1 ЧЕЛОВЕКА, СЕЛЕКТИВНО СОРБИРУЕТ АУТОРЕАКТИВНЫЕ АНТИТЕЛА ИЗ СЫВОРОТОК БОЛЬНЫХ ПУЗЫРЧАТКОЙ

© 2021 г. Е. Н. Ларина^{1,*}, В. С. Карасев¹, М. В. Шпилева¹, Т. К. Алиев¹,
О. П. Бочкова², А. Э. Карамова³, Д. С. Балабашин¹, Д. Г. Дерябин³, Т. В. Бобик¹, И. В. Смирнов¹,
член-корреспондент РАН А. А. Кубанов³, С. М. Староверов², академик РАН А. Г. Габибов¹,
академик РАН М. П. Кирпичников^{1,4}

Поступило 30.11.2020 г.

После доработки 28.02.2021 г.

Принято к публикации 28.02.2021 г.

С использованием в качестве аффинного лиганда рекомбинантного второго фрагмента экстрацеллюлярного домена (EC2) десмоглеина 3-го типа (Dsg3) человека был получен иммуносорбент, селективно связывающий аутореактивные антитела к указанному домену из иммунных сывороток больных пузырчаткой. Белок EC2 был получен в виде гибридного белка с Fc-фрагментом IgG1 человека, наработка осуществлялась методом транзientной экспрессии в клетках CHO.

Ключевые слова: вульгарная пузырчатка, десмоглеин 3 человека, аутоантитела, экспрессия в клетках CHO, иммуноадсорбция

DOI: 10.31857/S2686738921030082

Пузырчатка является аутоиммунным буллезным дерматозом, который характеризуется тяжелым и прогрессирующим течением, высокой инвалидизацией и потенциальной летальностью. Болезнь развивается в связи с образованием в организме и дальнейшим взаимодействием аутореактивных антител (АТ) класса IgG с экстрацеллюлярным доменом Dsg3, что приводит к разрушению десмосом и потере межклеточной адгезии, т.е. к акантолизу [1].

В составе молекулы Dsg3 человека выделяют внутриклеточный, трансмембранный и экстрацеллюлярный домены. Антигенные сайты, с которыми и происходит взаимодействие аутореактивных АТ, располагаются в экстрацеллюлярном домене, состоящем из 5 фрагментов (EC1, EC2,

EC3, EC4, EC5) [2]. Наиболее иммуногенными, т.е. против которых выделяется преимущественное количество патогенных аутореактивных АТ у больных, считаются фрагменты, располагающиеся на N-конце Dsg3, где образуются Ca²⁺-зависимые конформационные эпитопы [3].

Целью данной работы являлось получение рекомбинантного белка EC2-Fc Dsg3 человека, химическая иммобилизация его на носителе и анализ способности такого иммуносорбента селективно извлекать из сывороток пациентов с пузырчаткой специфические аутореактивные АТ.

С помощью полимеразно-цепной реакции (ПЦР) был амплифицирован фрагмент ДНК, кодирующий EC2-домен Dsg3 человека 159–268 а.о. в соответствии с P32926 базы последовательностей белков UniProt), а также получена нуклеотидная последовательность, соответствующая шарнирному участку и CH2-CH3 доменам IgG1 человека. Далее методом SOE-ПЦР данные фрагменты были объединены, при этом конечная экспрессионная кассета содержала последовательность Козак (СТCAAA), нативные лидерный (MMGLFPRTTGALAIFVVILVHG) и прелидерный (ELRIETKGQYDEEEMTMQQAARRQKR) пептиды Dsg3 человека. Нарботку белка EC2-Fc проводили в клетках CHO методом транзientной экспрессии, для чего была использована плазми-

¹ Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова Российской академии наук, Москва, Россия

² АО “БиоХимМак СТ”, Москва, Россия

³ Государственный научный центр дерматовенерологии и косметологии Министерства здравоохранения Российской Федерации, Москва, Россия

⁴ Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, Москва, Россия

*e-mail: Ekaterina.iljina.7@yandex.ru

да pcDNA3.4 (Invitrogen, США), в которую клонировали экспрессионную кассету по сайтам рестрикции *NheI/XhoI*. Очистку EC2-Fc из среды культивирования осуществляли методом аффинной хроматографии на протеин А-сефарозе. Аналитическая гель-фильтрационная хроматография была выполнена на колонке Superdex 200-10/300-GL (GE Healthcare, США). После проведения электрофореза в ПААГ-SDS белок EC2-Fc был выявлен как основная полоса, мигрирующая в соответствии с ожидаемой молекулярной массой 78 кДа. Продуктивность используемой транзientной системы экспрессии составила до 110 мг/л среды культивирования.

Подобным образом также были получены гибридные белки EC1-Fc и EC4-Fc, содержащие фрагменты EC1 и EC4 экстрацеллюлярного домена Dsg3 соответственно.

Выделенный целевой белок с подтвержденной методом LC-MS/MS (анализ выполнен на приборе Orbitrap Tribrid Lumos, Thermo, США) аминокислотной последовательностью иммобилизовали на полимерном активированном носителе. В качестве носителя использовали макропористую, активированную бромгидриновыми $-O-CH_2CH(OH)-CH_2Br$ группами матрицу WorkBeads 40/10000ACT (Bio-Works, Швеция).

Для оптимизации процесса иммобилизации использовали человеческий IgG. Разработан метод количественного связывания IgG (до 60 мг белка/мл носителя). Химическое связывание иммуноглобулина происходит в течение 1 ч в 0.5 М натрий-фосфатном буферном растворе при pH 8.5 при комнатной температуре. Иммобилизация через бромгидриновые группы при pH 8.5 приводит к прочной ковалентной связи с первичными аминогруппами без образования заряженных групп на поверхности. Остаточные активные группы носителя нейтрализовали обработкой 1 М раствором моноэтаноламина при pH 9.5 в течение 1 ч при комнатной температуре.

Рекомбинантный аффинный лиганд EC2-Fc иммобилизовали с концентрацией 5, 10, 15 и 28 мг/мл носителя. Такие концентрации выбраны исходя из возможности исследования свободного связывания и проявления потенциальных стерических препятствий в порах носителя при образовании сорбционного комплекса “EC2-Fc – АТ”.

Процесс сорбции антител к EC2-фрагменту Dsg3 был изучен на примере сыворотки больного вульгарной пузырчаткой. Для проведения сорбции в статических условиях использовали сорбенты в объеме 50 мкл, содержащие 5, 10, 15 и 28 мг лиганда EC2-Fc/мл носителя. Процесс иммуносорбции на колонке с рекомбинантным белком EC2-Fc в качестве лиганда оценивали методом двухэтапного конкурентного иммуноферментного анализа [4]. Активность аутоантител к

полноразмерному экстрацеллюлярному домену Dsg3 человека оценивали в тест-системе “Anti-Dsg3 ELISA (IgG)” (Euroimmun, Германия). Взаимодействие АТ с отдельными фрагментами в виде EC1-Fc, EC2-Fc, EC4-Fc и отрицательным контролем для оценки неспецифической сорбции, БСА, определяли в иммунологических планшетах (Greiner-bio, Германия) с иммобилизованными соответствующими рекомбинантными белками в концентрации 10 мкг/мл.

Образцы сыворотки до и после взаимодействия с сорбентом в разведении 1:100 преинкубировали в течение 3 ч в лунках с сорбированным полноразмерным экстрацеллюлярным доменом Dsg3 человека, отдельными фрагментами экстрацеллюлярного домена Dsg3 человека, слитыми с Fc-доменом и БСА. Реакцию сыворотки с каждым фрагментом рассчитывали в соответствии с формулой (%):

$$[1 - (A_{Pos} - A_R)/(A_{Pos} - A_{Neg})] \times 100,$$

где A_{Pos} – активность сыворотки после преинкубации с полноразмерным экстрацеллюлярным доменом Dsg3 (положительный контроль); A_R – активность сыворотки после преинкубации в планшете с отдельным фрагментом экстрацеллюлярного домена Dsg3 человека; A_{Neg} – активность после преинкубации с БСА (отрицательный контроль) [4].

Активность аутореактивных АТ сыворотки к полноразмерному экстрацеллюлярному домену Dsg3 человека, выраженная в условных единицах (RU), составила 310–320 RU/мл; активность к EC2 – 140 RU/мл.

Определение статической емкости проводили путем внесения в колонку, объем которой составлял 50 мкл, сыворотки больного пузырчаткой с известным содержанием антител к EC2-фрагменту Dsg3 человека. Объем сыворотки был кратным 1, 3, 4, 5 и 6 объемам колонки и содержал 7–42 RU аутореактивных АТ, специфично взаимодействующих с EC2-Fc, иммобилизованным на носителе.

После добавления сыворотки суспензию перемешивали на шейкере в течение 1 ч, затем декантировали равновесный раствор и определяли содержание в нем несвязавшихся антител к полноразмерному экстрацеллюлярному домену Dsg3 человека и к эпиту EC2. Количество сорбированных АТ определяли по разнице их значений в растворах до и после сорбции. На основании полученных данных строили графики насыщения аффинных сорбентов в зависимости от соотношения матрица/лиганд и количества аутоантител к EC2.

Динамическую емкость адсорбции АТ к EC2-Fc и возможность регенерации определяли на сорбенте с содержанием привитого EC2-Fc-лиганда

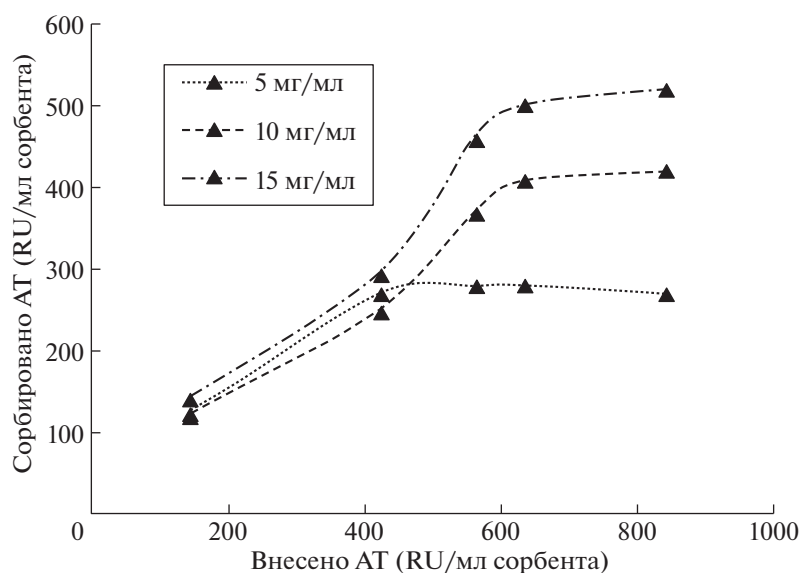


Рис. 1. Аффинное связывание на сорбентах с различным содержанием лиганда (5 мг/мл кривая точек; 10 мг/мл пунктирная кривая; 15 мг/мл кривая точка-пунктир).

в количестве 15 мг/мл носителя. Объем сорбента в колонке составлял 200 мкл. За один цикл сорбции через колонку пропускали 1 мл сыворотки, что соответствует пяти объемам колонки, при скорости потока 50 см/ч. После каждого цикла аффинного связывания колонку регенерировали 0.1 М раствором глицина с 5 мМ CaCl_2 и уравнивали ФСБ буфером, затем пропускали через колонку новую порцию сыворотки. Всего было проведено три цикла аффинного связывания/регенерации, при этом в проскоке после каждого цикла определяли содержание несвязавшихся аутоантител к полноразмерному экстрацеллюлярному домену Dsg3 человека и к фрагментам EC1, EC2, EC4. На основании полученных данных были построены иммунные профили сыворотки до и после взаимодействия с сорбентом.

Исследование стабильности состава плазмы крови при контакте с полученным аффинным сорбентом проводили в соответствии со статьей [5] путем сравнения ряда показателей (прозрачность, цветность, pH, белок, фракционный состав, активность фактора VIII) до и после пропускания плазмы через колонку (5 объемов колонки при скорости 50 см/ч).

Таким образом, в результате определения статической емкости было показано следующее: при проведении сорбции с использованием возрастающей нагрузки на сорбенты установлено, что с повышением концентрации привитого лиганда EC2-Fc от 5 до 15 мг/мл матрицы количество сорбируемых специфических аутореактивных АТ возрастает от 280 RU/мл сорбента до 530 RU/мл сорбента (рис. 1).

Сорбент с содержанием 15 мг EC2-Fc/мл носителя связывает около 80% всех добавленных АТ, тогда как сорбенты с концентрацией закрепленного EC2-Fc 5 мг/мл и 10 мг/мл сорбируют лишь 70% добавленных АТ. Если оценить величину связывания в расчете на 1 мг привитого лиганда EC2-Fc, то можно видеть, что при снижении количества закрепленных лигандов эффективность связывания возрастает. Для сорбента с концентрацией 15 мг EC2-Fc/мл эта величина составляет 30–35 RU АТ/мг привитого лиганда, а для сорбента 5 мг EC2-Fc/мл увеличивается до 55 RU АТ/мг привитого лиганда. Полученный результат свидетельствует о том, что в диапазоне исследованных концентраций, вероятно, начинают проявляться стерические препятствия при аффинном связывании АТ, обусловленные значительными размерами как лиганда, так и сорбируемых иммуноглобулиновых молекул. Тем не менее анализ полученных данных показал, что возможности увеличения емкости далеко не исчерпаны. Для исследования закономерностей роста емкости с возрастанием поверхностной концентрации привитого аффинного лиганда нами был получен сорбент с концентрацией закрепленных групп EC2-Fc 28 мг/мл носителя, что на наш взгляд близко к предельным возможным значениям эффективной работы иммобилизованных EC2-Fc лигандов.

Действительно, эта величина составляет 50% от максимально возможной концентрации привитого иммуноглобулина, полученной нами на этом сорбенте, и должна быть близка к максимально возможной концентрации аффинного комплекса “лиганд-антитело” с учетом его разме-

Таблица 1. Показатели динамической сорбции колонки объемом 200 мкл с лигандом EC2-Fc с концентрацией 15 мг/мл в отношении аутореактивных АТ к EC2 домену в течение трех циклов сорбции/регенерации сыворотки больного пузырчаткой (активность исходной сыворотки 140 RU/мл)

	1-й цикл сорбции	2-й цикл сорбции	3-й цикл сорбции
Активность сыворотки в элюате (RU/мл)	63	70	85
Количество связанных с колонкой антител (RU/мл)	77	70	55
Динамическая емкость колонки (RU/мл)	385	350	275

Таблица 2. Эпитопные профили сыворотки до и после аффинного связывания на сорбенте с привитым лигандом EC2-Fc с концентрацией 15 мг/мл

	Dsg3-full-Fc	EC1-Fc	EC2-Fc	EC4-Fc
До взаимодействия с сорбентом	320	60	140	71
После взаимодействия с сорбентом	249	47	75	58
Относительное изменение содержания АТ к разным эпитопам, %	22	21.6	46	18

ра. Нами установлено, что такой сорбент количественно связывает добавленные АТ из объема сыворотки, в 7 раз превышающей объем сорбента, тогда как сорбент, содержащий 15 мг EC2-Fc/мл сорбента, способен связать не более 80% антител из 5-6 объемов добавленной сыворотки, т.е. сорбционная емкость увеличивается с возрастанием количества закрепленных лигандов, но не пропорционально увеличению их количества.

В процессе определения динамической емкости было установлено, что после первого и второго циклов сорбции остаточная активность сыворотки по отношению к EC2 в элюате составила около 50% от исходного содержания, после третьего около 40% (табл. 1). Соответственно после каждого цикла с колонкой связывается 40–50% АТ к EC2, что соответствует динамической сорбционной емкости на уровне 300–400 RU АТ/мл сорбента.

Селективность взаимодействия оценивали до и после цикла аффинного связывания при динамической сорбции по изменению эпитопного профиля сыворотки (табл. 2).

Из табл. 2 видно, что содержание АТ к EC1-Fc и EC4-Fc, а также полноразмерному экстрацеллюлярному домену Dsg3 человека уменьшилось на 18–22%, тогда как концентрация АТ к EC2-Fc снизилась на 46%. Полученные значения демонстрируют высокую селективность сорбента, а по величине сорбции соответствуют результатам динамического связывания АТ. Примерно одинаковое относительное снижение антител к EC1-Fc, EC4-Fc и полноразмерному экстрацеллюлярному домену Dsg3 указывает на дополнительный механизм неселективного связывания с аффинным сорбентом.

Анализ характеристик плазмы крови после пропускания ее через сорбент показал, что для ряда изученных параметров заметных изменений

не происходит, что свидетельствует об инертности сорбента к плазме крови.

В результате проделанной работы впервые был получен иммуносорбент на основе рекомбинантного отдельного фрагмента EC2 экстрацеллюлярного домена Dsg3 человека, способного селективно связывать аутореактивные АТ к указанному домену. Сорбент инертен по отношению к компонентам плазмы крови. Высокая емкость сорбента и эффективность связывания в динамическом режиме позволяют надеяться на получение эффективных сорбентов для гемосорбции.

ИСТОЧНИК ФИНАНСИРОВАНИЯ

Работа была поддержана Министерством науки и высшего образования Российской Федерации (Соглашение № 075-15-2019-1942, уникальный идентификатор проекта RFMEFI60719X0325).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Koga H., Tsuruta D., Ohyama B., Ishii N., Hamada T., Ohata Ch., Furumura M., Hashimoto T. // Expert Opinion on Therapeutic Targets. 2013. V. 3. P. 293–306.
2. Wan H. // Choi S. Encyclopedia of Signaling Molecules. Springer, Cham. 2016. https://doi.org/10.1007/978-1-4614-6438-9_101583-1
3. Futei Y., Amagai M., Sekiguchi M., Nishifuji K., Fujii Y., Nishikawa T. // Journal of Investigative Dermatology. 2000. V. 115. P. 829–834.
4. Sekiguchi M., Futei Y., Fujii Y., Iwasaki T., Nishikawa T., Amagai M. // Journal of Immunology. 2001. V. 167. P. 5439–5448.
5. Государственная Фармакопея Российской Федерации // ФС.3.3.2.0001.15 “Плазма человека для фракционирования. Москва 2018. XIV издание, том IV.

RECOMBINANT FRAGMENT OF THE EXTRACELLULAR DOMAIN OF HUMAN DESMOGLEIN 3, FUSED WITH THE Fc-FRAGMENT OF HUMAN IgG1, SELECTIVELY ADSORBS AUTOREACTIVE ANTIBODIES FROM THE SERA OF PEMPHIGUS PATIENTS

E. N. Larina^{a, #}, V. S. Karasev^b, M. V. Shpilevaya^c, T. K. Aliev^d, O. P. Bochkova^b,
A. E. Karamova^c, D. S. Balabashin^a, D. G. Deryabin^c, T. V. Bobik^a, I. V. Smirnov^a,

Corresponding Member of the RAS A. A. Kubanov^c, S. M. Staroverov^b, Academician of the RAS A. G. Gabibov^a,
and Academician of the RAS M. P. Kirpichnikov^{a, d}

^a Shemyakin-Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry of the Russian Academy of Sciences, Moscow, Russian Federation

^b JSC "BioChemMack S&T", Moscow, Russian Federation

^c State Research Center of Dermatovenereology and Cosmetology, Moscow, Russian Federation

^d Lomonosov Moscow State University, Moscow, Russian Federation

[#]e-mail: Ekaterina.iljina.7@yandex.ru

Using the recombinant second fragment of the extracellular domain (EC2) of human desmoglein type 3 (Dsg3) as an affinity ligand, an immunosorbent was obtained that selectively binds autoreactive antibodies to this domain from the immune sera of patients with pemphigus. The EC2 protein was obtained in the form of a fusion with the Fc-fragment of human IgG1; the production was carried out in CHO cells using the method of transient expression.

Keywords: Pemphigus, human Dsg3, autoantibody, CHO expression, immunoabsorption

УДК 599.323.45: 614.484

МУТАЦИИ ГЕНА РЕЗИСТЕНТНОСТИ *VCORC1* К АНТИКОАГУЛЯНТАМ У СИНАНТРОПНЫХ ГРЫЗУНОВ НА УРБАНИЗИРОВАННЫХ ТЕРРИТОРИЯХ РОССИИ

© 2021 г. А. Н. Мальцев^{1,*}, С. В. Рябов², В. В. Стахеев³, Н. В. Панасюк³, С. Н. Гашев⁴, Н. В. Сорокина⁴, Ю. А. Баженов⁵, Е. В. Котенкова¹

Представлено академиком РАН В.В. Рожновым

Поступило 27.01.2021 г.

После доработки 06.03.2021 г.

Принято к публикации 06.03.2021 г.

Впервые для территории России проведен анализ изменчивости двух экзонов (1-го и 3-го) гена *VCORC1* у 125 *Mus musculus* и 19 *Rattus norvegicus*, отловленных в 13 населенных пунктах. Ранее в странах Западной Европы показано, что ряд мутаций в этих экзонах связаны с устойчивостью к антикоагулянтам у синантропных грызунов. У домовых мышей мы не обнаружили таких мутаций в России. Однако в первом экзоне выявлены две ранее не известные мутации, которые потенциально могут обладать таким действием (Lys58Arg и Ser31Trp). В трех округах г. Москвы найдены серые крысы, несущие в третьем экзоне ранее известную мутацию резистентности (Tyr139Ser) в гетерозиготном состоянии. Приводится обсуждение полученных результатов в связи с интенсивностью применения антикоагулянтов в населенных пунктах России и скоростью мутирования гена *VCORC1*.

Ключевые слова: *Mus musculus*, *Rattus norvegicus*, резистентность к антикоагулянтам, *VCORC1*

DOI: 10.31857/S2686738921030094

В настоящее время дератизация стала одним из факторов отбора экстремального характера в эволюции синантропных грызунов, поскольку она представляет собой хорошо организованную систему мероприятий, проводимых в течение длительного срока в большей части населенных пунктов, прежде всего городах [1]. По мере совершенствования методов контроля численности в популяциях грызунов возникают адаптации к мерам дератизации как ответ на непрерывное действие химических факторов истребления. К числу таких адаптаций можно отнести физиоло-

го-генетическую устойчивость к родентицидам-антикоагулянтам, которые считаются эффективными и относительно безопасными с точки зрения сохранения биоразнообразия средствами контроля численности грызунов. Генетическая устойчивость к антикоагулянтам обусловлена возникающими и закрепленными естественным отбором мутациями гена *VCORC1*.

Впервые аминокислотные замены Leu128Ser и Tyr139Cys, отвечающие за резистентность к варфарину, были обнаружены в Англии [2, 3]. Ген резистентности *VCORC1* расположен у серых крыс (*Rattus norvegicus*) в хромосоме 1 [4], а у *Mus domesticus* — в хромосоме 7, которая является аналогичной хромосоме 1 у крыс [2]. Изначально в ряде стран Европы у *M. domesticus* было обнаружено две мутации гена *VCORC1* (Tyr139Cys, Leu128Ser), но благодаря относительно недавним исследованиям их список был значительно расширен [5, 6]. У серых крыс также выявлен ряд мутаций, обеспечивающих резистентность к антикоагулянтам первого и второго поколений (Leu128Ser, Leu120Gln, Ile82Ile, Ile82Ile, Trp59Gly, Tyr139Cys, Tyr139Ser, Tyr139Phe, Leu128Gln, Arg35Pro). Сведения о географическом распространении устойчивых к антикоагулянтам первого и второго поколения серых и черных крыс (*Rattus rattus*), *M. domesticus* можно найти в ряде работ [5, 7, 6, 8, 9]. В

¹ Институт проблем экологии и эволюции им. А.Н. Северцова Российской академии наук, Москва, Россия

² Научно-исследовательский институт дезинфектологии Роспотребнадзора, Москва, Россия

³ Федеральный исследовательский центр Южный научный центр Российской академии наук, Ростов-на-Дону, Россия

⁴ Тюменский государственный университет, Тюмень, Россия

⁵ Институт природных ресурсов, экологии и криологии Сибирского отделения Российской академии наук, Чита, Россия

*e-mail: mus-musculus@yandex.ru

странах Западной Европы географическое распространение отдельных мутаций гена *VCORC1* отличается [8]. Существуют наиболее часто встречающиеся мутации у крыс и мышей, такие как Tyr139Cys и Leu128Ser, но каждая страна или регион характеризуется, кроме того, уникальными мутациями, обеспечивающими резистентность к антикоагулянтам, встречающимися только там. В недавних исследованиях во Франции и Германии у домашних мышей обнаружено девять точечных мутаций гена *VCORC1*, выявлены носители одновременно двух мутаций, которые объясняются генетической рекомбинацией [5, 6]. До сих пор в России физиологическую резистентность к антикоагулянтам первого и второго поколения у синантропных грызунов оценивали только на основании устаревшего, дорогостоящего и инвазивного метода, основанного на поедании приманок, содержащих эти соединения, и определении летальной дозы. В нашей работе впервые для территории России проведена оценка генетической резистентности к антикоагулянтам у домашних мышей и серых крыс на основании анализа мутаций гена *VCORC1*.

Цели исследования: на основании анализа изменчивости гена *VCORC1* у домашних мышей (*M. musculus*) и серых крыс (*R. norvegicus*) из популяций, населяющих РФ, выявить наличие (или отсутствие) и географическое распространение мутаций, определяющих резистентность этих видов к антикоагулянтам; оценить эволюционное значение найденных мутаций и замен в экзонах у домашних мышей и серых крыс.

Материалом для молекулярно-генетического анализа служили 125 домашних мышей (*M. musculus*) и 19 серых крыс (*R. norvegicus*) из 13 населенных пунктов (городов и сел) России. Домовые мыши отловлены в: гг. Москва – 16, Подольск – 4, Ногинск – 4, Ростов-на-Дону – 18, Астрахань – 3, Тюмень – 24, Ямбург – 3, Чита – 19, а также сельских населенных пунктах: селах Тормосин (Волгоградская область) – 16, Балабаны (Волгоградская область) – 3, Дьяковка (Саратовская область) – 1, Большевик (Забайкальский край) – 3, Нижний Цасучей (Забайкальский край) – 7. Серые крысы отловлены в: гг. Москва – 18 и Тюмень – 1. После отлова грызунов содержали в стандартных пластиковых клетках для лабораторных животных. Перед взятием тканей зверьков умерщвляли смещением шейных позвонков. ДНК серых крыс и домашних мышей выделяли из тканей разных частей тела (хвост, сердце, мышцы конечностей), которые хранили в 96% спирте при температуре 6°C. Для выделения ДНК использовали наборы DNeasy Blood & Tissue Kit (Qiagen). ПЦР проведена в термоциклере SimpliAmp™ (Applied Biosystems). Для амплификации геномной ДНК домашних мышей использовались следующие праймеры: экзон 1 – GACCAATCTTCCGG-

TAGGAG (прямой праймер), CGACCCCAG-ACTCCAAAAT (обратный праймер); экзон 3 – GAAGCACCTGCTGTCTGTCA (прямой праймер), GCCTTCTAGGAACCCACACA (обратный праймер).

Амплификация проводилась с помощью набора 2x Мастер-микс HotStarTaq Plus (Qiagen). В 25 мкл реакционной смеси входил микс из смеси полимераз (HS-Taq и Pfu), смеси дезоксинуклеозидтрифосфатов, ПЦР-буфер, Mg²⁺ и другие реагенты (ДНК-матрица – 1–2 нг, деионизированная вода (H₂O) до 50 мкл, прямой и обратный праймеры – 0.1–800 нМ). Режим ПЦР включал следующие условия: 94°C в течение 3 мин, 25 циклов амплификации (94°C – 30 с, 58°C – 30 с и 72°C – 1 мин 30 с и финальную достройку цепей (72°C – 10 мин). ПЦР для тотальной ДНК серых крыс проведена с использованием следующих праймеров: экзон 1 – RE1AF CTCTTGTGTCTG-CGCTGTAC, RE1R GCTTTTCATTTCTGCACG-CA; экзон 3 – RE3F TGAGTTCCTGGTGTCT-GTC, RE3R TTTTAGGGACCCACACACGA [8]. Условия ПЦР: 94°C – 3 мин, 35 циклов амплификации (94°C – 30 с, 58°C – 30 с и 72°C – 1 мин и финальную достройку цепей (72°C – 10 мин). Для очистки ПЦР-продуктов использовался набор QIAquick PCR Purification Kit. Секвенирование ПЦР-продуктов проводилось по обеим цепям с помощью генетического анализатора 3500xL (Applied Biosystems). Было отсеквенировано 2 участка ДНК гена *VCORC1* у домашних мышей (250 п.н. – 1-й экзон, 330 п.н. – 3-й экзон) и серых крыс (209 и 227 п.н. соответственно). Выравнивание последовательностей ДНК произведено с помощью программы BioEdit v.7.0.5.3, анализ в MEGA V.10.05. Полученные нуклеотидные последовательности для обнаружения гомозиготных мутаций гена *VCORC1* сравнивались с диким типом контрольных последовательностей из базы данных GenBank/NCBI: (NM_203335.2 для *R. norvegicus* и NM_178600.2 для *M. musculus*). Для обнаружения гетерозиготных мутаций сравнивали хроматограммы положения нуклеотидов в последовательностях прямого и обратного праймеров. Для оценки соотношения синонимичных и несинонимичных замен (dN/dS) в экзонах у домашних мышей и серых крыс использовали программу DNAsP, v.6.

У домашних мышей не обнаружено мутаций гена *VCORC1*, отвечающих за резистентность к антикоагулянтам первого и второго поколения по позициям Leu128Ser и Tyr139Cys, локализованных в третьем экзоне [10, 5, 8]. Однако в городах мы обнаружили две ранее не описанные мутации в первом экзоне Lys58Arg и Ser31Trp. В Ростове у 13.7% от всех исследованных мышей, в Москве – 87.5%, в Тюмени – 13%, в Ногинске и Подольске – 100%. Мутации были вызваны применением ан-

тикоагулянтов первого и второго поколения: в г. Москва, Московская область — бромацион, бродифакум в концентрации 0.005%; в г. Ростов-на-Дону — бромацион в концентрации 0.005%, тетрафенацин в концентрации 0.25%, а также варфарин и дифенацин, в г. Тюмень — бромацион, бродифакум — 0.005% и дифацион — 0.0075%. Таким образом, концентрация приманок в городах России не превышала нормы. Дератизационные мероприятия в городах России проводились согласно постановлению правительства РФ от 22 сентября 2014 г. № 58 (“Санитарно-эпидемиологические требования к организации и проведению дератизационных мероприятий”). В Западной Европе (Германии, Швейцарии, Франции) концентрации веществ были сходными (варфарин — 0.025%, куматетралил — 0.05%, бромацион — 0.005%, дефинакум — 0.005%, бродифакум — 0.005%, флорумафен — 0.005% [5, 6]).

В Швейцарии, Германии [5] и Франции [6] находили мутации в первом экзоне, повышающие резистентность к антикоагулянтам, причем Arg12Trp, Ala26Ser, Ala48Thr, Glu37Gly встречаются как во Франции, так и в Германии. В России в первом экзоне нами обнаружены две другие мутации Lys58Arg и Ser31Trp, которые могут быть либо нейтральными, либо повышать устойчивость к антикоагулянтам. Не исключено, что они могут быть уникальными для нашей страны. Аминокислотные замены (Lys58Arg и Ser31Trp) локализируются вместе у анализируемых образцов *M. musculus*, что, по-видимому, связано с эпистатическим эффектом.

Следует отметить, что процентное соотношение особей, несущих мутации резистентности и не имеющих эти мутации, существенно различается в разных странах и в разных районах одной и той же страны и может зависеть от интенсивности использования и набора применяемых антикоагулянтов. Так, в Европе частота встречаемости мышей-носителей мутаций гена *VCORC1* чрезвычайно высока и может составлять до 70–80%. Например, в Германии, Швейцарии и на Азорских островах было обнаружено, что 80% мышей, отловленных в 30 локалитетах, являются носителями одной мутации. И лишь один локалитет оказался свободен от мышей-носителей мутаций Leu128Ser и Tyr139Cys [5]. Напротив, в Австралии и Аргентине эти мутации не были обнаружены [11, 12], а в Италии только у одной особи из 30 была найдена мутация Tyr139Cys [13]. В городах России мы не выявили ранее описанных мутаций, обеспечивающих резистентность у домовых мышей.

Из 19 проанализированных серых крыс г. Москвы только у трех особей в гетерозиготном состоянии была найдена одна из мутаций (Tyr139Ser) резистентности к антикоагулянтам (варфарину). Процент резистентных особей со-

ставлял 15.7%. Крысы, у которых была обнаружена резистентность, отловлены в трех округах г. Москвы: Юго-Западном, Северном и Северо-Восточном. Основными действующими веществами в Москве во время проведения мероприятий по дезинфекции и дератизации служили антикоагулянты второго поколения — бродифакум и бромацион с концентрацией активного действующего вещества 0.005%. По данным немецких коллег [5] антикоагулянты второго поколения (бромацион и бродифакум) могут стимулировать развитие генетической резистентности у домовых мышей и серых крыс по мутации Tyr139Ser.

Оценка соотношения синонимичных и несинонимичных замен (dN/dS) у анализируемых синантропных грызунов показала следующее: у домовых мышей, в первом экзоне $dN/dS > 2.74$, в третьем экзоне $dN/dS > 3.06$; у серых крыс в третьем экзоне $dN/dS > 3.0$. Таким образом, более высокие значения несинонимичных замен свидетельствуют о действии положительного отбора в изученных популяциях *M. musculus* и *R. norvegicus*.

Подводя итоги, следует отметить, что относительно низкий процент мутаций гена резистентности *VCORC1* у домовых мышей и серых крыс в населенных пунктах России может свидетельствовать об относительно редком и относительно недавнем начале использования антикоагулянтов по сравнению с большинством стран Западной Европы. Высокую частоту мутирования этого гена во Франции исследователи объясняют частым и постоянным применением антикоагулянтов населением, после которого значительная часть грызунов, получивших полудетальную дозу, выживает [6]. Именно в результате этого дератизация превращается в фактор отбора, приводящий к быстрому мутированию гена резистентности *VCORC1*, сохранению и закреплению в популяциях мышей все новых и новых мутаций, обеспечивающих резистентность.

ИСТОЧНИК ФИНАНСИРОВАНИЯ

Исследование выполнено за счет гранта Российского научного фонда (проект № 19-74-00148).

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы подтверждают отсутствие конфликта интересов.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Содержание животных после отлова и их умерщвление проведены в соответствии с правилами Европейской конвенции о защите позвоночных. Одобрено Биоэтической комиссией ИПЭЭ им. А.Н. Северцова РАН. Протокол № 39 от 27.07.2020 г.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Рыльников В.А. Серая крыса (*Rattus norvegicus* Berk.). Экологические основы и подходы к управлению численностью. М.: НЧНОУ Институт пест-менеджмента, 2010.
2. Wallace M.E., Macswiney F.J. A major gene controlling warfarin resistance in the house mouse // J. Hyg. 1976. V. 76. № 2. P. 173–181.
3. Prescott C.V. A preliminary study of the genetics of resistance in house mice. In: Timm R.M., Crabb C. editors.: Proceedings of the Seventeenth Vertebrate Pest Conference; 1996; University of California, Davis: CA; 1996. V. 17. P. 83–87.
4. Greaves J.H., Ayres P. Heritable resistance to warfarin in rats // Nature. 1967. V. 215. № 5103. P. 877–878.
5. Pelz H.-J., Rost S., Müller E., et al. Distribution and frequency of *VKORC1* sequence variants conferring resistance to anticoagulants in *Mus musculus* // Pest Management Science 2012. V.68. № 2. P. 254–259.
6. Goulois J., Lambert V., Legros L., et al. Adaptive evolution of the *Vkorc1* gene in *Mus musculus domesticus* is influenced by the selective pressure of anticoagulant rodenticides // Ecology and Evolution. 2017. V. 7. № 8. P. 2767–2776.
7. Прескотт С.В. Резистентность к родентицидам-антикоагулянтам. Новая молекулярная методология определения мутаций гена резистентности *VKORC1* и понимание их возможного влияния на эффективность применения препаратов // Пест-менеджмент. 2013. № 4. С. 39–46.
8. Mooney J., Lynch M., Prescott C., et al. *VKORC1* sequence variants associated with resistance to anticoagulant rodenticides in Irish populations of *Rattus norvegicus* and *Mus musculus domesticus* // Scientific Reports. 2018. V. 8. № 4535. P. 1–6.
9. McGee C.F., McGilloway D.A., Buckle A.P. Anticoagulant rodenticides and resistance development in rodent pest species – A comprehensive review // Journal of Stored Products Research. 2020. V. 88. № 101688. P. 1–18.
10. Pelz H.-J., Rost S., Hünerberg M., et al. The genetic basis of resistance to anticoagulants in rodents // Genetics. 2005. V. 170. № 4. P. 1839–1847.
11. Espinosa M.B. Efficacy of anticoagulant drugs as rodenticides and genetic variation on *Vkorc1* of *Mus musculus* from Buenos Aires province (Argentina) // Journal of Basic & Applied Genetics. 2013. V. 24. № 1. P. 27–31.
12. Duncan B.J.M.L., Koenders A., Burnham Q., et al. *Mus musculus* populations in Western Australia lack *VKORC1* mutations conferring resistance to first generation anticoagulant rodenticides: Implications for conservation and biosecurity // PLOS ONE. 2020. V. 15. № 9. P. 1–16.
13. Iannucci A., Natali C., Capizzi D., et al. First record of *VKORC1* sequence mutation associated with resistance to anticoagulant rodenticides in Italian individuals of *Mus musculus domesticus* // Hystrix the Italian Journal of Mammalogy. 2019. V. 30. № 2. P. 183–185.

MUTATIONS OF THE GENE RESISTANCE TO ANTICOAGULANTS *VKORC1* IN COMMENSAL RODENTS IN URBANIZED TERRITORIES OF RUSSIA

A. N. Maltsev^{a, #}, S. V. Ryabov^b, V. V. Stakheev^c, N. V. Panasjuk^c, S. N. Gashev^d,
N. V. Sorokina^d, Y. A. Bazhenov^e, and E. V. Kotenkova^a

^a Severtsov Institute of Problems of Ecology and Evolution, Russian Academy of Sciences, Moscow, Russian Federation

^b Scientific Research Disinfectology Institute of Federal Service for Surveillance on Consumer Rights Protection and Human Well-being, Moscow, Russian Federation

^c The Federal Research Center Southern Scientific Centre of the Russian Academy of Sciences, Rostov-on-Don, Russian Federation

^d University of Tyumen, Tyumen, Russian Federation

^e Institute of Natural Resources, Ecology and Cryology, Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences, Chita, Russian Federation

[#]e-mail: mus-musculus@yandex.ru

Presented by academician of the RAS V.V. Rozhnov

For the first time in the territory of Russia, we analyzed the variability of two exons (1st and 3rd) of the *VKORC1* gene in 125 *Mus musculus* and 19 *Rattus norvegicus* captured in 13 settlements. It was shown earlier that in the countries of Western Europe a number of mutations in these exons are associated with resistance to anticoagulants in synanthropic rodents. We did not find such mutations in house mice in Russia. However, in the first exon, two previously unknown mutations were identified that could potentially have such an effect (Lys58Arg and Ser31Trp). In three districts of Moscow, Norway rats were found carrying in the third exon a previously known resistance mutation (Tyr139Ser) in a heterozygous state. The results are discussed in connection with the intensity of the use of anticoagulants in the settlements of Russia and the rate of mutation of the *VKORC1* gene.

Keywords: *Mus musculus*, *Rattus norvegicus*, resistance to anticoagulants, *VKORC1*

УДК 575.22:595.773.4

БЕЛОК BEAF-32 НАПРЯМУЮ ВЗАИМОДЕЙСТВУЕТ С БЕЛКАМИ Z4/putzig и Chriz/Chromator у *Drosophila melanogaster*

© 2021 г. Л. С. Мельникова^{1,*}, В. В. Молодина¹, М. В. Костюченко¹,
академик РАН П. Г. Георгиев¹, А. К. Головин¹

Поступило 29.01.2021 г.

После доработки 06.02.2021 г.

Принято к публикации 08.02.2021 г.

У *Drosophila* белки BEAF-32, Z4/putzig и Chriz/Chromator колокализуются в междисках полиденных хромосом. Предполагалось, что эти белки могут формировать комплекс, влияющий на структуру хроматина. Однако механизм формирования такого комплекса не был изучен. Мы впервые доказали, что белки BEAF-32, Z4/putzig и Chriz/Chromator взаимодействуют между собой напрямую и локализовали домены белков, обеспечивающие множественные белок-белковые взаимодействия. На основании полученных данных мы разработали модель механизма формирования комплекса BEAF/Z4/Chriz и его рекрутирования на хроматин.

Ключевые слова: BEAF-32, Chriz/Chromator, Z4/putzig, белок-белковое взаимодействие, дрожжевая двугибридная система

DOI: 10.31857/S2686738921030100

Хромосомы высших эукариот организованы в топологически ассоциированные домены (ТАДы). Размеры и способы формирования этих доменов значительно отличаются у разных животных. У дрозофилы районы хроматина, разделяющие ТАДы, насыщены генами с высоким уровнем транскрипции. Они активно взаимодействуют между собой, формируя петли хроматина. У дрозофилы границы ТАДов, скорее, определяются активным состоянием и свойствами хроматина, чем сайтами связывания конкретного белка. Тем не менее на границах ТАДов часто присутствуют белки dCTCF, CP190, Chriz/Chromator, Z4/putzig и BEAF-32, связывающиеся с промоторами генов домашнего хозяйства. Роль этих белков в формировании границ ТАДов пока не ясна [1]. Возможно, эти белки являются компонентами комплексов, которые одновременно поддерживают структуру интерфазного хроматина и обеспечивают высокую транскрипционную активность. Однако механизм формирования и функционирования хроматинорганизирующих комплексов еще недостаточно изучен.

Считается, что “диск-междисковая” структура полиденных хромосом у *Drosophila* отражает до-

менную структуру организации хромосом. В дисках полиденных хромосом локализован плотно упакованный хроматин, где активность генов подавлена, а в междисках — открытый хроматин, где связывание транскрипционных факторов облегчено, и гены активно транскрибируются. В представленной работе мы детально изучили механизм формирования комплекса между тремя белками BEAF, Z4 и Chriz, локализованными в междисках полиденных хромосом, и разработали модель, объясняющую участие такого комплекса в формировании открытого хроматина и, следовательно, границ ТАДов.

Белки Z4/putzig и Chriz/Chromator необходимы для поддержания структуры интерфазных хромосом. Они экспрессируются во многих тканях на всех стадиях онтогенеза, колокализуются во всех междисках полиденных хромосом, иммунопреципитируются в общем комплексе и напрямую взаимодействуют друг с другом [2–5]. Белок Z4 участвует в регуляции транскрипции ряда генов. Например, показано, что Z4 входит в состав TRF2-зависимого комплекса, определяющего активность промоторов части генов домашнего хозяйства. Кроме того, Z4 присутствует в ремоделирующем нуклеосомы комплексе NURF [6]. Белок Chriz также связывается с большей частью промоторов генов домашнего хозяйства (данные проекта modENCODE), однако его роль в регуляции транскрипции остается неизвестной. Несмотря на значительное количество публикаций,

¹ Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт биологии гена Российской академии наук (ИБГ РАН), Москва, Россия

*e-mail: lsm73@mail.ru

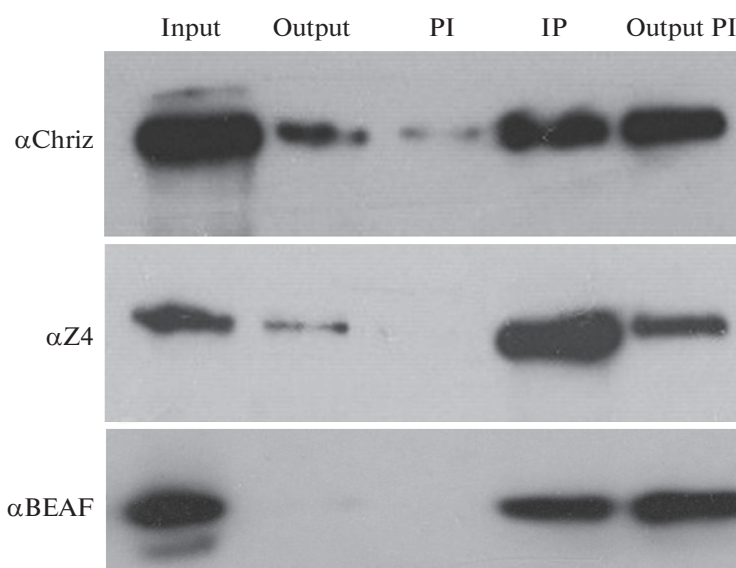


Рис. 1. Результаты тестирования взаимодействия между белком BEAF и белками Z4 и Chriz методом IP из лизата клеток S2. Иммунопреципитацию проводили с помощью антител к белку BEAF (α BEAF) и с помощью преиммунной сыворотки крови (отрицательный контроль). Перед загрузкой в SDS-PAGE для Вестерн-блоттинга IP-комплексы промывали 300 мМ KCl-содержащими буферами. Мембрану PVDF последовательно гибридизовали со специфичными антителами против белков Chriz и Z4 (α Chriz и α Z4, обозначены слева от соответствующих панелей). Input – 10% от лизата клеток, использованного в коиммунопреципитации; IP – иммунопреципитация антителами к BEAF; Output – супернатант после IP; PI – иммунопреципитация преиммунной сывороткой; Output PI – супернатант после PI. Наличие полосы в колонке IP означает, что тестируемые белки входят в состав общего комплекса.

все еще не обнаружены конкретные ДНК-связывающие белки, рекрутирующие Z4 и Chriz на хроматин.

Белок BEAF-32 необходим для оогенеза, эмбриогенеза и поддержания структуры хромосом [7, 8]. Он был впервые обнаружен на инсуляторной последовательности *scs'* и впоследствии локализован на политемных хромосомах во множестве диск-междисковых границ [9]. Анализ геномного распределения BEAF выявил, что этот белок преимущественно локализован в 5' не-транслируемой области различных генов, ориентированных “голова-к-голове”. Примечательно, что большинство из этих генов относятся к генам домашнего хозяйства [10]. Это позволяет предположить, что, взаимодействуя с другими транскрипционными факторами, ассоциированными с генами домашнего хозяйства, BEAF участвует в поддержании открытой структуры хроматина, обеспечивающей значительный уровень транскрипции генов.

Было показано, что каждый из белков, Z4 и Chriz, иммунопреципитируется и частично колокализуется с белком BEAF [4]. На основании этого было выдвинуто предположение, что все три белка входят в состав общего комплекса и взаимодействуют между собой, однако прямое взаимодействие между ними не изучалось [4]. В представленной работе мы впервые доказали, что белки Z4 и Chriz напрямую взаимодействуют с

белком BEAF и точно локализовали районы белков, обеспечивающие такое взаимодействие.

В первую очередь, с помощью коиммунопреципитации белков (IP) из лизата клеток S2 мы продемонстрировали, что все три белка, BEAF, Z4 и Chriz формируют общий комплекс. С помощью антител к белку BEAF комплекс связывали с сефарозой A, а затем с помощью специфичных антител детектировали присутствие в нем белков Z4 и Chriz (рис. 1).

Однако иммунопреципитация допускает возможность опосредованных взаимодействий между белками. Чтобы выяснить, могут ли белки Z4, Chriz и BEAF взаимодействовать напрямую мы использовали дрожжевую двугибридную систему (ДДС). Сначала были протестированы взаимодействия между полноразмерными белками BEAF, Z4 и Chriz. На основе вектора pGBT9, содержащего промотор гена *Adh* и ДНК-связывающий домен дрожжевого белка GAL4, мы создали конструкции, экспрессирующие в дрожжах белок BEAF. кДНК белков Z4 и Chriz клонировали в вектор pGDA, включающий активационный домен GAL4. В экспериментах использовался дрожжевой штамм pJ69-4A.

Эффективность экспрессии Chriz и Z4 в составе конструкций подтверждалась с помощью Вестерн-блоттинга. Эксперименты проводили в соответствии с методикой, описанной нами ранее [11]. Оказалось, что белок BEAF способен напря-

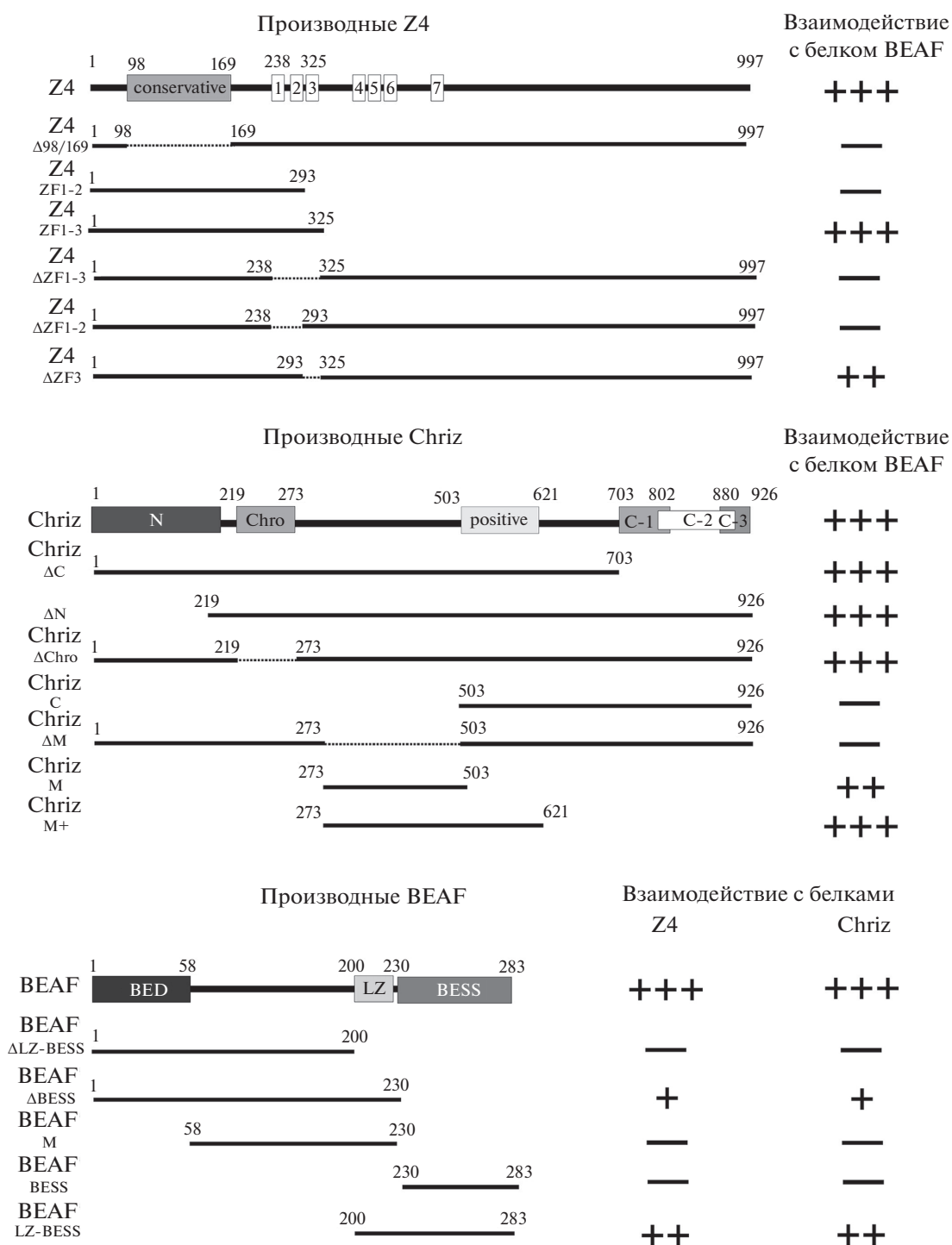


Рис. 2. Взаимодействия между белком BEAF и белками Z4 и Chriz в ДДС.

Тестируемые белки изображены схематично. Для белка Z4: conservative – высококонсервативный район; прямоугольники 1–7 обозначают цинковые пальцы. Для белка Chriz: N – N-концевой консервативный домен; Chro – хромодомен; positive – район, обогащенный положительно заряженными аминокислотами; C-1, C-2, C-3 – консервативные C-концевые районы белка. Для белка BEAF: BED – домен цинкового пальца; LZ – лейциновая молния; BESS – домен BESS. Цифрами обозначены аминокислотные остатки, ограничивающие домены и производные формы. Слева указаны названия белков и их производных, размер производных обозначен отрезками, пунктирные линии обозначают внутренние делеции. Справа от схем обозначена сила взаимодействия между белками: “+++” – сильное; “++” – умеренное; “+” – слабое; “–” – отсутствие взаимодействия.

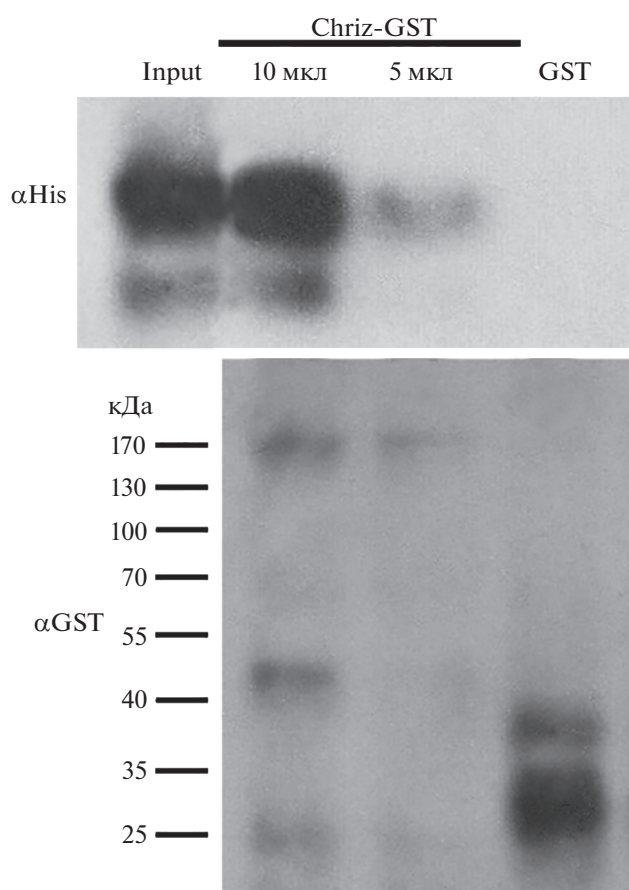


Рис. 3. Результаты тестирования взаимодействия между белками BEAF и Chriz в GST pull down экспериментах. Input — нанесено 10% белка BEAF-His, использованного в каждом эксперименте (положительный контроль). Детекция проводилась с помощью антител к гистидину (α His), с которым был слит белок BEAF — верхняя панель. GST — связывание белка BEAF-His с белком GST (отрицательный контроль). Белок BEAF-His связывали с 10 мкл (вторая дорожка) и 5 мкл (третья дорожка) белка Chriz, слитого с GST. Наличие полосы в вертикальной колонке означает, что белки BEAF и Chriz связываются напрямую. Нижняя панель (α GST) — контрольная гибридизация мембраны с антителами к GST. Полосы в вертикальных колонках отражают количество белков Chriz-GST и GST, использованных в каждом эксперименте.

мую взаимодействовать как с белком Z4, так и с белком Chriz (рис. 2).

Для подтверждения выявленных взаимодействий мы провели реципрокные эксперименты: кДНК белка BEAF переклонировали в вектор pGDA, а кДНК белков Z4 и Chriz — в вектор pGBT9. Затем взаимодействия между белками снова протестировали в ДДС. Полученные результаты полностью подтвердили наличие прямых межбелковых взаимодействий.

С помощью соосаждения белков на глутатион S-сефарозе (GST pull down) мы также продемон-

стрировали, что белки Chriz и BEAF напрямую взаимодействуют *in vitro* (рис. 3).

Чтобы с помощью ДДС выявить минимальный район взаимодействия для каждого из партнеров, на основе векторов pGDA и pGBT9 были созданы серии делеционных производных тестируемых белков.

Ранее было показано, что N-концевой район белка Z4 (1–237 а.о.) обеспечивает его взаимодействие с белком Chriz [4]. Мы локализовали на N-конце белка Z4 консервативный участок (98–169 а.о.) и показали, что именно он отвечает за взаимодействие белка Z4 с белком BEAF (рис. 2). Также белок Z4 содержит 7 цинковых пальцев C_2H_2 типа (239–515 а.о.), однако самостоятельного связывания Z4 с ДНК в междиске обнаружено не было [2]. Поочередно делетируя каждый из них, мы продемонстрировали, что во взаимодействии с белком BEAF участвуют цинковые пальцы 1–3 (рис. 2). С-концевой район белка Z4 не нужен для взаимодействия с белком BEAF.

В предыдущей работе мы показали, что последовательность белка Chriz от 273 до 503 а.о. обеспечивает его взаимодействие с белком Z4 [5]. Обогащенный положительно заряженными аминокислотами участок Chriz от 503 до 621 а.о. дополнительно стабилизирует взаимодействие Chriz–Z4. Неожиданно оказалось, что эти же последовательности отвечают за взаимодействие белка Chriz с белком BEAF (рис. 2). N- и С-концевые районы белка Chriz, а также его хромодомен не участвуют во взаимодействии Chriz–BEAF (рис. 2).

На N-конце белка BEAF расположен нетипичный домен типа цинковый палец, называемый BED доменом. Он отвечает за связывание белка BEAF с консенсусной последовательностью ДНК CGATA [12]. На С-конце находится BESS домен, отвечающий за гомодимеризацию белка и участвующий в белок-белковых взаимодействиях. Недавно было предсказано наличие у белка BEAF домена лейциновой молнии [10], способствующего гомодимеризации [13].

Со стороны белка BEAF во взаимодействиях с обоими белками, Z4 и Chriz, одновременно участвуют только BESS домен и район лейциновой молнии (рис. 2). Таким образом, Z4 и Chriz взаимодействуют с белком BEAF, способным образовывать ди/тримеры.

Наиболее эффективно белок BEAF связывается с так называемыми “Dual-core” последовательностями, где 2–5 коровых сайта связывания разделены АТ богатой последовательностью размером около 200 п.н. [12]. Исходя из этого, можно предположить, что через свои BESS домены и район LZ белок BEAF образует ди/тримеры и таким образом эффективно связывается с “Dual-core” последовательностями. Однако полноге-

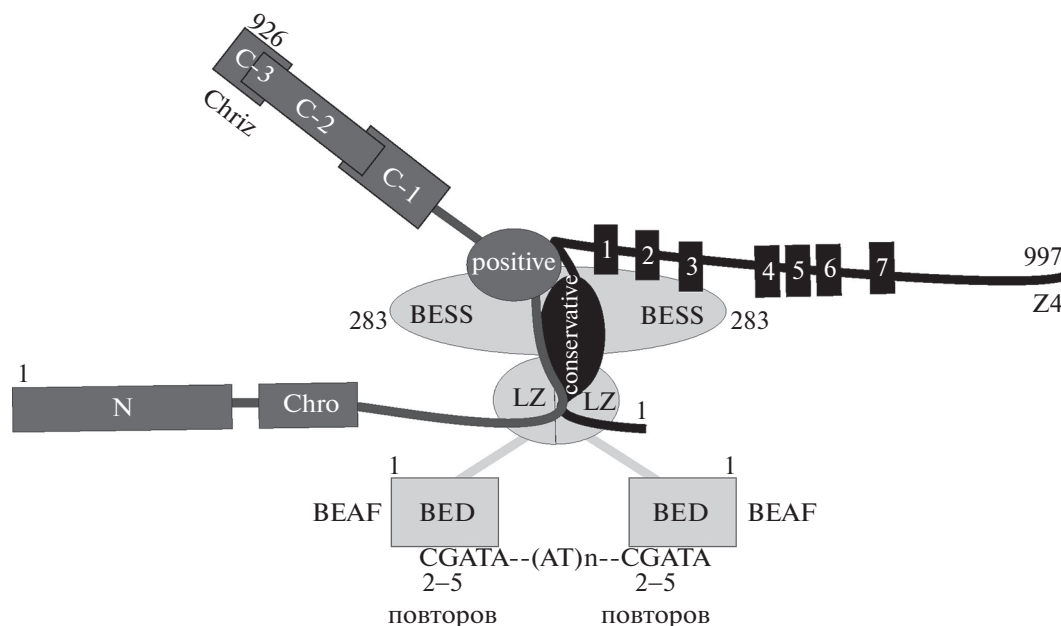


Рис. 4. Модель взаимодействия между димеризующимся белком BEAF и белками Z4 и Chriz. Заглавными буквами обозначены мотивы связывания белка BEAF; (AT)_n – AT богатая последовательность. Районы белка BEAF обозначены светло-серым; районы белка Chriz – темно-серым; районы белка Z4 – черным. Остальные обозначения, как на рис. 2.

номное картирование не выявило каких-либо жестких правил размещения или относительной ориентации мотивов CGATA в областях обогащения белком BEAF [14]. Некоторые последовательности, демонстрирующие сильное связывание в экспериментах EMSA (electrophoretic mobility shift assay), имеют только 2 мотива CGATA, в то время как другие, имеющие 3 и более мотивов, связывали BEAF гораздо хуже. Это предполагает, что BEAF, так же, как ДНК-связывающий белок Su(Hw) [11], нуждается в партнерах, опосредующих его связывание с различающимися по структуре мотивами генома. Сложная перекрывающаяся структура выявленных нами межбелковых взаимодействий позволяет предположить, что партнерами, способствующими связыванию белка BEAF с районами междисков полигенных хромосом, служат белки Z4 и Chriz.

Основываясь на полученных данных, мы предлагаем модель сборки и функционирования комплекса BEAF/Z4/Chriz (рис. 4). В таком комплексе белки Z4 и Chriz не только стабилизируют связывание BEAF с ДНК, но одновременно могут привлекать на хроматин другие белковые компоненты, такие как комплекс NURF [8] и белок CP190.

Например, были получены данные, что искусственное привлечение белка Chriz в район диска полигенных хромосом, соответствующий интеркалярному гетерохроматину, приводит к локальной деконденсации хроматина и рекрутированию

белков Z4 и CP190 [15]. Кроме того, показано, что хроматиновый комплекс, содержащий белки Chriz, Z4 и BEAF, участвует в H3S10 фосфорилировании интерфазных хромосом, предположительно за счет местного рекрутирования тандемной киназы JIL-1.

Локальное связывание и активность такого комплекса на полигенных хромосомах может приводить к деконденсации областей междисков [4]. Таким образом, стабильный комплекс BEAF/Z4/Chriz способен формировать активный открытый хроматин, соответствующий междискам полигенных хромосом и границам ТАДов.

ИСТОЧНИК ФИНАНСИРОВАНИЯ

Исследование выполнено за счет гранта РФФИ (проект № 19-04-00257). Работа была выполнена с использованием инфраструктуры Центра высокоточного редактирования и генетических технологий для биомедицины ИБГ РАН.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Мельникова Л.С., Георгиев П.Г., Головин А.К. Функции и механизмы действия инсультаторов в геномах высших эукариот // Acta naturae. 2020. Т. 12. № 4. С. 15–33.
2. Eggert H., Gortchakov A., Saumweber H. Identification of the *Drosophila* interband-specific protein Z4 as a DNA-binding zinc-finger protein determining chro-

- mosomal structure // *J. Cell. Sci.* 2004. V. 117. № 8. P. 4253–4264.
3. Gortchakov A.A., Eggert H., Gan M., et al. Chriz, a chromodomain protein specific for the interbands of *Drosophila melanogaster* polytene chromosomes // *Chromosoma*. 2005. V. 114. № 1. P. 54–66.
 4. Gan M., Moebus S., Eggert H., et al. The Chriz-Z4 complex recruits JIL-1 to polytene chromosomes, a requirement for interband-specific phosphorylation of H3S10 // *J. Biosci.* 2011. V. 36. № 3. P. 425–438.
 5. Мельникова Л.С., Костюченко М.В., Георгиев П.Г., и др. Белок Chriz способствует рекрутированию белка Z4 на промоторы STAT-зависимых генов // *ДАН*. 2020. Т. 490. № 1. С. 39–43.
 6. Kugler S.J., Nagel A.C. A novel Pzg-NURF complex regulates Notch target gene activity // *Mol. Biol. Cell.* 2010. V. 21. № 19. P. 3443–3448.
 7. Gilbert M.K., Tan Y.Y., Hart C.M. The *Drosophila* boundary element-associated factors BEAF-32A and BEAF-32B affect chromatin structure // *Genetics*. 2006. V. 173. № 3. P. 1365–1375.
 8. Roy S., Gilbert M.K., Hart C.M. Characterization of BEAF mutations isolated by homologous recombination in *Drosophila* // *Genetics*. 2007. V. 176. № 2. P. 801–813.
 9. Zhao K., Hart C.M., Laemmli U.K. Visualization of chromosomal domains with boundary element-associated factor BEAF-32 // *Cell*. 1995. V. 81. № 6. P. 879–889.
 10. Lam K.C., Muhlpfordt F., Vaquerizas J.M., et al. The NSL complex regulates housekeeping genes in *Drosophila* // *PLoS Genet.* 2012. V. 8. № 6. P.e1002736.
 11. Melnikova L., Kostyuchenko M., Molodina V., et al. Multiple interactions are involved in a highly specific association of the Mod(mdg4)-67.2 isoform with the Su(Hw) sites in *Drosophila* // *Open Biol.* 2017. V. 7. № 10. P. 170150.
 12. Emberly E., Blattes R., Schuettengruber B., et al. BEAF regulates cell-cycle genes through the controlled deposition of H3K9 methylation marks into its conserved dual-core binding sites // *PLoS Biol.* 2008. V. 6. № 12. P. 2896–2910.
 13. Avva S.V., Hart C.M. Characterization of the *Drosophila* BEAF-32A and BEAF-32B Insulator Proteins // *PLoS One*. 2016. V. 11. № 9. P.e0162906.
 14. Jiang N., Emberly E., Cuvier O., et al. Genome-wide mapping of boundary element-associated factor (BEAF) binding sites in *Drosophila melanogaster* links BEAF to transcription // *Mol. Cell. Biol.* 2009. V. 29. № 13. P. 3556–3568.
 15. Pokholkova G.V., Demakov S.A., Andreenkov O.V., et al. Tethering of CHROMATOR and dCTCF proteins results in decompaction of condensed bands in the *Drosophila melanogaster* polytene chromosomes but does not affect their transcription and replication timing // *PLoS One*. 2018. V. 13. № 4. P.e0192634.

THE BEAF-32 PROTEIN DIRECTLY INTERACTS WITH Z4/putzig AND Chriz/Chromator PROTEINS IN *Drosophila melanogaster*

L. S. Melnikova^{a, #}, V. V. Molodina^a, M. V. Kostyuchenko^a,
Academician of the RAS P. G. Georgiev^a, and A. K. Golovnin^a

^a Institute of Gene Biology, Russian Academy of Sciences, Moscow, Russian Federation

[#]e-mail: lsm73@mail.ru

In *Drosophila*, the BEAF-32, Z4/putzig, and Chriz/Chromator proteins colocalize in the interbands of polytene chromosomes. It was assumed that these proteins can form a complex that affects the structure of chromatin. However, the mechanism of the formation of such a complex has not been studied. We have proved for the first time that the BEAF-32, Z4/putzig, and Chriz/Chromator proteins interact directly with each other and localized protein domains that provide multiple protein-protein interactions. Based on the data obtained, we developed a model of the mechanism of the formation the BEAF/ Z4/Chriz complex and its recruitment to chromatin.

Keywords: BEAF-32, Chriz/Chromator, Z4/putzig, protein-protein interaction, yeast two-hybrid system

УДК 543.645.9

ЛАЗЕРНАЯ МИКРОТОМОГРАФИЯ ЗРЕЛОГО ООЦИТА ЧЕЛОВЕКА В ПРОТОКОЛЕ ЭКСТРАКОРПОРАЛЬНОГО ОПЛОДОТВОРЕНИЯ

© 2021 г. А. Г. Погорелов^{1,*}, Н. П. Макарова², Е. А. Калинина², А. И. Панаит¹,
В. Н. Погорелова¹, академик РАН Г. Т. Сухих²

Поступило 29.01.2021 г.

После доработки 15.02.2021 г.

Принято к публикации 15.02.2021 г.

В технологии экстракорпорального оплодотворения качество ооцита является определяющим фактором, который оказывает непосредственное влияние на оплодотворение и развитие доимплантационного эмбриона. Перед оплодотворением *in vitro* клинический эмбриолог проводит прижизненную оценку ооцитов человека с использованием морфологических критериев. В настоящее время, чтобы оценить женскую половую клетку, применяют единственный неразрушающий клетку метод — визуализацию посредством обычного светового микроскопа. Цель данной работы заключалась в том, чтобы адаптировать неинвазивный метод лазерной томографии (QLSM — Quantitative Laser Scanning Microtomography) для изучения морфологических особенностей женской половой клетки *in vitro*. Посредством данного метода послойно изучали внутреннее строение ооцита человека. Последующая компьютерная 3-D реконструкция позволила определить клеточный объем ооцита. Величина объема и особенности внутриклеточного строения использовали в качестве новых критериев для оценки состояния яйцеклетки после стресса, обусловленного процедурой криоконсервирования.

Ключевые слова: женская половая клетка, количественная лазерная микротомография (QLSM), экстракорпоральное оплодотворение (ЭКО), криоконсервирование

DOI: 10.31857/S2686738921030112

Зрелые ооциты представляют собой неоднородную популяцию, из которой только половина способна завершить мейоз, поэтому эффективность оплодотворения зависит от качества яйцеклетки [1, 2]. В связи с этим в технологии ЭКО актуальной задачей является диагностическое описание строения женской половой клетки [3–7]. В настоящее время набор инструментов, которые не повреждают яйцеклетку, ограничен только визуальным наблюдением [5, 8, 9]. Для характеристики полноценного созревания ооцита используют морфологические признаки: размер клетки, состояние внеклеточного пространства, внешний вид полярного тельца, перивителлинового пространства, а также наличие разного рода цитоплазматических включений. Дополнительные данные о строении живой яйцеклетки человека

можно получить или уточнить их с помощью QLSM — метода экспериментальной биофизики, разработанного для бесконтактного тестирования микрообъекта [10].

QLSM основан на послойной томографии, что позволяет получить стопку последовательных оптических срезов по глубине объекта микронных размеров. Изначально данный метод корреляционной микроскопии был предложен для изучения препарата, процедура подготовки которого вызывает гибель клетки [11]. Однако нет причин, которые ограничивают возможность изучения нативного ооцита посредством QLSM. Цель работы состояла в том, чтобы адаптировать данный метод для диагностики женской половой клетки, инкубируемой в физиологической среде. В результате должно реализоваться основное достоинство послойной томографии — неинвазивная визуализация внутреннего строения живой яйцеклетки, а также количественная оценка важных пространственных характеристик, например, клеточного объема.

Использование женских половых клеток в биомедицинских целях разрешено этическим комитетом ФГБУ НМИЦ АГП им. В.И. Кулакова МЗ РФ. Для научных исследований брали замо-

¹ ФГБУН Институт теоретической и экспериментальной биофизики Российской академии наук, Пущино, Россия

² ФГБУ Национальный медицинский исследовательский центр акушерства, гинекологии и перинатологии им. В.И. Кулакова, Москва, Россия

*e-mail: agpogorelov@rambler.ru

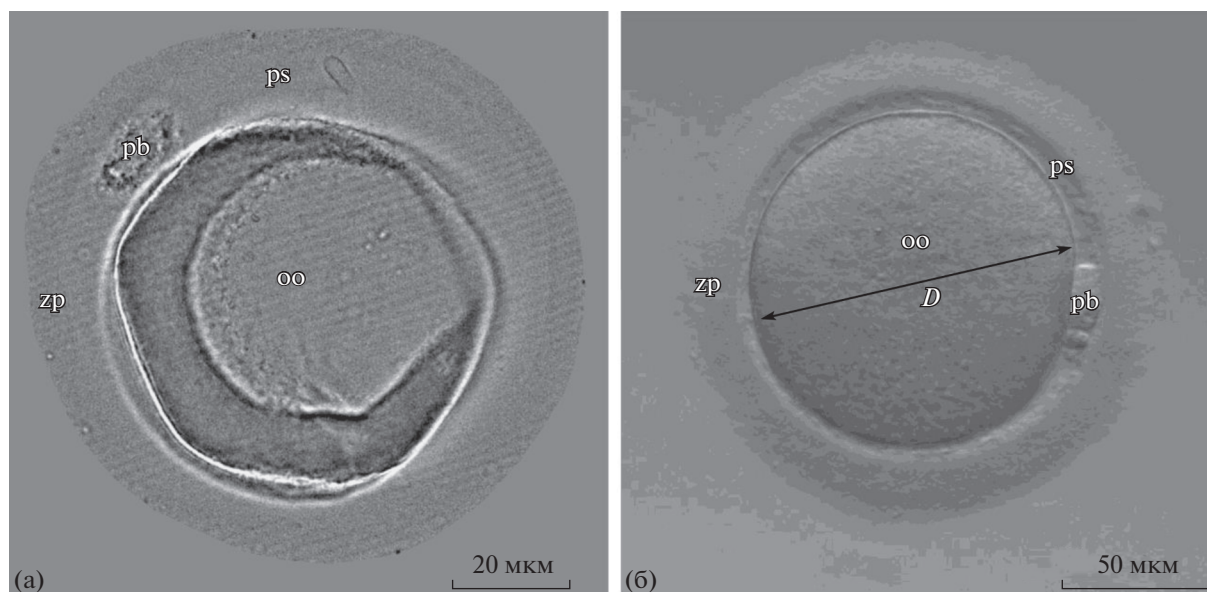


Рис. 1. Характерное изображение женской половой клетки на заключительных этапах протокола криоконсервирования: (а) вид яйцеклетки непосредственно после размораживания, (б) отмывка от криопротектора (DMSO) яйцеклетка, готовая к оплодотворению. Обозначения: zp — зона пеллюцида (оболочка), oo — ооплазма, pb — полярное тельце, ps — пространство между клеткой и оболочкой ооцита; D — эффективный диаметр яйцеклетки в проекции поля зрения микроскопа.

рожденные ооциты донора, что обусловлено доступностью такого клинического материала, разрешенного этическим комитетом. Материал получали из криобанка указанного учреждения. После размораживания и отмывки отдельную яйцеклетку изучали с помощью конфокального микроскопа Leica TCS SPE в режиме бесконтактной лазерной микротомографии (красный лазер — 635 нм, в проходящем свете). Принципы и технические особенности метода QLSM детально описаны ранее [10, 12, 13]. Отметим существенную деталь, интервал воздействия лазера на ооцит при получении стопки срезов (50 штук) составляет не более 60 с. Чтобы предотвратить высыхание анализируемого образца, яйцеклетки в капле физиологического раствора помещали в микрокамеру микроскопа, где поддерживали атмосферу насыщенного пара воды. На рис. 1 приведены микрофотографии женской половой клетки, полученной после размораживания и последующей отмывки от криопротектора (DMSO).

Размороженная яйцеклетка представляет собой деформированный диск неправильной формы (рис. 1а). Такой вид ооцит принимает в результате замещения клеточной воды криопротектором (DMSO) на этапе подготовки к замораживанию в жидком азоте. После отмывки, следующей за размораживанием, возвращается округлая форма (рис. 1б). К сожалению, в поле зрения светового микроскопа наблюдается результат наложения изображений внутренних структур клетки по всей ее толщине, что ограни-

чивает возможность изучения тонкой внутренней морфологии ооцита. Еще один недостаток заключается в том, что микрообъект визуализируется в одной проекции, что не позволяет оценить пространственные особенности изучаемой яйцеклетки. Например, на основе диаметра (104 мкм) ооцита, видимого в поле зрения микроскопа (рис. 1б), рассчитывается клеточный объем, значение которого равно ~590 пЛ. Данная величина будет соответствовать истинному объему клетки, только если ооцит не распластался при инкубации, оставаясь по форме близким к шару. Бесконтактная лазерная микротомография преодолевает отмеченные ограничения, дополняя ряд диагностических признаков деталями внутреннего строения на разных уровнях ооцита, его формой и объемом (рис. 2).

Из рисунка видно, что посредством QLSM реализована послойная визуализация внутренней структуры живой женской половой клетки. Иллюстрируя данный режим, приведены микрофотографии оптического среза у «макушки» (рис. 2а) и в экваториальной плоскости (рис. 2б) ооцита. На обоих изображениях наблюдается скопление везикул в кортикальной области яйцеклетки. Указанный морфологический признак может отражать реакцию клетки на процесс замещения криопротектора водой, поступающей из внеклеточного пространства [14]. Наблюдаемый дисморфизм, возможно, обусловлен увеличением размера ооцита по мере отмывки DMSO, что вызывает скопление липидных везикул, являю-

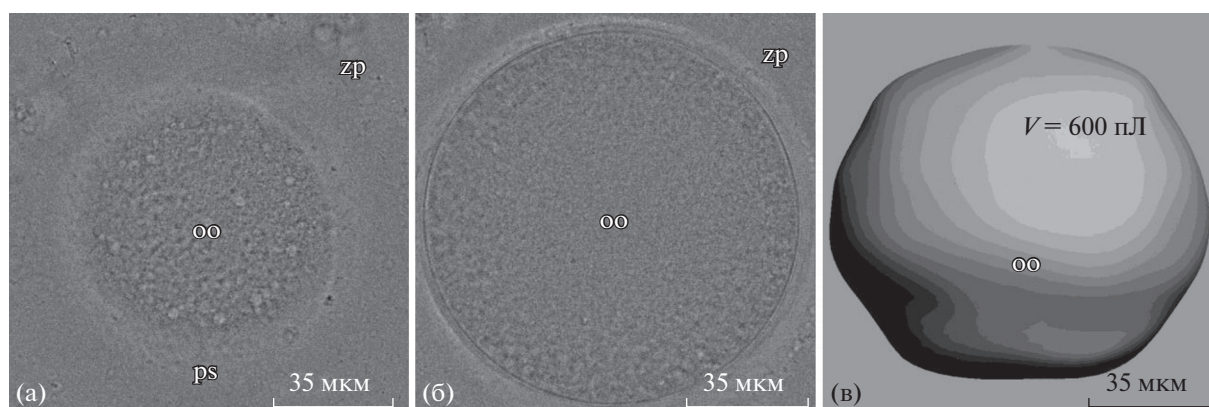


Рис. 2. Результаты неинвазивной лазерной микротомографии (QLSM) живой женской половой клетки, инкубируемой в физиологическом растворе: (а) внутреннее строение яйцеклетки в плоскости оптического среза № 5 – вид сверху, (б) внутреннее строение яйцеклетки в плоскости оптического среза № 20 – вид сверху, (в) компьютерная 3-D модель живой яйцеклетки человека – вид сбоку, где V – значение объема (пЛ, пиколитры) исследуемого ооцита. Обозначения: zp – зона пеллюцида (оболочка), oo – ооплазма, ps – пространство между ооцитом и оболочкой.

щихся строительным материалом для цитоплазматической мембраны [15]. Таким образом, изображение на оптических срезах содержит основные структурные элементы, характерные для зрелого ооцита, что позволяет оценить наличие дисморфизма.

На рис. 2в представлено изображение ооцита после его 3-D реконструкции. Видно, что после размораживания-отмывки яйцеклетка восстановила свою обычную округлую форму, а объем (600 пЛ) компьютерной модели значимо не отличается от величины, рассчитанной на основе сферической экстраполяции и значения эффективного диаметра ооцита (рис. 1б).

В завершение можно сделать следующие выводы. В технологии ЭКО бесконтактная лазерная микротомография является эффективным подходом для диагностического описания морфологии женской половой клетки. Посредством данного метода реализовано основное достоинство послойной томографии – неинвазивная визуализация внутреннего строения нативного ооцита человека. Показано скопление мелких везикул в кортикальной области отмывого ооцита. Данный дисморфизм может быть обусловлен незавершенностью процесса установления равновесного состояния после отмывки криопротектора. Последующая компьютерная 3-D реконструкция позволила дополнить характеристику ооцита значением клеточного объема, что отражает важный функциональный признак – осмотический статус яйцеклетки.

ИСТОЧНИКИ ФИНАНСИРОВАНИЯ

В части развития методов изучения структуры микробъектов исследование выполнено при поддержке РНФ (проект № 20-16-00019).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Balaban B., Urman B. // *Reprod. Biomed. Online*. 2006. V. 12. P. 608–615.
2. Rienzi L., Ubaldi F.M., Iacobelli M., et al. // *Fertil. Steril.* 2008. V. 90. P. 1692–1700.
3. Ebner T., Moser M., Sommergruber M., et al. // *Hum. Reprod. Update*. 2003. V. 9. P. 251–262.
4. Lasiene K., Lasys V., Glinskyte S., et al. // *J. Reprod. Stem Cell Biotechnol.* 2011. V. 2. P. 1–13.
5. Orazov M.R., Radzinsky V.Y., Ivanov I.I., et al. // *Gynecol. Endocrinol.* 2019. V. 35. P. 24–26.
6. Yi X.F., Xi H.L., Zhang S.L., et al. // *Sci. Rep.* 2019. V. 9. ID 7215.
7. Yu E.J., Ahn H., Lee J.M., et al. // *Clin. Exp. Reprod. Med.* 2015. V. 42. P. 156–162.
8. Ceviren A.K., Ozcelik N.T., et al. // *IVF Lite*. 2014. V. 1. P. 88–93.
9. Otsuki J. // *J. Mamm. Ova. Res.* 2009. V. 26. P. 26–31.
10. Pogorelov A.G., Pogorelova V.N. // *J. Microsc.* 2008. V. 232. P. 36–43.
11. Gulin A., Nadtochenko V., Astafiev A., et al. // *Analyst.* 2016. V. 141. P. 4121–4129.
12. Pogorelova M.A., Golichenkov V.A., Pogorelov A.G. // *Optics and Spectroscopy*. 2014. V. 116. P. 488–493.
13. Pogorelova M.A., Panaut A.I., Pogorelov A.G. // *Bio-physics*. 2016. V. 61. P. 445–452.
14. Richani D., Gilchrist R.B. // *Hum. Reprod. Update*. 2018. V. 24. P. 1–14.
15. De Silva N.S., Siug C-H. // *J. Biol. Chem.* 1981. V. 256. P. 5845–5850.

LASER MICROTOMOGRAPHY FOR IVF OOCYTE OF HUMAN

A. G. Pogorelov^{a, #}, N. P. Makarova^b, E. A. Kalinina^b, A. I. Panait^a,
V. N. Pogorelova^a, and Academician of the RAS G. T. Sukhih^b

^a Institute of Theoretical and Experimental Biophysics, Russian Academy of Sciences, Pushchino, Moscow, Russian Federation

^b Research Center for Obstetrics, Gynecology and Perinatology named after V.I. Kulakov, Moscow, Russian Federation

[#]e-mail: agpogorelov@rambler.ru

For *in vitro* fertilization technology, the quality of oocytes has a direct impact on the egg fertilization and developmental competence of early embryo. The morphological criteria are used for the estimation of oocyte quality before its fertilization *in vitro*. To date, only one method is known to determine the maturity of oocyte. This is the routine observation with light microscope. The aim of this article was to adapt the non-invasive quantitative laser scanning microtomography (QLSM) for the investigation of morphological features of a human oocyte *in vitro*. This approach was used to accumulate the Z-stack gallery of optical sections of IVF oocyte. The layer-by-layer acquisition allows the fine cytoplasmic structure imaging. Applying the QLSM Z-stack of optical sections, the cellular volume was calculated with quantitative 3D reconstruction of a human oocyte. The volume value and intracellular structure were used as novel criteria to assess the oocyte state after the stress evoked by cryopreservation procedure.

Keywords: human mature oocyte, quantitative laser microtomography (QLSM), *in vitro* fertilization technology (IVF), cryopreservation

УДК 57.084.1+578.74

СИНТЕЗ БЕЛКА ОБОЛОЧКИ ПАПИЛЛОМАВИРУСА L1 АНОГЕНИТАЛЬНОГО ТИПА ВПЧ6 В РАСТИТЕЛЬНОЙ ЭКСПРЕССИОННОЙ СИСТЕМЕ НА ОСНОВЕ ПЛОДОВ ТОМАТА

© 2021 г. Н. И. Рекославская^{1,2,*}, член-корреспондент РАН Р. К. Салаяев¹, А. С. Столбиков¹

Поступило 05.12.2020 г.

После доработки 29.01.2021 г.

Принято к публикации 03.02.2021 г.

Белок оболочки папилломавируса аногенитального типа ВПЧ6 L1 синтезировали в растительной экспрессионной системе на основе плодов томата. Содержание ВПЧ6 L1 достигало 380 мкг на мг общего растворимого белка, который был представлен единичной полосой в 56 кДа при ДСН-электрофорезе. Перорально введенный в мышей препарат из плодов томата, трансгенного по ВПЧ6 L1, вызывал высокоэффективный синтез антител с высоким титром. При анализе сыворотки крови иммунизированных мышей было обнаружено перекрестное взаимодействие антител к белку ВПЧ6 L1 с антигенными белками ВПЧ16 L1, ВПЧ18 L1, ВПЧ31 L1 и ВПЧ45 L1, что создает возможность перспективы создания вакцины более широкого спектра действия против опасных аногенитальных папилломатозов и цервикального рака.

Ключевые слова: аногенитальные папилломатозы, ВПЧ6 L1, пероральная иммунизация мышей, перекрестное взаимодействие антител к белку ВПЧ6 L1 с антигенными белками ВПЧ L1 типов 16, 18, 31 и 45

DOI: 10.31857/S2686738921030124

Распространение аногенитальных папилломатозов в природе достаточно велико [1]. Ежегодный прирост количества заболеваний, характеризующихся разрастаниями у теплокровных по типу остроконечных кондилом *Condyloma acuminata*, вызываемых аногенитальными типами ВПЧ6 и ВПЧ11, достигает 1 млн случаев в тех странах, где осуществляется контроль за этим заболеванием [2], при этом в число заболеваний включаются не только аногенитальные кондиломы и бородавки, но также карциномы легких, миндалин и рак гортани [3]. Кроме того, известно [4], что аногенитальные типы папилломатозов ВПЧ6 и ВПЧ11 ответственны за появление и развитие неканцерогенных (условно) рецидивирующих респираторных папилломатозов верхних дыхательных путей.

Вследствие возвратного характера этого заболевания пациенты вынуждены подвергаться многократному хирургическому вмешательству (от 40 до 150 раз) в течение своей жизни [5–7]. Полага-

ют, что возвратный характер папилломатозов обусловлен латентным состоянием вируса без клинических признаков заболевания, не распознаваемого иммунной системой хозяина вследствие низкой копийности и малого содержания антигенов, но способным проявляться при иммуносупрессии, под действием внешних факторов (УФ радиация, раздражение и стрессы) [8]. Латентность ВПЧ поддерживается увеличением содержания транскриптов “раннего” гена ВПЧ E1, ответственного за выживание и сохранность эписомальных геномов папилломатозов в условиях ограниченной репликации [9].

Широкое распространение папилломатозов требует и достаточно крупных финансовых затрат. В США затраты на лечение аногенитальных папилломатозов составляют 220 млн долларов ежегодно [10], на лечение рецидивирующих респираторных папилломатозов тратится свыше 100 млн долларов [5, 6]. В странах Западной Европы, в частности, в Англии ежегодно затрачивается 16.8 млн фунтов стерлингов для лечения этих заболеваний [11].

Несмотря на то что ВПЧ6 L1 и ВПЧ11 L1 входят в состав таких вакцин, как квадривалентный Гардасил и 9-валентный нона-Гардасил, желательна разработка специальных вакцин против аногенитальных папилломатозов.

¹ ФГБНУ Сибирский институт физиологии и биохимии растений Сибирского отделения РАН, Иркутск, Россия

² ФГБНУ Иркутский научный центр Сибирского отделения РАН, Иркутск, Россия

*e-mail: rekoslavskaya@sifibr.irk.ru

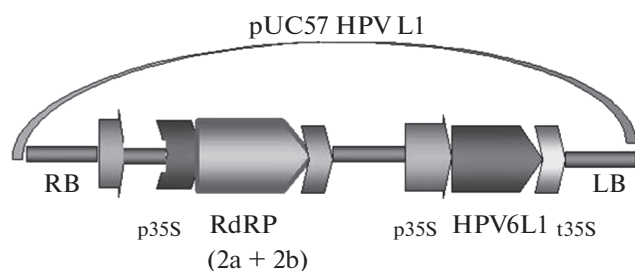


Рис. 1. Схема генетической конструкции для синтеза ВПЧ6 L1.

Гардасил послужил неплохим профилактическим препаратом, но только для предотвращения цервикального рака. Другие типы папилломатозов: рак головы и шеи [12], аногенитальные папилломатозы, рецидивирующие респираторные папилломатозы [13–15] оказались вне сферы действия этих вакцин и за последние 10 лет заболеваемость увеличилась примерно в 10 раз согласно статистике Международного агентства по изучению рака IARC, GLOBOCAN, WHO [16, 17]. Так как при этом все же у пациентов обнаруживались специфические антитела к типам ВПЧ6 и 11 (наряду с 16 и 18 типами), предположили, что одной из причин роста заболеваний является нарушение иммуногенеза Т лимфоцитов [2, 4, 18].

В задачу настоящей работы входило использование растительной экспрессионной системы на основе плодов трансгенного по гену *hrv6* L1 томата для синтеза антигенного белка ВПЧ6 L1 с целью рассмотрения перспективы создания вакцины достаточно широкого действия против аногенитальных и других опасных папилломатозов.

На рис. 1 приведена схема генетической конструкции для синтеза антигенного белка ВПЧ6 L1 в растительной экспрессионной системе, разработанной нами ранее [19].

Центральным регуляторным элементом данной конструкции является ген *RdRP*, кодирующий РНК зависимую РНК полимеразу вируса мозаики огурца CMV, состоящий из двух фрагментов: РНК 2a (собственно полимеразу) и матрицу суперсупрессора РНК интерференции, кодирующую белок антисайленсер CMV 2b [20]. Наличие собственного суперсупрессора РНК интерференции белка CMV 2b, кодируемого в цис-ориентации, позволяет накапливать РНК реплисомы в количестве до 200 на клетку. При этом значительно усиливается экспрессионная эффективность разработанной нами конструкции, а реплисомы способны ассамблироваться в димеры, тримеры, пентамеры и, наконец, в разнообразные полимеры (полигоны, сотовые структуры, структуры в виде пучков димеров и др.), в которых нет доступных сайтов для действия РНКаз [21].

Генетическую трансформацию плодов томата проводили по ранее опубликованному методу [19]. Для этого на полевой делянке СИФИБР СО РАН в поликарбонатной теплице выращивали растения томата розовоплодного гибрида F1 (основа томата сорта Абаканский розовый) до достижения размера зеленых плодов 200–400 г с содержанием сырого протеина до 6%.

Генетические конструкции, клонируемые в *Agrobacterium tumefaciens* EHA 105, хранились при -62°C в криоконсервации (среда LB с 30% глицерином). После посева на агаровую среду LB с 50 мг/л ампицилина клетки росли в течение 2 сут, а затем бактериальный газон суспендировали стерильным раствором 1% ацетосирингона (Sigma, USA) в 5% глюкозе. Эту бактериальную суспензию использовали для трансформации зеленых плодов.

Для наработки вакцинного материала с целью последующей вакцинации мышей в доклинических испытаниях использовали около 50 кг зеленых плодов. Плоды трансформировали в ламинар-боксе в стерильных условиях. Для этого одноразовым шприцем вводили по 10–20 мкл бактериальной суспензии в локулюсы (камеры) в нижней части плода, отверстия заклеивали кусочком медицинского лейкопластыря, а затем плоды раскладывали на полки бытового холодильника и содержали в темноте при $6\text{--}8^{\circ}\text{C}$. Трансформация осуществлялась в течение 18 сут (и более, см. рис. 2). При трансформации создавали стандартные условия, что и отразилось на примерно одинаковом выходе синтезированного антигенного белка (25–33% ОРБ). За период 18 сут плоды томата краснели, но были еще достаточно плотными, поэтому для их гомогенизации использовали электрический измельчитель (фирма Redmond). Гомогенизированный вакцинный материал распределяли в пищевые пластиковые контейнеры, замораживали и до момента анализа хранили при температуре -24°C в бытовом морозильнике. Перед анализом гомогенаты размораживали при комнатной температуре, затем осветляли центрифугированием (14000 g в течение 15 мин при 4°C). Супернатант использовали для электрофореза, Вестерн-блот-гибридизации и ИФА. Антигенные белки L1 типов ВПЧ16, 18, 31 и 45 получали аналогичным образом.

Для ДСН электрофореза с последующей Вестерн-блот-гибридизацией на пластинки SDS PhastGel (ПААГ градиент 8–15%) наносили по 0.5 мкл образцов гомогенатов трансформированных плодов. В качестве контролей на пластинки наносили воду (2 мкл), гомогенаты нетрансформированных плодов (2 мкл), а также растворы HPV16 L1 (SantaCruz, USA) 1.5 мкг и 2.5 мкг в 6 мкл (максимально допустимый объем нанесения) и подвергали электрофорезу в приборе

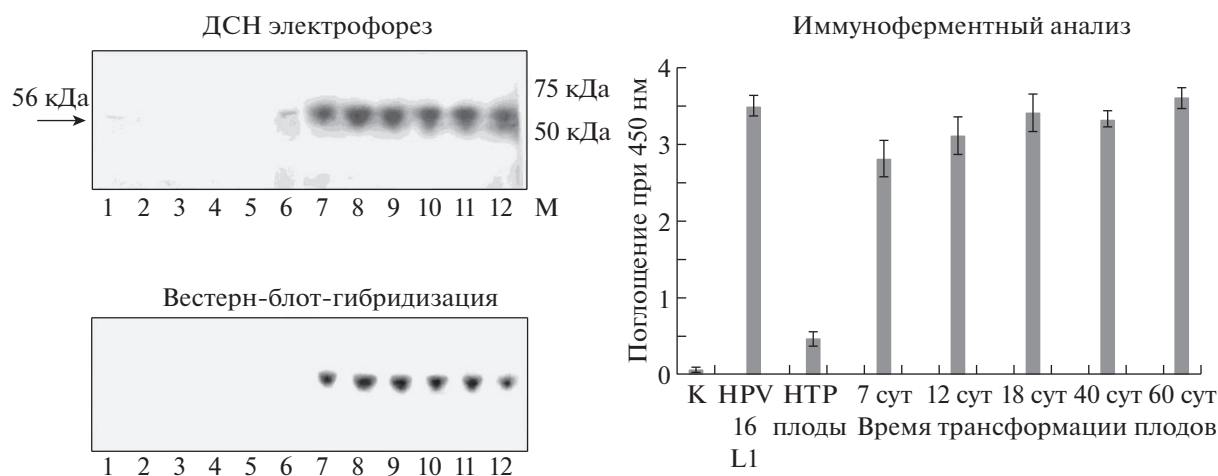


Рис. 2. ДСН электрофорез (слева сверху) и Вестерн-блот-гибридизация (слева внизу) антигенного белка ВПЧ6 L1, полученного в растительной экспрессионной системе на основе плодов томата через 18 сут после трансформации и ИФА динамики накопления белка ВПЧ6 L1 в течение 7, 12, 18, 40 и 60 сут после трансформации (в правой части рисунка). Для проявления в Вестерн-блот-гибридизации использовали в качестве первичных антител сыворотку крови мышей, предварительно вакцинированных ВПЧ6 L1. Использованы вторичные антитела, конъюгированные с щелочной фосфатазой, субстрат 5-бром-4-хлор-3-индолилфосфат (BCIP) и активатор окисления нитротетразолий синий (NBT). В левой части рисунка обозначения: № 1 и № 6 – 1.5 и 2.5 мкг HPV16 L1 (SantaCruz, США), № 2 и № 5 – 5 мкл воды, № 3 и № 4 – 5 мкл гомогенатов контрольных плодов, № 7–12 представляют образцы по 0.5 мкл индивидуально трансформированных геном *hpv6* L1 плодов. М – показано положение цветных полос стандартных белков 50 кДа (пурпурная окраска) и 75 кДа (желтая окраска) набора Full Range Rainbow Recombinant protein molecular weight markers (Amersham). 56 кДа – молекулярная масса стандартного белка HPV16 L1 (SantaCruz).

Обозначения на графике в правой части рисунка: К – “пустой” отрицательный контроль, HPV16 L1 – положительный контроль, стандарт 200 нг HPV16 L1 (SantaCruz, США), НТР плоды – нетрансформированные плоды. Использованы в качестве первичных антител сыворотка крови мышей, вакцинированных ВПЧ6 L1, вторичные антитела – конъюгаты мышиных IgG с пероксидазой хрена (Abcam, UK), субстрат – ортофенилендиамин (SigmaFAST™ OPD). В барах представлены средние квадратичные ошибки (N = 30).

PhastSystem (Amersham, UK), используя программное обеспечение прибора для разделения белков (программа № 3).

Для получения антител к ВПЧ6 L1 мышей (беспородные самки в возрасте 6 мес, полученные из вивария Восточно-Сибирского института медико-экологических исследований, г. Ангарск, работы с животными одобрены на заседании биоэтического совета СИФИБР СО РАН протокол № 9 от 30.10.2019) перорально вакцинировали вакцинным материалом плодов томата из расчета 500 мг антигенного белка ВПЧ6 L1 на мышью трижды с интервалами: 1, 2 и 3 мес (итого 6 мес вакцинации). Всего в эксперименте мышей содержали 10 мес от момента первой вакцинации на полном рационе, затем у них брали кровь и определяли наличие антител в сыворотке крови по ранее опубликованному методу [22]. При содержании мышей соблюдали стандартные условия, прописанные в ГОСТ 33215-2014, 33216-2014.

Для оценки антител, получаемых в сыворотке крови вакцинированных мышей, была проведена значительная подготовительная работа. (Антитела к HPV6 L1 зарубежными фирмами в Россию не поставляются.)

Эффективность и титр полученных антител в сыворотке крови мышей определяли косвенным путем, анализируя сыворотку крови мышей, вакцинированных ВПЧ16 L1, ВПЧ6 L1 и сравнивая титр (эффективность) с титром коммерческих антител на HPV16 L1 фирмы SantaCruz (США). Для их сравнительной оценки использовали следующие антитела: мышиное моноклональное антитело на HPV16 L1 (CAMVIR-1), sc-47699; мышинное моноклональное антитело на HPV16 L1 (MD2H11), sc-65713; козы поликлональные антитела на HPV16 L1 (vc-13), sc-18052. Оказалось, что во всех случаях антитела из сыворотки крови мышей, нами вакцинированных ВПЧ16 L1, либо ВПЧ6 L1, были примерно на 3 порядка более эффективны, чем любые коммерческие антитела фирмы SantaCruz. Причиной, по-видимому, является более высокая авидность (от англ. avidity – жадность, цепкость связывания) антител, получаемых нами в сыворотке крови вакцинированных мышей. Поэтому мы сочли возможным использовать антитела сыворотки крови вакцинированных мышей в анализах. Аналогичный подход к получению сывороток крови мышей, содержащих антитела на определенный тип ВПЧ, хорошо известен в литературе и широко используется в аналитической работе [23].

Таблица 1. Содержание антигенного белка ВПЧ6 L1 в супернатантах гомогенатов сырых плодов томата, трансгенного по гену *hprv6 L1*

Номер плода	Содержание ВПЧ6 L1, мкг/мг ОРБ*
1	230.2 ± 16.1
2	248.3 ± 7.5
3	333.7 ± 10.0
4	317.7 ± 9.5
5	372.5 ± 11.2
6	324.2 ± 9.7
7	361.9 ± 10.9
8	382.0 ± 11.5
9	256.30 ± 7.7
10	275.7 ± 9.3
11	335.8 ± 10.1
12	333.1 ± 10.0
13	299.0 ± 9.0
14	286.2 ± 8.6
15	261.9 ± 7.9
16	306.7 ± 9.2
Контроль	0.0 ± 0.0

* Количество ВПЧ6 L1 определяли в пересчете на эквивалент стандартного белка HPV16 L1 (SantaCruz, США).

На рис. 2 представлены результаты электрофоретического разделения (слева вверху) экстрактов плодов томата, трансгенного по ВПЧ6 L1, Вестерн-блот-гибридизация с сывороткой крови мышей, вакцинированных ВПЧ6 L1 (слева внизу). Динамика накопления белка ВПЧ6 L1 в плодах томата в течение 7, 12, 18, 40, 60 сут после трансформации представлена в правой части рис. 2.

Как можно видеть из рис. 2 (слева), на ДСН электрофореграмме экстрактов плодов томата (по 5 мкл), трансформированных геном *hprv6 L1*, присутствуют только пятна (пятна под № 7–12), совпадающие по Rf с подвижностью стандартного белка оболочки папилломавируса L1 в 56 кДа (HPV type 16 L1 antigen protein, full length, recombinant from *S.cerevisiae*) (SantaCruz, США), который нанесен на пластинку SDS PhastGel в количестве 1.5 мкг (пятно № 1) и 2.5 мкг (максимально возможное количество в 6 мкл, пятно № 6). Других пятен, соответствующих по подвижности маркерному белку HPV16 L1 фирмы SantaCruz, на пластинке нет. В качестве контролей представлены нанесение 5 мкл воды (№№ 2 и 5) и экстракт нетрансформированных плодов по 5 мкл (№№ 3 и 4), в которых также не обнаружено каких-либо пятен. При нативном электрофорезе обнаруживали только одну полосу соответствующей подвижности (Rf 56 кДа), других высокомолекулярных соединений, реагирующих с антителами, не

было обнаружено. Для соотнесения с маркерными стандартными белками на рис. 2 (слева, буква М) указаны Rf двух белков (50 и 75 кДа) из линейки цветных белковых стандартов фирмы Amersham, предназначенных для визуализации хроматографирования на пластинках SDS Phast-Gel ("Full Range Rainbow Recombinant protein molecular weight markers" (RPN 800). Проявление зон гибридизации в Вестерн блоттинге осуществляли с помощью антител, полученных в сыворотке крови мышей, вакцинированных ВПЧ6 L1 по методу, опубликованному ранее [22].

При изучении динамики синтеза ВПЧ6 L1 (рис. 2, справа) методом ИФА обнаружено, что уже через 7 сут в плодах накапливается значительное количество ВПЧ6 L1, которое возрастает к 18 сут трансформации и при дальнейшей инкубации поддерживается на том же примерно уровне. В качестве контроля были взяты экстракты нетрансформированных плодов томата, в которых не было обнаружено присутствия антигенного белка ВПЧ6 L1. Положительным контролем послужил маркерный стандартный белок HPV16 L1 (SantaCruz, США) в количестве 25 мкг в лунку планшета. Во всех случаях в качестве первичных антител использовали сыворотку крови мышей,

В табл. 1 приведен анализ выборки из 16 плодов (массой около 200 г), трансформированных геном *hprv6 L1* в течение 18 сут. Методом ИФА [22] показано, что в плодах накапливалось значительное количество антигенного белка ВПЧ6 L1, достигающее значений 25–30% общего растворимого белка (ОРБ). В контроле (нетрансформированные плоды) антигенный белок, реагирующий с антителами на ВПЧ6 L1, не был найден.

В последнее время значительное внимание уделяется перекрестным взаимодействиям антигенных белков оболочки папилломавирусов различных типов, так как это создает перспективу возможности получения профилактической вакцины более широкого спектра действия, включая высококанцерогенные и аногенитальные типы и, вероятно, меньшей стоимости при ее изготовлении за счет уменьшения числа ее компонентов.

В настоящей работе методом Вестерн-блот-гибридизации белков ВПЧ6 L1, ВПЧ16 L1, ВПЧ18 L1, ВПЧ31 L1 и ВПЧ45 L1 с антителами сыворотки крови мышей, вакцинированных ВПЧ6 L1, изучали перекрестное взаимодействие между этими типами (рис. 3). Для этого на нитроцеллюлозную мембрану Hybond™-С EXTRA (оптимизированную для гибридизации белков) (Amersham Biosciences, UK) наносили однократно по 5 мкл осветленных гомогенатов соответствующих трансформированных плодов, высушивали на воздухе в течение дня, блокировку осуществляли 3% раствором БСА в течение суток

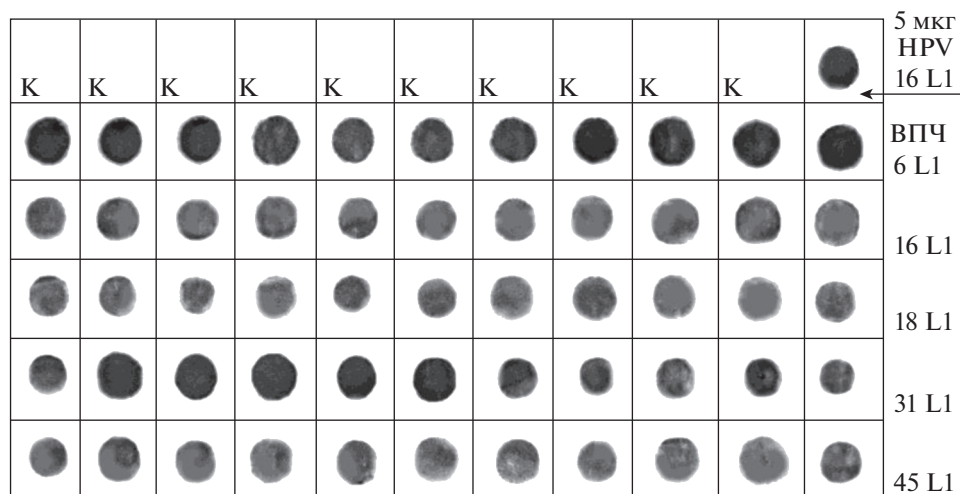


Рис. 3. Вестерн-блот-гибридизация и перекрестное взаимодействие антигенных белков ВПЧ6 L1, ВПЧ16 L1, ВПЧ18 L1, ВПЧ31 L1 и ВПЧ45 L1 с антителами из сыворотки крови мышей, вакцинированных ВПЧ6 L1. Используются вторичные антитела, конъюгированные с щелочной фосфатазой, субстрат 5-бром-4-хлор-3-индолилфосфат (BCIP) и активатор окисления нитротетразолий синий (NBT). К — в качестве отрицательного контроля гомогенаты нетрансформированных плодов. HPV16 L1 — положительный контроль, в пятно нанесено 5 мкг раствора стандартного белка HPV16 L1 (SantaCruz, США). Осветленные гомогенаты антигенных белков ВПЧ6 L1, ВПЧ16 L1, ВПЧ18 L1, ВПЧ31 L1 и ВПЧ45 L1 нанесены в объеме 5 мкл в пятно однократно.

при 6–8°C, на следующий день проводили гибридизацию с антителами сыворотки крови мышей, вакцинированных ВПЧ6 L1 по методу, опубликованному [22].

На рис. 3 можно видеть, что все типы белков L1 (6, 16, 18, 31 и 45) были способны достаточно хорошо гибридизироваться с антителами сыворотки крови мышей, вакцинированных ВПЧ6 L1. В контроле (нетрансформированные плоды) пятен гибридизации не обнаружено.

Таким образом, оказалось, что разрабатываемая нами кандидатная вакцина против аногенитальных типов папилломавирусов может оказаться перспективной для разработки вакцины с использованием в качестве профилактической с целью индукции синтеза антител широкого спектра, узнающих антигены L1 папилломавирусов также и высокоонкогенных типов.

Молекулярный механизм перекрестного праймирования “наивных” антигенпредставляющих клеток: дендритных клеток, Т и В лимфоцитов, макрофагов, моноцитов, нейтрофилов и др. — уже весьма детально изучен и представлен в ряде обзоров [24–26]. Согласно этим данным для осуществления мониторинга за состоянием “здоровья” клеток иммунная система привлекает антигенпредставляющие клетки для сбора антигенов из микроокружения других клеток и представляет их CD8+ Т лимфоцитам в форме пептидов, ассоциированных с МНС1 молекулами (главного комплекса гистосовместимости, класс I) [24, 25]. Конформационные различия структуры эпитопов антигенных белков L1 различных типов па-

пилломавирусов составляют примерно 7–15 ангстрем [23] и поэтому, вероятно, может быть допустимым перекрестное праймирование при наличии больших доз антигенных белков в вакцине.

Рассматривая полученные результаты, мы видим, что на рис. 2 (слева) на электрофореграмме присутствует только одно пятно, соответствующее молекулярной массе 56 кДа. Высокое соответствие продукта трансляции задаваемой матрицей при синтезе белка является характерным свойством растительных экспрессионных систем. Более того, вирусные контролирующие элементы: репликазы, промоторы, энхансеры, цис-и транс-элементы, обеспечивающие полицистронный характер трансляции в природных условиях, способствуют также прочтыванию длинных матриц в рекомбинантных генетических конструкциях. Микробные (дрожжевые, бактериальные) же экспрессионные системы характеризуются тем, что в них часто происходят преждевременные остановки трансляции вследствие разнообразных блокаторов экспрессии. Это приводит к накоплению неполноразмерных, промежуточных продуктов синтеза, достаточно различающихся по массе. Данное обстоятельство является значительным препятствием для биотехнологических работ по созданию вакцин, так как требуются дополнительные затраты на очистку и концентрацию целевого белкового продукта, что неизбежно приводит к удорожанию вакцин. С другой стороны, бактериальные системы отличаются высокой степенью протеолиза, что может

снижать выход целевого продукта [27–29]. Белок ВПЧ6 L1, полученный в нашей растительной экспрессионной системе, представляет собой вполне однородное белковое соединение, судя по рис. 2.

Целевой продукт в нашей растительной экспрессионной системе по данным ДСН электрофореза составляет на 18 сут инкубации примерно одну треть от общего растворимого белка (ОРБ) и более (табл. 1). Поэтому нет необходимости в очистке конечного продукта и дальнейшей его концентрации для пероральной вакцинации, так как содержание 200–300 мкг на мг ОРБ примерно соответствует концентрации белков L1 в Гардасиле. Поэтому мы полагаем, что для создания профилактической вакцины против аногенитальных папилломатозов и рецидивирующих респираторных папилломатозов, в том числе и высококанцерогенных, перспективно использовать растительные экспрессионные системы.

Эти данные позволяют считать перспективным создание вакцин с меньшим числом антигенных белков, что, с одной стороны, существенно уменьшает трудоемкость и стоимость процесса изготовления вакцины, а с другой стороны, увеличивает эквивалентную дозу нейтрализующих антител при снижении количества ее компонентов. Показано, что увеличение числа компонентов вакцины не приводит к усилению ее эффективности [30], возможно, не только из-за разбавления титра антител при многих компонентах вакцины, а также в результате иммунных нарушений [18].

Таким образом, в настоящей работе рассмотрена предпосылка для реальной перспективы создания пероральной растительной профилактической вакцины более широкого спектра действия, включая аногенитальные и высококанцерогенные типы папилломавирусов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. van Doorslaer K. // *Virology*. 2013. V. 445. P. 11–20.
2. Yu. Y., Guo J., Li D., Liu Y. et al. // *Vaccine*. 2018. V. 36. P. 4927–4934.
3. Shin T.H., Pankhong P., Yan J. et al. // *Human Vaccines and Immunotherapeutics*. 2012. V. 8. P. 470–478.
4. Garbuglia A.R., Lapa D., Sias C. et al. // *Frontiers in Immunol.* 2020. V. 11. Article 188.
5. Bonagura V.R., Hatam L.J., Rosenthal D.W. et al. // *APMIS*. 2010. V. 118. P. 455–470.
6. Hatam L.J., DeVoti J.A., Rosenthal D.W. et al. // *Clin. Cancer Res.* 2012. V. 18. P. 1925–1935.
7. Venkatesan N.N., Pine H.S., Underbrink M.P. // *Otolaryngol. Clin. North Am.* 2012. V. 45. P. 671.
8. Maglennon G.A., McIntosh P., Doorbar J. // *Virology*. 2011. V. 414. P. 153–163.
9. Gravitt P. // *J. Clin. Investigat.* 2011. V. 121. P. 4593–4599.
10. Yakely A.E., Avni-Singer L., Oliveira C.R. et al. // *Sex Transm. Dis.* 2019. V. 46. P. 213–220.
11. Egawa N., Doorbar J. // *Virus Research*. 2017. V. 231. P. 119–127.
12. Roden R.B.C., Stern P.L. // *Nature Reviews Cancer*. 2018. V. 18. P. 240–254.
13. Guiliano A.R., Palefsky J.M., Goldstone S., Moreira E.D. et al. // *The New England J. of Medicine*. 2011. V. 364. P. 401–411.
14. Harper D.M., Vierthaler S.L., Santee J.A. // *J. of Vaccines and Vaccination*. 2010. V. 1. P. 1–7.
15. Gi R.E.A.T.P., Giorgi M.R.M., Pawlita M. et al. // *Eur. Arch. Otorhinolaryngol.* 2016. V. 273. P. 3231–3236.
16. Bray F., Ferlay J., Soerjomataram I. et al. // *CA: Cancer J. Clin.* 2018. V. 68. P. 394–424.
17. Bruni L., Albero G., Serrano B. et al. // *Human papillomavirus and related diseases report. ICO/IARC Information Centre on HPV and Cancer. WORLD*. 2019. 306 p.
18. Bezjat V. // *Human Genetics*. 2020. V. 139. P. 919–939.
19. Salyaev R.K., Rekoslavskaya N.I., Stolbikov A.S. // *Doklady Biochem. Biophys.* 2019. V. 484. P. 52–54.
20. Koundal V., Mohd Q., Haq R., Praveen S. // *Biochem. Genet.* 2011. V. 49. P. 25–38.
21. Haque F., Guo P. // *RNA Nanotechnology and Therapeutics: Methods and Protocols. Chapter 1. Methods in Molecular Biology*. 2015. V. 1297. P. 1–19.
22. Salyaev R.K., Rekoslavskaya N.I., Stolbikov A.S., Tretyakova A.V. // *Doklady Biochem. Biophys.* 2017. V. 474. P. 186–188.
23. Bishop B., Dasgupta J., Klein M. et al. // *The journal of Biol. Chem.* 2007. V. 282. P. 31803–31811.
24. Cruz F.M., Colbert J.D., Merino E. et al. // *Annu. Rev. Immunol.* 2017. V. 35. P. 149–176.
25. Blander M.J. // *Annu. Rev. Immunol.* 2018. V. 36. P. 717–753.
26. Muntjewerff E.M., Meesters L.D., van den Bogaart G. // *Frontiers in Immunol.* 2020. V. 11. Article 1276.
27. Kim S.N., Jeong H.S., Park S.N., Kim H.-J. // *J. of Virol. Methods*. 2007. V. 139. P. 24–30.
28. Wei M., Wang D., Li Z., Song S. et al. // *Emerging Microbes and Infections*. 2018. V. 7. Article 160. P. 1–12.
29. Tomita J., Shirasawa H., Simizu B. // *Journal of Virology*. 1987. V. 61. P. 2389–2394.
30. Kwak K., Jagu R., Jiang S. et al. // *PLOS ONE*. 2013. V. 8. e60507.

THE SYNTHESIS OF MAIN CAPSID PROTEIN OF ANOGENITAL TYPE HPV6 L1 IN PLANT EXPRESSION SYSTEM ON THE BASE OF TOMATO FRUITS

N. I. Rekoslavskaya^{a,b,#}, Corresponding Member of RAS R. K. Salyaev^a, and A. S. Ctolbikov^a

^a *Siberian Institute of Plant Physiology and Biochemistry of the Siberian Branch of Russian Academy of Sciences, Irkutsk, Russian Federation*

^b *The Irkutsk Scientific Centre, Irkutsk, Russian Federation*

[#]*e-mail: rekoslavskaya@sifibr.irk.ru*

The HPV6 L1 major capsid protein of anogenital type was synthesized in the plant expression system on the base of tomato fruits. The content of HPV6 L1 was appreciated as high as 380 mkg per 1 mg of total soluble protein of raw fruit mass that was presented as the single band with molecular mass of 56 kDa on the SDS electropherogram. Orally administrated to mice, the vaccine material from transgenic with HPV6 L1 tomato fruit induced highly effective antibody immune response of the strong titer. The cross-reactivity was found during the interaction of antibody to protein HPV6 L1 from peripheric blood serum of mice vaccinated with HPV6 L1 with antigenic proteins HPV16 L1, HPV18 L1, HPV31 L1 and HPV45 L1. This was suggested a perspective of the creation of vaccine with broad reactivity against dangerous anogenital papillomatoses and cervical cancer.

Keywords: anogenital papillomatoses, HPV6 L1, peroral immunization of mice, cross-reactivity of antibody to protein HPV6 L1 with antigenic proteins HPV16 L1, HPV18 L1, HPV31 L1 and HPV45 L1

УДК 631.4; 579.6

О ПРИРОДЕ ВЛИЯНИЯ НЕКОТОРЫХ МИЦЕЛИАЛЬНЫХ АКТИНОБАКТЕРИЙ НА ПРОРАСТАНИЕ СЕМЯН ЯРОВОЙ ПШЕНИЦЫ В ПОЧВАХ

© 2021 г. Член-корреспондент РАН С. А. Шоба¹, Т. А. Грачева^{1,*},
А. Л. Степанов¹, Г. Н. Федотов¹, И. В. Горепекин¹

Поступило 27.01.2021 г.

После доработки 08.02.2021 г.

Принято к публикации 10.02.2021 г.

Изучено влияние предпосевной обработки семян яровой пшеницы суспензиями различных штаммов актиномицетов. Установлено, что 4 из 18 изученных штаммов оказывали стимулирующее влияние на прорастание семян в почвах и развитие из них растений. Показано, что стимуляция семян этими штаммами не наблюдается при проращивании семян в песке. Было выдвинуто предположение, что механизм ускорения развития семян актиномицетами может быть основан не только на выделении стимулирующих биологически активных веществ, но и на потреблении ими аллелотоксинов. Проведенная проверка по изучению возможности роста актиномицетов на среде, содержащей один из наиболее распространенных аллелотоксинов — кумарин, показала, что способствующие прорастанию семян актиномицеты развивались на этой среде интенсивнее по сравнению со штаммами, которые не оказывали влияния или угнетали прорастание семян яровой пшеницы. Это подтвердило выдвинутое предположение о способности актиномицетов стимулировать прорастание семян за счет потребления почвенных аллелотоксинов.

Ключевые слова: аллелотоксичность, стимуляция семян, предпосевная обработка семян, актиномицеты, кумарин

DOI: 10.31857/S2686738921030136

Накоплен большой материал [1–4] по мониторингу почвенных микроорганизмов, влияющих на урожайность, стимулирование роста и развитие растений, а также на повышение их адаптационных способностей.

Считается, что во многих случаях это связано с образованием значительной частью микроорганизмов многочисленных физиологически активных веществ (ауксинов, гиббереллинов, цитокининов и т.д.), которые поступают в корни растений, стимулируя их рост и повышая качество урожая [5].

В частности, есть данные [6], что с воздушных корней эпифитных оранжерейных орхидей *Dendrobium moschatum* выделены культивируемые бактерии из филума Actinobacteria, которые образовывали ауксины. Некоторые наиболее активные продуценты увеличивали всхожесть семян и стимулировали прорастание и развитие проростков

не только *D. moschatum*, но и других видов растений.

Однако это не единственный возможный механизм стимуляции прорастания семян и развития растений микроорганизмами.

Хорошо известно явление аллелотоксического почвоутомления, которое обусловлено накоплением в почве аллелотоксинов из-за ее высокой сорбционной способности [7–11]. Они выделяются растениями для борьбы с конкурентами, а также в качестве сигнальных веществ для предупреждения о возникшей экологической опасности или для торможения своих биохимических процессов, чтобы возникшие негативные экологические факторы нанесли растениям минимальный урон [7, 9, 10]. Установлено, что действие любых негативных факторов, возникающих в процессе вегетации, приводит к усилению выработки растениями аллелотоксинов, выделению их в окружающую среду и повышению аллелотоксичности почв [9]. Наряду с этим также отмечено, что аллелотоксины способны выполнять функции сигнальных молекул [12]. Токсичные вещества вырабатываются микроорганизмами при борьбе с конкурентами за ресурсы, в качестве по-

¹ Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, Москва, Россия

*e-mail: tanyadunaeva12@mail.ru

бочных продуктов метаболизма или фитопатогенами для ослабления иммунитета растений [7, 9, 11]. Кроме того, аллелотоксины выделяются из самих растительных остатков при их разложении в почвах [7–10].

Эти вещества угнетают развитие растений особенно на начальных этапах роста. Выдвигалось предположение о том, что почвенные микроорганизмы могут использовать аллелотоксины в качестве источников углерода и снижение численности микроорганизмов приводит к замедлению освобождения почвы от аллелотоксинов [13]. В частности, было показано, что стерилизация почвы сильно замедляет ее освобождение от аллелотоксинов [13]. Это свидетельствует о том, что наряду с изменением активности аллелотоксинов из-за их закрепления в почвах, возможно разложение аллелотоксинов микроорганизмами почв. Такой механизм стимуляции развития растений может быть альтернативой ускорению их роста веществами-стимуляторами.

Целью нашей работы являлось изучение природы влияния бактериализации семян пшеницы водной суспензией мицелиальных актинобактерий.

Исследования проводили на семенах яровой пшеницы (*Triticum*) урожая 2018 г. сорта “Лиза”.

Проращивали семена в образцах дерново-подзолистой легкосуглинистой почвы из окрестностей поймы р. Яхромы, Московская область, и в отмытом речном песке с частицами 0.5–0.8 мм.

Предпосевную обработку семян суспензией актиномицетов проводили полусухим способом при расходе 40 л суспензии на тонну семян.

В работе использовали чистые культуры мицелиальных актинобактерий рода *Streptomyces*, которые были выделены из различных местообитаний: из ассоциаций с почвенными беспозвоночными животными (навозного червя *Eisenia fetida* и многоножек — серого кивсяка *Cilindroiulus caeruleocinctus* и крымского кивсяка *Pachyiulus flavipes*); тропических почв заповедных зон Вьетнама; сапропеля и почвы, загрязненной нефтью. Актинобактерии поддерживали на среде Гаузе I (минеральный агар I) (г/л) [14]: K_2HPO_4 — 0.5; $MgSO_4$ — 0.5; KNO_3 — 1; $NaCl$ — 0.5; $FeSO_4$ — следы; крахмал — 20; pH 7.2–7.4.

Для получения моноспоровой суспензии культуры засеивали газоном на чашки Петри, инкубировали при 28°C в течение 10 сут. После этого в стерильных условиях скальпелем собирали материал с поверхности агара в колбу со стерильной дистиллированной водой. Полученную взвесь одиночных спор, споровых конгломератов и обрывков вегетативного мицелия обрабатывали на низкочастотном ультразвуковом диспергаторе УЗДН — 1 (30–60 сек 22 кГц 0.44 А). Затем эту суспензию фильтровали через слой стерильной хирургической ваты в стерильную колбу и отмывали

от среды стерильной дистиллированной водой центрифугированием (5000 об/мин 10 мин 5 раз). Микроскопический контроль за распределением спор в суспензии проводили в камере Горяева. Семена пшеницы обрабатывали суспензией, содержащей 10^7 – 10^8 клеток в 1 мл.

Для повышения воспроизводимости получаемых данных изучали изменение интегральной длины проростков 7.5 г семян (~200 шт), которую определяли, используя экспресс-метод, основанный на существовании линейной зависимости между насыпным объемом проросших семян в воде и длиной их проростков [15].

Опыт проводили в шестикратной повторности с последующей статистической обработкой результатов. В связи с использованием в одном опыте 1000–1200 семян удавалось минимизировать ошибку, связанную с разнокачественностью семян до 7%.

На начальном этапе работы было проведено изучение влияния обработки семян пшеницы суспензией актиномицетов на скорость прорастания и развития растений в почвах. Установлено (табл. 1), что из 18 проверенных, 4 штамма (а 3, ер/28, ер/21, L/28) заметно увеличивали скорость прорастания семян пшеницы и развития из них растений.

Для выяснения возможности влияния на развитие семян микробных веществ-стимуляторов был проведен посев обработанных семян в песок. При выделении актиномицетами биологически-активных веществ на песке должна была наблюдаться стимуляция прорастания семян и развития их проростков, сопоставимая с той, что наблюдалась для почв. Однако ускорения прорастания семян не наблюдалось. Это свидетельствует о том, что механизм положительного влияния исследованных штаммов актиномицетов (штаммы а 3, ер/28, ер/21, L/28) основан не на выделении биологически-активных веществ, стимулирующих прорастание семян, а на использовании аллелотоксинов в качестве источников углерода.

Для дополнительной проверки способности изученных видов актиномицетов ускорять развитие семян пшеницы за счет снижения концентрации в почве аллелотоксинов были проведены эксперименты по изучению способности роста актиномицетов на среде с кумарином — одним из наиболее распространенных аллелотоксинов [6].

Исследуемые штаммы актиномицетов проверяли на способность к росту на среде с кумарином, добавленного в среду, в качестве основного источника питания.

Было установлено, что актиномицеты, стимулирующие развитие семян пшеницы в почвах, хорошо растут на кумарине, в отличие от штаммов, не оказывающих на развитие семян значимого влияния. В качестве примера на фотографиях

Таблица 1. Влияние суспензии актиномицетов на прорастание семян пшеницы

Номер опыта	Номер штамма ¹	Воздействие на развитие семян, %	Место выделения штамма	Примечания
1	5/15	0	Сапропель	—
2	a 1	+7	Тропические почвы	—
3	a 2	+7	Тропические почвы	—
4	51	—9	Почва, загрязненная нефтью	—
5	53	—5	Почва, загрязненная нефтью 160 г/кг	—
6	KCl 12	0	Кишечная жидкость	<i>Cilindroiulus caeruleocinctus</i>
7	a 3	+9	Тропические почвы	—
8	a 4	—1	Тропические почвы	—
9	KCl 15	—5	Кишечная жидкость	<i>Pachyiulus flavipes</i>
10	KCl 17	+1	Кишечная жидкость	<i>Eisenia fetida</i>
11	2/15	+8	Сапропель	—
12	ep/21	+18	Подвешенная почва эпифитов из корзинок	Заповедник Пу Хоат, Вьетнам, лес в долине реки
13	ep/10	—3	Подвешенная почва эпифитов из корзинок	—
14	S 20/14	+7	Аллювиальная почва, 20 см	—
15	L/28	+23	Опад	—
16	ep/28	+17	Подвешенная почва эпифитов из корзинок	—
17	S 20/21	+4	Аллювиальная почва, 20 см	—
18	ep/27	+6	Подвешенная почва эпифитов из корзинок	—

¹ Номера штаммов приведены по внутренней классификации кафедры биологии почв факультета почвоведения МГУ им. М.В. Ломоносова.

(рис. 1) приведены результаты активного роста штамма актиномицета L/28 (рис. 1б), стимулирующего прорастание семян пшеницы, и отсутствие роста на среде с кумарином у штамма 51 (рис. 1а).

Таким образом, проведенные эксперименты позволяют сделать вывод, что штаммы актиномицетов, которые стимулируют развитие семян в почвах и хорошо развиваются на аллелотоксинах (кумарине), по-видимому, способны снижать

**Рис. 1.** Рост штаммов актиномицетов рода *Streptomyces* 51 (а) и L/28 (б) на среде с кумарином.

влияние этих соединений на начальную стадию развития растений.

ИСТОЧНИКИ ФИНАНСИРОВАНИЯ

Работа выполнена в рамках государственного задания МГУ, часть 2 (тема № 117031410017-4) по Программе Развития МГУ при поддержке Междисциплинарной научно-образовательной школы Московского государственного университета имени М.В. Ломоносова “Будущее планеты и глобальные изменения окружающей среды”.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Звягинцев Д.Г., Добровольская Т.Г., Чернов И.Ю. Принципы мониторинга микробного разнообразия экосистем. Мониторинг биоразнообразия. М.: Наука. 1997. С. 203–207.
2. Axenov-Gribanov D.V., Kostka D.V., Protasov E.S., Emshanova V.A., Vereshchagina K.P., Krasnova M.E., Gorbenco I.V., Lubyaga Y.A., Voycehovskaya I.V., Timofeyev M.A. Culturable actinobacteria associated with baikal algae: diversity and antimicrobial activity // Journal of stress Physiology & Biochemistry. 2018. V. 14 (2) P. 19–25.
3. Широких И.Г., Широких А.А. Биосинтетический потенциал актиномицетов бурой лесной почвы Восточного побережья Эгейского моря // Почвоведение. 2017. № 11. С. 1355–1361.
4. Блинков Е.А., Цавкелова Е.А., Селицкая О.В. Образование ауксина штаммом *Klebsiella planticola* ТСХА-91 и его влияние на развитие семян огурца посевного (*Cucumis sativus* L.) // Микробиология. 2014. 83 (5). С. 543–551.
5. Bottini R., Cassán F., Piccoli P. Gibberellin production by bacteria and its involvement in plant growth promotion and yield increase // Applied microbiology and biotechnology. 2004. V. 65. № 5. P. 497–503.
6. Teixeira da Silva J.A., Tsavkelova E.A., Zeng S., Ng T.B., Parthibhan S., Dobránszki J., Cardoso J.C., Rao M.V. Symbiotic in vitro seed propagation of Dendrobium: fungal and bacterial partners and their influence on plant growth and development // Planta. 2015. V. 242 (1). P. 1–22.
7. Гродзинский А.М., Богдан Г.П., Головкин Э.А., Дзюбенко Н.Н., Мороз П.А., Прутенская Н.И. Аллелопатическое почвоутомление. Киев: Наук. Думка. 1979. 248 с.
8. Лобков В.Т. Использование почвенно-биологического фактора в земледелии: монография // Лобков В.Т. — Орел: Изд-во ФГБОУ ВО Орловский ГАУ. 2017. 166 с.
9. Allelopathy. A Physiological Process with Ecological Implications // Ed. M.J. Reigosa, N. Pedrol, L. Gonzalez. Springer. 2006. 637 p.
10. Rice E.L. Allelopathy. New York—London: Academic Press. 1984. 422 p.
11. McCalla T.M., Haskins F.A. Phytotoxic Substances from Soil Microorganisms and Crop Residues // Bacteriological Reviews. 1964. V. 28. № 2. P. 181–207.
12. Tomilov A., Tomilova N., Shin D.H., Jamison D., Torres M., Reagan R., McGray H., Horning T., Truong R., Nava Aj., Nava A., Yoder J.I. Chemical signalling between plants // Chemical Ecology: From Gene to Ecosystem. The Netherlands: 2006. Springer. P. 55–69.
13. Jilani G., Mahmood S., Chaudhry A. N., Hassan I., Akram M. Allelochemicals: sources, toxicity and microbial transformation in soil — a review // Annals of Microbiology. 2008. V. 58 (3). P. 351–357.
14. Гаузе Г.Ф., Преображенская Т.П., Свешникова М.А., Терехова Л.П., Максимова Т.С. Определитель актиномицетов. 1983. М.: Наука. 245 с.
15. Федотов Г.Н., Шоба С.А., Федотова М.Ф., Горепекин И.В. Влияние аллелотоксичности почв на прорастание семян зерновых культур // Почвоведение. 2019. № 4. С. 489–496.

ON THE NATURE OF THE INFLUENCE OF SOME MYCELIAL ACTINOBACTERIA ON THE SPRING WHEAT SEEDS GERMINATION IN SOILS

Corresponding Member of the RAS S. A. Shoba^a, T. A. Gracheva^{a, #}, A. L. Stepanov^a,
G. N. Fedotov^a, and I. V. Gorepekin^a

^a Lomonosov Moscow State University, Moscow, Russian Federation

[#]e-mail: tanyadunaeva12@mail.ru

The effect of pre-sowing treatment of spring wheat seeds with suspensions of various actinomycete strains has been studied. It was found that 4 of the 18 studied strains had a stimulating effect on the seed germination in soils and the development of plants from them. It is shown that seed stimulation by these strains is not observed during seed germination in sand. It was suggested that the mechanism of accelerating seed development by actinomycetes may be based not only on the release of stimulating biologically active substances, but also on the consumption of allelotoxins by them. A test conducted to study the possibility of actinomycete growth on a medium containing one of the most common allelotoxins, coumarin, showed that actinomycetes promoting seed germination developed on this medium more intensively compared to strains that did not affect or inhibit the germination of spring wheat seeds. This confirmed the hypothesis put forward about the ability of actinomycetes to stimulate seed germination through the consumption of soil allelotoxins.

Keywords: allelotoxins, seed stimulation, pre-sowing treatment of seeds, actinomycetes, coumarin

УДК 57.083.3

МОНОКЛОНАЛЬНЫЕ АНТИТЕЛА К БЕЛКУ PRAME ЗАМЕДЛЯЮТ РАЗВИТИЕ PRAME-ЭКСПРЕССИРУЮЩЕЙ ОПУХОЛИ

© 2021 г. О. Н. Солопова^{1,*}, Ю. П. Финашуткина^{1,2}, Н. Н. Касаткина¹,
Н. А. Лыжко^{1,2}, А. А. Турба², Л. А. Кесаева^{1,2}, В. А. Мисюрин^{1,2}, А. В. Мисюрин², М. В. Ларина³,
Т. К. Алиев^{3,4}, академик РАН М. П. Кирпичников^{3,4}

Поступило 30.11.2020 г.
После доработки 28.02.2021 г.
Принято к публикации 28.02.2021 г.

Два моноклональных антитела, распознающие неперекрывающиеся участки белка PRAME, вводили иммунокомпетентным мышам для оценки их влияния на рост подкожных опухолевых узлов. В качестве трансплантатов использовали линию мышинной меланомы B16F10, экспрессирующую человеческий белок PRAME либо содержащую вектор без гена *PRAME*. В результате каждое из антител показало способность подавлять опухолевый рост PRAME-экспрессирующей опухоли, но не опухоли без PRAME.

Ключевые слова: раково-тестикулярный антиген, PRAME, моноклональные антитела

DOI: 10.31857/S2686738921030148

ВВЕДЕНИЕ

Белок PRAME может быть мишенью для терапевтических моноклональных антител, так как экспрессируется примерно у половины больных солидными опухолями и онкогематологическими заболеваниями [1]. Кроме того, белок способен вызывать Т-клеточный иммунный ответ у пациентов [2]. Высокий уровень экспрессии PRAME в злокачественных новообразованиях позитивно коррелирует с уровнем метастазирования, негативно с общей и безрецидивной выживаемостью, и в целом связан с плохим прогнозом для пациента. [3], [4]. Следовательно, разработка иммунотерапевтических препаратов против этого антигена может быть весьма перспективной.

В настоящее время ведется или уже проведен ряд клинических исследований по таргетированию белка PRAME, в основном это либо вакцины на основе рекомбинантного белка или адаптивная терапия Т-лимфоцитами [5].

Целью данной работы было исследовать противоопухолевый эффект введения двух вариантов моноклональных антител против PRAME на модели PRAME-экспрессирующей опухоли.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В эксперименте использовали мышей линии C57BL/6, самок весом 18–20 г, возраста 7–8 нед, по 5 голов в каждой группе. Все эксперименты на животных проводили в соответствии с требованиями Комиссии по контролю за содержанием и использованием животных ФИБХ РАН (Протокол заседания № 117 от 18.02.2020 г.). Животным подкожно вводили клетки мышинной меланомы линии B16F10, трансфицированные плазмидой с геном *PRAME* и экспрессирующие соответствующий белок, либо плазмидой без гена *PRAME*, в дозе 5×10^4 клеток на мышь (день 0). При этом за 3 дня до введения опухолевых клеток, а также на 4, 7, 14, 21-й день после введения клеток меланомы, животным внутрибрюшинно вводили в физиологическом растворе по 300 мкг мышинных моноклональных антител против PRAME, клоны 6H8 и 5D3 [6], либо раствор без антител (рис. 1).

В качестве контрольного вектора использовали плазмиду pCER4 (#V04450, Invitrogen). Плазмиду pCER4-PRAME получали, клонируя кодирующую последовательность человеческого гена PRAME (NM_001291715.2) по сайту рестрикции NotI в плазмиду pCER4 для высокого уровня экспрессии гена под CMV промотором. Обе плазми-

¹ ФГБУ «РОНЦ им. Н.Н. Блохина» Минздрава России, Москва, Россия

² ООО «ГеноТехнология», Москва, Россия

³ Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова Российской академии наук, Москва, Россия

⁴ ФГБОУ ВО «МГУ имени М.В. Ломоносова», Москва, Россия

*e-mail: solopova@msn.com

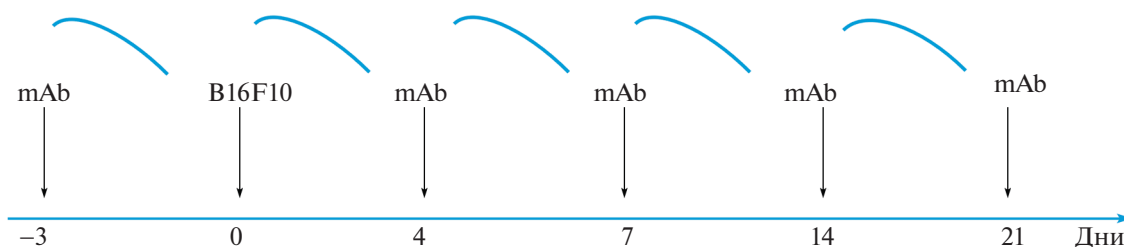


Рис. 1. Схема введения антител (дни от введения опухолевых клеток). mAb — введение антител; B16F10 — введение трансфицированных клеток мышиной меланомы.

ды содержали ген устойчивости к гигромицину для селекции трансфицированных клеток.

Противоопухолевый эффект оценивали по измерениям размеров опухоли во всех группах. Размеры опухолей измерялись на 14, 18 и 21-й день после введения клеток. Пальпируемые узлы измеряли и рассчитывали объем по формуле [7]. В сыворотках крови определяли титр анти-PRAME антител методом непрямого ИФА в день введения клеток опухоли и на 21-й день. Для статистического анализа использовали критерий Манна-Уитни.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Дизайн эксперимента был разработан таким образом, чтобы транзистентная экспрессия *PRAME* оставалась в достаточно большом проценте опухолевых клеток на весь период проведения опыта. По этой причине имплантацию опухоли проводили на фоне достаточно высокого содержания антител против *PRAME* в крови, которое контролировали при помощи ИФА. Средние значения титров антител в опытных группах показаны на

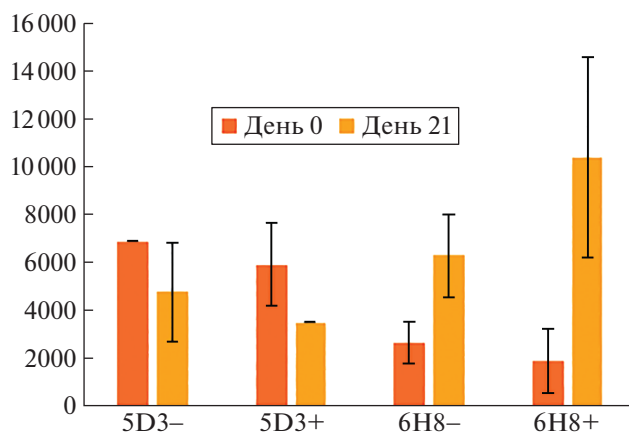


Рис. 2. Средние значения титров антител в группах мышей, получавших терапию антителами. 5D3- и 6H8-группы мышей, привитых опухолью без экспрессии *PRAME*; 5D3+ и 6H8+ группы мышей, привитых опухолью с экспрессией *PRAME*.

рис. 2. Различия в фармакокинетике двух антител могут быть обусловлены их субизотипами, IgG2a для антитела 5D3 и IgG1 для антитела 6H8. Известно, что мышиный субизотип IgG2a характеризуется слабым связыванием с неонатальным Fc рецептором, ответственным за рециркуляцию антител в организме [8].

Экспрессия человеческого белка *PRAME* в трансфицированных клетках B16F10 перед прививанием мышам была подтверждена методами иммуноблота и проточной цитометрии (данные не приведены).

Измерение размеров опухолей показало, что на 21-й день объемы опухоли, экспрессирующей человеческий белок *PRAME*, у мышей статистически значительно снижены при введении обоих вариантов мышиных антител к *PRAME* (5D3 и 6H8), $p = 0.0199$ по сравнению с контрольной группой без антител (рис. 3), тогда как в группах с меланомой без экспрессии человеческого *PRAME* введение антител не привело к подавлению роста опухоли (рис. 4).

Следует отметить, что скорость пролиферации линии B16F10, экспрессирующей *PRAME*, существенно выше скорости пролиферации той же линии, трансфицированной “пустым” вектором, не содержащим гена *PRAME*. Это различие наблюдается как в культивировании *in vitro* (данные не приведены), так и при трансплантации животным, что хорошо видно на рис. 3 и 4.

Тем не менее оба антитела оказались способными сдерживать более агрессивную *PRAME*-содержащую меланому B16F10. Ранее было показано [9], что антитела 6H8 и 5D3 направлены к разным неперекрывающимся участкам белка *PRAME*, но тем не менее каждое по отдельности способно подавлять рост опухолевых узлов. Это наблюдение придает большую привлекательность использования *PRAME* в качестве мишени при терапии онкологических заболеваний, поскольку уход опухоли от действия препаратов при помощи мутаций в данном случае будет затруднен.

При сравнении противоопухолевой активности двух антител необходимо учитывать разный

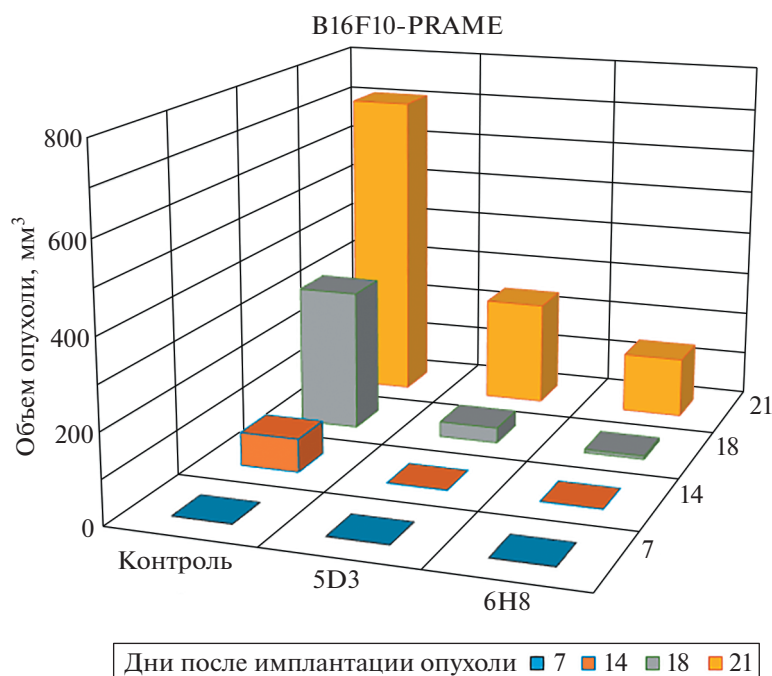


Рис. 3. Размер опухолевых узлов меланомы B16F10-PRAME. Контроль — без антител; 5D3, 6H8 — моноклональные антитела против PRAME.

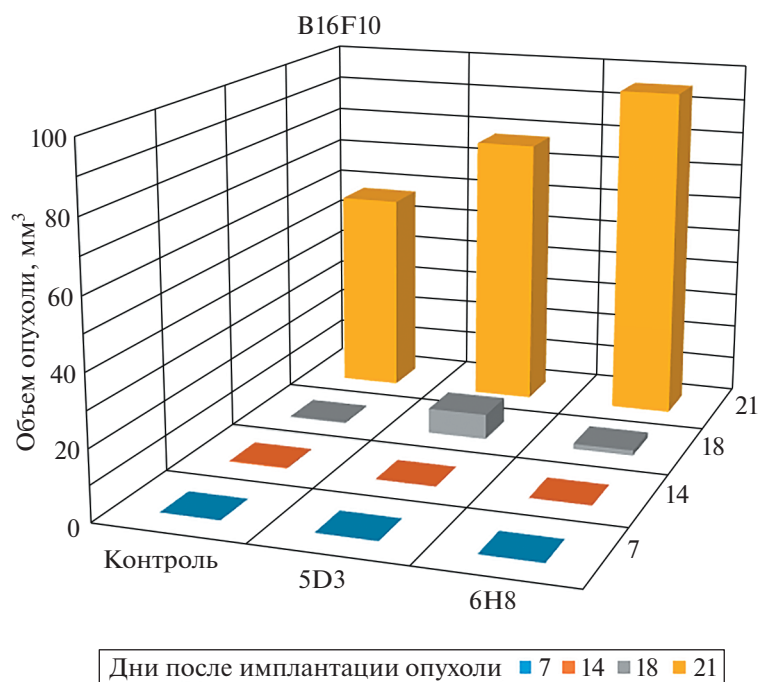


Рис. 4. Размер опухолевых узлов меланомы B16F10 без экспрессии PRAME. Контроль — без антител; 5D3, 6H8 — моноклональные антитела против PRAME.

характер их взаимодействия с FcRn в силу различий субизотипов. На мышинной модели мы видим, что антитело 6H8 более выражено подавляет опухолевый рост по сравнению с антителом

5D3, однако это происходит на фоне большего содержания антитела 6H8 в кровотоке животных во время эксперимента. При использовании гуманизированных аналогов этих антител с одина-

ковыми субизотипами эти различия могут быть нивелированы. Таким образом, оба антитела являются перспективными с точки зрения разработки терапевтического препарата для лечения злокачественных опухолей, экспрессирующих белок PRAME.

ИСТОЧНИК ФИНАНСИРОВАНИЯ

Работа выполнена при финансовой поддержке Министерства науки и высшего образования Российской Федерации (Соглашение № 075-15-2019-1249 от 10.06.2019). Уникальный идентификатор проекта RFMEFI60418X0204.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Yichi Xu, Ruanmin Zou, Jing Wang et al.* The role of the cancer testis antigen PRAME in tumorigenesis and immunotherapy in human cancer. *Cell Prolif.* 2020 Mar; V. 53. № 3. e12770.
2. *Мисюрин В.А.* // Клиническая онкогематология. Фундаментальные исследования и клиническая практика. 2018. № 11 (1). С. 26–33.
3. *Li J., Yin J., Zhong J. et al.* Clinicopathological and Prognostic Significance of PRAME Overexpression in Human Cancer: A Meta-Analysis. // *Biomed Res Int.* 2020 Dec 10. P. 2020:8828579.
4. *Albertsmeier M., Altendorf-Hofmann A., Lindner L.H. et al.* Cancer Testis Antigens and Immunotherapy: Expression of PRAME Is Associated with Prognosis in Soft Tissue Sarcoma // *Cancers (Basel).* 2020 Dec 3. V. 12. № 12. P. 3612.
5. *Al-Khadairi G. and Decock J.* Cancer Testis Antigens and Immunotherapy: Where Do We Stand in the Targeting of PRAME? // *Cancers (Basel).* 2019 Jul. V. 11. № 7. P. 984.
6. *Финашутина Ю.П., Мисюрин А.В., Ахлынина Т.В. и др.* Получение рекомбинантного раково-тестикулярного белка PRAME и моноклональных антител к нему. // *Российский биотерапевтический журнал.* 2015. Т. 14. № 3. С. 29–36.
7. *Трещалина Е.М., Жукова О.С., Герасимова Г.К. и др.* Методические рекомендации по доклиническому изучению противоопухолевой активности лекарственных средств. В кн.: Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных средств. Часть I. Под ред. А.Н. Миронова, Н.Д. Бунятян, А.Н. Васильева и др. М.: Гриф и Ко, 2012. С. 640–54.
8. *Andersen J.T., Daba M.B., Berntzen G., et al.* Cross-species binding analyses of mouse and human neonatal Fc receptor show dramatic differences in immunoglobulin G and albumin binding. // *J Biol Chem.* 2010. V. 285. P. 4826–4836.
9. *Мисюрин В.А., Финашутина Ю.П., Турба А.А. и др.* Эпитопный анализ мышиных и химерных моноклональных антител, распознающих раково-тестикулярный антиген PRAME. // *Доклады Российской академии наук. Науки о жизни.* 2020. Т. 492. № 1. С. 293–296.

MONOCLONAL ANTIBODIES TO PRAME PROTEIN SLOW THE DEVELOPMENT OF PRAME-EXPRESSING TUMOUR

O. N. Solopova^{a, #}, Yu. P. Finashutina^{a, b}, N. N. Kasatkina^a, N. A. Lyzhko^{a, b}, A. A. Turba^a, L. A. Kesaeva^{a, b}, V. A. Misyurin^{a, b}, A. V. Misyurin^b, M. V. Larina^c, T. K. Aliev^{c, d}, and Academician of the RAS M. P. Kirpichnikov^{c, d}

^a *N.N. Blokhin National Medical Research Center of Oncology, Moscow, Russian Federation*

^b *LLC "GeneTechnology", Moscow, Russian Federation*

^c *Shemyakin and Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry, Moscow, Russian Federation*

^d *Lomonosov Moscow State University, Moscow, Russian Federation*

[#] *e-mail: solopova@msn.com*

Two monoclonal antibodies recognizing non-overlapping epitopes of the PRAME protein were injected into immunocompetent mice to study their influence on the growth of subcutaneous tumour nodes. The B16F10 murine melanoma line, either expressing human PRAME protein or bearing only a vector without PRAME gene, have been used as transplants. Each of the antibodies demonstrated the ability to suppress tumour growth of a PRAME-expressing tumour, but not a tumour without PRAME.

Keywords: cancer testis antigen, PRAME, monoclonal antibodies abstract